

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
des Universitätsklinikums Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl**

**Die Evaluation der Endothelfunktion bei
ApoE/NOS Doppelknockout Mäusen**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von
Isabelle Schumann
aus Schweinfurt**

Würzburg, September 2006

Referent: Prof. Dr. med. C. Wanner

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Gekle

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

27.07.2007

Die Promovendin ist Ärztin

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ApoE	Apolipoprotein E
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
BH ₄	Tetrahydropterin
c	Konzentration
cNOS	konstitutionelle NO-Synthase
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
Diclo	Diclofenac
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
g	Gramm
IL	Isoleucin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ko	Knockout
LDL	Low density lipoprotein
L-NAME	L-Nitroargininmethylester
LRP	LDL-Rezeptor related protein
M	Molare Masse (g/mol)
mg	Milligramm
min	Minute
mM	millimolar (mol/l)
n	Anzahl
NE	Norepinephrin
Ni	Nitroindazol
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NSAID	Nichtsteroidale Antiphlogistika
O ₂	Sauerstoff
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGI ₂	Prostazyklin
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
sec	Sekunde
SNP	Natrium-Nitroprussid
t _{1/2}	Halbwertszeit
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TNF	Tumornekrosefaktor
Tab.	Tabelle
VLDL	Very low density lipoprotein
wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Einführung und Fragestellung</i>	1
1.2 <i>Physiologie der Blutgefäße</i>	2
1.2.1 <i>Aufbau der Blutgefäße</i>	2
1.2.2 <i>Funktion des Gefäßendothels</i>	3
1.2.3 <i>Mediatoren der Vasodilatation</i>	5
1.2.4 <i>Mediatoren der Vasokonstriktion</i>	7
1.3 <i>Endotheliale Dysfunktion</i>	8
1.3.1 <i>Definition der Atherosklerose</i>	8
1.3.2 <i>Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose</i>	9
1.3.3 <i>Bedeutung von NOS-Isoformen und ApoE für die Endothelfunktion</i>	11
1.3.4 <i>Tiermodelle für Atherosklerose</i>	14
1.4 <i>Die Knockout Mäuse: Stand der Forschung</i>	15
1.4.1 <i>ApoE-knockout Mäuse</i>	15
1.4.2 <i>eNOS-knockout Mäuse</i>	16
1.4.3 <i>iNOS-knockout Mäuse</i>	18
1.4.4 <i>ApoE/iNOS-knockout Mäuse</i>	18
2. Material	20
2.1 <i>Geräte</i>	20
2.2 <i>Lösungen und Substanzen</i>	20
2.2.1 <i>Krebs-Henseleit-Puffer</i>	20
2.2.2 <i>Anästhetika</i>	22
2.2.3 <i>Vasoaktive Substanzen</i>	22
2.3 <i>Versuchstiere</i>	24
2.4 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	25
3. Methoden	26
3.1 <i>Versuchsaufbau</i>	26
3.2 <i>Versuchsablauf</i>	27
3.2.1 <i>Anästhesie der Mäuse</i>	27
3.2.3 <i>Präparation der Gefäße</i>	27
3.2.4 <i>Fixation der Gefäßsegmente im Organbad</i>	27
3.2.5 <i>Versuchsdurchführung im Organbad</i>	28
3.3 <i>Statistik</i>	30
4. Ergebnisse	32
4.1 <i>Relaxation</i>	32
4.1.1 <i>Endothelabhängige Relaxation auf Acetylcholin</i>	32

Inhalt

4.1.2 Endothel-unabhängige Relaxationen auf Natrium-Nitroprussid	35
4.2 Kontraktionen	36
5. Diskussion	39
6. Zusammenfassung	43
7. Anhang.....	45
7.1 Tabellenverzeichnis.....	45
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	45
7.3 Literaturverzeichnis	47

1. Einleitung

1.1 Einführung und Fragestellung

Atherosklerotische Erkrankungen des Gefäßsystems tragen in großem Umfang zu Mortalität und Morbidität in den westlichen Industrieländern bei. Verschiedene Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Hypertension, Adipositas, Dyslipidämie und Rauchen erhöhen das vaskuläre und insbesondere das kardiovaskuläre Risiko der Patienten [1-3].

Die pathophysiologischen und –biochemischen Mechanismen sind bisher nur begrenzt bekannt, jedoch gilt als gesichert, dass Störungen der zellulären Homöostase, der Wechselwirkung zwischen dem Endothel und den Blutzellen einen wichtigen Beitrag zur Entstehung atherothrombotischer Erkrankungen leisten.

Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand haben alle aufgeführten Risikofaktoren ein gemeinsames Zielorgan: sie beeinträchtigen die Funktion des Endothels und provozieren eine „endotheliale Dysfunktion“, die als kausaler Faktor die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen initiiert und begünstigt [4;5].

Dabei ist neben der anatomischen Integrität der funktionelle Zustand der Endothelschicht von ebensolcher Bedeutung für die Entwicklung von Gefäßerkrankungen [6].

Werden Endothelzellen geschädigt, kommt es zur Störung ihrer Funktionalität und zur Entwicklung der endothelialen Dysfunktion [7-9].

Nachweisen lässt sich diese Funktionsstörung des Endothels mit der qualitativ oder quantitativ abweichenden Reaktion der Blutgefäße auf vasoaktive Substanzen, wobei sich die Dysfunktion sowohl in einer veränderten Gefäßrelaxation als auch -kontraktion manifestiert.

Die durch verschiedene Reize getriggerte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) zur Relaxation der Gefäße spielt dabei eine wichtige Rolle und stellt eine charakteristische Eigenschaft von intaktem Endothel dar [10].

Die Untersuchung der endothelabhängigen Vasoreaktivität bietet somit sowohl ein diagnostisches als auch ein prognostisches Werkzeug zur Erfassung des vaskulären Risikos [11].

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Evaluation der Endothelfunktion verschiedener Knockout-Mäuse für NO-Synthase-Isoformen sowie deren Kombination in Form einer ApoE/iNOS-Doppelknockout-Variante als Tiermodell für Atherogenese.

Als Versuchstiere wurden entsprechende Knockout-Mäuse und deren Wildtyp-Geschwistertiere eingesetzt. Die Endothelfunktion wurde mittels Einsatz der Organkammer zur Untersuchung der isometrischen Spannungsänderung unter Zuhilfenahme vasoaktiver Substanzen evaluiert.

Ziel der Arbeit ist es, die Rolle bzw. die Bedeutung der jeweiligen NO-Synthase-Isoformen in der beginnenden Atherosklerose zu definieren. Um insbesondere die Bedeutung der iNOS zu klären, wurde ein Doppelknockout-Mausmodell (ApoE/iNOS) etabliert, an dem das Verhalten der iNOS charakterisiert werden kann.

1.2 Physiologie der Blutgefäße

1.2.1 Aufbau der Blutgefäße

Nach histologischen Kriterien kann die Wand der Blutgefäße in drei Schichten unterteilt werden (siehe Abb.1.2.1): Von der Gefäßinnenseite nach außen gehend handelt es sich hierbei um die Tunica intima (Intima), die Tunica media (Media) und die Tunica externa (Adventitia).

Die **Tunica intima** setzt sich aus der Basalmembran, der Membrana elastica interna und dem einschichtigen Endothel zusammen, welches die Gefäßinnenwand vollständig auskleidet. Die **Tunica media** zeichnet sich durch mehrere Lagen meist ringförmig angeordneter glatter Muskelzellen mit je nach Gefäßtyp variierendem Gehalt an dazwischengelagerten Elastin, Kollagen und Proteoglykanen aus. Die **Tunica adventitia** ist als äußerste Schicht hauptsächlich

für die Verankerung der Blutgefäße im umliegenden Gewebe verantwortlich und besteht überwiegend aus den Bindegewebsfasern Elastin und Kollagen.

Nutritiv versorgt werden die Gefäßwände über Diffusion in Tunica interna und Vasa vasora in den äußeren Schichten. Die Innervation erfolgt über sympathische Nervenfasern [12].

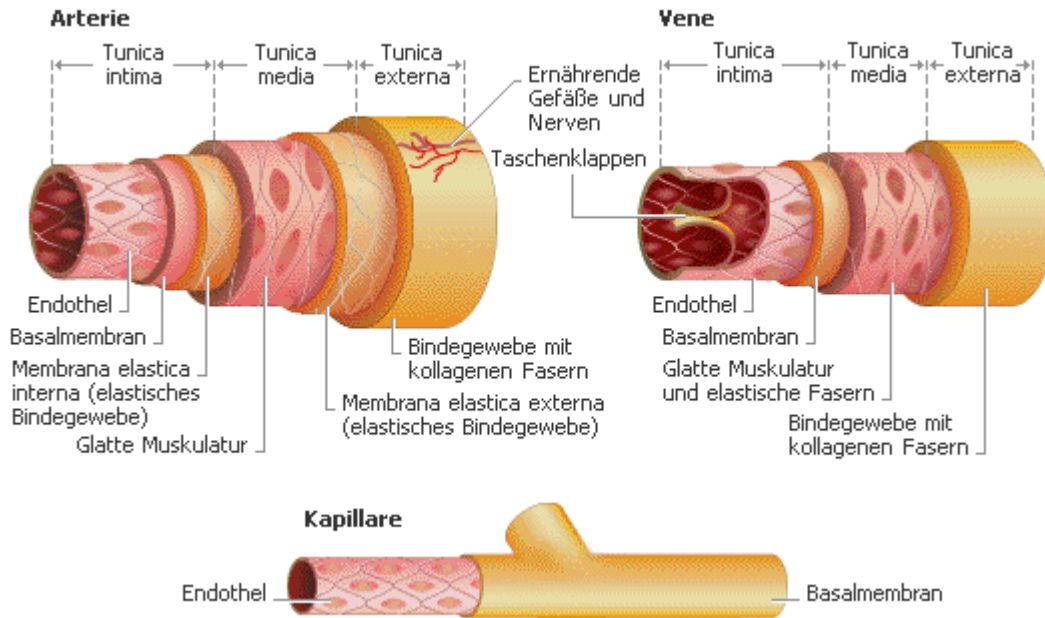


Abbildung 1.2.1: Gefäßaufbau
Schematische Darstellung der Schichtung der Gefäßwand. (modifiziert nach http://de.encarta.msn.com/medias_761560628/Anatomie.html).

1.2.2 Funktion des Gefäßendothels

Das Endothel kleidet das Blutgefäßsystem mit einem einschichtigen Plattenepithel aus. Trotz seiner nur mikroskopischen Dimension mit einer Dicke häufig geringer als 1 μm , stellt es ein multifunktionelles Organ dar, ohne das ein Blutfluß und ein funktionierender Kreislauf nicht möglich wären und dessen Dysfunktion einen kritischen Faktor für die Entstehung vaskulärer Erkrankungen darstellt:

Neben der Rolle als mechanische Barriere zwischen strömendem Blut und Gefäßwand sowie dem umgebenden Gewebe erfüllt das intakte Gefäßendothel

wichtige physiologische Aufgaben: So trägt seine vasodilatierende Funktion zu einem bedarfsangepassten Gefäßtonus bei [13], kontrolliert die Einwanderung von Entzündungszellen und setzt antiproliferativ wirksame Mediatoren frei [14].

Des Weiteren ist es an der Fibrinolyse, Thrombozytenaktivierung und –inhibition, der Monozytenadhäsion sowie am Schutz vor luminalen oxidativem Stress beteiligt [15].

Die Regulationsmechanismen und Interaktionen zwischen dem Endothel, den glatten Gefäßmuskelzellen und den im Blut zirkulierenden zellulären Bestandteilen wurden erst in den letzten Jahren erkannt und gewinnen zunehmend an Bedeutung [16].

Das Gefäßendothel ist in der Lage sowohl vasodilatierend wirkende (z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin) als auch vasokonstriktorisches wirkende Substanzen (z.B. Thromboxane oder Endothelin-1) zu synthetisieren und zu sezernieren. Durch ein komplexes Mitwirken und Beeinflussen der Vasomotorik, Plättchen- und Leukozytenadhäsion und Plaquestabilisierung schützt ein gesundes Endothel u.a. vor Entstehung von Atherosklerose und deren Komplikationen [17].

Ein frühes Zeichen einer geänderten bzw. reduzierten endothelialen Funktion bzw. endothelialen Dysfunktion ist eine Verminderung der endothelabhängigen Vasodilatation. Hierdurch kommt es, wenn man zum Beispiel die endothelabhängige Vasodilatation durch Gabe von Acetylcholin stimuliert, zu einer verminderten Zunahme der Dilatation bzw. des Gefäßdurchmessers und Blutflusses, sowie eventuell an bestimmten Stellen des Gefäßbettes sogar zu einer paradoxen Vasokonstriktion [18;19].

Marker, die für eine Verletzung des Endothels sprechen, sind Zytokine, CRP und apoptotische Zellen [20]:

Proinflammatorische Risikofaktoren induzieren nicht nur eine Zytokinproduktion im Gefäßsystem, sondern auch in der Leber (IL1, IL6, TNF α), was den Spiegel des C-reaktiven Proteins (CRP) im Plasma erhöht. CRP wirkt prothrombotisch,

verursacht eine Induktion des Tissue factor, eine Abnahme des NO-Gehalts im Gefäß, und eine Steigerung des Vasotonus. Durch die beginnende vaskuläre Inflammation kommt es zur T-Zell-induzierten Lyse von Endothelzellen, die als apoptotische Zellen im Blut zirkulieren und gemessen werden können. Sie sind Marker der Verletzung des Endothels und erreichen höchste Werte im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms [21-23].

1.2.3 Mediatoren der Vasodilatation

Unterschiedliche Substanzen wie Neurotransmitter, Hormone und von Thrombozyten sezernierte Stoffe können zu einer endothelabhängigen Gefäßerweiterung führen [24]. Auch Scherkräfte durch das zirkulierende Blut oder Hypoxie können endothelvermittelt zu einer Gefäßerweiterung führen. Dieser Mechanismus spielt bei blutdrucksteigernden Situationen wie körperlicher Belastung eine wichtige Rolle. Der hauptsächliche Mediator der endothelabhängigen Vasodilatation ist wie bereits mehrfach erwähnt Stickstoffmonoxid [25-27].

Stickstoffmonoxid (NO)

Im Gefäßsystem ist NO der wichtigste Mediator der endothelabhängigen Vasodilatation. Das relativ kurzlebige Radikal, das als Molekül vom Körper freigesetzt wird, hat neben vielfältigen physiologischen Funktionen eine zentrale Rolle in der intra- und interzellulären Signaltransduktion und ist bereits seit vielen Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [28;29]:

Furchgott konnte im Jahre 1980 [30] zeigen, dass der über Acetylcholin vermittelte Effekt der Vasodilatation an isolierten vaskulären, thorakalen Aortenringen beim Kaninchen abhängig von der endothelialen Funktion ist. Später gelang der Nachweis, dass Nitrovasodilatoren durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und dessen Effekt auf die glatte Muskulatur wirken [29;31].

Die Hypothese wurde aufgestellt, dass die Relaxation der glatten Muskelzellen durch einen Anstieg des zyklischen GMP verursacht werden könnte [32] und Furchgott und Ignarro bewiesen im Jahr 1986, dass endothelium-derived relaxing factor (EDRF) und Stickstoffmonoxid identisch seien [33].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen und Makrophagen L-Arginin, die Vorstufe von NO, produzieren, welches danach zu Nitrit und Nitrat metabolisiert wird [34].

Acetylcholin (Ach)

Beim Acetylcholin handelt es sich um den Essigsäureester des Cholins, das als physiologischer Neurotransmitter an zahlreichen Nervenenden freigesetzt wird und als Überträger dient. Acetylcholin kommt als Transmitter an den effektorischen Synapsen des Parasympathikus, an allen prä- und einigen postganglionären effektorischen Synapsen des Sympathikus sowie an den motorischen Endplatten in der Muskulatur vor. Acetylcholin wird durch die Cholinacetylase synthetisiert, an den Übertragungsstellen in Vesikeln gespeichert und bei Nervenerregung in Quanten freigesetzt. Durch Bindung an nikotin- oder muskarinerge Rezeptoren des Erfolgsorgans öffnet oder moduliert es Ionenkanäle in der Membran. Die Wirkungsdauer des Acetylcholins ist wegen des schnellen hydrolytischen Abbaus durch die Acetylcholinesterase in Cholin und Acetat sehr kurz. Seine pharmakologische Wirkung besteht in einer Blutdrucksenkung durch Vasodilatation, Bronchokonstriktion, Tonussteigerung des Darmes, Zunahme der Drüsensekretion und einer negativ chronotropen sowie negativ inotropen Wirkung am Herzen [35].

Natrium-Nitroprussid (SNP)

Natrium-Nitroprussid ist eine anorganische, lichtempfindliche Komplexverbindung, die als NO-Donator zu einer Vasodilatation arterieller Widerstands- und venöser Kapazitätsgefäße führt. Die Substanz wird medikamentös in Form einer Infusionslösung zur akuten Blutdrucksenkung eingesetzt. Die Wirkungsweise von Natrium-Nitroprussid ist streng dosisabhängig, die Wirkungsdauer sehr kurz. Da im Körper aus Natrium-Nitroprussid neben NO auch noch Zyanid freigesetzt wird,

kann eine Überdosierung durch Überlastung der Rhodanid-Synthase zu einer Zyanid-Vergiftung führen [36].

1.2.4 Mediatoren der Vasokonstriktion

Das Endothel produziert außer vasodilatierenden Substanzen auch vasokonstriktorisches Faktoren, wie Endothelin oder Metabolite des Zyklooxygenasestoffwechsels (z.B. Thromboxan A₂ und Prostaglandin H₂) und das Angiotensin-Converting-Enzym, welches die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems reguliert.

Norepinephrin (NE)

Norepinephrin stellt ein pharmakologisches Analogon zu Noradrenalin (NA) dar, ein zu den Katecholaminen gehörender Neurotransmitter des Sympathikus. Noradrenalin wird sowohl in den Ganglienzellen des gesamten sympathischen Nervensystems als auch in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks neben Adrenalin gebildet. Im Rahmen der Biosynthese entsteht Noradrenalin über die Zwischenstufen 3,4-Dihydrophenylalanin und Dopamin aus der essentiellen Aminosäure L-Tyrosin. Chemisch betrachtet fehlt dem Noradrenalin im Unterschied zu Adrenalin eine Methylgruppe an der Aminogruppe, was seine schwächeren und zum Teil gegensätzlichen Wirkungen erklärt. Nach Zufuhr von Noradrenalin steigen systolischer und diastolischer Blutdruck unter anderem durch eine kontraktionsbedingte Verengung der Widerstandsgefäße an. Vermittelt wird die Kontraktion über α_1 -Rezeptoren, die G-Protein gekoppelt die Phospholipase C aktivieren. Daraufhin kommt es zur intrazellulären IP₃- und DAG-Erhöpfung, was wiederum zu einem Anstieg von intrazellulärem Kalzium und damit zur Kontraktion führt [37;38]

Endothelin-1

Die Endotheline gehören zu den bekanntesten Vasokonstriktoren [17;39].

Es werden drei Formen des Oligopeptids unterschieden: ET-1, ET-2 und ET-3 [40].

ET-1 ist im Hinblick auf die Vasoregulation die wichtigste Isoform und wird hauptsächlich von Endothelzellen und in geringerem Ausmaß von glatten Gefäßmuskelzellen und perivaskulären Nervenzellen produziert. Gespeichert wird ET-1 nicht in Form von Granula in den Endothelzellen [41], sondern innerhalb von wenigen Minuten nach Reizen wie Hypoxie, Ischämie oder Scherkräften transkribiert, synthetisiert und sezerniert. Es existieren zwei Endothelin-Rezeptor-Subtypen: ET_A- und ET_B-Rezeptoren [42]. Beide Rezeptorsubtypen können Endothelin-induzierte Konstriktionen vermitteln. ET_A-Rezeptoren kommen am häufigsten auf glatten Gefäßmuskelzellen vor und sind hauptverantwortlich für Endothelin-induzierte Konstriktionen. ET_B-Rezeptoren werden in den meisten Gefäßbetten hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert, wo sie über eine Aktivierung der NO-Synthese eine Dilatation der Gefäßmuskulatur bewirken [43].

In manchen Gefäßen werden ET_B-Rezeptoren auch von glatten Muskelzellen exprimiert und vermitteln dort eine Vasokonstriktion [25-27].

1.3 Endotheliale Dysfunktion

1.3.1 Definition der Atherosklerose

Die Welt-Gesundheits-Organisation WHO definiert den Begriff Atherosklerose als „variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ [44].

Atherosklerose ist die häufigste Arterienerkrankung, deren wesentliche Folgekomplikationen Herzinfarkt, Schlaganfall und arterielle Durchblutungsstörungen der Extremitäten sind. Sie wird beschrieben als ein chronisch-progredienter, inflammatorischer Prozess, dessen häufigste klinische Manifestation die koronare Herzerkrankung darstellt, deren Inzidenz und Prävalenz beständig zunimmt [45].

1.3.2 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose

Die Kenntnis der Pathophysiologie der Atherosklerose hat sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend gewandelt. Während man früher annahm, dass der atherosklerotische Prozess im Wesentlichen in der Ablagerung von Lipiden und Lipoproteinen in der Gefäßwand besteht, wird Atherosklerose heute als ein hochkomplexer, chronisch-inflammatorischer Prozess verstanden [46], der sich über viele Jahre erstreckt und bei dessen Entstehung die Zellen der Gefäße selbst (Endothelzellen, glatte Muskelzellen) eine aktive Rolle spielen. In jeder Phase der Atherosklerose sind entzündliche Faktoren beteiligt, von der initialen Plaquesbildung über das Wachstum der Plaque bis hin zur Plaquesruptur, die schließlich zum akuten Ereignis eines Herzinfarkts oder Apoplexes führt. Mäßig erhöhte Serumkonzentrationen von Entzündungsparametern wie CRP, Fibrinogen, Serum-Amyloid (SAA) und bestimmten proinflammatorischen Zytokinen, die eigenständige Risikofaktoren für eine koronare Herzerkrankung darstellen, unterstützen diese Theorie [47].

Diese Parameter sind zudem unabhängig von den klassischen Risikofaktoren wie Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, und Rauchen [48;49].

Am Anfang der Atherosklerose steht die endotheliale Dysfunktion, d.h. der Verlust oder die Einschränkung wichtiger Endothelzellfunktionen. Das dysfunktionale Endothel verliert seine physiologische Fähigkeit zur Hemmung der Kontraktion glatter Muskelzellen, der Adhäsion von Leukozyten und Monozyten sowie der Thrombozytenaggregation und Zellproliferation. Vielmehr exprimiert es

spezifische Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Substanzen, die zur Einwanderung mononukleärer Leukozyten in die Intima führen. Der Kontakt der Endothelzellen mit den Monozyten wird dabei durch Selektine vermittelt [50], wodurch deren Rollen entlang der Endotheloberfläche ermöglicht wird. Durch immunglobulinähnlichen Adhäsionsmoleküle wie Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) werden die Monozyten gestoppt und migrieren unter dem Einfluss chemotaktischer Faktoren in den subendothelialen Raum, wo sie zu Makrophagen werden, verstärkt oxidativ modifiziertes Low Density Lipoprotein (LDL) über die Scavenger-Rezeptoren aufnehmen und Schaumzellen bilden, das typischen Merkmal der frühen atherosklerotischen Plaque [51;52].

Dieser Prozess ist zunächst voll reversibel und trägt noch keine klinischen Konsequenzen. Erst aufgrund der weiteren Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Insulinlike Growth Factor (IGF), sowie Fibroblast Growth Factor (FGF), deren Synthese durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) stimuliert wird, kommt es zur Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen mit Bindegewebsproduktion und Bildung eines progredienten Atheroms. Der anhaltende Entzündungsprozess wird möglicherweise durch CRP, das zusammen mit Komplement in atherosklerotischen Plaques gefunden wurde, getriggert [53;54].

Durch die Synthese von Proteinen durch die glatten Muskelzellen findet eine Kalzifizierung der atherosklerotischen Plaque statt. Die durch die Atherombildung entstandene arterielle Stenose kann jedoch über Jahre symptomlos bleiben. Durch die Ruptur der Plaque kann es zur Thrombenbildung und zum plötzlichen arteriellen Verschluss kommen [55].

In dieses Entzündungskonzept der Atherosklerose lassen sich nicht nur die klassischen Risikofaktoren einordnen, indem sie selbst eine chronische Entzündung der Endothelien auslösen oder diese über Jahre aufrecht erhalten und vorantreiben können, sondern darüber hinaus können auch andere Prozesse das Entzündungsgeschehen entscheidend beeinflussen, wie z.B. chronische

Infektionen. Infekte u.a. hervorgerufen oder getriggert durch Chlamydiae pneumoniae, Helicobacter pylori oder Herpesviren stehen zudem in Verdacht, atherogen zu sein, wobei der Kausalzusammenhang noch nicht gesichert ist [56-59].

1.3.3 Bedeutung von NOS-Isoformen und ApoE für die Endothelfunktion

Die Mediation der Vasodilatation durch die Endothelzellen ist von äußerster Wichtigkeit für die physiologische Funktion der Gefäßwand. Das durch die Endothelzellen freigesetzte Stickstoffmonoxid stellt bedingt durch die resultierende Relaxation die Durchgängigkeit der Gefäße sicher. Unter physiologischen Bedingungen wird NO kontinuierlich freigesetzt. Störungen in der endothelialen Zellfunktion verringern die NO-Freisetzung und dadurch auch die Vasodilatation.

Die NO-Synthese erfolgt durch Oxidation von L-Arginin durch NO-Synthasen (NOS) wobei Citrullin und NO entstehen. Dabei dient Tetrahydrobiopterin (BH₄) als Cofaktor.

Drei Isoformen der NOS sind bisher bekannt: zwei konstitutive Formen, die endotheliale NOS (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) und eine induzierbare Form (iNOS) [60].

Konstitutive NOS werden über Kalzium und Calmodulin reguliert und wurden zuerst aus Geweben des zentralen Nervensystems (nNOS) und Endothelzellen (eNOS) isoliert. Die induzierbare iNOS dagegen wird durch Stimulation durch Endotoxin oder Zytokine freigesetzt, ist unabhängig vom intrazellulären Kalziumspiegel und führt zu deutlich höheren Konzentrationen von Stickstoffmonoxid als die konstitutiven Formen [61;62].

Mitte der 90er Jahre begann eine intensive Forschungsarbeit über die NOS-Isoformen [26;29], über die NO-abbauenden Enzyme, die Phosphodiesterasen,

und über die Inhibitoren dieser Enzyme. Die Regulation und Lokalisation sind wichtige Unterscheidungsmerkmale dieser Isoenzyme. Zwischen 1991 und 1994 konnten diese Isoformen kloniert und aufgereinigt produziert werden [28;30;31].

So ist die eNOS ein Schlüsselenzym der vaskulären Homöostase, dessen enzymatisches Produkt, Stickstoffmonoxid, die bereits erwähnten vasodilatatorischen Eigenschaften aufweist und eine Reihe von antiatherogenen und antithrombotischen Effekten vermittelt u.a. die Reduktion der Thrombozyten- und Leukozyten-Adhäsion an der Gefäßwand, Inhibition der Wachstumsfaktor-induzierten Proliferation, Reduktion der Migration der vaskulären glatten Muskelzellen, sowie Reduktion des extrazellulären Matrix-Umsatzes und der Neointimabildung nach Gefäßverletzung [63].

Eine Beeinträchtigung des eNOS-Stoffwechselwegs über L-Arginin geht mit der Pathogenese der Atherosklerose einher [64]. Genetische Polymorphismen in der eNOS-Sequenz sind bereits als Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung beschrieben [65].

Sowohl Endothelzellen als auch Thrombozyten exprimieren die konstitutive NO-Synthase-Isoform eNOS und sind in der Lage, NO aus L-Arginin freizusetzen. Im Bereich atherosklerotischer Läsionen ist die Funktion der endothelialen NO-Synthese beeinträchtigt, so dass hier die thrombozytäre NO-Synthese eine herausragende Rolle in der Regulation der Zell-Zell-Interaktionen spielen könnte. Die genaue Bedeutung des thrombozytären bzw. des endothelialen NO-Systems für die Modulation der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in vivo ist jedoch bislang nur unzureichend geklärt [66;67].

Die Regulation der eNOS geschieht durch Einwirkung verschiedener Stimuli wie hämodynamische Scherkräfte und eine Reihe kalziummobilisierender Agonisten wie Bradykinin und Acetylcholin [68].

Der Anstieg des Kalziumspiegels in der Endothelzelle bewirkt die Bindung von Calmodulin, was die Aktivierung von eNOS stimuliert. Das von der eNOS gebildete NO diffundiert in die anliegende glatte Gefäßmuskulatur und bindet an

das zentrale Hämoprotein der löslichen Guanylatcyclase (sGC), was über eine Konformationsänderung und Aktivierung der sGC die Konversion von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) stimuliert. cGMP aktiviert die Proteinkinase G, was letztlich über eine Phosphorylierungskette zu einer Senkung des intrazellulären Kalziumspiegels und zur Vasodilatation führt [69].

Phosphodiesterasen inaktivieren cGMP durch Konversion zu GMP. Dabei unterliegt die Bioverfügbarkeit von NO verschiedenen Faktoren, wie z.B. der posttranslationalen Modifikation des Enzyms durch Acylierung von Fettsäuren, Veränderungen im Redoxstatus der Zelle oder Phosphorylierung der eNOS durch Aktivierung einer Proteinkinase durch u.a. Bradykinin, VEGF oder Insulin [70;71].

Der NO-Produktion durch iNOS werden bei zahlreichen Erkrankungen sowohl protektive als auch schädigende Effekte zugeschrieben [72]. Diese Effekte sind dabei von der NO-Konzentration abhängig. Bei niedrigen Konzentrationen überwiegen die antioxidativen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid, bei hohen Konzentrationen oder anhaltender Produktion dagegen (z.B. durch Hochregulation von iNOS oder Anwendung von exogenem Stickstoffmonoxid) werden zytotoxische, reaktive Stickstoffverbindungen gebildet [73]. Auch scheint die Form des Zelluntergangs von der resultierenden NO-Konzentration abzuhängen [74-76]. Hohe Konzentrationen von NO (iNOS-vermittelt) scheinen eher negative Folgen für unterschiedlichste Zellsysteme haben, während niedrige Stickstoffmonoxidkonzentrationen (eNOS- oder nNOS-vermittelt) eher protektiv wirken können.

Im Zusammenhang mit Atherosklerose und atheromatösen Plaques [77] wirkt iNOS im Sinne einer möglicherweise direkt schädigenden Wirkung. Bei der Bildung von endothelschädigenden Peroxynitriten [78] wird der iNOS eine die Bildung begünstigende Mitbeteiligung zugeschrieben [79].

Apolipoprotein E (ApoE) spielt im Fettstoffwechsel eine zentrale Rolle als Bestandteil der Plasmalipoproteine wie z.B. Chylomikronen, very low density lipoprotein (VLDL) und intermediate density lipoproteins (IDL). Dabei fungiert es

als hochaffiner Ligand von Lipoproteinpartikeln und beeinflusst somit den Transport und die Verteilung von Lipiden zwischen Organen und innerhalb eines Gewebes [80].

ApoE wird zu 90% in der Leber synthetisiert, aber auch in Monozyten, Makrophagen und Astrogliazellen im peripheren und zentralen Nervensystem.

Es gibt drei verschiedene ApoE Varianten, die als e2, e3 und e4 bezeichnet werden und sich in ihren Aminosäuren an Position 112 und 158 unterscheiden [81;82].

Als Ligand vieler Lipoprotein-Rezeptoren, z.B. Low density lipoprotein (LDL) Rezeptor, LDL receptor-related protein (LRP) sowie VLDL-Rezeptor, bindet ApoE mit einer hohen Affinität an den LDL-Rezeptor und beschleunigt so den Abbau triglyzeridreicher Partikel (VLDL, Chylomikronen) [83] und beeinflusst die Synthese und/oder die Sekretion ApoB100-haltiger Lipoproteine [84].

Aus mehreren Gründen wird dem Apolipoprotein E antiatherogene Wirkung zugesprochen: Neben der Beseitigung von Lipiden aus dem Plasma und des reversen Cholesterintransports aus den peripheren Geweben zur Leber [85], besitzt es antioxidative Eigenschaften und vermindert möglicherweise die oxidative Modifikation von Lipiden [86].

Ebenso hat es Einfluss auf eine Reihe von Zellfunktionen, wie die Proliferation von Muskelzellen und die Lipoproteinaufnahme von Makrophagen [80;87].

1.3.4 Tiermodelle für Atherosklerose

Tiermodelle helfen, komplexe pathophysiologische Mechanismen aufzudecken, die durch *in-vitro*-Verfahren allein nicht zu erforschen sind wie z.B. bei polygenetischen Erkrankungen, bei denen mehrere Gene mit verschiedenen Umwelt-Einflüssen interagieren und so den klinischen Phänotyp ausprägen [88].

Anfangs bediente man sich in der Atheroskleroseforschung größerer Tierarten, wie Primaten, Schweinen oder Kaninchen [89], die sich jedoch durch eine genetische Variabilität sowie aufwendiger Haltung und Zucht negativ

auszeichneten, was dieses Tiermodell limitierte. Heute stehen mehrere Mausmodelle zur Verfügung, die den Vorteil der geringen genetischen Varianz und der schnellen Zuchtfolge mit sich bringen [88;89].

Diese Modelle, wie die Apolipoprotein E-defiziente Maus (ApoE ko Maus) und die LDL-Rezeptor-defiziente Maus (LDL ko Maus), wurden durch gezielte genetische Manipulation generiert [90].

ApoE defiziente Mäuse weisen in der Entwicklung der Atherosklerose eine hohe Ähnlichkeit zu humanen Veränderungen auf [91] und gelten daher als klassisches, häufig verwendetes und gut validiertes Mausmodell für die Atherosklerose (90) bei dem die Apolipoprotein E-Synthese blockiert ist [92].

Der plasmatische Cholesterinspiegel ist, wie beim Menschen, von der Ernährung abhängig und durch eine lipid- und cholesterinreiche so genannte „Western-type diet“ steigerbar [93].

Eine hohe Serumcholesterin-Konzentration beschleunigt die Progredienz der atherosklerotischen Veränderungen [89;92;94].

Auch die Stadien des Gefäßumbaus in diesem Mausmodell sind denen des Menschen vergleichbar [94]. Sie beginnen mit „Fatty Streaks“ und enden in fortgeschrittenen Läsionen mit der Bildung einer fibrösen Kappe [89; 92; 93].

In der vorliegenden Arbeit bietet das Mausmodell neben obig angegebenen noch einen weiteren Vorteil: aufgrund der umfassenden genomischen Aufschlüsselung ist es möglich, Mäuse durch genetische Manipulation zu verändern. Durch gezielte genetische Veränderung und Zucht entsteht ein Mausmodell, welches neben der ApoE-Defizienz zusätzlich eine Defizienz in den verschiedenen Isoformen der NO-Synthase aufweist.

1.4 Die Knockout Mäuse: Stand der Forschung

1.4.1 ApoE-knockout Mäuse

Das ApoE ko Modell dient neben der Bedeutung als das klassische Modell für Atherosklerose u.a. für die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen

Superoxiden und Tetrabiopterinmangel, deren Anstieg bzw. Fehlen beide zu einer verminderten NO-Produktion führen [95].

Auch außerhalb des Lipidstoffwechsels besitzt ApoE zahlreiche Aufgaben wie z.B. die Modulation der zellulären Immunantwort, die Hemmung der Thrombozytenaggregation und die Regulation der Steroidsynthese. Im peripheren Nervensystem beeinflusst ApoE Wachstum und Differenzierung von Neuronen. Diskutiert wird die Rolle des ApoE bei der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit [80;96;97] durch den Abbau neurotoxischer Amyloid-Peptide und von Plaque-Komplexen. Dabei könnten defiziente Reparations- und Protektionsmechanismen bei ApoE4-Phänotypen Ursache für Neurodegenerationen sein, die für die Alzheimer'sche Krankheit pathognomonisch sind [98;99].

Ebenso wird dem ApoE-Polymorphismus eine Rolle als kardialer Risikofaktor und bei der Entstehung und Schwere der Multiplen Sklerose zugeschrieben bzw. diskutiert [100-102].

1.4.2 eNOS-knockout Mäuse

Die Verwendung von relativ selektiven L-Arginin-Analoga zur Blockade der NO-Produktion ermöglicht nur eine bedingte Aussage über die physiologische Bedeutung der drei NOS-Isoformen. Erst die Entwicklung von NOS-defizienten Mäusen verbesserte das Verständnis der Funktion dieser Isoenzyme. Huang et al. entwickelten 1995 erstmals eNOS-knockout Mäuse [103].

Dadurch wurde die essentielle Rolle der eNOS für die Endothelfunktion und die Gefäßum- und neubildung durch Untersuchungen in eNOS ko Mäusen deutlich [104]. Diese Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen erhöhten basalen Gefäßtonus und einen erhöhten Blutdruck auf. Neben der Regulation des Gefäßtonus ist NO ein essentieller Faktor für die durch Wachstumsfaktoren induzierte Angiogenese [105].

In eNOS ko Mäusen ist die Angiogenese im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert und kann auch nicht durch Applikation von Wachstumsfaktoren verbessert werden [106;107].

Die wichtige Funktion für das Gefäßremodelling nach Ligatur wurde ebenfalls in eNOS ko Mäusen gezeigt. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen erfolgt bei den NO-defizienten Tieren eine paradoxe Zunahme der Wandstärke, die durch eine erhöhte Proliferation der glatten Muskelzellen bedingt ist [108], da NO normalerweise die Proliferation von glatten Muskelzellen inhibiert. Diese Studien zeigen, dass neben der zentralen Rolle für die Regulation des Blutflusses NO ein essentieller Faktor für die normale Gefäßneu- und umbildung ist [109;110].

Bezüglich der Pathogenese der Atherosklerose wird der eNOS folgende Rolle zugeschrieben: Neben zahlreichen Mechanismen, die zu einer mangelnden endothelvermittelten Relaxation führen, scheint die Bildung von freien Sauerstoffradikalen durch fehlende eNOS eine zunehmende Beachtung zu finden. Unter Bedingungen, in denen Tetrahydrobiopterin als Kofaktor für NOS fehlt bzw. abgeschwächt ist, steigt die Superoxidproduktion der dysfunktionellen eNOS an [111].

Neuere Befunde zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen auch die endotheliale NO-Synthase (eNOS), das Enzym, das eigentlich für die NO-Produktion verantwortlich ist, Superoxid (O_2^-) generieren kann. Hierfür werden in erster Linie ein Mangel an Substrat (L-Arginin) oder essentiellen Kofaktoren (z.B. Tetrahydrobiopterin) verantwortlich gemacht [112].

Der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt und Gegenstand aktueller Forschungsprojekte. Dabei scheint die NO-Produktion selbst nicht eingeschränkt sondern im Gegenteil sogar erhöht zu sein. Es kommt dabei jedoch zu einer gesteigerten Produktion freier Sauerstoffradikale (Superoxidanionen; O_2^-), die zusammen mit NO zu dem Produkt Peroxynitrit reagieren können und damit NO inaktivieren. Dem Gleichgewicht zwischen NO-Produktion einerseits und der Inaktivierung durch Superoxidanionen (O_2^-) andererseits kommt eine entscheidende Rolle zu, das im Frühstadium der Atherosklerose zur vermehrten NO-Inaktivierung verschoben ist [113]. Dieses Konzept der Inaktivierung von NO durch vermehrte Produktion freier Sauerstoffradikale wird auch als "Oxidativer Stress" bezeichnet. Mögliche Folge der Entkopplung ist auch eine gleichzeitige NO und O_2^- -Produktion, die dann zusammen zu Peroxynitrit reagieren können [114]. Peroxynitrit gilt als stark oxidatives Agens, das z.B. Tetrahydrobiopterin oxidieren kann. So könnte die Entkopplung der eNOS durch ihre eigenen

Reaktionsprodukte aufrecht erhalten werden und ein *circulus vitiosus* entstehen, der zu weiteren Schädigungen des Endothels und Gefäßes führt.

1.4.3 iNOS-knockout Mäuse

iNOS, exprimiert in Leukozyten und glatte Muskelzellen, scheint den inflammatorischen Prozess atherosklerotischen Plaques-Entwicklung zu unterhalten.

Im Zusammenhang mit der Entstehung der Atherosklerose konnte bisher gezeigt werden, dass das Fehlen der iNOS die Anfälligkeit der Mäuse für Atherosklerose nicht erhöht, es jedoch zu einer vermehrten Bildung von extrazellulärem Kollagen kommt [115].

iNOS kommt in Epithelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen, Hepatozyten und in Makrophagen vor, und wird bei inflammatorischen Zuständen schnell hochreguliert. Der Produktion von Stickstoffmonoxid durch iNOS werden je nach Konzentration sowohl protektive als auch schädigende Effekte zugeschrieben [116]. Im Sepsis-Geschehen, das geprägt ist durch eine verminderte Ansprechbarkeit auf vasokonstriktorische und vasodilatative Stimuli, konnte gezeigt werden, dass die Sepsis-induzierte Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) für die vasokonstriktorischen und vasodilatativen Defizite verantwortlich ist [117;118].

Auch für die Bedeutung der chronischen Gelenkentzündungen ist die iNOS bezüglich therapeutischer Gesichtspunkte von Interesse [119;120]. Des Weiteren scheint es einen Zusammenhang zwischen der induzierbaren NO-Synthase und der Pathogenese von Tumorgewebe zu geben [121;122], in dem die iNOS ebenfalls hochreguliert ist.

1.4.4 ApoE/iNOS-knockout Mäuse

Die Doppelknockout-Varianten werden genutzt, um gezielt die Bedeutung der iNOS für die Atherogenese zu untersuchen. Von den Doppelknockout Mäuse

liegen bisher u.a. Studien zur Effektivität einer Behandlung der Atherosklerose von ApoE-knockout und ApoE/iNOS ko mit L-Arginin vor [123]. Hierbei wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine zusätzliche Gabe von L-Arginin bei ApoE ko Mäusen keinen Effekt zeigt, in Doppelknockouttieren für ApoE/iNOS jedoch dem protektiven Nutzen der iNOS auf atherosklerotische Läsionen entgegenwirkt und paradoxerweise diese sogar erhöht, möglicherweise durch NOS- Entkopplung und Bildung von Superoxiden.

Dabei erhärtet sich der Verdacht, dass in ApoE-defizienten Mäusen durch das Fehlen der iNOS ein Wachstum von atherosklerotische Plaques verringert wird [117;124]. In diesen Studien wurde das Verhalten der iNOS auf das Wachstum der Atherosklerose-Plaques in ApoE ko Mäusen evaluiert. Dabei wurde festgestellt, dass bei ApoE/iNOS ko Mäusen die Atherogenese im Vergleich zu reinen ApoE ko Mäusen. signifikant reduziert war.

Ein Fehlen der iNOS-vermittelten LDL-Oxidation könnte dazu beitragen [125].

2. Material

2.1 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Experimente in der Organkammer eingesetzt:

Organbad 6 Kammern	10A-5306 isolierte Organapparatur, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Wärmebad	HAAKE B3, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Waagen	Sartorius Analysenwaage, Typ NDBR100, Göttingen, Deutschland Chyo Elektronik Balance MP 3000, A.Hartenstein, Würzburg

2.2 Lösungen und Substanzen

2.2.1 Krebs-Henseleit-Puffer

Zur Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers fanden folgende Substanzen Verwendung:

NaCl	Natriumchlorid (M= 58,44 g/mol), Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂	Calciumchlorid (M=110,99g/mol), Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
KCl	Kaliumchlorid (M=74,85g/mol), Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat (M=136,09g/mol), Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland

Material

NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat (M=84,01g/mol), Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄	Magnesiumsulfat (M=120,4g/mol) Sigma- Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈	EDTA Titriplex (M=372,24g/mol), Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
C ₆ H ₁₂ O ₆	D(+)-Glucose-Monohydrat (M=198,17g/mol), Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland

Zuvor wurden Stammlösungen aus den obigen Substanzen angesetzt (siehe Tab.2.2) und wie unten angegeben gemischt, mit EDTA und Glucose versetzt, auf 5l mit aqua bidest aufgefüllt und nach gründlicher Durchmischung anschließend auf 25l verdünnt und für 30 min mit Carbogen, einem Gemisch aus 95% Sauerstoff (O₂) und 5% Kohlendioxid (CO₂), begast.

NaCl 9%	1925 ml
CaCl ₂ 1,2%	575 ml
KCL 1,15%	775 ml
MgSO ₄ 1,9%	192 ml
KH ₂ PO ₄ 2,11%	192 ml
NaHCO ₃ 6,5%	807 ml
EDTA	250 mg
C ₆ H ₁₂ O ₆	50 g

ad 5l Aqua bidest

Tab. 2.1: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers mit den jeweiligen Anteilen der einzelnen Stammlösungen und Zusatzsubstanzen, insgesamt mit aqua bidest aufgefüllt auf 25 l.

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden die aus der Tabelle 2.2 zu entnehmenden Mengen der Stoffe entsprechend abgewogen und auf 5 Liter mit 2fach destilliertem Wasser (aqua bidest) verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

NaCl 9%	450g NaCl	ad 5l aqua bidest
CaCl ₂ 1,2%	61g CaCl ₂	ad 5l aqua bidest
KCl 1,15%	57,5g KCl	ad 5l aqua bidest
MgSO ₄ 1,9%	95g MgSO ₄	ad 5l aqua bidest
KH ₂ PO ₄ 2,11%	105,3g KH ₂ PO ₄	ad 5l aqua bidest
NaHCO ₃ 6,5%	325g NaHCO ₃	ad 5l aqua bidest

Tab. 2.2: Zusammensetzung der Stammlösungen mit den zugrunde liegenden Stoffmengen.

2.2.2 Anästhetika

Folgendes Anästhetikum, dessen Lagerung bei Raumtemperatur erfolgte, fand bei den Versuchen Anwendung:

Nembutal[®] Pentobarbital, Abbott Laboratories, North Chicago, USA

2.2.3 Vasoaktive Substanzen

Vasokontrahierende Substanzen:

KCl	Kaliumchlorid (74,85g/mol), Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
NE	Norepinephrin, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Vasodilatierende Substanzen:

Ach	Acetylcholin Chlorid, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
SNP	Nitroprussid-Na [Natriumpentacyanonitrosylferrat(II)], Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Von Ach und NE wurden, um gleiche Grundbedingungen zu schaffen, zu Beginn der gesamten Versuchsreihe jeweils eine einzige Stammlösung angesetzt. (NE 10^{-4} mol/l, Ach 10^{-3} mol/l), aliquotiert (Menge in μ l: Ach 120; NE 120) und bei -20°C gelagert. Die SNP-Lösung wurde täglich frisch in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l hergestellt. Als Lösungsmittel diente aqua bidest, wobei ca. 50 mg Natrium Nitroprussid-Kristalle in Reagenzglas eingewogen und pro 5,07 mg 1ml Aqua bidest dazugegeben wurden.

Mit Krebs-Henseleit-Puffer als Verdünnungssubstanz wurde von diesen drei Substanzen die im Versuch verwendeten Konzentrationsreihen jeweils frisch an den einzelnen Versuchstagen angefertigt.

Zur Bestimmung der Referenzkontraktion (Vorkontraktion eines jeden Ringes) wurde eine 1 molare KCl-Lösung (74,6 g/l aqua bidest) hergestellt und bei 4°C gelagert.

Inkubationssubstanzen

Bei einem Teil der Versuche wurden die Gefäßringe vorinkubiert. Dabei fanden folgende Substanzen Verwendung:

7-Ni	7-Nitroindazol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-NAME	N-Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA

Diclofenac Diclofenac sodium salt, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA
L-NAME (10^{-4} mol/l), 7-Nitroindazol (10^{-5} mol/l) sowie Diclofenac (10^{-4} mol/l)
wurden täglich frisch mit Aqua bidest angesetzt.

2.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden in der vorliegenden Arbeit wurden pro Gruppe 7 Mäuse im Alter von 7-9 Wochen eingesetzt.

Untersucht wurden folgende Gruppen:

eNOS, iNOS und ApoE Knockout-Mäuse sowie ApoE/iNOS-Doppelknockout und die Wildtyp-Vergleichsgruppe.

Gezüchtet wurden die ApoE/iNOS-Doppelknockout-Mäuse in der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Kuhlencordt (Medizinische Universitätsklinik Würzburg) mit Jackson Black 6 als genetischem Background. Die ApoE Ko Tiere wurden bei Jackson Labs gekauft und in Würzburg gezüchtet. Diese beiden Stämme erhielten eine Western Diät. Diese Diät kommt von der Firma Harlan Teklad (USA). Es handelt es sich um eine fettreiche, normocholesterinämie Diät (42% der Gesamtkalorien von Fett, 0,15% Cholesterin). Die Diät wurde ursprünglich von Wissenschaftlern des Rockefeller Instituts entwickelt, um die "fast food" Ernährung zu simulieren, deshalb der Namen "western-type" Diät.

Die eNOS ko Tiere stammten von P. Huang aus Boston, Massachusetts. iNOS ko sowie die Kontroll-Tiere waren ebenfalls vom Stamm Jackson Black 6 (Charles River, Sulzfeld); alle erhielten normales 1321 Haltungsfutter für Mäuse (Altromin GmbH).

Für die Dauer des Versuchs wurden die Tiere im optimalen Haltungsbereich des Tierstalles der Universitätsklinik Würzburg bei konstanter Temperatur (21°C), Luftfeuchtigkeit (55-65%), Belüftung sowie geregelter Tag-Nacht-Rhythmus (Tag: 12h, Nacht: 12h) gehalten.

2.4 Verbrauchsmaterialien

Zentrifugenröhrchen	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH Würzburg, Deutschland
Eppendorfcups	RSL1 Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5ml, save lock, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	PSG 1000 Pipettenspitzen gelb, Typ Eppendorf 1-100µl, A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH Würzburg, Deutschland PSB 1000 Pipettenspitzen blau, Typ Eppendorf 100 - 1000 µl, A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH Würzburg, Deutschland
Skalpellsklingen	100 Skalpellsklingen steril, Gebrüder Martin Tuttlingen, Deutschland
Petrischalen	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH Würzburg, Deutschland
Spritzen	Omnicam U-40 Insulin, 1ml, B Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland
Tierfutter	1321 Haltungsfutter Mäuse, Altromin GmbH, Lage, Deutschland
aqua bidest	Ampuwa für Spülzwecke 10l, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H, Deutschland

3. Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Die Versuchsanordnung bestand aus einem Organbad, in dem sich das zu analysierende Gewebe befand, einem Kraftumwandler, der die resultierenden isometrischen Gewebereaktionen in elektrische Signale umwandelte, und einem Computer, an den die Daten weitergeleitet und graphisch aufgezeichnet wurden. Gemessen wurde die durch externe Stimuli induzierte, reaktive isometrische Spannungsänderung von Gefäßringen (Aorta descendens der Mäuse).

Die sich im Organbad befindliche Krebs-Ringer-Henseleit-Lösung, die permanent mit einem Gasgemisch von 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast wurde, und mittels des die Organkammer umspülenden Wärmebades auf einer Temperatur von 37° C gehalten wurde, gewährleistete dabei dem zu untersuchenden Geweben ein konstantes und möglichst physiologisches Milieu. Die Versuche konnten so unter isoosmotischen, isohydrischen und isothermen Bedingungen durchgeführt werden.

Die vom Bindegewebe befreiten Blutgefäße wurden dabei in gleich breite Ringe (3mm) geschnitten und schonend zwischen zwei steigbügelartigen Haken in der Organkammer so auf- und vorgespannt, dass die Kraftentwicklung der Gefäßreaktionen mittels eines Kraftumwandlers gemessen und graphisch auf dem Computer aufgezeichnet werden konnte [126].

In der vorliegenden Arbeit wurden die isometrischen Kontraktionen und Relaxationen von Segmenten der Aorta descendens der verschiedenen Knockout-Mäuse (siehe 3.1.2.) und deren Wildtyp-Kontrolltieren auf vasokonstriktorisch bzw. vasodilatatorisch wirkende Substanzen gemessen. Die provozierten Reaktionen der Gefäße waren dabei je nach Stimulus endothelunabhängig oder endothelabhängig, d.h. die Substanzen wirkten entweder direkt an den Muskelzellen oder am Gefäßendothel, dessen Unversehrtheit für die Umwandlung der Substanzen durch Transmitter und Hormone in die eigentlichen Überträgerstoffe Voraussetzung war.

3.2 Versuchsablauf

3.2.1 Anästhesie der Mäuse

Am jeweiligen Versuchstag wurden die Mäuse mit Pentobarbital 40 mg/kg KG durch intraperitoneale (i.p.) Injektion anästhesiert.

3.2.3 Präparation der Gefäße

Die anästhesierten Mäuse wurden auf einer Operationsunterlage fixiert und mit Pinzette und Schere thorako-abdominal eröffnet und die Aorta und das Herz vorsichtig freipräpariert. Danach wurde die Aorta descendens in No-Touch-Technik zur Schonung des Endothels entnommen und unverzüglich in 4°C gekühlten Krebs-Henseleit-Puffer überführt. Die Aorta wurde mittels einer Kanüle sondiert, vom Herzen getrennt, mit Pinzette und Operationsschere vom umgebenden Bindegewebe befreit und mit Hilfe eines Skalpells in 3mm breite Ringsegmente geschnitten [126].

3.2.4 Fixation der Gefäßsegmente im Organbad

Die Gefäßsegmente wurden auf zwei Triangelgestelle aus feinem Draht (Durchmesser 10 µm) montiert, welche wiederum an zwei Drahhaken befestigt wurden, die mit einem Kraftumwandler zur Messung der isometrischen Spannung verbunden waren [127].

Anschließend wurden die Aortenringe in den mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten Organbädern (10ml) aufgehängt, mit Carbogen begast und mittels eines Wärmebades konstant auf einer Temperatur von 37°C gehalten [128].

3.2.5 Versuchsdurchführung im Organbad

Nach Einspannen der präparierten Gefäß-Segmente ruhten diese über 30 Minuten zur Anpassung an das Milieu im Organbad. Danach wurde die Spannung über einen Zeitraum von weiteren 30 Minuten in 0,5g-Schritten bis auf 2g erhöht [129]. In Voruntersuchungen dieser Arbeit wurde ermittelt, dass eine entsprechende Vorspannung ein für die maximale Muskelkontraktion optimales Längen-Spannungs-Verhältnis gemäß dem Frank-Starling-Mechanismus gewährleistet [130]. Die Gefäße besitzen dadurch ihr volles Kontraktions- und Relaxationsvermögen. So können bei Zugabe von vasokonstriktorisches und vasodilatatorischen Substanzen standardisierte Daten über den Spannungszustand des Gefäßabschnittes gewonnen werden. Nach Erreichen dieser Referenzspannung erfolgt weiteres Abwarten von 10 Minuten zu dessen Stabilisierung, um anschließend mit der Applikation der vasoaktiven Substanzen zu beginnen [131].

Zunächst wurden die Blutgefäße je zweimal mit 100mM Kaliumchlorid-Lösung zum Erlangen eines individuellen, standardisierten Referenzwertes bezüglich maximaler Kontraktion inkubiert [132]. Nach Erreichen eines Plateaus (d.h. keine weitere Steigerung der isometrischen Kraftentwicklung) bei der ersten KCl-Inkubation erfolgte eine dreimalige Spülung mit Krebs-Henseleit-Puffer, um die Ausgangssituation wiederherzustellen. Etwaige Abfälle der Ruhedehnungsspannung (2g) wurden durch Nachjustieren der Vorspannung ausgeglichen, bevor nach weiterer 10 minütiger Anpassungszeit eine zweite durch KCl induzierte Kontraktion erfolgte. Auch hier erfolgte nach abgeschlossener Plateaubildung eine dreimalige Spülung mit Krebs-Henseleit-Puffer, um die KCl-Lösung vollständig aus dem Organbad zu entfernen.

Ein Teil der Gefäße wurde für die Versuche für eine Dauer von 15 Minuten mit Diclofenac (10^{-5} mol/l), L-NAME (10^{-4} mol/l) oder Nitroindazol (10^{-5} mol/l) vorinkubiert und die Gefäßreaktion auf Acetylcholin und Norepinephrin untersucht. Der andere Teil der Gefäße wurden nativ belassen und der Einfluss von SNP, NE und Ach registriert. Die Applikation der unterschiedlichen

Testsubstanzen in die Organbäder erfolgte dabei nach genau definiertem Protokoll.

Zwischen den Versuchsdurchgängen wurden die Gefäße jeweils dreimal mit Krebs-Henseleit-Puffer gespült, um den Gefäßen Zeit zu geben, sich wieder in ihre ursprüngliche Ausgangslage mit der entsprechenden Vorspannung zu begeben. Die Zugabe von NE erfolgte dabei in aufsteigender Konzentration von 10^{-10} bis 10^{-5} mol/l in jeweils logarithmischen Abständen einer halben Zehnerpotenz. Dabei musste vor Applikation der nächst höheren Konzentration die Ausbildung eines Plateaus als Gefäßreaktion abgewartet werden.

Vor Applikation der dilatierenden Substanzen Ach und SNP erfolgte durch Zugabe von NE (10^{-7} mol/l) eine Vorkontraktion der Gefäße auf 70-80% der Referenzkontraktion durch die 100mM Kaliumchlorid-Lösung, um dann in aufsteigender Konzentration den jeweiligen Vasodilatator (10^{-10} bis 10^{-5} mol/l für Ach bzw. 10^{-10} bis 10^{-5} mol/l für SNP) zuzugeben, ebenfalls in Abständen einer halben Zehnerpotenz. Vor Zugabe der nächst höheren Konzentration wurde das jeweilige Relaxationsplateau abgewartet.

In Tabelle 3.2 sind die bei den Gefäßen durchgeführten Untersuchungen aufgelistet:

Vorinkubations- substanzen Substanz- verdünnungs- -reihe (mol/l)	Ohne Vorin- kubation	Mit Vorin- kubation L-NAME 10 ⁻⁴ mol/l 15 min	Mit Vorin- kubation Diclo 10 ⁻⁵ mol/l 15 min	Mit Vorin- kubation 7-Ni 10 ⁻⁵ mol/l 15min
Ach, 10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻⁵	X	X	X	
SNP, 10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻⁵	X			
NE, 10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻⁵		X	X	X

Tab. 3.2: Übersicht über die verwendeten Vorinkubationssubstanzen und ihren jeweilig Einsatz

3.3 Statistik

Die Auswertung der Versuche erfolgte durch eine computergestützte Ermittlung der erzielten Gefäßantworten bei den entsprechenden Substratkonzentrationen. Die Angabe der Gefäßreaktionen auf Vasokonstriktoren erfolgte in Prozent der jeweiligen individuellen Referenzkonzentration auf Kaliumchlorid (100mmol/l).

Gefäßreaktionen auf Vasodilatoren wurden in Prozent der Vorkontraktion auf Norepinephrin (10^{-7} mol/l) aufgeführt. Nur Gefäßsegmente, deren endothelabhängige Relaxation auf Acetylcholin mehr als 50% der Vorkontraktion auf Norepinephrin betragen, kamen für die Auswertung in Betracht.

Die Datenerfassung erfolgte mittels VitroDatWin (FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland). Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) angegeben. Zur statistischen Analyse wurde die Sensitivität (pD₂) der Gefäße auf die vasoaktiven Substanzen als negativer Logarithmus der Konzentration, die eine halbmaximale Kontraktion bzw. Relaxation ausgelöst hat, ausgedrückt. Die maximale Relaxation (ausgedrückt in Prozent der NE-Kontraktion) bzw. die maximale Kontraktion wurden unter Zuhilfenahme von MatLab Software (MatWorks, Natick, MA, USA) für jede Dosis-Wirkungskurve durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt. Für den Vergleich zwischen zwei Werten kam der ungepaarte Student's t-Test zur Anwendung.

Die graphische Darstellung der Gefäßreaktion und der Vitaldaten der Mäuse erfolgte in Form von Linien-Diagrammen mit zusätzlich dargestellter Standardabweichung der Mittelwerte unter Verwendung von SigmaPlot (Jandel Scientific Software 2001, San Rafael, CA, USA). Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet [133;134].

4. Ergebnisse

4.1 Relaxation

4.1.1 Endothelabhängige Relaxation auf Acetylcholin

Die endothelabhängige Relaxation auf Ach zeigte außer bei den e-NOS ko Tieren keinen signifikanten Unterschied. Bei den eNOS ko Tieren kam es dagegen zu keiner relevanten Relaxation (siehe Abb. 4.1).

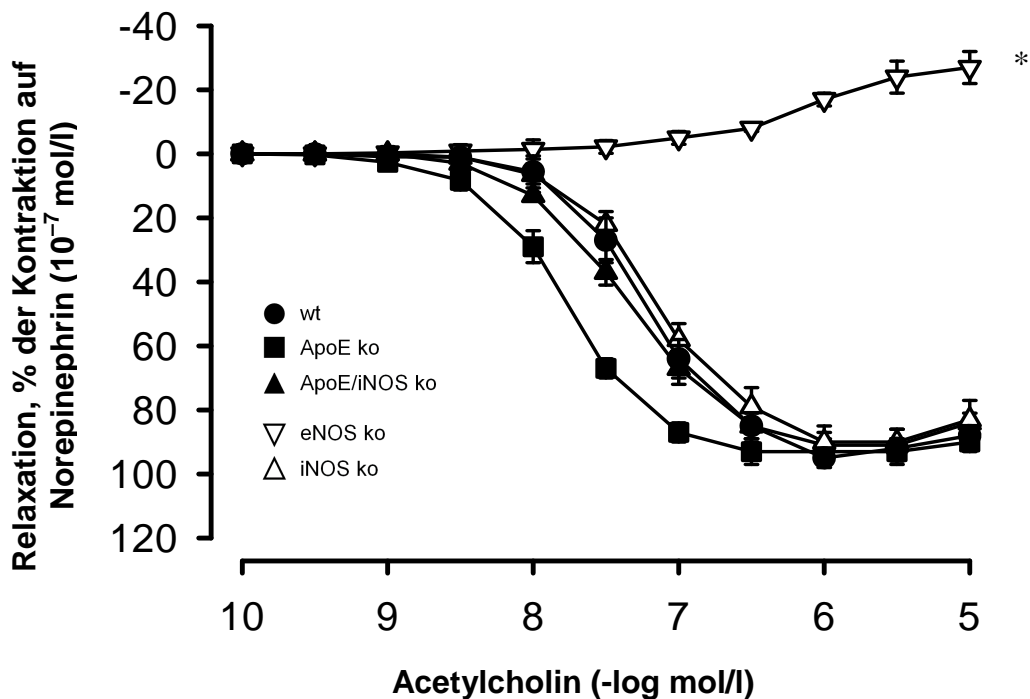


Abb. 4.1: Endothelabhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

Nach der Vorinkubation mit Diclofenac (10^{-5} mol/l) ergab sich außer bei den eNOS ko Tieren kein Unterschied zwischen den anderen Tiergruppen (siehe Abb. 4.2).

Die eNOS ko Mäuse reagierten mit nahezu keiner Relaxation.

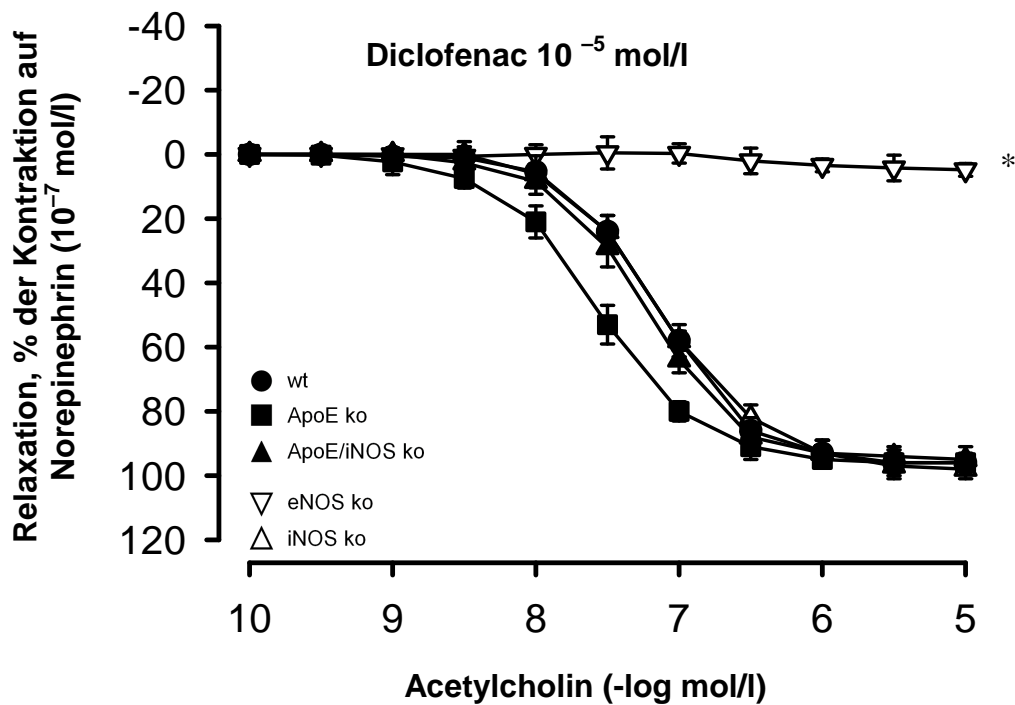


Abb. 4.2:

Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (ACh) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwisterieren (wt) nach Vorinkubation mit Diclofenac (10^{-5} mol/l). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

Nach Vorinkubation mit dem NO-Synthase-Hemmer L-NAME (10^{-5} mol/l) zeigte sich bei allen Versuchstieren bis auf die eNOS ko Tiere eine nahezu vollständig unterdrückte Relaxation auf Ach (siehe Abb. 4.3).

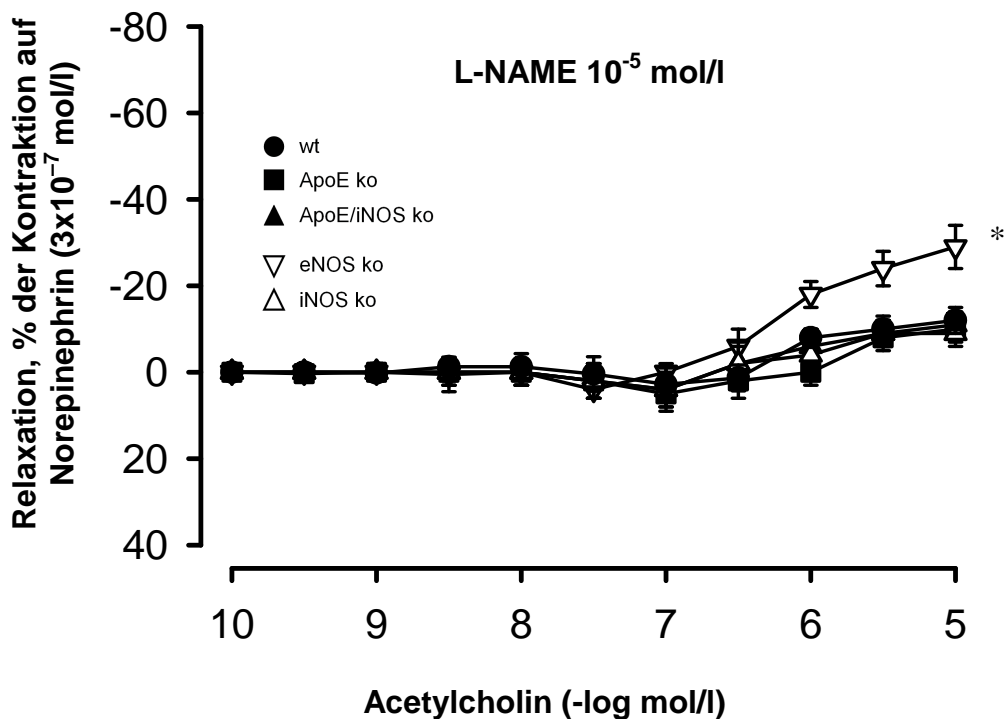


Abb. 4.3:

Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwisterieren (wt) nach Vorinkubation mit L-NAME (10^{-5} mol/l). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

4.1.2 Endothel-unabhängige Relaxationen auf Natrium-Nitroprussid

Bei den Endothel-unabhängigen Relaxationen auf Natrium-Nitroprussid ergab sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (siehe Abb. 4.4).

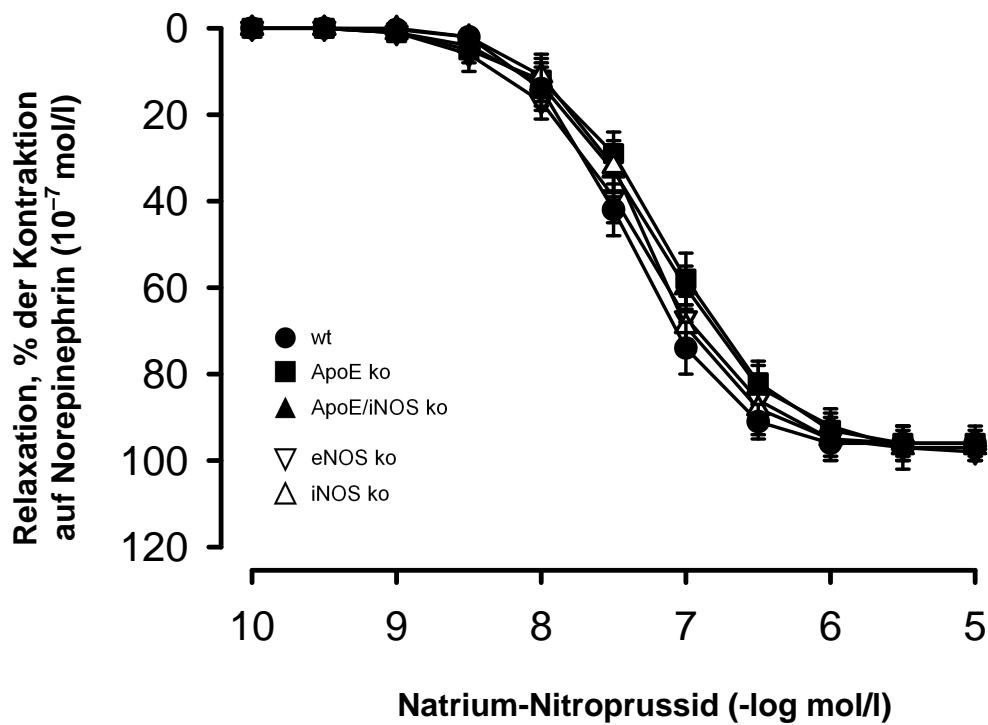


Abb. 4.4:

Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Natrium-Nitroprussid (SNP) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben ($n = 6/\text{Gruppe}$). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

4.2 Kontraktionen

Die Kontraktion auf Norepinephrin (siehe Abb. 4.5) war bei den iNOS ko Mäusen deutlich reduziert, während sie bei den eNOS ko Mäusen signifikant stärker ausfiel als bei den Wildtypgeschwistertieren.

Die restlichen Knockout-Tiere unterschieden sich nicht wesentlich von den Wildtypen.

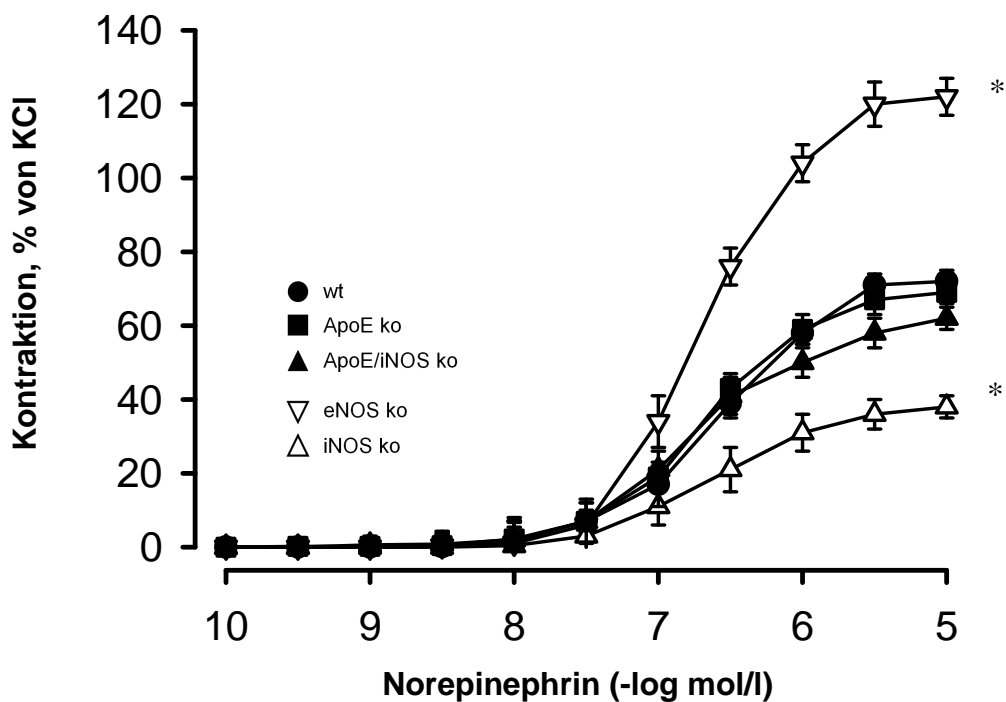


Abb. 4.5: Konzentrations-abhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin (NE) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

Die Vorinkubation mit 7-Nitroindazol, das relativ selektiv die nNOS inhibiert, hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Kontraktionsverhalten der verschiedenen Gruppen.

Auch hier war die Kontraktion der Gefäßringe der iNOS ko Tiere deutlich reduziert, während die Kontraktion der eNOS ko Tiere deutlich stärker im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen ausfiel (siehe Abb. 4.6).

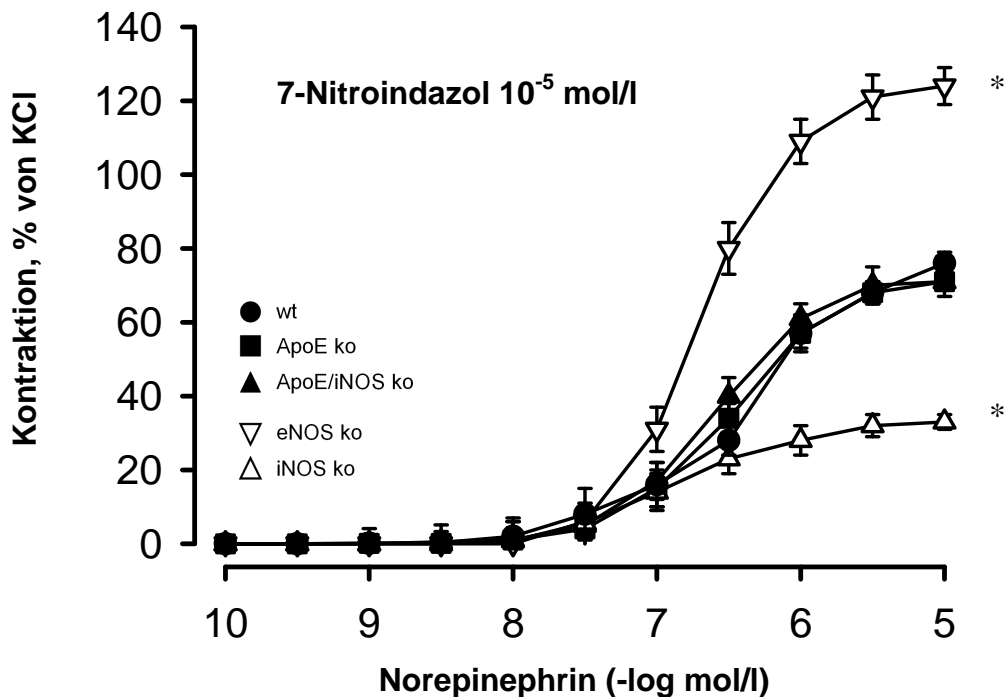


Abb. 4.6:

Konzentrations-abhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin (NE) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt) nach Vorinkubation mit 7-Nitroindazol (10^{-5} mol/l). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben

(n = 6/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

Die Reaktionen auf Norepinephrin nach Vorinkubation mit L-NAME unterschied sich in den Gruppen nicht signifikant (siehe Abb. 4.7).

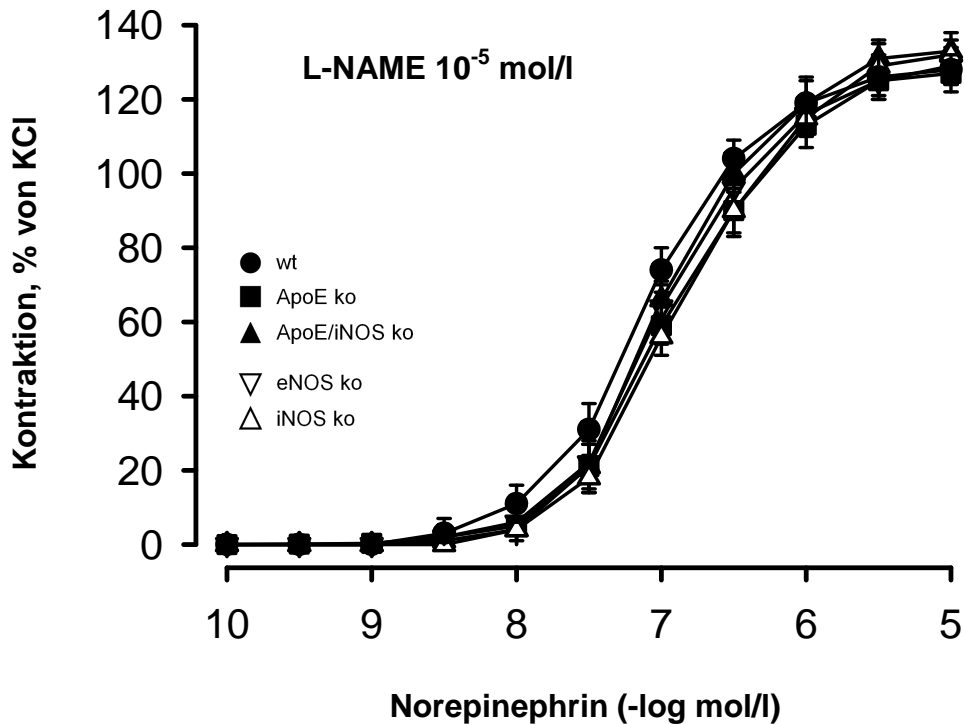


Abb. 4.7:

Konzentrations-abhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin (NE) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt) nach Vorinkubation mit L-NAME (10^{-5} mol/l). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * p < 0,05 vs. Wildtyp.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Endothelfunktion bzw. endotheliale Dysfunktion anhand isolierter Ringe aus der Aorta descendens von Mäusen mittels Untersuchung der isometrischen Spannungsänderung im Organbad evaluiert.

Eingesetzt wurden verschiedene Knockoutmausmodelle mit unterschiedlichen Defizienzen für NO-Synthaseisoformen (iNOS, eNOS), ApoE-knockout als Atherosklerosemodell und eine Doppelknockoutvariante für ApoE/iNOS.

Dabei erhielten die ApoE ko- sowie die ApoE/iNos ko Tiere eine atherosklerosefördernde "Westliche Diät" zur Provokation einer Atherosklerose; die restlichen Gruppen dagegen normale Kost.

Bei der Evaluation der **endothelabhängigen Relaxation** auf Acetylcholin stellte sich bei allen Knockouttieren eine entsprechende Relaxation ein. Ausnahme bildeten die eNOS ko Tiere, bei denen keine relevante Relaxation erfolgte. Die restlichen Gruppen zeigten in ihrem Relaxationsverhalten untereinander keine signifikanten Unterschiede. Das Ausbleiben der Vasodilatation bei einem Fehlen der eNOS unterstreicht die zentrale Bedeutung der durch das Enzym gebildeten NO für den Gefäßtonus [64].

Das Fehlen einer endothelabhängigen Relaxation bei eNOS-knockout Mäusen wurde bereits mehrfach beschrieben [135-137].

Durch die Vorinkubation mit Diclofenac wurde durch Hemmung der Cyclooxygenase eine mögliche direkt cAMP-vermittelte vasodilatatorische Wirkung durch Prostazyklin untersucht.

Jedoch ergab sich hierbei keine Änderung im Relaxationsverhalten der Gefäßringe, was eine Vermittlung der Relaxation durch Prostazyklin ausschliessen lässt.

Diclofenac gehört zu der Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID), wobei es sich um ein Phenyllessigsäurederivat handelt. Es wirkt analgetisch, antiinflammatorisch und antipyretisch. Diclofenac hemmt beide COX-Formen,

wobei die konstitutiven Form (COX-1) stärker betroffen ist.

Die Wirkung der NSAID beruht darauf, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu hemmen. Dazu greifen diese in die Prostaglandinsynthese auf der Stufe des Enzyms Cyclooxygenase ein. Das Enzym Cyclooxygenase (COX) oxidiert zuerst Arachidonsäure zu Prostaglandin G₂ (PGG₂) und anschließend peroxidiert es PGG₂ zu PGH₂. PGH₂ dient als Ausgangssubstanz für andere Prostaglandine (PGE₂ usw.), für Thromboxan A₂ (TXA₂), und für Prostacyclin (PGI₂). Im Organismus existieren zwei unterschiedliche Formen der Cyclooxygenase, eine konstitutive (COX-1) und eine induzierbare (COX-2) Form.

COX-1 vermittelt die Produktion von PGI₂, TXA₂ und PGE₂, COX-2 befindet sich in Makrophagen, anderen Entzündungszellen, sowie Endothelzellen und wird im Gegensatz zur konstitutiven Form (COX-1) erst nach einem inflammatorischen Stimulus in den Zellen exprimiert.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Hemmung der NO-Synthasen durch den unspezifischen NO-Synthase-Inhibitor L-NAME bei allen Versuchstieren eine nahezu vollständiges Fehlen der endothelabhängigen Relaxation zur Folge hat.

L-NAME gehört zu den L-Arginin-Analoga. Diese können wie auch L-Arginin von dem aktiven Zentrum der NOS gebunden werden, allerdings können sie nicht umgesetzt werden und blockieren somit das Enzym und somit die Bildung von NO. Die Ergebnisse zeigen bei allen Versuchstieren ein nahezu vollständig unterdrücktes Ausbleiben der endothelabhängigen Relaxation auf Ach, unabhängig von deren Versuchsgruppenzugehörigkeit und Ernährung.

Eine signifikante Beteiligung der neuronalen NOS an der Vasodilatation wurde durch Vorinkubation mit Nitroindazol ausgeschlossen. Die Gefäßantwort unterschied sich nicht von den Ergebnissen ohne Nitroindazol-Vorinkubation.

In höheren Konzentration lässt sich bei den eNOS ko Tieren eine Zunahme der Wandspannung dokumentieren, die nach Vorinkubation durch Diclofenac ausblieb.

Lüscher et al. hat dieses Phänomen ebenfalls vorgefunden und auf ein Mitwirken an kontraktionsfördernden Cyclooxygenase-Produkte gedeutet. Hierbei wurde eine endothelabhängige Kontraktion auf Ach in spontan hypertensiven Ratten nachgewiesen [138].

Entsprechend ist diese Kontraktion durch Produkte der Cyclooxygenase vermittelt, was bereits in anderen Tiermodellen beschrieben ist. [11;13;14;139;140]

Auch die **endothelunabhängige Relaxation** wurde in der Arbeit untersucht.

Die Relaxation auf SNP, das unabhängig von dem Funktionszustand des Endothels, d.h. auch im Falle einer endothelialen Dysfunktion wirksam ist, ergab ebenfalls keine Unterschiede in den verschiedenen Gruppen. SNP wirkt ohne Verzögerung als direkt eingebrachtes NO. Es bedarf keiner Umwandlung und kann somit augenblicklich durch Erhöhung des cGMP-Spiegels in der glatten Gefäßmuskulatur seine vasodilatatorische Wirkung entfalten. Die adäquate Relaxation nach Applikation von SNP spricht für die Intaktheit der nachgeschalteten Signaltransduktion.

Weder der Genotyp noch die Fütterung der Tiere hatten Einfluss auf die SNP-vermittelte Gefäßrelaxation.

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Fehlen der eNOS zu einer deutlichen Zunahme der **Kontraktion auf NE** führt. Dies wurde bereits früher im Hinblick auf eine entzündliche Genese der Atherosklerose diskutiert [46].

Das Kontraktionsverhalten der ApoE und ApoE/iNOS ko Tiere entsprach dem der Wildtypiere.

Die Kontraktionen der Aortenringe der iNOS ko Mäuse waren dagegen deutlich reduziert. Möglicherweise ist die Expression anderer NOS-Isoformen kompensatorisch hochreguliert. In Frage kommt hier in erster Linie die eNOS, da

die selektive Inhibition der nNOS durch Vorinkubation mit Nitroindazol nicht zu einer Veränderung der Kontraktionsverhaltens geführt hat.

Schwarz et al. haben im Rahmen einer Studie zur Beeinflussung der NE-Ausschüttung sympathischer Neurone von Rattenherzen zeigen können, dass die Ausschüttung von NE in Gegenwart von NO reduziert wird [141]. In diesem Sinne könnte die Reduktion der NO-Produktion in den eNOS ko Tieren zu einer verstärkten Kontraktion der entsprechenden Gefäßringe geführt haben.

Gunnett et al. konnten zeigen, dass die Anwesenheit von iNOS zu einer endothelialen Dysfunktion führt [142] und das kontraktile Potential durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase reduziert wird [143].

Dies steht im Einklang mit der in der vorliegenden Studie verminderten NE-vermittelten Kontraktion der iNOS-knockout Mäuse.

Die in der vorliegenden Versuchsreihe erarbeiteten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass iNOS und eNOS durchaus entgegengesetzte Effekte –obwohl beide potentielle NO-Lieferanten sind- auf die Gefäßreaktivität haben können.

Dies mag mit der zusätzlichen Fähigkeit der Enzyme zur Bildung von Peroxynitrit in Zusammenhang stehen.

Die jeweils spezifischen Bedingungen, die bei den Enzymen einen Überschuss an NO bzw. Peroxynitrit entstehen lassen, wird Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein müssen.

6. Zusammenfassung

Die Funktion bzw. Dysfunktion des Endothels spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese verschiedener Gefäßkrankheiten, insbesondere der Atherosklerose. Die Homöostase des gesunden, intakten Endothels wird über eine Vielzahl von Mediatoren vermittelt, deren Zusammenspiel eine fragile Balance vasodilatierender und vasokontraktiler Kräfte aufrechterhält. Einer der quantitativ und funktionell bedeutsamsten vasoaktiven Faktoren ist das Stickstoffmonoxid (NO), welches von verschiedenen Isoformen der NO-Synthase gebildet werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand differenzierter Knockout-Varianten (iNOS ko, eNOS ko, ApoE ko und ApoE/iNos ko) die Bedeutung der verschiedenen Gefäßtonus-regulierenden Systeme für die Pathogenese der Atherosklerose zu untersuchen. Als früher Indikator der Veränderung des Gefäßsystems in dem ApoE knockout Modell für Atherosklerose diente die Evaluation der Endothelfunktion mittels isometrischer Spannungsänderung von isolierten Gefäßringen im Organbad.

An isolierten, vorgespannten Segmenten der Aorta descendens erfolgte die Untersuchung der endothelabhängigen bzw. -unabhängigen Gefäßreaktion als dosisabhängige Relaxation auf Acetylcholin bzw. Natrium-Nitroprussid in der Organkammer. Ebenso wurde die dosisabhängige Kontraktion der Gefäßringe auf Norepinephrin mit und ohne Vorinkubation mit verschiedenen Substanzen analysiert.

Die endothelabhängigen Relaxation auf Acetylcholin war in allen Versuchsgruppen vergleichbar, lediglich bei den eNOS-ko Mäusen blieb eine Vasodilatation auf Ach aus; eine Cyclooxygenase-Inhibition mit Diclofenac führte zu keiner signifikanten Änderung des Gefäßverhaltens. Die endothelunabhängige Relaxation der Gefäße auf Natrium-Nitroprussid unterschied sich in den einzelnen Versuchsgruppen nicht.

Die Kontraktion der Gefäßringe auf Norepinephrin war bei den iNOS knockout Tieren signifikant vermindert, bei den eNOS-knockout Tieren im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen jedoch deutlich verstärkt. Eine Präinkubation mit

Nitroindazol zur Inhibition der nNOS führte zu keiner relevanten Veränderung des Kontraktionsverhaltens.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Fehlen von eNOS bzw. iNOS – obwohl beide Enzyme prinzipiell in der Lage zur Produktion des Vasodilatators Stickoxid sind – in einem Mausmodell für Atherosklerose gegensätzliche Effekte auf die Gefäßfunktion haben. Unterschiede in der Gefäßreaktivität betreffen hierbei nicht nur die endothelabhängige Relaxation, sondern auch das Kontraktionsverhalten der Gefäße. Welche spezifischen Faktoren zu Unterschieden in der Produktion von Stickoxid durch eNOS bzw. iNOS führen, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

- Tab. 2.1:** Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers mit den jeweiligen Anteilen der einzelnen Stammlösungen und Zusatzsubstanzen, insgesamt mit aqua bidest aufgefüllt auf 25 l.
- Tab. 2.2:** Zusammensetzung der Stammlösungen mit den zugrunde liegenden Stoffmengen.
- Tab. 3.1:** Einteilung der Tiere in die verschiedenen Versuchsgruppen; n: Anzahl der Tiere in einer Gruppe.
- Tab. 3.2:** Übersicht über die verwendeten Vorinkubationssubstanzen und ihren jeweiligen Einsatz

7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.2.1:** Abbildung 1.2.1: Gefäßaufbau
Schematische Darstellung der Schichtung der Gefäßwand.
(modifiziert nach http://de.encarta.msn.com/medias_761560628/Anatomie.html).
- Abb. 4.1:** Endothelabhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * p < 0,05 vs. Wildtyp.
- Abb. 4.2:** Endothelabhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt) nach Vorinkubation mit Diclofenac (10^{-5} mol/l). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe).

* $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

Abb. 4.3: Endothelabhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (ACh) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt) nach Vorinkubation mit L-NAME (10^{-5} mol/l). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe).

* $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

Abb. 4.4: Endothelabhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Natrium-Nitroprussid (SNP) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

Abb. 4.5: Konzentrationsabhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin (NE) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

Abb. 4.6: Konzentrationsabhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin (NE) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS-knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt) nach Vorinkubation mit 7-Nitroindazol (10^{-5} mol/l). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

Abb. 4.7: Konzentrationsabhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin (NE) bei ApoE-knockout Mäusen (ApoE ko), eNOS knockout Mäusen (eNOS ko), iNOS-knockout Mäusen (iNOS ko) und ApoE/iNOS-doppelknockout Mäusen (ApoE/iNOS ko) und deren Wildtyp Geschwistertieren (wt) nach Vorinkubation mit L-NAME (10^{-5} mol/l). Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6/Gruppe). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

7.3 Literaturverzeichnis

- (1) Zimmet P, Aberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-7.
- (2) Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998;339:229-34.
- (3) Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. 1993;16:434-44.
- (4) Gimbrone A, Topper JN. Biology of the vessel wall: endothelium. In: Chien KR (ed). *Molecular Basis of Cardiovascular Disease*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1999;331-48.
- (5) Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, Yudkin JS. Endothelial dysfunction: cause auf the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 1997;46(Suppl 2):9-13.
- (6) Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J.Cardiovasc.Pharmacol*. 1993;22(Suppl 4):1-14.
- (7) Lin PJ, Chang CH. Endothelium dysfunction in cardiovascular diseases. *Changgeng.Yi.Xue.Za Zhi*. 1994;17:198-210.
- (8) Lüscher TF, Tanner FC, Tschudi MR, Noll G. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu.Rev.Med*. 1993;44:395-418.
- (9) Garcia-Palmieri MR. The endothelium in health and in cardiovascular disease. *P.R.Health Sci.J*. 1997;16:136-141.
- (10) Wennmalm A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J.Intern.Med*. 1994; 235:317-327.
- (11) Lüscher TF, Tanner FC. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am.J.Hypertens*. 1994;6:283-293.
- (12) Klink R, Silbernagl S. *Lehrbuchder Physiologie*. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart-New York 1996:159-170.
- (13) Lüscher TF, Dohi Y, Tanner FC, Boulanger C. Endothelium-dependent control of vascular tone: effects of age, hypertension and lipids. *Basic Res Cardiol*. 1991; 86(Suppl 2):143-158.

- (14) Lüscher TF, Noll G. Endothelial function as an end-point in interventional trials: concepts, methods and current data. *J Hypertens*. 1996;14(Suppl 2):111-119.
- (15) Lüscher TF. Vascular protection: current possibilities and future perspectives. *Int J Clin Pract*. 2001;117:3-6.
- (16) Ruschitzka FT, Noll G, Lüscher TF. The endothelium in coronary artery disease. *Cardiology*. 1997;88(Suppl 3):3-19.
- (17) Anderson TJ. Oxidative stress, endothelial function and coronary atherosclerosis. *Cardiologia*. 1997;42(7):701-714.
- (18) Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RM, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation*. 1997;96(10):3378-3383.
- (19) Celermajer DS. Testing endothelial function using ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32(Suppl 3):29-32.
- (20) Stam F, van Guldener C, Schalkwijk CG, ter Wee PM, Donker AJ, Stehouwer CD. Impaired renal function is associated with markers of endothelial dysfunction and increased inflammatory activity. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(5):892-898.
- (21) Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, et al. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2000;102:1000-1006.
- (22) Wang C-H, Li S-H, Weisel RD, et al. C-Reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation*. 2003;107:1783-1790.
- (23) Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2004;350:1387-1397.
- (24) Lüscher TF, Dohi Y, Tanner FC, Boulanger C. Endothelium-dependent control of vascular tone: effects of age, hypertension and lipids. *Basic Res Cardiol*. 1991;86(Suppl 2):143-158.
- (25) Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol*. 1998;274(2 Pt 1):L212-L219.
- (26) Ignarro LJ. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int. Suppl* 1996;55:S2-S5.

- (27) Dusting GJ, Fennessy P, Yin ZL, Gurevich V. Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain? *Clin Exp Pharmacol Physiol. Suppl* 1998; 25:S34-S41.
- (28) Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1995;38:87-104.
- (29) Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H: Nitric oxide synthase isozymes: Characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension.* 1994;23:1121-1131.
- (30) Furchgott R.F, Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle cells by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-6.
- (31) Murad F, Waldman SA, Fiscus RR, Rapoport RM. Regulation of cyclic GMP synthesis and the interactions with calcium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1986;8:S57-S60.
- (32) Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1984; 24:175-197.
- (33) Fleming I, Busse R. NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31(1):5-14.
- (34) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327 :524-526.
- (35) Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl. Wiss. Verl. Gess, Stuttgart 2001:143.
- (36) Leighton K. M, Bruce C, MacLeod B.A. Sodium nitroprusside-induced hypotention and renal blood flow. *Can Anaesth Soc J* 1977;24 [6]:637-40.
- (37) Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8.Aufl. Wiss. Verl.Gess, Stuttgart 2001:324-331.
- (38) Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wiss. Verl. Gess, Stuttgart 2001:351-354.
- (39) Rubanyi G.M, Polokoff M.A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol.Rev.* 1994;46:325-415.

- (40) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998;86:2863-2867.
- (41) Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Demura H, Uemura H. Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry.* 1990;94:475-477.
- (42) Nakamuta M, Takayanagi R, Sakai Y, Sakamoto S, Hagiwara H, Mizuno T, Saito Y, Hirose S, Yamamoto M, Nawata H. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1991;177:34-39.
- (43) Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J.Clin.Invest.* 1993;91:1367-1373.
- (44) Riede UN, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 1993.
- (45) Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet.* 1997;349:1436-1442.
- (46) Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126
- (47) Bach-Ngohou K, Nazih H, Nazih-Sanderson F, Zair Y, Le Carrer D, Krempf M et al. Negative and independent influence of apolipoprotein E on C-reactive protein (CRP) concentration in obese adults. Potential anti-inflammatory role of ApoE in vivo. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25(12):1752-1758.
- (48) Debreceni L. Homocysteine--a risk factor for atherosclerosis. *Orv Hetil.* 2001;142(27):1439-1444.
- (49) Semenkovich CF, Heinecke JW. The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot. *Diabetes.* 1997; 46(3):327-334.
- (50) Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation.* 2000;101(19):2290-2295.
- (51) Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1992;140(2):301-316.
- (52) Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature.* 1997;386(6622):292-296.

- (53) Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest.* 1988;58(3):249-261.
- (54) Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(5):842-851.
- (55) Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180:1332-1339.
- (56) Campbell LA, Blessing E, Rosenfeld M, Lin T, Kuo C. Mouse models of *C. pneumoniae* infection and atherosclerosis. *J Infect Dis.* 2000;181(Suppl 3):S508-S513.
- (57) Aalto-Setälä K, Laitinen K, Erkkilä L, Leinonen M, Jauhiainen M, Ehnholm C et al. Chlamydia pneumoniae does not increase atherosclerosis in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(4):578-584.
- (58) Alber DG, Powell KL, Vallance P, Goodwin DA, Grahame-Clarke C. Herpesvirus infection accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Circulation.* 2000;102(7):779-785.
- (59) Quaschnig T, Wanner C: The role of Chlamydia in coronary heart diseases- fact or fiction? *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:2800-2803.
- (60) Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2479-2488.
- (61) Panaro MA, Brandonisio O, Acquafredda A, Sisto M, Mitolo V. Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2003;3(3):210-221.
- (62) Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur.Heart J.* 1993;14 (Suppl I):10-15.
- (63) Radomski MW, Salas E. Nitric oxide--biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1995;118 Suppl:69-80.
- (64) Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation.* 1997;96:379-382.

- (65) Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med.* 1996;2:41-45.
- (66) Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics.* 2002;12(5):407-413.
- (67) Kader KN, Akella R, Ziats NP, Lakey LA, Harasaki H, Ranieri JP et al. eNOS-overexpressing endothelial cells inhibit platelet aggregation and smooth muscle cell proliferation in vitro. *Tissue Eng.* 2000;6(3):241-251.
- (68) Feron O, Zhao YY, Kelly RA. The ins and outs of caveolar signaling. m2 muscarinic cholinergic receptors and eNOS activation versus neuregulin and ErbB4 signaling in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;874:11-19.
- (69) Wu WC, Wang Y, Su CK, Chai CY. The nNOS/cGMP signal transducing system is involved in the cardiovascular responses induced by activation of NMDA receptors in the rostral ventrolateral medulla of cats. *Neurosci Lett.* 2001;310(2-3):121-124.
- (70) Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252(3):743-746.
- (71) Felaco M, Grilli A, De Lutiis MA, Patruno A, Libertini N, Taccardi AA et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and localization in healthy and diabetic rat hearts. *Ann Clin Lab Sci.* 2001;31(2):179-186.
- (72) Kröncke K-D, Fehsel K, Suschek CV, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death, and cell survival. *Int. Immunopharmacol.* 2001;1:1407-1420.
- (73) Wink DA, Feelisch M, Fukuto J, Chistodoulou D, Jourde'heuil D, Grisham MB et al. The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch Biochem Biophys.* 1998;351(1):66-74.
- (74) Bohlinger I, Leist M, Barsig J, Uhlig S, Tiegs G, Wendel A. Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor alpha-induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology.* 1995;22(6):1829-1837.
- (75) Annicchiarico-Petruzzelli M, Bernassola F, Lovat PE, Redfern CP, Pearson AD, Melino G. Apoptosis in neuroblastomas induced by interferon-gamma involves the CD95/CD95L pathway. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36(1):115-117.

- (76) Estevez AG, Spear N, Thompson JA, Cornwell TL, Radi R, Barbeito L et al. Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1998;18(10):3708-3714.
- (77) Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S et al. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol*. 2000;165(6):3430-3435.
- (78) Beckman J.S, Beckman T.W, Chen J, Marshall P.A, Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:1620.
- (79) Buttery L.D, Springall D.R, Chester A.H, Evans T.J, Standfield E.N, Parums D.V, Yacoub M.H, Polak J.M. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab. Invest*. 1996;75:77.
- (80) Mahley RW, Rall SC. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507-537.
- (81) Utermann G, Weisgraber K.H, Weber W, Mahley R.W. Genetic polymorphism of apolipoprotein E: a variant form of apolipoprotein E2 distinguished by sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gel electrophoresis. *J Lipid Res*. 1984;25(4):378-382.
- (82) Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J*. 1987;113(2 Pt 2):433-440.
- (83) Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240(4852):622-630.
- (84) Demant T, Bedford D, Packard CJ, Shepherd J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipemic subjects. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1490-1501.
- (85) Lorkowski S, Cullen P. Genetics and molecular biology: apolipoprotein E--from plasma lipids to plaque stability. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13(6):689-692.
- (86) Ishigami M, Swertfeger DK, Hui MS, Granholm NA, Hui DY. Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1020-1026.

-
- (87) Mahley RW, Weisgraber KH, Melchior GW, Innerarity TL, Holcombe KS. Inhibition of receptor-mediated clearance of lysine and arginine-modified lipoproteins from the plasma of rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:225-229.
- (88) Becker KD, Gottshall KR, Kenneth RC. Strategies for Studying cardiovascular phenotypes in genetically manipulated mice. *Hypertension*. 1996;27:495-501.
- (89) Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:133-140.
- (90) Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258(5081):468-471.
- (91) Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:141-147.
- (92) Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:4431-4435.
- (93) Plump AS, Breslow JL. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu Rev Nutr*. 1995;15:495-518.
- (94) Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985;57:65-73.
- (95) Laursen J.B, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman B:A, Tarpey M, Fukai T, Harrison D.G. Endothelial Regulation of Vasomotion in ApoE-Deficient Mice : Implications for Interactions Between Peroxynitrite and Tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001;103:1282-1288.
- (96) Lovestone S, Anderton BH, Hartley C, Jensen TG, Jorgensen AL. The intracellular fate of apolipoprotein E is tau dependent and apoe allele-specific. *Neuroreport*. 1996;7(5):1005-1008.
- (97) Pitas R.E, Ji Z.S, Weisgraber K.H, Mahley R.W. role of apolipoprotein E in modulating neurite outgrowth: potential effect of intracellular apolipoprotein E. *Biochem Soc Trans*. 1998;26(2):257-262.
- (98) Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10(3):207-217.
- (99) Ashford JW. ApoE4: is it the absence of good or the presence of bad? *J Alzheimers Dis*. 2002;4(3):141-143.

- (100) Frikke-Schmidt R. Context-dependent and invariant associations between APOE genotype and levels of lipoproteins and risk of ischemic heart disease: a review. *Scand J Clin Lab Invest. Suppl* 2000;233:3-25.
- (101) Fazekas F, Strasser-Fuchs S, Kollegger H, Berger T, Kristoferitsch W, Schmidt H et al. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis. *Neurology*. 2001;57(5):853-857.
- (102) Evangelou N, Jackson M, Beeson D, Palace J. Association of the APOE epsilon4 allele with disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.1999;67(2):203-205.
- (103) Huan PL, Huang Z, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;377:239-242.
- (104) Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Madri J.A, Sessa W.C.Nitric Oxide Production Contributes to the Angiogenic Properties of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Endothelial Cells. *J. Clin. Invest*.1997;100:3131-3139.
- (105) Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Ok Yun C, Buerk D.G, Huang P.L, Jain R.K.Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *PNAS*. 2001;98:2604-2609.
- (106) Murohara T, Horowitz T.R, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan S, Isner J.M.Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Enhances Vascular Permeability Via Nitric Oxide and Prostacyclin. *Circulation*. 1998;97:99-107.
- (107) Ozaki M, Kawashima S, Hirase T, Yamashita T, Namiki M, Inoue N et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Am J Pathol*. 2002;160(4):1335-1344.
- (108) Katsuya A, Hiroaki M, Osamu I, Mitsuhiko O et al. Enhancement of Ischemia-Induced Angiogenesis by eNOS Overexpression. *Hypertension*. 2003;41:156-162.
- (109) Rudic R.D, Shesely E.G, Maeda N, Smithies O, Segal S.S, Sessa W.C.Direct Evidence for the Importance of Endothelium-derived Nitric Oxide in Vascular Remodeling. *J. Clin. Invest*. 1998;101:731-736.
- (110) Ueno H, Kanellakis P, Agrotis A, Bobik A. Blood Flow Regulates the Development of Vascular Hypertrophy, Smooth Muscle Cell Proliferation, and Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase in Hypertension. *Hypertension*. 2000;36:89-96.
- (111) Kawashima S:Malfuction of Vascular Control in Lifestyle-Related Diseases: Endothelial Nitric Oxide (NO) Synthase/NO System in Atherosclerosis. *J Pharmacol Sci*. 2004;96:411-419.

- (112) Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:998-1005.
- (113) Rubbo H, O'Donnell V. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology.* 2005;208(2):305-17.
- (114) Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22546-54.
- (115) Niu X.L, Yang X, Hoshiai K, Tanaka K, Sawamura S, Koga Y, Nakazawa H. Inducible Nitric Oxide Synthase Deficiency Does Not Affect the Susceptibility of Mice to Atherosclerosis but Increases Collagen Content in Lesions. *Circulation.* 2001;103:1115-1120.
- (116) Kroncke KD, Suschek CV, Kolb-Bachofen V. Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid Redox Signal.* 2000;2(3):585-605.
- (117) Baker CH, Sutton ET. Arteriolar endothelium-dependent vasodilatation occurs during Endotoxin shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1993; 264:1118-1123.
- (118) Hollenberg SM, Cunnion RE, Zimmerberg J. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1993;264:660-663.
- (119) Veihelmann A, Krombach F, Refior HJ, Messmer K. Effects of NO synthase inhibitors on the synovial microcirculation in the mouse knee joint. *J Vasc Res.* 1999;36(5):379-384.
- (120) Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Sanchez E, Lopez-Nevot MA, Amoli MM, Garcia-Porrúa C et al. Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology.* 2004;43(9):1182-1185.
- (121) Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000; 50(1-2):39-48.
- (122) Cullis ER, Klaber TL et al. Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. *Microvasc Res.* 2006;71(2):76-84.
- (123) Chen J, Kuhlencordt P, Urano F, Ichinose H, Astern J, Huang PL. Effects of chronic treatment with L-arginine on atherosclerosis in apoE knockout and apoE/inducible NO synthase double-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(1):97-103.

-
- (124) Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2001;103(25):3099-104.
- (125) Miyoshi T, Li Y, Shih DM, Wang X, Laubach VE, Matsumoto AH, Helm GA, Lusis AJ, Shi W. Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci*. 2006;79(6):525-31.
- (126) Quaschnig T, D'uscio LV, Shaw S, Lüscher TF. Vasopeptidase inhibition exhibits endothelial protection in salt-induced hypertension. *Hypertension*. 2001;37(4):1108-1113.
- (127) Barton M, D'uscio LV, Shaw S, Meyer P, Moreau P, Lüscher TF. ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 1998;31(1 Pt 2):499-504.
- (128) Russell A, Watts S. Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(2):598-604.
- (129) Quaschnig T, D'uscio LV, Shaw S, Grone HJ, Ruschitzka F, Lüscher TF. Vasopeptidase inhibition restores renovascular endothelial dysfunction in salt-induced hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12(11):2280-2287.
- (130) Moreau P, Takase H, Kung CF, Shaw S, Lüscher TF. Blood pressure and vascular effects of endothelin blockade in chronic nitric oxide-deficient hypertension. *Hypertension*. 1997;29(3):763-769.
- (131) Lüscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von Segesser L et al. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med*. 1988;319(8):462-467.
- (132) Moreau P, Takase H, Kung CF, Shaw S, Lüscher TF. Blood pressure and vascular effects of endothelin blockade in chronic nitric oxide-deficient hypertension. *Hypertension*. 1997;29(3):763-769.
- (133) Hafner D, Heinen E, Noack E. Mathematical analysis of concentration-response relationships. Method for the evaluation of the ED50 and the number of binding sites per receptor molecule using the logit transformation. *Arzneimittelforschung*. 1977;27(10):1871-1873.
- (134) Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res*. 1980;47(1):1-9.
- (135) Waldron GJ, Ding H, Lovren F, P Kubes P, C R Triggle CR. Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *British Journal of Pharmacology*. 1999;128:653-658.

- (136) Chataigneau T, Feletou M, Huang PL, Fishman MC, Duhault J, Vanhoutte PM. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol*. 1999;126(1):219-26.
- (137) Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;21:239-42.
- (138) Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1986;8(4):344-8.
- (139) Zhou Y, Varadharaj S, Zhao X, Parinandi N, Flavahan NA, Zweier JL. Acetylcholine causes endothelium-dependent contraction of mouse arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(3):1027-32.
- (140) Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *British Journal of Pharmacology*. 2005;146:834-845.
- (141) Schwarz P, Diem R, Dun NA, Förstermann U. Endogenous and Exogenous Nitric Oxide Inhibits Norepinephrine Release From Rat Heart Sympathetic Nerves. *Circ Res*. 1995;77:841-848.
- (142) Gunneth CA, Lund DD, Chu Y, Brooks RM, Faraci FM, Heistad DD. Mechanisms of Inducible Nitric Oxide Synthase-Mediated Vascular Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1617-1622.
- (143) Gunneth CA, Lund DD, Chu Y, Brooks RM, Faraci FM, Heistad DD. NO-Dependent Vasorelaxation Is Impaired After Gene Transfer of Inducible NO-Synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1281-1287.