

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

- Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl -

---

**Einfluss von Östrogen und Gestagen auf  
Endothelfunktion und Blutdruckregulation  
bei ovariectomierten Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät der

Julius – Maximilians -Universität Würzburg

vorgelegt von

Jan Michael Wilimsky

aus Bad Königshofen i. Grabfeld

Würzburg, im Juli 2007







Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

- Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl -

---

**Einfluss von Östrogen und Gestagen auf  
Endothelfunktion und Blutdruckregulation  
bei ovariectomierten Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät der

Julius – Maximilians -Universität Würzburg

vorgelegt von

Jan Michael Wilimsky

aus Bad Königshofen i. Grabfeld

Würzburg, im Juli 2007

Referent: Prof. Dr. med. C. Wanner

Korreferent: Prof. Dr. med. K. Schuh

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2008

Der Promovend ist Arzt

*Meinen Eltern,  
meinem Bruder  
und  
meinen Großeltern  
gewidmet*



Herrn PD Dr. med. T. Quaschnig  
danke ich sehr herzlich für die  
Überlassung des Themas, seine  
Anregungen und für seine stets  
engagierte Unterstützung bei der  
Durchführung meiner Arbeit.



## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
	<b>1.1 Einführung in die Thematik und Fragestellung</b>	<b>1</b>
	<b>1.2. Morphologie und Physiologie der Blutgefäße</b>	<b>3</b>
	1.2.1 Blutgefäßmorphologie	3
	1.2.2 Glatte Gefäßmuskelzellen	4
	1.2.3 Endothelfunktion	6
	1.2.4 Gefäßtonus - hormonale und nervale Regulation	7
	1.2.5 Mediatoren der Vasodilatation	8
	Stickstoffmonoxid	9
	Acetylcholin	10
	Natrium-Nitroprussid	11
	1.2.6 Mediatoren der Vasokonstriktion	11
	Norepinephrin (NE)	11
	Endothelin-1 (ET-1)	12
	<b>1.3 Die Familie der Endotheline und ihre physiologische Bedeutung</b>	<b>12</b>
	1.3.1 Die Endothelin-Isoformen	12
	1.3.2 Die Endothelin-Rezeptoren	14
	<b>1.4. Hypertonie: Einteilung und Pathophysiologie</b>	<b>17</b>
	1.4.1 Einteilung der Hypertonie	17
	1.4.2 Rolle von Endothelin-1 in der Pathogenese der Hypertonie	18
<b>2.</b>	<b>Materialien</b>	<b>19</b>
	<b>2.1 Geräte</b>	<b>19</b>
	<b>2.2 Versuchslösungen und -substanzen</b>	<b>19</b>
	2.2.1 Krebs-Henseleit-Puffer	21
	2.2.2 Anästhetika	21
	2.2.3 Vasoaktive Substanzen	22
	<b>2.3 Versuchstiere</b>	<b>23</b>
	<b>2.4 Sonstige Materialien</b>	<b>24</b>

<b>3.</b>	<b>Methodik</b>	<b>25</b>
	<b>3.1 Anordnung des Versuches</b>	<b>25</b>
	3.1.1 Organkammeraufbau	25
	3.1.2 Tiergruppen	27
	<b>3.2 Ablauf des Versuches</b>	<b>27</b>
	3.2.1 Anästhesie der Ratten	27
	3.2.2 Präparation der Gefäße	27
	3.2.3 Fixation der Gefäße im Organbad	28
	3.2.4 Versuchsdurchführung im Organbad	28
	<b>3.3 Statistik</b>	<b>31</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
	<b>4.1 Relaxationen</b>	<b>32</b>
	4.1.1 Endothel-abhängige Reaktionen	32
	4.1.2 Endothel-unabhängige Reaktionen	35
	<b>4.2 Kontraktionen</b>	<b>36</b>
	4.2.1 Kontraktion auf Norepinephrin	36
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>47</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>49</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>50</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik und Fragestellung

Erkrankungen des Herz – Kreislaufsystems führen seit Jahren die Liste der Todesursachen in den westlichen Industrieländern und in Mitteleuropa an. Annähernd 50 % der Krankenhauseinweisungen sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen. Faktoren, wie unter anderem das Geschlecht, Alter (1;2), arterielle Hypertonie (3;4), Diabetes mellitus (5), Adipositas und Nikotinabusus (6) begünstigen hierbei atherosklerotische Veränderungen. Diese Faktoren werden als Risikofaktoren für die Entstehung von Gefäßkrankheiten und deren morphologische Korrelate angesehen (7). Die hohe Morbidität dieser Krankheiten ist auf die weite Verbreitung der oben genannten Risikofaktoren in der Gesamtbevölkerung zurückzuführen. Zudem liegen oft multiple Risikofaktoren bei einzelnen Personen vor. Die durch die Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems langfristig verursachten Endorganschädigungen bedingen auch eine hohe Mortalität. Aus diesem Grund gilt die arterielle Hypertonie, obgleich sie an sich bei den meisten Personen keine subjektiven Beschwerden verursacht, als Risikofaktor für Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Apoplex, Myokardinfarkt und terminales Nierenversagen. In den letzten Jahren wurde die Forschung auf dem Gebiet zellulärer bzw. molekularer Wechselwirkungen stark forciert. Aus diesem Grund hat das Wissen über kardiovaskuläre Erkrankungen und deren Ursachen, sowie auch das Verständnis ihrer Komplexität stark zugenommen (8;9). Die Regulationsfunktionen, welche das Endothel physiologischer Weise im kardiovaskulären System übernimmt, sind vielfältig und wurden in zahlreichen Studien untersucht (10). Hierbei zeigte sich, dass der Gefäßtonus einerseits durch zirkulierende Hormone und durch das vegetative Nervensystem beeinflusst wird, andererseits jedoch auch durch Faktoren mitbestimmt wird, die vom Endothel aktiv freigesetzt werden (Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1) (11;12).

Bei der arteriellen Hypertonie, aber auch anderen kardiovaskulären Erkrankungen, zeigt sich eine morphologische und funktionelle Veränderung einzelner Endothelzellen (13) sowie eine Beeinflussung des gesamten Endothels (14;15). Kommt es nun zur Beeinträchtigung oder Verletzung einzelner Endothelzellen oder des Endothels an sich, so resultiert daraus eine endotheliale Dysfunktion (16). Diese Funktionsstörung ist durch eine qualitativ und/oder quantitativ abweichende Reaktion der Gefäße auf vasoaktive Substanzen (z. B. Acetylcholin (17), Bradykinin (18)) nachweisbar. Eine Fehlfunktion des Gefäßendothels kann sich einerseits in einer veränderten Gefäß-Relaxation als auch in einer Gefäß-Kontraktion manifestieren. Wichtige Mediatoren der Vasomotion sowohl bei gesunden Personen, wie auch bei Personen mit kardiovaskulären und renalen Erkrankungen, sind neben zahlreichen anderen Transmittern (19;20;21) relaxierend wirkendes Stickstoffmonoxid (22), welches Endothel-abhängig freigegeben wird, und auch vasokonstriktorisches Endothelin-1 (23;24).

Derzeit sind drei Endothelin-Isoformen bekannt: Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). Die Zellen des Gefäßendothels produzieren in einem mehrstufigen Prozess hauptsächlich ET-1 (25), ein 21-Aminosäurepeptid, welches den zurzeit stärksten bekannten Vasokonstriktor darstellt. Die Wirkung von Endothelin wird über mindestens zwei verschiedene Endothelinrezeptoren, den Endothelin<sub>A</sub>- (ET<sub>A</sub>) und den Endothelin<sub>B</sub>- (ET<sub>B</sub>) Rezeptor vermittelt (26;27). In letzter Zeit wurden Substanzen entwickelt, welche die Wirkung von Endothelin am Rezeptor hemmen können (28). Mit Hilfe dieser Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ET-RA) wurde in mehreren Studien die Bedeutung der Endothelin-Rezeptoren bei der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen näher untersucht. Die exakte Funktion dieser Rezeptoren am Endothel in bezug auf die Pathogenese der Hypertonie ist jedoch bis heute nicht eindeutig erklärt. Zudem weiß man auch schon seit einigen Jahren, dass Östrogene einen wichtigen protektiven Einfluss auf die Funktion des Endothels ausüben (29). Gestagene, wie das in diesem Tiermodell verwendete Methyl-Progesteron-Acetat (MPA) hingegen, zeigen diesen Endothel - protektiven Effekt nicht.

In der vorliegenden Arbeit sollte am Tiermodell der Einfluss östrogen- und progesteron-haltiger Substanzen auf das Endothel und damit die Blutdruckregulation, und zusätzlich die Bedeutung des ET-B Rezeptors für die Endothelfunktion und die Blutdruckregulation näher untersucht werden. Als Versuchstiere wurden ovariectomisierte weibliche Wistar-Ratten eingesetzt, welche mit Ethinylöstradiol und Aldosteron angereichertes Futter erhielten, und welchen zusätzlich entweder Spironolacton, Drospirenon oder MPA subkutan appliziert wurde. Die Funktion des Endothels wurde durch Messung der isometrischen Spannungsänderung in der Organkammer – induziert durch vasoaktive Substanzen - charakterisiert.

## 1.2 Physiologie der Blutgefäße

### 1.2.1 **Blutgefäßmorphologie**

Je nach Lage der Blutgefäße im Systemkreislauf und auf Grund ihrer unterschiedlichen Funktionen als arterielle, venöse und kapilläre Gefäße, ist ihr Aufbau unterschiedlich. Histologisch kann man den Aufbau der Gefäße grundsätzlich in drei Schichten unterteilen. Von der Gefäßinnenseite her beginnend spricht man von der Tunica intima (Intima), der Tunica media (Media) und der Tunica externa oder auch Tunica adventitia (Adventitia) genannt.

Die Intima besteht von der Gefäßaußenseite zur -Innenseite gesehen aus der Basalmembran, der Membrana elastica interna und dem einschichtigen Endothel. Dieses kleidet die Gefäßwand auf deren Innenseite und damit zum zirkulierenden Blut hin vollständig aus.

Die Media besteht zum größten Teil aus glatten Muskelzellen, zwischen denen unterschiedliche Mengen Kollagen, Elastin und Proteoglykane eingelagert sind. Je nach Lage und Funktion des Gefäßes im Systemkreislauf ist das Verhältnis zwischen Muskelmasse und elastischem Gewebe unterschiedlich. In großen

Gefäßen findet man dann im Anschluss an die Media häufig eine Membrana elastica externa, welche die Media von der Adventitia trennt.

Die Hauptaufgabe der Außenschicht (Adventitia) ist es, das Gefäß im umliegenden Gewebe fest zu verankern. Sie besteht zum größten Teil aus den Bindegewebsfasern Elastin und Kollagen. Zusätzlich findet man hier jedoch auch vegetative Fasern zur Steuerung des Gefäßtonus und kleinste Gefäße zur Eigenversorgung des Blutgefäßes.

### **1.2.2 Glatte Gefäßmuskelzellen**

Wie oben schon beschrieben, enthält die Tunica media je nach Lage und Funktion des Gefäßes im Blutkreislauf eine unterschiedliche Anzahl von glatten Muskelzellen. Diese Zellen sind spindelförmig, haben eine Größe von ca. 50 – 400 µm und eine Dicke von ca. 2 – 10 µm. Untereinander verbunden sind die einzelnen Muskelzellen durch so genannte Desmosomen (spezielle Zellkontakte), wodurch aus den einzelnen Muskelzellen ein untereinander stark verknüpftes Netzwerk entsteht.

Eine Kontraktion erfolgt, ähnlich wie im Skelettmuskel, durch den so genannten Gleitfilamentmechanismus. Im Gegensatz zum Skelettmuskel ist dieser Mechanismus in den Gefäßmuskelzellen jedoch viel langsamer und benötigt auch viel weniger Energie. Dies ist insofern vorteilhaft, da aus diesem Grund die Gefäßmuskelzelle gerade für ausdauernde Haltefunktionen sehr gut geeignet ist. Das Membranpotential einer glatten Muskelzelle in Ruhe liegt etwa bei –60 Millivolt (mV). Zur Kontraktion einer Muskelzelle kommt es, wenn es zu einer Depolarisation der Zellmembran kommt. Dies geschieht entweder durch im Blut zirkulierende Hormone oder durch Transmitter, welche aus den Nervenendigungen freigesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit der Auslösung einer Muskelkontraktion ist eine spontane Depolarisation der Zellmembran. Bei diesen Vorgängen spielt die freie Calciumionenkonzentration im Zytosol einer jeden Muskelzelle eine wichtige Rolle. Normalerweise beträgt die intrazelluläre Calciumkonzentration in Ruhe ca.  $10^{-7}$  mol/l. Für eine Kontraktion benötigt die Zelle eine Calcium-Quelle. Im Falle einer Muskelkontraktion steigt die

intrazelluläre Calcium-Konzentration durch zwei wesentliche Mechanismen auf etwa 0,5–1  $\mu\text{mol/l}$  an. Hierbei spielt neben dem sarkoplasmatischen Retikulum auch der Extrazellulärraum eine wichtige Rolle. Der Calcium-Einstrom erfolgt durch elektromechanische Koppelung während eines Aktionspotentials und durch lang andauernde Depolarisation der Zellmembran, bei der spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet werden. Als Folge von diesen Vorgängen strömen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vom Extra- in den Intrazellulärraum und in das Myoplasma. Andererseits kann eine pharmakomechanische Koppelung zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciums führen, dies wird durch Hormone, Pharmaka oder Neurotransmitter getriggert (30). Durch die Reaktion dieser Stoffe mit dem Membranrezeptor kommt es zur Öffnung rezeptorgesteuerter Calciumkanäle oder auch zur Bildung eines intrazellulären Botenstoffes, dem Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ). Dieser entsteht gleichzeitig mit Diacylglycerol (DAG) aus Phospholipiden der Zellmembran durch Einwirkung des Enzyms Phospholipase C.  $\text{IP}_3$  setzt nun aus dem sarkoplasmatischen Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  frei, womit die Konzentration an Calcium-Ionen im Zytosol ansteigt. Der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und zusätzlich die Reaktionsfähigkeit der Myofilamente gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  ist entscheidend für den Tonus der glatten Muskelzellen.  $\text{Ca}^{2+}$  bindet hierbei an Kalmodulin. Der entstandene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kalmodulin-Komplex ist für die Aktivierung eines weiteren Enzyms verantwortlich, welches schlussendlich die leichten Ketten des Myosins phosphoryliert. Diese reagieren mit Aktin und es entstehen Myosinquerbrücken, welche unter Adenosintriphosphat (ATP)-Spaltung zyklisch tätig werden und so die Kontraktion auslösen.

Der Muskel erschlafft, sobald die elektrische Aktivität endet und die Zellmembran re- oder hyperpolarisiert. Eine Relaxation können zudem bestimmte Hormone, Pharmaka und Neurotransmitter bewirken, und zwar einerseits durch Öffnen von Kaliumkanälen, wodurch eine Hyperpolarisation entsteht, andererseits durch eine Konzentrations-Erhöhung zyklischer Nukleotide (zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP)) im Zytosol. Zyklisches Adenosinmonophosphat und zyklisches Guanosinmonophosphat sind beide sekundäre Botenstoffe, wobei cAMP G-Protein-vermittelt durch Aktivierung der

Adenylatzyklase aus ATP entsteht, cGMP hingegen unter Einwirkung von Stickstoffmonoxid (NO), welches vom Gefäßendothel sezerniert wird. Beide Botenstoffe haben eine relaxierende Wirkung auf die glatten Muskelzellen. Erstens fördern sie eine Rückresorption der Calcium-Ionen ins sarkoplasmatische Retikulum, und zweitens hemmen sie die Aktivität der Myosinkinase dadurch, dass sie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente herabsetzen.

### 1.2.3 Endothelfunktion

Das gesamte Blutgefäßsystem des Körpers ist mit einem einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Alle Endothelzellen bilden somit einen zusammenhängenden Zellverband, der im Körper eines Erwachsenen aus etwa  $6 \times 10^{23}$  Zellen besteht, ca. 1,5 kg Gewicht ausmacht und ungefähr einer Fläche von  $5000 \text{ m}^2$  entspricht.

Das Endothel hat einerseits die Aufgabe, den Blutfluss zu kanalisieren und dient hierbei als mechanische Barriere zwischen dem flüssigen Blut mit seinen zellulären Bestandteilen und den übrigen Gefäßschichten (31). Zum anderen hat es eine wichtige Funktion bei der Abwehr potentiell schädlicher Einflüsse, und bei der Modulation des Gefäßtonus und des Gefäßwachstums (31;32). Das Endothel schützt auch die glatten Gefäßmuskelzellen vor luminalem oxidativem Stress (33). Des Weiteren ist es auch an der Fibrinolyse, der Thrombozytenaktivierung und -inhibition und auch an der Monozytenadhäsion beteiligt (10). Die verschiedenen Mechanismen der Regulation und Interaktion zwischen Endothel, Gefäßmuskelzellen und zirkulierenden zellulären Bestandteilen sind erst in den letzten Jahren detailliert verstanden worden (34;35).

Eine weitere Funktion des Endothels ist die Fähigkeit bestimmte Substanzen zu sezernieren, welche entweder vasodilatierend (NO oder Prostazyklin) oder aber auch vasokonstriktorisch wirken (Thromboxane oder Endothelin-1) (13). Diese vom Endothel gebildeten Substanzen regulieren nicht nur den Blutdruck, sie nehmen zudem auch Einfluss auf die Adhäsion und Aggregation der

Blutplättchen. Des Weiteren macht man sie auch für die Entstehung und Progression von atherosklerotischen Gefäßveränderungen und Gefäßthromben mit verantwortlich.

Im gesunden Endothel liegt ein ausgewogenes Gleichgewicht dieser Regulationsmechanismen vor. Thrombozytenaggregation und Monozytenadhäsion wird unterdrückt, Migration und Zellproliferation glatter Muskelzellen werden unterbunden. Unter pathologischen Bedingungen, z.B. bei arterieller Hypertonie oder anderen kardiovaskulären Erkrankungen können diese Regulationsmechanismen jedoch außer Kontrolle geraten und die physiologische Balance kann nicht mehr aufrecht erhalten werden (36).

#### **1.2.4 Gefäßtonus – hormonale und nervale Regulation**

Der Tonus der Blutgefäße hängt vom Kontraktionszustand der Gefäßmuskelzellen ab und kann durch dessen Modulation variiert werden, was vor allem für eine adäquate Organperfusion entscheidend ist. Die großen herznahen Gefäße wandeln den pulsatilen Blutfluss mit Hilfe des Windkesselleffektes in einen gleichmäßigen, peripheren Fluss um. Für die Aufrechterhaltung eines konstanten peripheren Blutdrucks und die Regulation des Widerstandes in der Gefäß-Peripherie sind jedoch die kleinen Widerstandsgefäße verantwortlich. Gewährleistet wird dieser konstante periphere Blutdruck durch verschiedene Kontrollsysteme, deren Stellglied die Regulation der Weite der Gefäßlumina ist. So kann durch Dilatation oder Kontraktion der Blutgefäße der Blutdruck entweder gesenkt oder erhöht werden (37).

Die beteiligten Regulationsmechanismen sind einerseits lokalen Kontrollen unterworfen, wobei hierbei noch zwischen einer myogenen und einer metabolischen Autoregulation unterschieden wird. Auf der anderen Seite findet man systemische Rückkopplungskreisläufe, bei denen nervale und humorale Mechanismen unterschieden werden.

Der *myogene Kontrollmechanismus* wird auch als so genannter Bayliss-Effekt bezeichnet und besteht aus einer dehnungsinduzierten Kontraktion der Gefäßmuskelzellen.

Die *metabolische Autoregulation* nimmt Bezug auf die aktuelle Stoffwechsellage im durchbluteten Gebiet, und reagiert auf Änderungen der  $K^+$  - und  $H^+$  - Konzentration, des  $CO_2$  - und Sauerstoff ( $O_2$ ) – Partialdruckes und der Gewebeosmolarität. Eine weitere Rolle in der Regulation der Gefäßweite spielt das Adenosin (hauptsächlich in Herz, Skelettmuskel und Gehirn), welches beim Abbau von ATP gebildet wird, und vor allem dilatatorisch wirkt.

Das sympathische Nervensystem gilt als einer der systemischen Kontrollmechanismen (*nervale Kontrolle*), es innerviert vor allem Arterien und Arteriolen, und hält diese Gefäße auf diese Weise fortlaufend auf einem vasokonstriktorisches Grundtonus, der je nach Notwendigkeit entweder gesenkt oder gesteigert werden kann (38).

Im Rahmen der *humoralen Kontrolle* können verschiedene Hormone, die vom endokrinen System sezerniert werden, Einfluss auf den Tonus der Gefäße ausüben. Hierbei spielen vor allem Katecholamine, Kinine, Histamin und Prostaglandine eine wichtige Rolle. Ob die einzelnen Hormone eher gefäßdilatorisch oder – konstringierend wirken, ist von der Rezeptorbesetzung der einzelnen Organe abhängig, an denen die Hormone wirken.

### 1.2.5 Mediatoren der Vasodilatation

Schon vor mehr als 2 Jahrzehnten stellte man fest, dass an isolierten Blutgefäßen eine vasodilatatorische Wirkung nur eintritt, solange das Endothel vorhanden und unversehrt ist (17). Zu einer solchen Endothel-abhängigen Gefäßerweiterung können sowohl Neurotransmitter und von Trombozyten-sezernierte Substanzen, als auch bestimmte Hormone führen (17;39). Des Weiteren lösen eine Gewebshypoxie oder vom Blut induzierte Scherkräfte eine Endothel-abhängige Dilatation aus. Diese Mechanismen sind insbesondere bei Bluthochdruck oder in Situationen welche den Blutdruck ansteigen lassen,

entscheidend. Der für die Endothel-abhängige Vasodilatation verantwortliche Mediator ist das Stickstoffmonoxid (NO) (40;41;42).

### **Stickstoffmonoxid (NO):**

Der wichtigste Mediator für die Modulation der glatten Muskelzellen wird als Endothelin-derived-relaxing-factor (EDRF) (17) bezeichnet und ist als Stickstoffmonoxid identifiziert worden (22). NO wird von den Endothelzellen an die darunter liegenden glatten Muskelzellen abgegeben und besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von ca. 3-5 s. Die Bildung von NO erfolgt mit Hilfe der Enzymaktivität von NO-Synthasen (NOS) durch Oxidation aus der Aminosäure L-Arginin (43). Die NO-Synthase wirkt bei dieser Reaktion als Katalysator und kommt in verschiedenen Geweben (Hirn, Gefäßmuskel, Endothel, Thrombozyten) in unterschiedlichen Isoformen vor (44;45;46).

Die *induzierbare Form* wird hauptsächlich in den glatten Gefäßmuskelzellen, in den Gefäßendothelzellen und in Makrophagen exprimiert. Diese Form der NOS ist unabhängig von Calcium und ist imstande, sehr große Mengen an NO zu bilden. Induziert wird die NOS-Bildung durch Anwesenheit von Endotoxin, Interleukin-1b und TNF.

Die *konstitutionelle Form* der NO-Synthase liegt vor allem Zellmembran-gebunden vor, im Zytoplasma der Zellen ist die Konzentration eher niedrig (47). Eine Erhöhung des freien intrazellulären Calcium-Spiegels aktiviert die endotheliale NOS und führt hierüber zu einer Gefäßrelaxation. Diese Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels wird einerseits durch rezeptor-abhängige Transmitter wie Acetylcholin, Bradykinin und Substanz P vermittelt, andererseits durch von Thrombozyten-abhängigen Substanzen wie Thrombin und Adenosindiphosphat (ADP) (48). Ferner führen durch den zirkulierenden Blutfluss entstehende Scherkräfte, und  $\text{O}_2$ -Mangel bzw. Hypoxämie und Östrogene zu einer gesteigerten induzierbaren NO-Synthase-Aktivität (iNOS) (49). Hieraus entsteht dann schlussendlich auch eine Vasodilatation.

Endothelzellen sezernieren das gebildete NO sowohl luminal als auch abluminal. In die Blutbahn freigesetzt wirkt NO als Thrombozytenaggregations-

hemmer (43). Abluminal erfolgt eine dauerhafte basale Sekretion aus den intakten Endothelzellen, wodurch eine dauerhafte Vasodilatation entsteht. Diese Gefäßerweiterung erfolgt durch Diffusion von NO aus den Endothelzellen hin zu den glatten Gefäßmuskelzellen. Hierbei kommt es nach Aktivierung einer zytosolischen Guanylatzyklase, unter Bildung von cGMP und einer Abnahme des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels, zur lokalen Vasodilatation (50).

Die Bildung und Sekretion von NO kann durch eine „falsche“ Aminosäure, nämlich L-M-Monomethylarginin (L-MNNA) oder L-Nitroargininmethylester (L-NAME) kompetitiv gehemmt werden (51). Zusätzlich zu Stickstoffmonoxid werden in den Endothelzellen auch noch andere vasodilatierende Substanzen wie z.B. Prostacyclin gebildet, jedoch ist NO mit Abstand der bedeutendste Vasodilatator (52).

### **Acetylcholin (Ach):**

Acetylcholin wirkt an zahlreichen Nervenendigungen als physiologischer Neurotransmitter und besitzt hier die Fähigkeit ankommende Aktionspotentiale auf das nächste Neuron zu übertragen oder Erregungsantworten zu modulieren. Diese Eigenschaft übt Acetylcholin vor allem an allen prä- und einigen postganglionären effektorischen Synapsen des Sympathikus aus, zusätzlich dient es auch an den effektorischen Synapsen des Parasympathikus und an den motorischen Endplatten der Muskulatur als Überträgerstoff (Transmitter). Acetylcholin wird durch die Cholinacetylase gebildet und danach in präganglionären Vesikeln gespeichert. Bei ankommenden Aktionspotentialen entleeren sich diese Vesikel in den synaptischen Spalt, und das Acetylcholin bindet an nikotinerge und/oder muskarinerge Rezeptoren des Endorgans, wo es verschiedene Ionenkanäle in der Membran verändert. Die Wirkung des Acetylcholin wird durch hydrolytischen Abbau mittels der Acetylcholin-Esterase beendet. Neben der Vermittlung einer Vasodilatation mit einhergehender Senkung des Blutdruckes, kann Acetylcholin außerdem eine Bronchokonstriktion, eine Tonussteigerung im Darm oder eine Steigerung der

Drüsensekretion bewirken. Zusätzlich sind auch noch negativ inotrope und chronotrope Wirkungen am Herzen nachgewiesen worden.

### **Sodium-Nitroprussid (SNP):**

Sodium-Nitroprussid, eine anorganische, sehr stark lichtempfindliche Komplexverbindung, bewirkt vor allem an arteriellen Widerstands- und an venösen Kapazitätsgefäßen durch direkte Freisetzung von Stickstoffmonoxid eine starke Gefäßerweiterung. Klinischen Einsatz findet die Substanz vor allem in der Therapie des akuten Bluthochdruckes. Hierbei wird dem Patienten eine Infusionslösung injiziert, um eine schnelle Blutdruck-Senkung zu erreichen. Wichtig ist hierbei die genaue Menge der injizierten Substanz, da die Wirkung von SNP streng dosisabhängig, und auch die Wirkungsdauer sehr kurz ist. Interessant ist, dass im Körper aus Sodium-Nitroprussid nicht nur NO freigesetzt wird, sondern auch Cyanid-Ionen, wodurch es bei Überdosierung, durch Überlastung der Rhodanid-Synthetase, zu einer Cyanid-Vergiftung im Körper kommen kann.

### **1.2.6 Mediatoren der Vasokonstriktion**

Außer den soeben beschriebenen Substanzen mit vasodilatierender Wirkung, produziert das Endothel auch Substanzen mit gegensätzlicher, also vaso-konstriktorischer Wirkung. Hierzu zählen neben den Endothelinen das Angiotensin-Converting-Enzym, sowie Thromboxane und Prostaglandine.

### **Norepinephrin (NE):**

Norepinephrin ist das pharmakologische Pendant zum Noradrenalin (NA), welches man zu den Neurotransmittern des Sympathikus und zu den Katecholaminen zählt. Die Bildung von NA erfolgt neben den Ganglienzellen des Sympathikus auch in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks. Hier erfolgt auch die Bildung von Adrenalin. Synthetisiert wird Noradrenalin über

verschiedene Zwischenstufen aus der essentiellen Aminosäure L-Thyrosin. Der Unterschied zum Adrenalin besteht im Fehlen einer Methylgruppe an der Aminogruppe, wodurch die Wirkung von NA schwächer als die von Adrenalin ist, und zum Teil auch gegensätzliche Wirkungen auftreten.

Noradrenalin steigert den Blutdruck, und zwar sowohl systolisch als auch diastolisch durch Kontraktion der Gefäßmuskelzellen und somit mittels Verengung der Widerstands-Gefäße. Diese Verengung wird über  $\alpha_1$ -Rezeptoren vermittelt, welche über ein G-Protein die Phospholipase C aktivieren. Intrazellulär erfolgt ein Anstieg von  $IP_3$  und DAG, worauf der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Spiegel ansteigt der letztendlich die Kontraktion auslöst.

### **Endothelin-1:**

Endothelin-1 ist der stärkste bekannte Vasokonstriktor (53). Es ist ein von den Endothelzellen sezerniertes Oligopeptid und entfaltet seine kontraktile Wirkung über spezifische Endothelin-Rezeptoren.

## **1.3 Die Endothelin-Familie und ihre physiologische Bedeutung**

### **1.3.1 Die Endothelin-Isoformen**

1985 konnte erstmals eine Substanz nachgewiesen werden, welche eine starke vasokonstriktorische Aktivität zeigte, und welche nachweislich aus den Endothelzellen stammte (23;24). Im selben Jahr wurde diese Substanz von japanischen Wissenschaftlern aus Gefäßzellen isoliert und identifiziert. Es handelte sich um ein Peptid aus 21 Aminosäuren, und wurde Endothelin genannt (54).

Mittlerweile weiß man, dass zu dieser Endothelin-Familie vier verschiedene 21-Aminosäure Peptide gehören:

**Endothelin-1:**

ET-1 stellt die dominierende Isoform bei Säugetieren dar (25;57). ET-1 ist der stärkste bisher bekannte Vasokonstriktor in vivo (53) und auch der einzige Vertreter aus der Endothelin-Familie, der im Gefäßendothel selber synthetisiert wird (58). ET-1 unterliegt einer Bedarfsproduktion, d.h. es wird weder „auf Vorrat“ gebildet noch wird es in Speichervesikeln gelagert (59). Einfluss auf die Synthese von ET-1 haben Hypoxie (60), Vasokonstriktoren (61;62), Wachstumsfaktoren (63), pH-Wert (64), Zytokine (65) und Adhäsionsmoleküle (66). Diese Faktoren induzieren die Transkription von ET-1-m-RNA und somit auch die Neusynthese und Ausschüttung von ET-1. Zunächst werden mehrere Vorstufen (Prepro-Endothelin, Big-Endothelin) gebildet, im Anschluss kommt es zur Abspaltung und Bildung des ET-1 durch ein Endothelin-Converting-Enzym (67). Einen hemmenden Einfluss auf die Neubildung von ET-1 haben Östrogene (68), NO (69), Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) (70) und Prostacycline (71).

Die Sezernierung von ET-1 erfolgt in ca. 80 % zur abluminalen Seite, also auf die glatte Gefäßmuskulatur hin gerichtet (72). Hier bindet das ET-1 an spezifischen Rezeptoren und induziert eine Vasokonstriktion. Da ET-1 fast ausschließlich nach Bedarf synthetisiert wird, bewegt sich die basale physiologische Konzentration von ET-1 im Serum im pikomolaren Bereich. Man spricht deshalb bei ET-1 von einem parakrinen Hormon. Der Abbau von ET-1 erfolgt nach Wiederaufnahme des Hormons in die Zellen durch neutrale Endopeptidasen vorwiegend in der Lunge (73), zum geringen Teil auch in Leber und Nieren (74;75).

Die Plasmazirkulations-Halbwertszeit von ET-1 ist sehr sehr kurz und beträgt nur ca. 3 Minuten (76), was auf die schnelle rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zellen zurückzuführen ist. Trotz der kurzen Halbwertszeit hält die Wirkung des Peptides deutlich länger an. Dies wird auf einen so genannten Post-Rezeptor-Effekt zurückgeführt, der genaue Mechanismus ist jedoch gegenwärtig noch nicht vollständig verstanden. Durch die Möglichkeit zur raschen Produktion und Sezernierung sowie die kurze Halbwertszeit kann das Gefäßendothel innerhalb

von wenigen Minuten auf Schwankungen des Blutdruckes reagieren und den Gefäßtonus an die lokalen Bedingungen anpassen.

Weitere Bildungsorte für ET-1 sind neben den Gefäßendothelzellen auch noch Astrozyten und Neuronen im ZNS, Mesangialzellen in der Niere, Hepatozyten, Sertoli-Zellen des Hodens und Epithelzellen in der Brust (77;78).

### **Endothelin-2:**

Im Gegensatz zum ET-1 kann man dem Endothelin-2 nach heutigem Wissensstand keine genaue Funktion zuordnen. Produziert wird es vor allem in den Nieren (79) und im Darm, sehr viel geringer ist die Produktion im Myokard, im Uterus und in der Plazenta.

### **Endothelin-3:**

Dieses Peptid konnte in sehr hohen Konzentrationen im ZNS (80) nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass es für die Entwicklung und Proliferation von Neuronen und Astrozyten verantwortlich ist. Weitere Nachweissorte sind der Gastrointestinaltrakt, die Lunge und die Nieren (79).

### **Endothelin-4:**

Endothelin-4 (ET-4) kommt nur bei Mäusen und Ratten als intestinaler Vasokonstriktor vor und verhält sich korrespondierend zum humanen ET-2 (55;56).

## **1.3.2 Die Endothelin-Rezeptoren**

Die oben beschriebenen Peptide vermitteln ihre Wirkungen über spezifische Rezeptoren. Diese sind seit Anfang der 90er Jahre bekannt; es handelt sich um zwei unterschiedliche Rezeptortypen, den ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptor (26;27).

In den folgenden Jahren konnte dann nachgewiesen werden, dass diese zwei unterschiedlichen Endothelin-Rezeptoren in vielen Spezies exprimiert werden (26;27;81;82).

Endothelin-Rezeptoren bestehen aus sieben Transmembran-Domänen, welche an der Membraninnenseite an G-Proteine gekoppelt sind. Die zwei verschiedenen Rezeptorsubtypen werden in verschiedenem Gewebe unterschiedlich stark exprimiert.

ET<sub>A</sub>-Rezeptoren befinden sich vor allem an Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (83). An diesen Rezeptoren erfolgt die Bindung von ET-1 und ET-2 mit einer hundertfach höheren Affinität als die Bindung von ET-3 (84).

Die ET<sub>B</sub>-Rezeptoren sind dagegen nur in sehr geringem Umfang an den glatten Muskelzellen lokalisiert, sie werden hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert (83). Die Bindungsstärke an ET<sub>B</sub>-Rezeptoren ist im Gegensatz zum ET<sub>A</sub>-Rezeptor für alle drei Endotheline gleich hoch (84).

ET<sub>A</sub>-Rezeptoren haben einen entscheidenden Einfluss auf die Vasokonstriktion (23;25;26), und Zellproliferation (85). Durch die Bindung von ET-1 an den ET<sub>A</sub>-Rezeptor kommt es über G-Proteine zur Aktivierung der Phospholipase C. Phospholipase-C-vermittelt erhöht sich IP<sub>3</sub> und das intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>, wodurch die Kontraktion der Gefäßmuskelzellen sehr lang anhält (23;25;86). Zusätzlich zum IP<sub>3</sub> kommt es auch zu einer Aktivierung von DAG, wodurch die Proteinkinase C stimuliert wird und auf diese Weise den zellproliferativen Effekt von ET-1 vermittelt (87).

Die Kontraktion kann jedoch verkürzt oder unterdrückt werden, indem man Stickstoffmonoxid (NO) zugibt, welches den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel schnell abfallen lässt (88).

ET<sub>B</sub>-Rezeptoren spielen vor allem bei der Modulation des Gefäßwiderstandes, bei der Natriurese, bei der Leberfunktion und bei neuronalen Aktivitäten eine entscheidende Rolle. In den Zellen dieser Gewebe kommt es verstärkt zur Expression dieses Rezeptortyps (89;90;91;92). Vor allem am Endothel und an der Tunica media von Blutgefäßen konnten diese Rezeptoren nachgewiesen werden (83). Die Bindung von ET-1 an diesen Rezeptortyp bewirkt nun im Gegensatz zum ET<sub>A</sub>-Rezeptor eine Vasodilatation, und zwar auf Grund der

Freisetzung von NO, Prostacyclin und Adrenomedullin (93;94;95). Die Vasodilatation entsteht bei NO cGMP-, bei Prostacyclin cAMP-vermittelt. Stickstoffmonoxid spielt zudem als physiologischer Antagonist in Hinsicht auf den Gefäßtonus zu ET-1 eine wichtige Rolle (96). Außerdem wirkt es hemmend auf die Synthese von ET-1. Nachgewiesen wurde auch eine Hemmung der Expression des Endothelin-Converting-Enzyms (ECE) durch NO in den Endothelzellen (97).

Eine weitere wichtige Funktion des ET<sub>B</sub>-Rezeptors ist die der Wiederaufnahme des ET-1 in die Zellen des Gefäßendothels (98), insbesondere in der pulmonalen Zirkulation (99). Die Hauptclearance von ET-1 erfolgt in der Lunge, da sich hier ungefähr die Hälfte des gesamten Endothels des Gefäßbaumes des Menschen befindet. Somit findet man hier auch die größte Dichte an ET<sub>B</sub>-Rezeptoren. Weitere Organe, die an der Clearance von ET-1 mitwirken, sind Niere und Milz. Vor allem die Aktivität der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren ist entscheidend für die Regulation des Plasmaspiegels von ET-1. Dies wird auch durch die Beobachtung bestätigt, dass es nach Gabe von L-NAME zu einem Anstieg von zirkulierendem ET-1 kommt (100).

Physiologischerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen Produktion und Clearance von ET-1, sodass eine Balance zwischen vasokonstriktorisches (ET<sub>A</sub>-vermittelt) und vasodilatatorisches (ET<sub>B</sub>-vermittelt) Wirkungen besteht (101).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der ET<sub>B</sub>-Rezeptor als wichtiger Modulator bei der Aufrechterhaltung des systemischen Blutdruckes und des totalen peripheren Widerstandes fungiert (89;100;102;103).

In zahlreichen experimentellen Tierstudien konnte die Bedeutung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors bestätigt werden, z.B. wurde durch Gabe eines Antagonisten des ET<sub>B</sub>-Rezeptors ein signifikanter Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes und auch ein höherer ET-1-Plasmaspiegel nachgewiesen (100).

Die Produktion von Endothelinen und Endothelin-Rezeptoren läuft physiologischerweise gleichmäßig und parallel nebeneinander ab. Fördernd auf die Expression von ET-1 und ET<sub>A</sub>-Rezeptoren wirken Hypoxie und Cyclosporine (77). Die Expression der ET<sub>A</sub>-Rezeptoren wird außerdem durch Östrogene,

cAMP und bestimmte Wachstumsfaktoren induziert. Gehemmt wird die Expression der ET<sub>A</sub>-Rezeptoren durch Endotheline, Angiotensin II (AT II) und Platelet Growthfaktor  $\beta$ .

Im Gegensatz dazu wird die Expression des ET<sub>B</sub>-Rezeptors durch C-type natriuretisches Hormon, AT II und bestimmte Wachstumsfaktoren induziert, die Hemmung der Expression des ET<sub>B</sub>-Rezeptors erfolgt durch cAMP und Katecholamine (104).

## 1.4 Hypertonie: Pathophysiologie - Einteilung

### 1.4.1 Einteilung der Hypertonie

Definitionsgemäß versteht man unter einer Hypertonie eine Druckerhöhung im arteriellen System des Kreislaufs. Der Blutdruck im Körper wird bestimmt durch Herzzeitvolumen (HZV) und totalen peripheren Widerstand (TPR). Das HZV ist das Produkt aus Herzfrequenz (HF) und Schlagvolumen. Pathophysiologisch gesehen ist eine Hypertonie die Folge eines erhöhten Herzzeitvolumens, eines erhöhten peripheren Widerstandes oder beider Faktoren.

Bei einer isolierten Erhöhung des HZV spricht man von einem hyperdynamischen Hochdruck. Dieser entsteht entweder als Folge einer gesteigerten Herzfrequenz oder eines erhöhten Extrazellulärvolumens.

Bei einem Anstieg des totalen peripheren Widerstandes handelt es sich um einen Widerstands-Hochdruck, der durch eine stark ausgeprägte Vasokonstriktion der arteriellen Widerstandsgefäße entsteht.

Man unterscheidet zwischen primärer (früher: essentieller) und sekundärer Hypertonie. Sekundären Hypertonien können renale (Nierenarterienstenose, Tumoren) oder endokrine (Conn-Syndrom, Cushing-Syndrom, Phäochromozytom) Ursachen zu Grunde liegen.

Ätiologisch zählen übermäßige Salzzufuhr, das Renin-Angiotensin-System und eine Regulationsstörung des sympathischen Nervensystems zu den wichtigsten

Faktoren. Zusätzlich können Faktoren wie die genetische Disposition und auch neurovaskuläre Anomalien die Ausbildung einer Hypertonie beeinflussen (105).

#### **1.4.2 Rolle von Endothelin-1 in der Pathogenese der Hypertonie**

Störungen der Endothelin-1 Homöostase sind auf vielfältige Weise an der Entstehung von Bluthochdruck beteiligt: Ein direkter Zusammenhang zwischen ET-1 und einem experimentell induzierten Bluthochdruck konnte mehrmals gezeigt werden (106;107;108;109;110;111;112). Des Weiteren konnte belegt werden, dass sich der Blutdruck bei Ratten, welche Angiotensin-II-Infusionen erhalten hatten, durch Gabe eines ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten wieder normalisiert hat (113;114).

Ferner ist bekannt, dass Östrogen-Applikation zu einer zunehmenden Wandsteifigkeit in großen Gefäßen wie z.B. der Aorta führt, und dass die vasodilatatorische Funktion des Endothels gesteigert wird (115).

Gestagene, wie das hier eingesetzte MPA führen jedoch nicht zu einer Antagonisierung der oben beschriebenen Effekte von Östradiol (116).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Östrogenen (Östradiol) und Gestagenen (MPA) bei ovariectomierten Ratten auf die Gefäße und auf das Endothel und dessen Reaktionen untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, welchen Einfluss eine orale Östrogen- und Aldosteronzufuhr, bei Applikation von entweder Drospirenon, Spironolacton oder Medroxy-Progesteron-Acetat (MPA) auf das Gefäßendothel und damit auch auf die Blutdruckregulation bei ovariectomierten Ratten hat.

## 2. Materialien

### 2.1 Geräte

Für die Experimente in der Organkammer fanden folgende Geräte

Verwendung:

Organbad 6 Kammern 10A-5306	isolierte Organ Apparatur, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Wärmebad	HAAKE B3, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Waagen	Sauter Feinwaage Typ 404/13, Kern & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland Chyo MP-3000, Kern & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland
Sonifikator	Bandelin Sonoplus GM70, Bandelin GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland

### 2.2 Versuchslösungen und -substanzen

#### 2.2.1 Krebs-Henseleit-Puffer

Zur Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers wurden folgende Substanzen verwendet:

NaCl	Natriumchlorid (M= 58,44g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid (M=110,99g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
KCl	Kaliumchlorid (M=74,85g/mol), Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat (M=136,09g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\text{NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat (M=84,01g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\text{MgSO}_4$	Magnesiumsulfat (M=120,4g/mol) Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$	Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) Titriplex (M=372,24g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	D(+)-Glucose-Monohydrat (M=198,17g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland

Die Herstellung der Stammlösungen mit den jeweiligen Substanzen folgte den in Tabelle 2.1 angegebenen Konzentrationsangaben. Dazu wurde die entsprechende Menge des Stoffes auf 5 Liter (l) mit 2fach destilliertem Wasser (Aqua bidest) aufgefüllt und bei 4°C gelagert.

### Stammlösungen

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

**Tab. 2.1:** Zusammensetzung der Stammlösungen mit den zugrunde liegenden Stoffmengen.

Zur Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers wurden die Stammlösungen, wie in Tabelle 2.2 angegeben gemischt, zusätzlich mit 250 mg EDTA und 50 g Glucose versetzt. Daraufhin mit Aqua bidest auf 25l verdünnt und schließlich für 30 Minuten (min) mit Carbogen, einem Gemisch aus 95% Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und

5% Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>), begast. Die Herstellung des Puffers erfolgte jeden Tag frisch.

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

**Tab. 2.2:** Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers mit den jeweiligen Anteilen der einzelnen Stammlösungen und Zusatzsubstanzen, insgesamt mit Aqua bidest aufgefüllt auf 25 l.

### 2.2.2 Anästhetika

Folgende Anästhetika wurden verwendet:

Rompun 2%	Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Ketavet	Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland
Metofane	Methoxyfluran, Janssen – Cilag GmbH, Neuss, Deutschland

Alle oben aufgeführten Präparate wurden bei 4°C gelagert

### 2.2.3 Vasoaktive Substanzen

An vasoaktiven Substanzen wurden folgende eingesetzt:

#### Vasokontrahierende Substanzen:

KCl	Kaliumchlorid (74,85g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
NE	Norepinephrin, Sigma –Aldrich CO, St. Louis MO, USA

#### Vasodilatierende Substanzen:

Ach	Acetylcholin Chloride, Sigma Diagnostics, St. Louis MO, USA
SNP	Nitroprussid-Na[Natrium-pentacyanonitrosylferrat(II)], Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland

Bei allen Substanzen - mit Ausnahme von SNP und KCl - wurde zu Beginn der Versuchsreihe jeweils eine einzige Stammlösung angesetzt ( $c(\text{mol/l})$ : Ach  $10^{-3}$ ; NE  $10^{-4}$ ), aliquotiert (Menge in  $\mu\text{l}$ : Ach 120; NE 120) und in Eppendorf-Cups bei  $-20^\circ\text{C}$  gefroren gelagert. SNP wurde täglich frisch in einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l angesetzt. Als Lösungsmittel diente Aqua bidest. An den jeweiligen Versuchstagen wurden dann, ausgehend von diesen Substanzmengen, die im Versuch verwendeten Verdünnungsreihen mit Krebs-Henseleit-Puffer als Verdünnungssubstanz angefertigt. Um eine Referenzkontraktion zu bestimmen (also die Vorkontraktion eines jeden Ringes) wurde eine 1 Molare KCl-Lösung (74,6 g/l Aqua bidest) hergestellt und im Wärmebad bei  $37^\circ\text{C}$  gelagert. Alle Angaben zu Substanzkonzentrationen beziehen sich auf die sich in den Organbädern befindenden endgültigen Konzentrationen.

### Inkubationssubstanzen:

Bei Teilen der Versuche sind die Gefäßringe vorinkubiert worden. Hierbei fanden folgende Substanzen Verwendung:

L-NAME	N $\omega$ -Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA; kompetitiver Hemmer der NO-Synthase
DICLO	Diclofenac, Cyclooxygenase- bzw. Prostaglandinsyntheseinhibitor,

L-NAME (c:  $10^{-4}$  mol/l) wurde täglich frisch mit Aqua bidest angesetzt. DICLO war schon vor Versuchsbeginn in der passenden Konzentration (c:  $10^{-5}$  mol/l) in Eppendorf-Cups bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert worden. Zum jeweiligen Versuchstag wurde immer eine frische Lösung verwendet, und am Ende des Versuchstages verworfen.

### 2.3 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden insgesamt 60 weibliche Wistar-Ratten (IFFA CREDO, Lyon, Frankreich) im Alter von 12 Wochen als Versuchstiere eingesetzt. Alle Tiere waren ovariectomiert und einseitig nephrektomiert.

Die Tiere wurden für die Dauer des Versuchs im Tierstall der Universitätsklinik Würzburg gehalten und dort für insgesamt 8 Wochen mit normalem Haltungsfutter (Altromin) gefüttert. Zusätzlich erhielten die Tiere  $17\beta$ -Östradiol in einer Dosierung von  $2\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  sowie Aldosteron in einer Konzentration von  $0,75\ \mu\text{g}/\text{h}$ , welches den Ratten über Minipumpen der Firma Alzet (Modell 2004) kontinuierlich infundiert wurde. Die Haltung erfolgte unter optimalen Haltungsbedingungen bei konstanter Temperatur ( $21^{\circ}\text{C}$ ), gleich bleibender Luftfeuchtigkeit (50 – 60 %) und Belüftung und auch unter einem konstanten Tag-Nacht-Rhythmus (je 12 h).

## 2.4 Sonstige Materialien

Zentrifugenröhrchen	100/16; Rundboden, Polystyrol glasklar RE 04, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland
Pipettenspitzen	PSG 1000 Pipettenspitzen gelb, Typ Eppendorf 1-100µl, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland PSB 1000 Pipettenspitzen blau, Typ Eppendorf 100 - 1000 µl, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland
Petrischalen	PP90, 94x16mm, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland
Eppendorfcups	RSL1 Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5ml, save lock, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Skalpellsklingen	SJ21 100 Skalpellsklingen steril, Megro GmbH Wesel, Deutschland
Spritzen	Omicam U-40 Insulin, 1ml, B Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland Omnifix-F Plus, 1ml, B Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland Injekt 2ml, luer, solo, B Braun AG, Melsungen, Melsungen, Deutschland
Tierfutter	1321 Haltungsfutter Ratten, Altromin GmbH, Lage, Deutschland
Aqua bidest	Ampuwa für Spülzwecke 10l, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H, Deutschland

### 3. Methodik

#### 3.1 Anordnung des Versuches

##### 3.1.1 Organkammeraufbau

Die Versuchsanordnung besteht aus einem Organbad, worin das zu untersuchende Gewebe enthalten ist, einem Kraftumwandler, welcher die Reaktionen des Gewebes in elektrische Signale umwandelt und schließlich einem Computer, an dem die Daten zusammenfließen und graphisch dargestellt werden können. Das Prinzip besteht darin, eine reaktive isometrische Spannungsänderung von muskelzellhaltigem Gewebe auf externe Stimuli zu messen.

Um zu gewährleisten, dass der gesamte Versuchsablauf, und somit auch die zu untersuchenden Gefäßringe, in einer annähernd physiologischen und konstanten Umgebung abläuft, wurden die Organkammern mit Krebs-Ringer-Henseleit-Lösung gefüllt, und mit Carbogen-Gas (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) belüftet. Zusätzlich wurden alle Organkammern auf einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten, und zwar durch ein die Organkammern umspülendes Wärmebad. So war es letztendlich möglich, die Versuche unter isoosmotischen, isohydrischen und isothermen Bedingungen durchzuführen.

In dieser Arbeit wurden die Kontraktion und Relaxation von Abschnitten der Aorta descendens bei ovariectomierten Ratten auf vasoaktive Substanzen untersucht und gemessen. Hierfür wurde die Aorta descendens vom umliegenden Bindegewebe befreit und in gleich lange Ringe (3mm) geschnitten. Die Gefäßringe wurden dann umgehend auf jeweils zwei triangelförmige Häkchen aufgefädelt, und schonend in der Organkammer so aufgehängt und vorgespannt (0,5 N), dass die Gefäßreaktion mit Hilfe eines Kraftumwandlers gemessen und auf dem Computer graphisch dargestellt werden konnte.

Bei den Versuchen sind sowohl Endothel-unabhängige als auch Endothel-abhängige Reaktionen induziert worden. Die Endothel-unabhängigen

Reaktionen wurden durch direkt an den Muskelzellen ansetzende Substanzen herbeigeführt, die endothel-abhängigen durch bestimmte Mediatoren, welche aus unversehrtem Endothel erst die Produktion der eigentlichen Überträgerstoffe induziert haben.

### 3.1.2 Tiergruppen

Die insgesamt 60 weiblichen, ovariectomierten Ratten wurden dem Zufallsprinzip folgend in 6 unterschiedliche Gruppen eingeteilt (G1 – G6). Alle Tiere wurden mit Haltungsfutter für Ratten (Altromin) gefüttert, zudem erhielten alle Gruppen  $17\beta$ -Östradiol in einer Dosierung von  $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  sowie Aldosteron, welches den Ratten über Minipumpen (Alzet, Modell 2004) mittels einer Dauerinfusion von  $0,75 \mu\text{g}/\text{h}$  injiziert wurde. Je nach Zuteilung zu einer einzelnen Gruppe wurde den Tieren noch zusätzlich Spironolacton  $20 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$  über das Trinkwasser verabreicht, Drospirenon (bestehend aus Ethinylöstradiol und Gestagen) in einer Dosis von 3, 9 oder  $30 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$  s.c. oder MPA  $3 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$  subkutan appliziert. Ethinylöstradiol wurde hierbei in EtOH aufgelöst und mit Hilfe von Erdnussöl, das als Trägersubstanz diente subkutan appliziert. Drospirenon und MPA wurden ebenfalls in EtOH aufgelöst und auch mittels s.c.-Injektion verabreicht. Hierbei diente Castoröl als Trägersubstanz. Die erste Gruppe der Tiere (G1) erhielt außer  $17\beta$ -Östradiol und Aldosteron keine weiteren Zusätze, und dient somit als Kontrollgruppe (Placebo). Zu Beginn der Versuchsreihe bestand jede Gruppe aus 10 Tieren. Während der Haltung verstarben insgesamt 7 Tiere. Aus diesem Grund ergab sich somit folgende Gruppeneinteilung:

Gruppe	Beschreibung der Tiere	n
G1 (Placebo)	Ovarektomie + 17 $\beta$ -Östradiol 2 $\mu$ g/kg/d+ Aldosteron 0,75 $\mu$ g/h	10
G2	Ovarektomie + 17 $\beta$ -Östradiol 2 $\mu$ g/kg/d + Aldosteron 0,75 $\mu$ g/h + Spironolactone 20 mg/kg/d s.c.	10
G3	Ovarektomie + 17 $\beta$ -Östradiol 2 $\mu$ g/kg/d + Aldosteron 0,75 $\mu$ g/h + Drospirenon 3 mg/kg/d s.c.	9
G4	Ovarektomie + 17 $\beta$ -Östradiol 2 $\mu$ g/kg/d + Aldosteron 0,75 $\mu$ g/h + Drospirenon 9 mg/kg/d s.c.	9
G5	Ovarektomie + 17 $\beta$ -Östradiol 2 $\mu$ g/kg/d + Aldosteron 0,75 $\mu$ g/h + Drospirenon 30 mg/kg/d s.c.	8
G6	Ovarektomie + 17 $\beta$ -Östradiol 2 $\mu$ g/kg/d + Aldosteron 0,75 $\mu$ g/h + MPA 3 mg/kg/d s.c.	9

**Tab. 3.1:** Übersicht über die unterschiedlichen Gruppen; n = Anzahl der Tiere

## 3.2 Ablauf des Versuches

### 3.2.1 Anästhesie der Ratten

Die Tiere wurden am Morgen des Versuchstages mit einem Transportkäfig aus dem Tierstall abgeholt. Kurz vor Versuchsbeginn wurden die Ratten aus dem Transportkäfig genommen, und mit einer intraperitonealen Injektion (1,5 ml) eines Gemisches aus Ketamin (1ml) und Rompun 2% (0,5ml) anästhesiert. Nun wurden die Ratten wieder in den Käfig zurückgesetzt, der Käfig abgedunkelt und man wartete, bis die Narkose einsetzte. Nachdem die Tiefe der Analgesie mittels Kompression der Pfotenspitzen überprüft wurde, erfolgte noch eine Antikoagulation mit 1 ml Heparin (5.000 IE/ml) intraperitoneal.

### 3.2.2 Gefäßpräparation

Die Versuchstiere wurden mit Hilfe von Pinzette und Schere thorako-abdominal eröffnet. Nach der Entfernung von Leber, Lunge und Ösophagus erfolgte die letale Exanguination durch Punktion des rechten Ventrikels. Nun erfolgte die Loslösung des Herzens von der ventralen Thoraxwand, und die Aorta

descendens wurde zugfrei, mit Hilfe der No-Touch-Technik (zur Schonung des Endothels), von der Wirbelsäule freipräpariert, und schließlich kurz vor der iliacaalen Bifurkation mit einer Schere abgesetzt. Das Gefäßstück wurde sofort nach der Entnahme in eine Petrischale mit Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung gegeben, welche durch Eis auf eine Temperatur von 4°C gekühlt wurde. Nun erfolgte unverzüglich eine Spülung der Aorta mit Heparin, anschließend eine Säuberung des Gefäßes vom umliegenden Bindegewebe mit Pinzette und Operationsschere. Dann wurde die Aorta mittels Skalpell in 3 mm breite Ringe geschnitten.

### **3.2.3 Fixation der präparierten Gefäßringe im Organbad**

Die einzelnen Gefäßringe wurden nun auf zwei triangelförmige Drahtgestelle aufgefädelt, diese wiederum an zwei Drahtaken befestigt, welche senkrecht im Organbad angeordnet waren (117;118;119). In den Organkammern wurden die Gefäßringe von Krebs-Henseleit-Puffer umspült, mit Carbogen begast und mit Hilfe des Wärmebades auf einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten (120).

Die beiden Haken waren jeweils mit einem Kraftumwandler verbunden, der die isometrische Spannung maß und mittels der Software „VitroDat Win“ graphisch darstellte.

### **3.2.4 Durchführung der Versuche**

Nach dem Einspannen der Gefäßringe in die Haltevorrichtungen (mit einem Ruhetonus von 0,5 g), wurden diese nun für 30 Minuten zur Anpassung an die Bedingungen im Organbad ruhen gelassen. Anschließend erfolgte eine schrittweise Erhöhung der Spannung um 0,5 g bis zu einer Spannung von 2 g (Ausgangsniveau für alle Versuche). Diese Vorspannung wurde in Vorversuchen ermittelt, um gemäß Frank-Starling-Mechanismus, ein für die maximale Muskelkontraktion optimales Längen-Spannungs-Verhältnis zu erhalten (121). Erst nach Erreichen dieses Zustandes besitzen die Gefäße ihr

volles Kontraktions- und Relaxationsvermögen, so dass nun nach Zugabe von vasoaktiven Substanzen standardisierte Daten über die Spannungsänderung des Gefäßabschnittes gewonnen werden können.

Um einen für jeden Gefäßring individuellen und standardisierten Referenzwert bezüglich der maximalen Kontraktion zu erhalten, wurden die Gefäße 2x mit 1000  $\mu$ l 1M Kaliumchlorid-Lösung inkubiert (120). Nachdem die Gefäße ihr jeweiliges Kontraktionsplateau erreicht hatten, (das heißt, es erfolgte keine weitere Steigerung der isometrischen Kontraktion), wurde dreimal mit Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung gespült, um wieder das Ausgangsniveau zu erreichen. Nach einer 30-minütigen Ruhephase erfolgte dann die zweite KCl-Kontraktion, die nach Erreichen eines Plateaus wiederum durch Spülen mit Krebs-Henseleit-Puffer beendet wurde. Falls die zweite KCl-Kontraktion deutlich ( $> 30\%$ ) über die erste Kontraktion hinausging, so wurde die KCl-Kontraktion so oft wiederholt, bis das Kontraktionsmaximum annähernd konstant blieb. Im Anschluss daran wurde den Gefäßen wiederum eine Ruhezeit von 30 Minuten gegeben.

Für die Versuche wurden die Gefäße entweder nativ eingesetzt, oder mit Substanzen vorinkubiert. Bei den nativ belassenen Gefäßen wurde der Einfluss von SNP, NE und Ach untersucht. Als Substanzen zur Vorinkubation wurden DICLO (c:  $10^{-5}$  mol/l) und L-NAME (c:  $10^{-4}$  mol/l) verwendet, die jeweils 30 Minuten vor Versuchsbeginn appliziert wurden. Die Zugabe der einzelnen Substanzen erfolgte nach vorher genau festgelegten Protokollen in die einzelnen Organbäder. Zwischen den unterschiedlichen Versuchen wurden die Organbäder jeweils dreimal mit Krebs-Henseleit-Puffer gespült um sicherzustellen, alle vorher zugegebenen Substanzen wieder ausgewaschen zu haben.

Zur Vorkontraktion der Gefäßringe vor Einsatz der Vasodilatoren wurde NE eingesetzt. Die NE-Vorkontraktion lag bei ca. bei 75-85 % der maximalen Kaliumchlorid-Kontraktion. Zur Evaluation der Gefäßkontraktion erfolgte die Zugabe von NE in aufsteigender Konzentration ( $10^{-10}$  bis  $10^{-4}$  mol/l), jeweils in logarithmischem Abstand einer halben Zehnerpotenz. Die Applikation der

nächsthöheren Konzentration durfte allerdings erst erfolgen, sobald sich ein Plateau – als Zeichen der Gefäßreaktion – ausgebildet hatte.

Als dilatierende Substanzen dienten Ach und SNP, welche nach Induktion der NE-Referenzkonzentration in aufsteigender Konzentration ( $10^{-10}$  bis  $10^{-5}$  für SNP,  $10^{-10}$  bis  $10^{-4}$  für Ach) zugegeben wurde. Die Zugabe erfolgte wiederum in logarithmischen Abständen einer halben Zehnerpotenz. Auch hier musste vor Zugabe der nächsthöheren Konzentration erst eine Plateaubildung abgewartet werden (119;122).

In Tabelle 3.2 sind die mit den Gefäßsegmenten durchgeführten Untersuchungen aufgelistet.

<b>Vorinkubations- substanzen</b>	<b>Ohne</b>	<b>Mit</b>	<b>Mit</b>
	<b>Vorinkubation</b>	<b>Vorinkubation</b>	<b>Vorinkubation</b>
<b>Substanz- verdünnungs- reihe (mol/l)</b>		<b>L-NAME</b> c: $10^{-5}$ mol/L 20 min	<b>Diclofenac</b> c: $10^{-5}$ mol/L 20min
<b>Ach, <math>10^{-10}</math>-<math>10^{-4}</math></b>	X	X	X
<b>SNP, <math>10^{-10}</math>-<math>10^{-5}</math></b>	X		
<b>NE, <math>10^{-9}</math>-<math>10^{-4}</math></b>		X	X

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

### 3.3 Statistik

Die Auswertung der Versuche erfolgte durch eine computergestützte Ermittlung der erzielten Gefäßantworten bei den entsprechenden Substratkonzentrationen. Die Angabe der Gefäßreaktion 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 Endothel-abhängige Relaxation auf Acetylcholin mehr als 50 % der Vorkontraktion auf Norepinephrin betragen, kamen für die Auswertung in Betracht. Entsprechend wurden jeweils 8 Tiere jeder Gruppe in die Datenanalyse einbezogen.

Zur Datenerfassung diente das Programm „VitroDat Win“ der Firma FMI Föhr Medical Instruments GmbH (Seeheim, Deutschland). Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) angegeben. Zur statistischen Analyse wurde die Sensitivität (pD<sub>2</sub>) der Gefäße auf die vasoaktiven Substanzen in Abhängigkeit als negativer Logarithmus der Konzentration angegeben, welche eine halbmaximale Kontraktion bzw. Relaxation ausgelöst hat. Die maximale Relaxation bzw. die maximale Kontraktion wurden unter Zuhilfenahme von MatLab Software (MatWorks, Natick, MA, USA) für jede Dosiswirkungskurve durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelt. Für den Vergleich zwischen zwei Werten kam der ungepaarte Students t-Test zur Anwendung.

Die graphische Darstellung der Gefäßreaktionen erfolgte in Form von Linien-Diagrammen mit zusätzlich dargestellter Standardabweichung der Mittelwerte unter Verwendung von SigmaPlot (Jandel Scientific Software 2001, San Rafael, CA, USA). Hierbei wurde ein p-Wert von <0,05 als signifikant betrachtet (123;124).

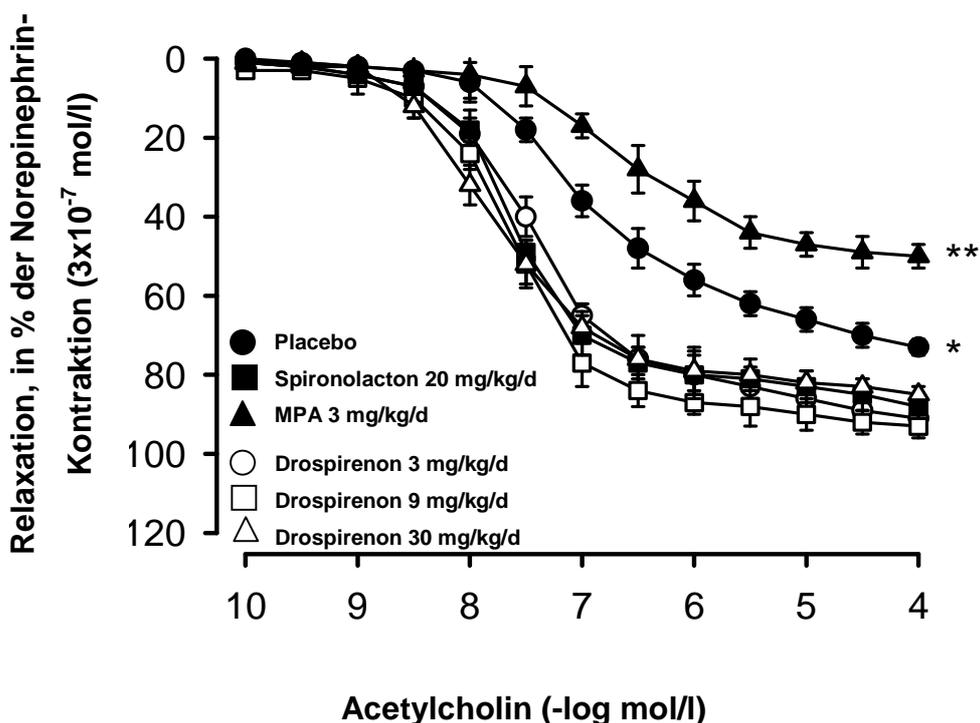
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Relaxationen

#### 4.1.1 Endothel - abhängige Relaxation auf Acetylcholin

Bei den mit Spironolacton bzw. Drospirenon (unabhängig von der Dosis) behandelten, ovariectomierten Tieren erfolgte eine Endothel-abhängige Relaxation, wie sie für unbehandelte Ratten typisch ist.

Bei den Placebo-behandelten, ovariectomierten Tieren war die Endothel-abhängige Relaxation hingegen beeinträchtigt. Die Behandlung mit MPA führte zu weiterer, signifikanter Einschränkung der Endothel-abhängigen Relaxation. (Abb. 4.1 - 1)



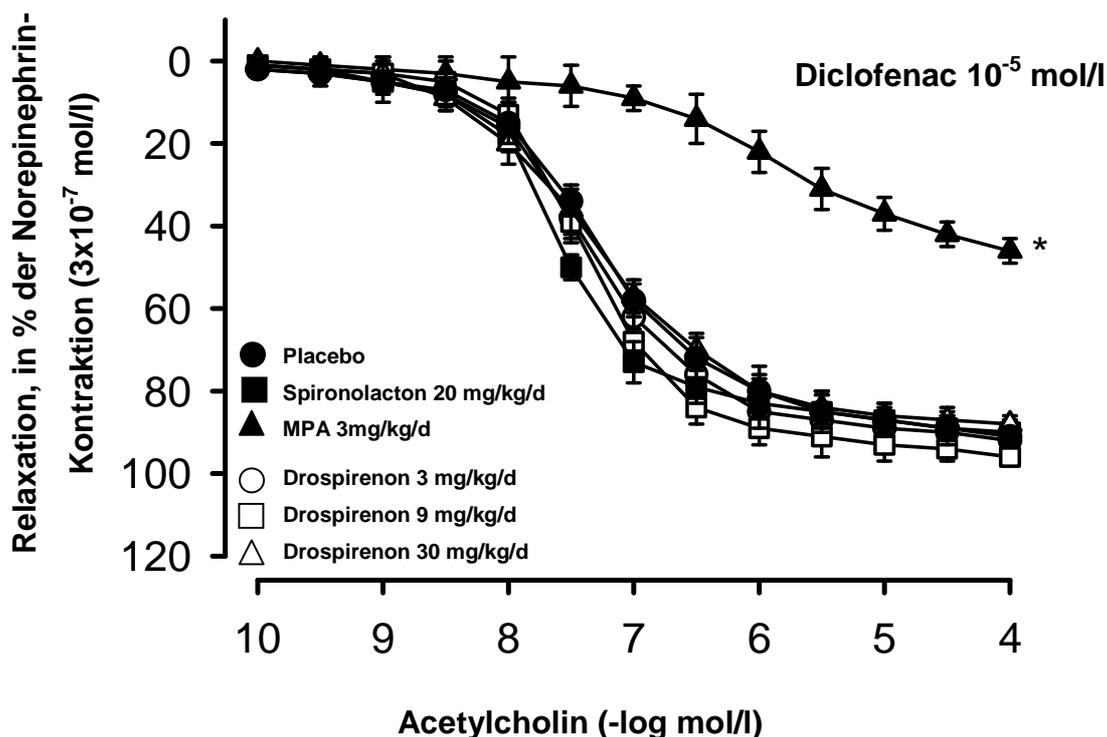
**Abb. 4.1 - 1**

Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

\*  $p < 0,05$  vs. alle anderen Gruppen

\*\*  $p < 0,05$  vs. Placebo-Gruppe und  $p < 0,01$  vs. alle anderen Gruppen

Eine Präinkubation mit Diclofenac (zur Hemmung der Synthese von Arachidonsäurederivaten) führte zu einer Normalisierung der Endothel-abhängigen Relaxation bei den Placebo-behandelten Tieren, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Endothel-abhängige Relaxation der mit MPA-behandelten Tiere. (Abb. 4.1 - 2)



**Abb. 4.1 - 2**

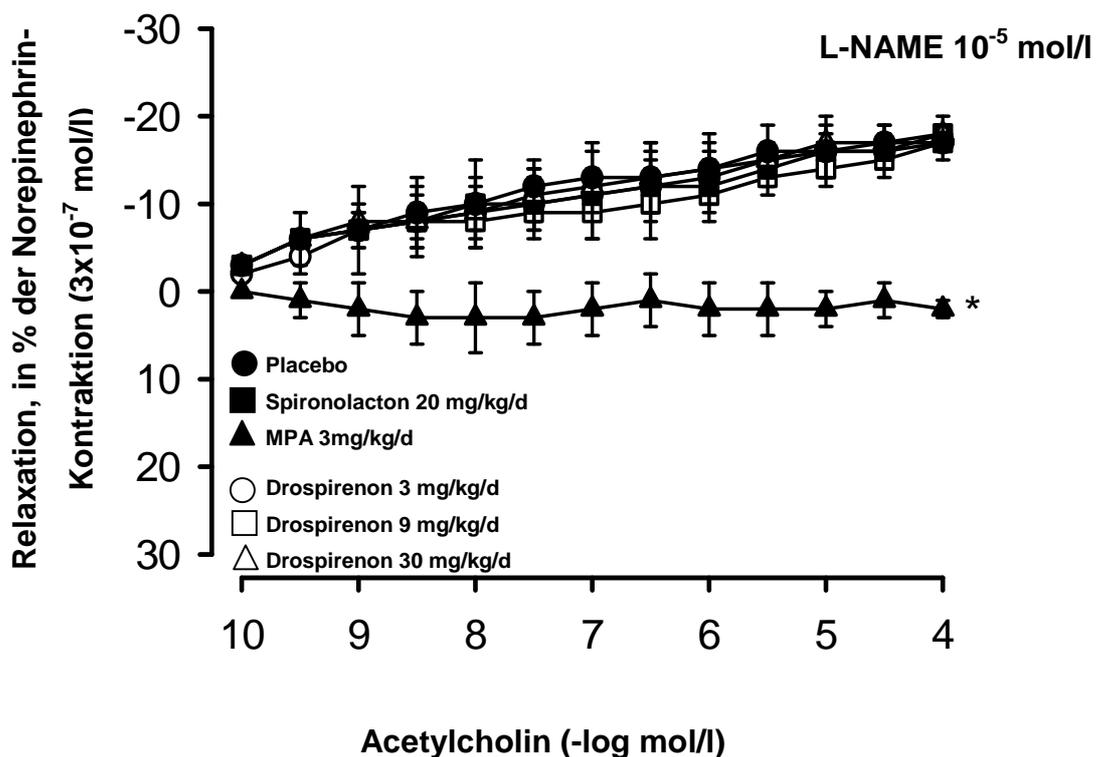
Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

\*  $p < 0,01$  vs. Placebo-behandelte Tiere

Nach Präinkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NAME kam es zu einer vollständigen Unterdrückung der Endothel-abhängigen Relaxation mit einer "paradoxen" Kontraktion bei aufsteigender Ach-Dosierung.

Lediglich bei den MPA-Tieren war eine solche Kontraktion nicht zu beobachten.

(Abb. 4.1 - 3)



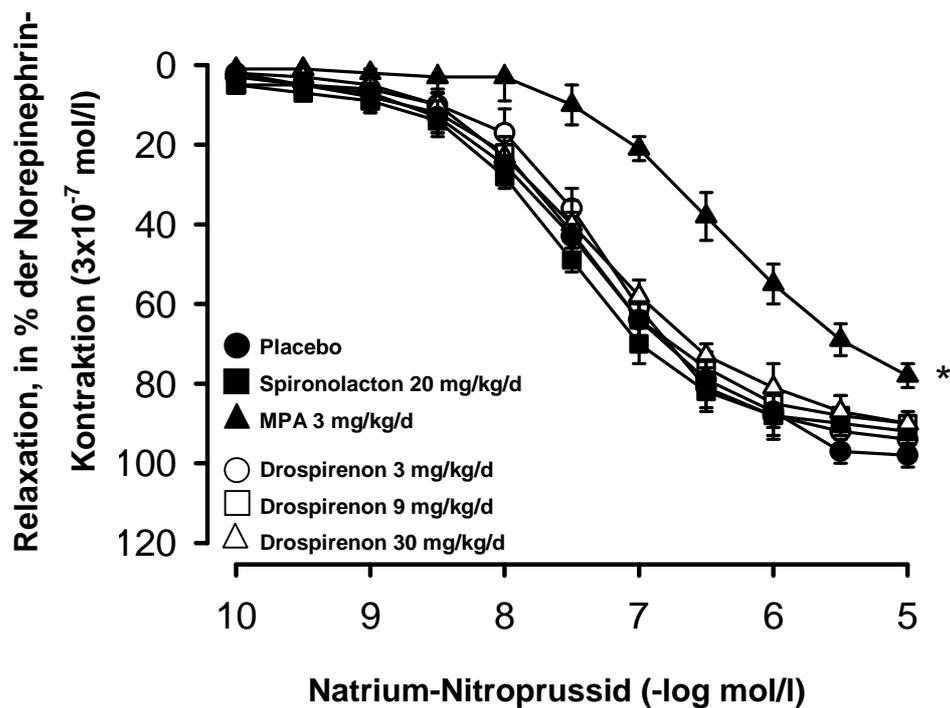
**Abb. 4.1 - 3**

Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

\*  $p < 0.01$  vs. Placebo-behandelte Tiere

#### 4.1.2 Endothel - unabhängige Relaxation auf Natrium-Nitroprussid

Die Endothel-unabhängige Relaxation auf Natrium-Nitroprussid (SNP) war bei allen Gruppen - mit Ausnahme der Tiere die MPA erhalten hatten – vergleichbar. Bei den mit MPA behandelten Tieren war die Relaxation auf Zugabe des NO-Donors SNP beeinträchtigt. (Abb. 4.1 - 4)



**Abb. 4.1 - 4**

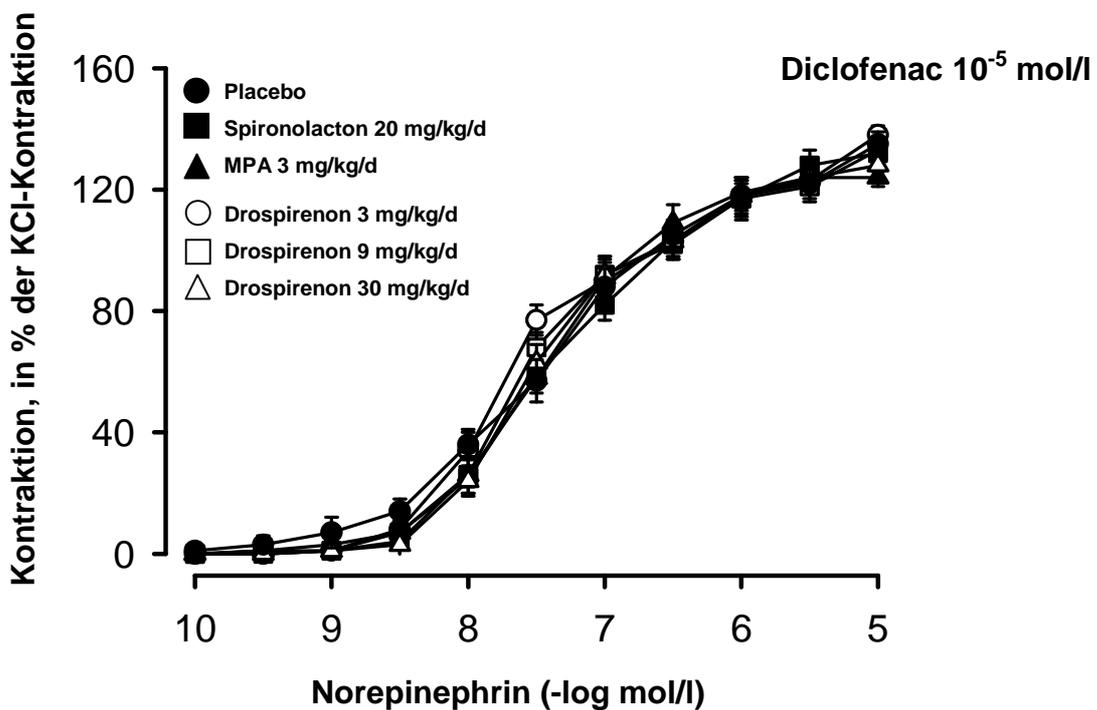
Endothel-unabhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Natrium-Nitroprussid (SNP) bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

\*  $p < 0,05$  vs. Placebo-behandelte Tiere

## 4.2 Kontraktionen

### 4.2.1 Kontraktion auf Norepinephrin

Die Kontraktion auf Norepinephrin war in den Versuchsgruppen vergleichbar. (Abb. 4.2 - 1)

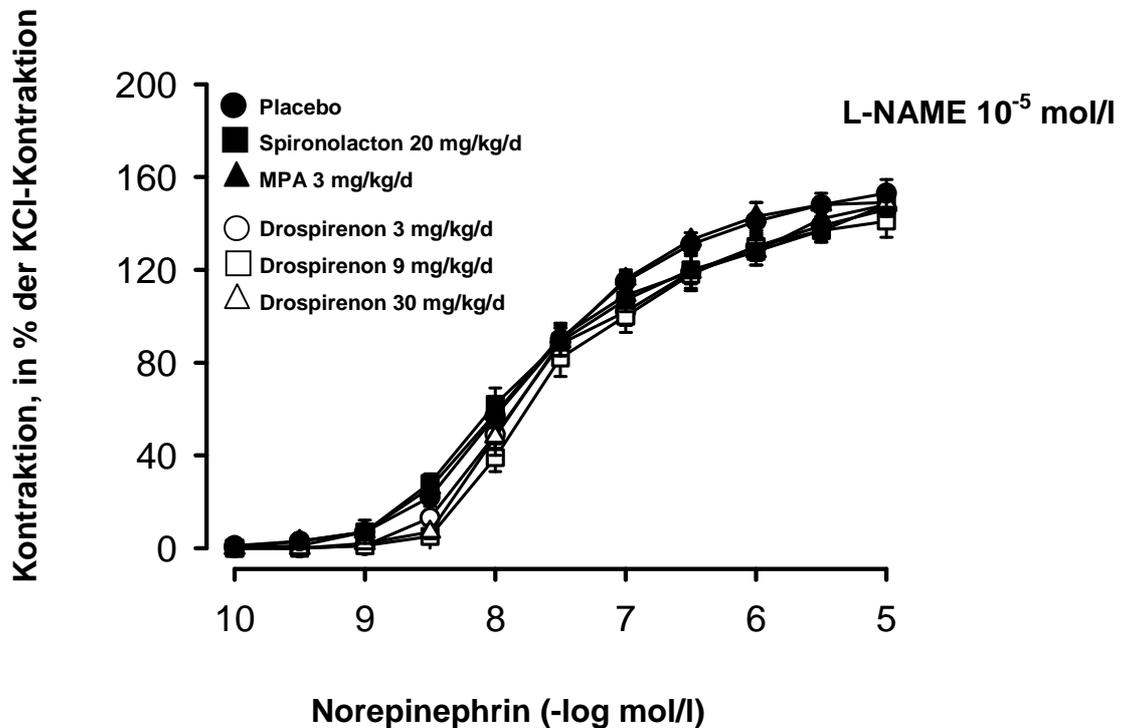


**Abb. 4.2 - 1**

Konzentrations-abhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

Nach Inkubation mit L-NAME war die Kontraktion in allen Gruppen diskret verstärkt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen bestand nicht. (Abb. 4.2 - 2)



**Abb. 4.2 - 2**

Konzentrations-abhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

## 5. Diskussion

Endotheline zählen zu den am stärksten wirksamen Vasokonstriktoren im menschlichen Körper (53). Sie werden mit der Pathogenese von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems (Hypertonie, Arteriosklerose) in Verbindung gebracht. Der Wirkmechanismus dieser 21-Aminosäure-Peptide läuft über G-Protein-vermittelte, auf der Zellmembran exprimierte ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren ab (26;27). Östrogene können eine vermehrte Expression von ET<sub>A</sub>-Rezeptoren induzieren. ET<sub>A</sub>-Rezeptoren, welche vor allem auf den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur lokalisiert vorkommen, sind für den direkten vasokonstriktorischen Effekt der Endotheline verantwortlich. Im Gegensatz hierzu werden von den Endothelzellen hauptsächlich ET<sub>B</sub>-Rezeptoren exprimiert, die über NO und Prostacyclin eine Endothel-abhängige Vasodilatation auslösen (83).

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss eine orale Östrogen- und Aldosteronzufuhr, bei Applikation von entweder Drospirenon, Spironolacton oder Medroxy-Progesteron-Acetat (MPA) auf das Gefäßendothel und damit auch auf die Blutdruckregulation bei ovariectomierten Ratten hat. Hierzu wurden 60 ovariectomierte Wistar-Ratten 2 Monate lang bei konstanten äußeren Bedingungen und der entsprechenden Östrogen- und Aldosteron-angereicherten Fütterung gehalten. Nach einer 8-wöchigen Fütterungsphase erfolgte die Entnahme der Aorta zur Untersuchung der Endothel-abhängigen und der Endothel-unabhängigen Gefäßreaktionen. Zum einen wurde die Reaktion an vorgespannten Segmenten der Aorta descendens auf Ach und SNP in der Organkammer untersucht. Zusätzlich erfolgte die Analyse der dosis-abhängigen Dilatation der isolierten Gefäßringe auf Ach, entweder bei Vorinkubation mit dem NO-Synthese-Hemmer L-NAME oder mit dem Cyclooxygenase-Inhibitor Diclofenac. Ferner wurde die dosisabhängige Kontraktion der Gefäßringe auf Norepinephrin (NE) untersucht.

Bei den Tieren, die Drospirenon (bestehend aus Gestagen und Ethinylöstradiol) und Spironolacton erhalten hatten, war die Endothel-abhängige Relaxation einheitlich und vergleichbar mit dem Relaxationsverhalten von Ratten ohne

Intervention. Es konnte auch kein Unterschied im Relaxationsverhalten abhängig von der Dosis von Drospirenon aufgezeigt werden. Vermindert war hingegen die Relaxation auf Ach bei den Tieren der Placebo-Gruppe, also derer Tiere, welche für die Dauer der Fütterung mit Östradiol und Aldosteron keine zusätzlichen Medikamente erhalten hatten. Eine noch deutlichere Einschränkung der Endothelfunktion trat bei der Gruppe der Tiere auf, welche MPA erhielten. Man kann also sagen, dass ohne zusätzliches Ethinylöstradiol die Endothel-unabhängige Relaxation deutlich geringer ausfiel, als bei einer Zusatztherapie mit Ethinylöstradiol. Insofern scheinen Östrogene einen positiven, eventuell sogar protektiven Effekt auf das Gefäßendothel zu haben, was bereits beschrieben ist. (125). Vermindert war hingegen die Endothel-abhängige Relaxationsfähigkeit bei den unbehandelten Tieren bzw. bei den Tieren, die Progesteron (MPA) erhielten. Offensichtlich besteht bei diesen Tieren eine endotheliale Dysfunktion; ein negativer Einfluss von Gestagenen auf die vaskuläre Funktion konnte bereits gezeigt werden (116), ohne dass dadurch jedoch die Wirkung von Östrogenen antagonisiert worden wäre (116).

Bei einer Vorinkubation mit dem Arachidonsäure-Synthese-Hemmer Diclofenac kommt es bei allen mit Ethinylöstradiol behandelten Gruppen zu keiner nennenswerten Veränderung des Relaxationsverhaltens. Interessant ist jedoch, dass sich bei den Placebo-behandelten Tieren die Endothel-abhängige Relaxation verbessert und sich der Gefäßantwort der Ethinylöstradiol-behandelten Tiere angleicht. Diclofenac verhindert als Hemmstoff der Cyclooxygenase die Produktion von kontraktile wirkenden Arachidonsäure-derivaten. Offenbar führen Relaxationsprodukte der Cyclooxygenase bei ovariectomierten Ratten zu einem erhöhten Gefäßtonus, der partiell die Endothel-vermittelte Relaxation „antagonisiert“, so dass erst der Inhibitor der Produktion dieser Botenstoffe die vollständige, Endothel-abhängige Relaxation gleichsam demaskiert wird. Eine Zunahme der endothelvermittelten Vasodilatation durch Östrogene konnte im Tierversuch bereits gezeigt werden (115).

Diese Ergebnisse werden ergänzt durch die Induktion der Endothel-abhängigen Relaxation auf Ach nach Vorinkubation mit L-NAME. Diese Substanz hemmt die

NO-Synthase und damit auch die Bildung von NO, wodurch die NO-vermittelte Relaxation ausbleibt.

Außer den Endothel-abhängigen Relaxationen auf Ach, wurden in diesem Versuchsmodell auch die Endothel-unabhängigen Relaxationen durch Zugabe des direkten NO-Donors Natrium-Nitroprussid (SNP) untersucht. Hierbei zeigte sich in allen Versuchsgruppen mit Ausnahme der MPA-behandelten Tiere kein signifikanter Unterschied im Relaxationsverhalten. In den fünf Versuchsgruppen erfolgte sehr rasch nach Zugabe des NO-Donors SNP eine vollständige Relaxation. Die rasche Wirkung beruht auf der Tatsache, dass SNP als direkt eingebrachtes NO im Körper wirkt. Es ist keine zeitaufwendige Umwandlung nötig, sondern es kann sofort durch Erhöhung des cGMP-Spiegels mit folgendem Abfall des intrazellulären Calcium-Spiegels in den glatten Gefäßmuskulzellen wirken und eine Vasodilatation erzeugen. Medroxy-Progesteron-Acetat scheint jedoch in diese Vorgänge einzugreifen, da die Relaxation der Gefäße erst viel später und wesentlich schwächer erfolgte als im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen.

Bei den Untersuchungen bezüglich der Kontraktionsfähigkeit der Gefäßringe auf NE konnten bei Vorinkubation mit dem Arachidonsäure-Synthase-Hemmer Diclofenac zwischen den unterschiedlichen Gruppen keine relevanten Unterschiede festgestellt werden. Die Kontraktionsfähigkeit war bei allen Tieren vergleichbar und regelgerecht. Es war auch kein Unterschied festzustellen zwischen den Tieren, die nur mit Östrogenen behandelt wurden und denen, die Östrogene und MPA erhielten. Auch die Dosis von Drospirenon hatte keinen Einfluss auf die Gefäßreaktion. Die Kontraktion der Gefäße auf Norepinephrin erfolgt über  $\alpha$ -Rezeptoren der glatten Muskelzellen, die dann wiederum über G-Proteine zu einer Erhöhung der Phospholipase C führen. Über eine Akkumulation von  $IP_3$  und DAG kommt es dann zu einer intrazellulären Calciumerhöhung und damit zu einer lang anhaltenden Kontraktion. Auf diese Mechanismen scheinen Östrogene und Medroxy-Progesteron-Acetat im verwendeten Tiermodell weder in positiver noch negativer Weise Einfluss zu nehmen.

Auch bei der Kontraktion auf NE nach Vorinkubation mit L-NAME war die Gefäßantwort in den einzelnen Gruppen homogen und vergleichbar. Nach Vorinkubation mit Diclofenac war die Kontraktion der Gefäße in allen Gruppen geringfügig stärker. Dies ist bereits in anderen Tiermodellen beschrieben (126;127;128) und wird auf die Blockade der sogenannten „basalen“ NO-Sekretion zurückgeführt.

Zusammenfassend konnte im vorliegenden Tiermodell gezeigt werden, dass Ethinylöstradiol nicht zu einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion führt. Medroxy-Progesteron-Acetat führte in der vorliegenden Versuchsanordnung jedoch zu einer deutlichen endothelialen Dysfunktion. Wie bereits in anderen Tiermodellen gezeigt werden konnte (129;130) beeinträchtigt MPA erheblich die Relaxationsfähigkeit des Gefäßsystems.

Inwieweit jedoch eine langfristige Applikation von Östrogenen „Endothelprotektiv“ wirkt, konnte in dieser Versuchsanordnung nicht schlussendlich geklärt werden, da im Hinblick auf die Dosis von Ethinylöstradiol keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Relaxationsfähigkeit des Endothels aufgezeigt werden konnten. Hierfür wären weitere Studien notwendig, um die in diesem Tiermodell erhobenen Daten zu verifizieren und zu präzisieren.

## 6. Zusammenfassung

Ein intaktes und funktionsfähiges Endothel ist eine entscheidende Voraussetzung für ein funktionierendes Herz-Kreislaufsystem. Eine Dysfunktion des Endothels ist ein zentrales Glied in der Pathogenese zahlreicher Gefäßkrankheiten (Hypertonie, Atherosklerose, u.a.). Mehrere Mediatoren, welche die vasodilatierende und vasokontraktile Wirkungen des Endothels regulieren, sind für ein physiologisches Zusammenspiel der vernetzten Regelkreise des Endothels verantwortlich.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Östrogenen (Ethinylöstradiol) und Gestagenen (Medroxy-Progesteron-Acetat, MPA) bzw. von Drospirenon (aus Ethinylöstradiol und Gestagen) bei ovariectomierten Ratten auf das Gefäßendothel und die Vasomotorik zu untersuchen.

Hierfür wurden isolierte, vorgespannte Segmente der Aorta descendens der Versuchstiere in der Organkammer untersucht. Es erfolgte die Untersuchung der Endothel-abhängigen Gefäßreaktion als dosisabhängige Relaxation auf Acetylcholin mit und ohne Vorinkubation mit Diclofenac bzw. L-NAME, sowie der Endothel-abhängigen Gefäßreaktion auf Natrium-Nitroprussid. Zusätzlich wurde die dosisabhängige Kontraktion auf Norepinephrin bei Vorinkubation mit Diclofenac bzw. L-NAME evaluiert.

Die Endothel-abhängige Relaxation auf Acetylcholin ergab bei den mit Drospirenon sowie Spironolacton behandelten, ovariectomierten Tieren ein Relaxationsverhalten, wie es auch typisch für unbehandelte Wildtyp-Ratten ist. Bei den Placebo-behandelten Tieren zeigte sich jedoch eine deutliche Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen Relaxation, welche sich durch eine Präinkubation mit dem Arachidonsäure-Synthese-Hemmer Diclofenac egalieren liess. Eine stärkere Einschränkung der Endothel-abhängigen Relaxation zeigte sich bei den mit MPA-behandelten Tieren, bei denen sich auch durch Präinkubation mit Diclofenac keine Normalisierung der Gefäßreaktion erzielen ließ.

Eine Vorbehandlung mit dem NOS-Inhibitor L-NAME führte zu einem vollständigen Ausfall der Endothel-abhängigen Relaxation mit einer bei steigender Ach-Dosierung auftretenden „paradoxen“ Kontraktion. Bei den mit MPA-behandelten Ratten war dieser Effekt nicht zu beobachten.

Die Endothel-unabhängige Relaxation auf SNP war in allen Gruppen vergleichbar, mit Ausnahme der Tiere, die MPA erhielten. Bei diesen Tieren war die Endothel-unabhängige Gefäßantwort beeinträchtigt.

Die Kontraktion auf Norepinephrin bei Präinkubation mit Diclofenac fiel in allen Gruppen einheitlich aus. Auch bei Präinkubation mit L-NAME zeigte sich in allen Versuchsgruppen eine vergleichbare Gefäßreaktion, wobei die Kontraktion hier in allen Gruppen diskret stärker ausfiel, als ohne Gegenwart von L-NAME.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ethinyl-östradiol zu keiner funktionell relevanten Beeinträchtigung der Endothelfunktion führt. Medroxy-Progesteron-Acetat hingegen führte in dieser Versuchsanordnung zu einer deutlichen Einschränkung der Endothelfunktion und beeinträchtigte die Relaxationsfähigkeit der Gefäße erheblich.

Im Gegensatz zu Progesteron konnte unter den Bedingungen dieser Arbeit zumindest kein Endothel-schädigender Effekt für Östrogene nachgewiesen werden.

Inwieweit Östrogene – über längere Zeit appliziert – in der Lage sind, eine „Endothel-protective“ Wirkung zu entfalten, kann jedoch im Rahmen der vorliegenden Versuchsanordnung nicht abschließend beurteilt werden.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$	EDTA
$C_6H_{12}O_6$	D(+)-Glucose-Monohydrat
$Ca^{2+}$	Calciumion
$CaCl_2$	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
$CO_2$	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerol
Diclo	Diclofenac
ET-RA	Endothelin-Rezeptor-Antagonisten
EDRF	Endothelin-derived-relaxing-factor
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ET-4	Endothelin-4
ET <sub>A</sub> -Rezeptor	Endothelin <sub>A</sub> -Rezeptor
ET <sub>B</sub> -Rezeptor	Endothelin <sub>B</sub> -Rezeptor
HF	Herzfrequenz (Schläge/min)
HZV	Herzzeitvolumen
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
K <sup>+</sup>	Kaliumion

---

KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
L-MNNA	L-M-Monomethylarginin
L-NAME	L-Nitroargininmethylester
M	Molare Masse (g/mol)
$\text{MgSO}_4$	Magnesiumsulfat
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPA	Methyl-Progesteron-Acetat
mRNA	Messenger-RNA
mV	Millivolt
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
$\text{NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat
NE	Norepinephrin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
$\text{O}_2$	Sauerstoff
$\text{pD}_2$	Sensitivität
Prepro-ET-1	Synthesevorstufe zu ET-1
s.c.	subkutan
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
SNP	Natrium-Nitroprussid
Tab.	Tabelle
TPR	totaler peripherer Widerstand

## 8. Abbildungsverzeichnis

**Abb. 4.1 - 1:** Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

\*  $p < 0,05$  vs. alle anderen Gruppen

\*\*  $p < 0,05$  vs. Placebo-Gruppe und  $p < 0,01$  vs. alle anderen Gruppen

**Abb. 4.1 - 2:** Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

\*  $p < 0,01$  vs. Placebo-behandelte Tiere

**Abb. 4.1 - 3:** Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

\*  $p < 0,01$  vs. Placebo-behandelte Tiere

**Abb. 4.1 - 4:** Endothel-unabhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Natrium-Nitroprussid (SNP) bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

\*  $p < 0,05$  vs. Placebo-behandelte Tiere

**Abb. 4.2 - 1:** Konzentrations-abhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

**Abb. 4.2 - 2:** Konzentrations-abhängige Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin bei ovariectomierten Ratten mit unterschiedlicher Behandlung.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für jeweils 8 Tiere/Gruppe angegeben.

## 9. Tabellenverzeichnis

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

## 10. Literaturverzeichnis

1. Hazzard, W. R. "Aging and atherosclerosis. Teasing out the contributions of time, secondary aging, and primary aging." *Clin.Geriatr.Med.* 1.1 (1985): 251-84.
2. Kung, C. F. and T. F. Lüscher. "Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta." *Hypertension* 25.2 (1995): 194-200.
3. Raij, L. "Hypertension, endothelium, and cardiovascular risk factors." *Am.J.Med.* 90.2A (1991): 13S-8S.
4. Oliver, J. A. "Cardiovascular disease and hypertension." *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2.2 (1993): 299-306.
5. Cosentino, F. and T. F. Lüscher. "Endothelial dysfunction in diabetes mellitus." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 32 Suppl 3 (1998): S54-S61.
6. Jeremy, J. Y., D. P. Mikhailidis, and R. M. Pittilo. "Cigarette smoking and cardiovascular disease." *J.R.Soc.Health* 115.5 (1995): 289-95.
7. Jensen-Urstad, K., J. Johansson, and M. Jensen-Urstad. "Vascular function correlates with risk factors for cardiovascular disease in a healthy population of 35-year-old subjects." *J.Intern.Med.* 241.6 (1997): 507-13.
8. Noll, G. and T. F. Lüscher. "The endothelium in acute coronary syndromes." *Eur.Heart J.* 19 Suppl C (1998): C30-C38.
9. Zilla, P., U. von Oppell, and M. Deutsch. "The endothelium: a key to the future." *J.Card Surg.* 8.1 (1993): 32-60.
10. Lüscher, T. F. and M. Barton. "Biology of the endothelium." *Clin.Cardiol.* 20.11 Suppl 2 (1997): II-10.

11. Rubanyi, G. M. "The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 22 Suppl 4 (1993): S1-14.
12. Busse, R., G. Trogisch, and E. Bassenge. "The role of endothelium in the control of vascular tone." *Basic Res.Cardiol.* 80.5 (1985): 475-90.
13. Ruschitzka, F. T., G. Noll, and T. F. Lüscher. "The endothelium in coronary artery disease." *Cardiology* 88 Suppl 3 (1997): 3-19.
14. Lin, P. J. and C. H. Chang. "Endothelium dysfunction in cardiovascular diseases." *Changgeng.Yi.Xue.Za Zhi.* 17.3 (1994): 198-210.
15. Lüscher, T. F., Tanner, F.C., Tschudi, M.R. and Noll, G.. "Endothelial dysfunction in coronary artery disease." *Annu.Rev.Med.* 44 (1993): 395-418.
16. Garcia-Palmieri, M. R. "The endothelium in health and in cardiovascular disease." *P.R.Health Sci.J.* 16.2 (1997): 136-41.
17. Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki. "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* 288.5789 (1980): 373-76.
18. Cherry, P. D., Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. and Jothianandan, D. "Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79.6 (1982): 2106-10.
19. Wennmalm, A. "Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease." *J.Intern.Med.* 235.4 (1994): 317-27.
20. Haynes, W. G. and D. J. Webb. "Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease." *J.Hypertens.* 16.8 (1998): 1081-98.

21. Noll, G., R. R. Wenzel, and T. F. Lüscher. "Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease." *Mol.Cell Biochem.* 157.1-2 (1996): 259-67.
22. Lüscher, T. F. and F. C. Tanner. "Endothelial regulation of vascular tone and growth." *Am.J.Hypertens.* 6.7 Pt 2 (1993): 283S-93S.
23. Hickey, K. A., Rubanyi,G., Paul,R.J. and Highsmith,R.F. "Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells." *Am.J.Physiol* 248.5 Pt 1 (1985): C550-C556.
24. O'Brien, R. F., R. J. Robbins, and I. F. McMurtry. "Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance." *J.Cell Physiol* 132.2 (1987): 263-70.
25. Yanagisawa, M., Kurihara,H., Kimura,S., Tomobe,Y., Kobayashi,M., Mitsui,Y., Yazaki,Y., Goto,K. and Masaki,T. "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." *Nature* 332.6163 (1988): 411-15.
26. Arai, H., Hori,S., Aramori,I., Ohkubo,H. and Nakanishi,S. "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor." *Nature* 348.6303 (1990): 730-32.
27. Sakurai, T., Yanagisawa,M., Takuwa,Y., Miyazaki,H., Kimura,S., Goto,K. and Masaki,T. "Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor." *Nature* 348.6303 (1990): 732-35.
28. Lüscher, T. F. "Do we need endothelin antagonists?" *Cardiovasc.Res.* 27.12 (1993): 2089-93.
29. Tatchum-Talom, R., C. Martel, and A. Marette. "Influence of estrogen on aortic stiffness and endothelial function in female rats." *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 282.2 (2002): H491-H498.

30. Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo. "Signal transduction and regulation in smooth muscle." *Nature* 372.6503 (1994): 231-36.
31. Lüscher, T. F. "Endothelium in the control of vascular tone and growth: role of local mediators and mechanical forces." *Blood Press Suppl* 1 (1994): 18-22.
32. Tschudi, M. R., Barton, M., Bersinger, N.A., Moreau, P., Cosentino, F., Noll, G., Malinski, T. and Lüscher, T.F. "Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery." *J.Clin.Invest* 98.4 (1996): 899-905.
33. Linas, S. L. and J. E. Repine. "Endothelial cells protect vascular smooth muscle cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> attack." *Am.J.Physiol* 272.6 Pt 2 (1997): F767-F773.
34. Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. and Vane, J.R. "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation." *Nature* 263.5579 (1976): 663-65.
35. Furchgott, R. F., Cherry, P.D., Zawadzki, J.V. and Jothianandan, D. "Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 6 Suppl 2 (1984): S336-S343.
36. Noll, G., Tschudi, M., Nava, E. and Lüscher, T.F. "Endothelium and high blood pressure." *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 17.5 (1997): 273-79.
37. Mulvany, M. J. and C. Aalkjaer. "Structure and function of small arteries." *Physiol Rev.* 70.4 (1990): 921-61.
38. Judy, W. V., Watanabe, A.M., Henry, D.P., Besch, H.R., Jr., Murphy, W.R. and Hockel, G.M. "Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat." *Circ.Res.* 38.6 Suppl 2 (1976): 21-29.

39. Lüscher, T. F. "Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system." *Eur.Heart J.* 12 Suppl E (1991): 2-11.
40. Ignarro, L. J., Buga, G.M., Byrns, R.E., Wood, K.S. and Chaudhuri, G. "Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 246.1 (1988): 218-26.
41. Palmer, R. M., D. S. Ashton, and S. Moncada. "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." *Nature* 333.6174 (1988): 664-66.
42. Dusting, G. J., Macdonald, P.S., Higgs, E.A. and Moncada, S. "The endogenous nitrovasodilator produced by the vascular endothelium." *Aust.N.Z.J.Med.* 19.5 (1989): 493-98.
43. Tschudi, M. R. and T. F. Lüscher. "[Nitric oxide: the endogenous nitrate in the cardiovascular system]." *Herz* 21 Suppl 1 (1996): 50-60.
44. Forstermann, U., Nakane, M., Tracey, W.R. and Pollock, J.S. "Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system." *Eur.Heart J.* 14 Suppl I (1993): 10-15.
45. Bredt, D. S., P. M. Hwang, and S. H. Snyder. "Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide." *Nature* 347.6295 (1990): 768-70.
46. Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. "Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication." *Biochem.Pharmacol.* 38.11 (1989): 1709-15.
47. Sessa, W. C., Harrison, J.K., Barber, C.M., Zeng, D., Durieux, M.E., D'Angelo, D.D., Lynch, K.R. and Peach, M.J. "Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase." *J.Biol.Chem.* 267.22 (1992): 15274-76.

48. Lüscher, T. F., L. L. Aarhus, and P. M. Vanhoutte. "Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat." *Am.J.Hypertens.* 3.1 (1990): 55-58.
49. Nadaud, S., Philippe, M., Arnal, J.F., Michel, J.B. and Soubrier, F. "Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow." *Circ.Res.* 79.4 (1996): 857-63.
50. Rapoport, R. M., M. B. Draznin, and F. Murad. "Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation." *Nature* 306.5939 (1983): 174-76.
51. Moreau, P., Takase, H., Kung, C.F. and Lüscher, T.F. "[Effect of chronic inhibition of nitric oxide synthesis on vascular structure: remodeling or growth?]." *Arch.Mal Coeur Vaiss.* 88.8 (1995): 1141-43.
52. Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol.Rev.* 43.2 (1991): 109-42.
53. Hocher, B., Schwarz, A., Fagan, K.A., Thone-Reineke, C., El Hag, K., Kusserow, H., Elitok, S., Bauer, C., Neumayer, H.H., Rodman, D.M. and Theuring, F. "Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice." *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 23.1 (2000): 19-26.
54. Masaki, T. "The discovery of endothelins." *Cardiovasc.Res.* 39.3 (1998): 530-33.
55. Saida, K., Y. Mitsui, and N. Ishida. "A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity." *J.Biol.Chem.* 264.25 (1989): 14613-16.

56. Bloch, K. D., Hong, C.C., Eddy, R.L., Shows, T.B. and Quertermous, T. "cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2." *Genomics* 10.1 (1991): 236-42.
57. Miyauchi, T. and T. Masaki. "Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system." *Annu.Rev.Physiol* 61 (1999): 391-415.
58. Masaki, T. "The endothelin family: an overview." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 35.4 Suppl 2 (2000): S3-S5.
59. Nakamura, S., Naruse, K., Demura, H. and Uemura, H. "Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells." *Histochemistry* 94.5 (1990): 475-77.
60. Malek, A. and S. Izumo. "Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium." *Am.J.Physiol* 263.2 Pt 1 (1992): C389-C396.
61. Barton, M., Shaw, S., d'Uscio, L.V., Moreau, P. and Lüscher, T.F. "Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 238.3 (1997): 861-65.
62. Ito, H., Hirata, Y., Adachi, S., Tanaka, M., Tsujino, M., Koike, A., Nogami, A., Murumo, F. and Hiroe, M. "Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes." *J.Clin.Invest* 92.1 (1993): 398-403.
63. Matsuura, A., Yamochi, W., Hirata, K., Kawashima, S. and Yokoyama, M. "Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression." *Hypertension* 32.1 (1998): 89-95.

64. Wesson, D. E., J. Simoni and D. F. Green. "Reduced extracellular pH increases endothelin-1 secretion by human renal microvascular endothelial cells." *J.Clin.Invest* 101.3 (1998): 578-83.
65. Corder, R., Carrier,M., Khan,N., Klemm,P. and Vane,J.R. "Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 26 Suppl 3 (1995): S56-S58.
66. Schwarting, A., Schlaak,J., Lotz,J., Pfers,I., Meyer zum Buschenfelde,K.H. and Mayet,W.J. "Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblast-like synovial cells (FLS)." *Scand.J.Rheumatol.* 25.4 (1996): 246-56.
67. Yanagisawa, M. and T. Masaki. "Molecular biology and biochemistry of the endothelins." *Trends Pharmacol.Sci.* 10.9 (1989): 374-78.
68. Morey, A. K., Razandi,M., Pedram,A., Hu,R.M., Prins,B.A. and Levin,E.R. "Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1." *Biochem.J.* 330 ( Pt 3) (1998): 1097-105.
69. Boulanger, C. and T. F. Lüscher. "Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide." *J.Clin.Invest* 85.2 (1990): 587-90.
70. Wada, A., Tsutamato,T., Maeda,Y., Kanamori,T., Matsuda,Y. and Kinoshita,M. "Endogenous atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-1 secretion in dogs with severe congestive heart failure." *Am.J.Physiol* 270.5 Pt 2 (1996): H1819-H1824.
71. Stewart, D., Cernacek,P., Mohamed,F., Blais,D., Cianflone,K. and Monge,J.C. "Role of cyclic nucleotides in the regulation of endothelin-1 production by human endothelial cells." *Am.J.Physiol* 266.3 Pt 2 (1994): H944-H951.

72. Yoshimoto, S., Ishizaki, Y., Sasaki, T. and Murota, S. "Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells." *Stroke* 22.3 (1991): 378-83.
73. de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D. and Vane, J.R. "Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85.24 (1988): 9797-800.
74. Gasic, S., Wagner, O.F., Vierhapper, H., Nowotny, P. and Waldhausl, W. "Regional hemodynamic effects and clearance of endothelin-1 in humans: renal and peripheral tissues may contribute to the overall disposal of the peptide." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 19.2 (1992): 176-80.
75. Kaw, S., T. D. Warner, and J. R. Vane. "The metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by the isolated perfused kidney of the rabbit." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 22 Suppl 8 (1993): S65-S68.
76. Weitzberg, E., G. Ahlborg, and J. M. Lundberg. "Long-lasting vasoconstriction and efficient regional extraction of endothelin-1 in human splanchnic and renal tissues." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 180.3 (1991): 1298-303.
77. Simonson, M. S. "Endothelins: multifunctional renal peptides." *Physiol Rev.* 73.2 (1993): 375-411.
78. Rubanyi, G. M. and M. A. Polokoff. "Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology." *Pharmacol.Rev.* 46.3 (1994): 325-415.
79. Waeber, C., D. Hoyer, and J. M. Palacios. "Similar distribution of [125I]sarafotoxin-6b and [125I]endothelin-1, -2, -3 binding sites in the human kidney." *Eur.J.Pharmacol.* 176.2 (1990): 233-36.

80. Shinmi, O., Kimura,S., Sawamura,T., Sugita,Y., Yoshizawa,T., Uchiyama,Y., Yanagisawa,M., Goto,K., Masaki,T. and Kanazawa,I. "Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 164.1 (1989): 587-93.
81. Lin, H. Y., Kaji,E.H., Winkel,G.K., Ives,H.E. and Lodish,H.F. "Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88.8 (1991): 3185-89.
82. Sakamoto, A., Yanagisawa,M., Sakurai,T., Takuwa,Y., Yanagisawa,H. and Masaki,T. "Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 178.2 (1991): 656-63.
83. Seo, B., Oemar,B.S., Siebenmann,R., von Segesser,L. and Lüscher,T.F. "Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels." *Circulation* 89.3 (1994): 1203-08.
84. Masaki, T. "Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone." *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35 (1995): 235-55.
85. Alberts, G. F., Peifley,K.A., Johns,A., Kleha,J.F. and Winkles,J.A. "Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop." *J.Biol.Chem.* 269.13 (1994): 10112-18.
86. Pollock, D. M., T. L. Keith, and R. F. Highsmith. "Endothelin receptors and calcium signaling." *FASEB J.* 9.12 (1995): 1196-204.
87. Filep, J. G., Herman,F., Battistini,B., Chabrier,P.E., Braquet,P. and Sirois,P. "Antiaggregatory and hypotensive effects of endothelin-1 in beagle dogs: role for prostacyclin." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 17 Suppl 7 (1991): S216-S218.

88. Goligorsky, M. S., Tsukahara,H., Magazine,H., Andersen,T.T., Malik,A.B. and Bahou,W.F. "Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide." *J.Cell Physiol* 158.3 (1994): 485-94.
89. Strachan, F. E., Spratt,J.C., Wilkinson,I.B., Johnston,N.R., Gray,G.A. and Webb,D.J. "Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men." *Hypertension* 33.1 Pt 2 (1999): 581-85.
90. Rockey, D. C. and J. J. Chung. "Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing." *J.Clin.Invest* 98.6 (1996): 1381-88.
91. Lysko, P. G., Elshourbagy,N.A., Pullen,M. and Nambi,P. "Developmental expression of endothelin receptors in cerebellar neurons differentiating in culture." *Brain Res.Dev.Brain Res.* 88.1 (1995): 96-101.
92. Clavell, A. L., Stingo,A.J., Margulies,K.B., Brandt,R.R. and Burnett,J.C.,Jr. "Role of endothelin receptor subtypes in the in vivo regulation of renal function." *Am.J.Physiol* 268.3 Pt 2 (1995): F455-F460.
93. Warner, T. D., Mitchell,J.A., de Nucci,G. and Vane,J.R. "Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 13 Suppl 5 (1989): S85-S88.
94. Hirata, Y., Emori,T., Eguchi,S., Kanno,K., Imai,T., Ohta,K. and Marumo,F. "Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells." *J.Clin.Invest* 91.4 (1993): 1367-73.
95. Jougasaki, M., Schirger,J.A., Simari,R.D., Burnett,J.C.,Jr. "Autocrine role for the endothelin-B receptor in the secretion of adrenomedullin." *Hypertension* 32.5 (1998): 917-22.

96. Boulanger, C. M. and T. F. Lüscher. "Differential effect of cyclic GMP on the release of endothelin-1 from cultured endothelial cells and intact porcine aorta." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 17 Suppl 7 (1991): S264-S266.
97. Naomi, S., Iwaoka,T., Disashi,T., Inoue,J., Kanesaka,Y., Tokunaga,H. and Tomita,K. "Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells." *Circulation* 97.3 (1998): 234-36.
98. Ozaki, S., Ohwaki,K., Ihara,M., Fukuroda,T., Ishikawa,K. and Yano,M. "ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 209.2 (1995): 483-89.
99. Fukuroda, T., Fujikawa,T., Ozaki,S., Ishikawa,K., Yano,M. and Nishikibe,M. "Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 199.3 (1994): 1461-65.
100. Gratton, J. P., Cournoyer,G., Loffler,B.M., Sirois,P. and D'Orleans-Juste,P. "ET(B) receptor and nitric oxide synthase blockade induce BQ-123-sensitive pressor effects in the rabbit." *Hypertension* 30.5 (1997): 1204-09.
101. Rich, S. and V. V. McLaughlin. "Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease." *Circulation* 108.18 (2003): 2184-90.
102. Berthiaume, N., M. Yanagisawa, and P. D'Orleans-Juste. "Contribution of endogenous endothelin-1 and endothelin-A-receptors to the hypertensive state of endothelin-B heterozygous (+/-) knockout mice." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 36.5 Suppl 1 (2000): S72-S74.
103. Berthiaume, N., Yanagisawa,M., Labonte,J. and D'Orleans-Juste,P. "Heterozygous knock-Out of ET(B) receptors induces BQ-123-sensitive hypertension in the mouse." *Hypertension* 36.6 (2000): 1002-07.

104. Lüscher, T. F., Boulanger, C.M., Dohi, Y. and Yang, Z.H. "Endothelium-derived contracting factors." *Hypertension* 19.2 (1992): 117-30.
105. Beevers, G., G. Y. Lip, and E. O'Brien. "ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension." *BMJ* 322.7291 (2001): 912-16.
106. Lariviere, R., G. Thibault, and E. L. Schiffrin. "Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats." *Hypertension* 21.3 (1993): 294-300.
107. Lariviere, R., R. Day, and E. L. Schiffrin. "Increased expression of endothelin-1 gene in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats." *Hypertension* 21.6 Pt 2 (1993): 916-20.
108. Li, J. S., R. Lariviere, and E. L. Schiffrin. "Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy." *Hypertension* 24.2 (1994): 183-88.
109. Doucet, J., W. Gonzalez, and J. B. Michel. "Endothelin antagonists in salt-dependent hypertension associated with renal insufficiency." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 27.5 (1996): 643-51.
110. Schiffrin, E. L., Li, J. S. and R. Lariviere "Deoxycorticosterone acetate plus salt induces overexpression of vascular endothelin-1 and severe vascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats." *Hypertension* 25.4 Pt 2 (1995): 769-73.
111. Sharifi, A. M. "Vascular endothelin-1 expression and effect of an endothelin ETA antagonist on structure and function of small arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 31 Suppl 1 (1998): S309-S312.

- 
112. Sventek, P. "Vascular and cardiac overexpression of endothelin-1 gene in one-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats but only in the late phase of two-kidney one clip Goldblatt hypertension." *J.Hypertens.* 14.1 (1996): 57-64.
113. Moreau, P. "Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist." *Circulation* 96.5 (1997): 1593-97.
114. Rajagopalan, S. "Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension." *Hypertension* 30.1 Pt 1 (1997): 29-34.
115. Tatchum-Talom, R., C. Martel, and A. Marette. "Influence of estrogen on aortic stiffness and endothelial function in female rats." *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 282.2 (2002): H491-H498.
116. Dinh, H. and L. Nathan. "Medroxyprogesterone acetate does not antagonize estrogen-induced increases in endothelium-dependent vasodilation: potential clinical implications." *Fertil.Steril.* 78.1 (2002): 122-27.
117. Barton, M., Haudenschild,C.C., d'Uscio,L.V., Shaw,S., Munter,K. and Lüscher,T.F. "Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95.24 (1998): 14367-72.
118. d'Uscio, L. V., Shaw,S., Barton,M. and Lüscher,T.F. "Losartan but not verapamil inhibits angiotensin II-induced tissue endothelin-1 increase: role of blood pressure and endothelial function." *Hypertension* 31.6 (1998): 1305-10.
119. Ruschitzka, F., Shaw,S., Gygi,D., Noll,G., Barton,M. and Lüscher,T.F. "Endothelial dysfunction in acute renal failure: role of circulating and tissue endothelin-1." *J.Am.Soc.Nephrol.* 10.5 (1999): 953-62.

120. Russell, A. and S. Watts. "Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 294.2 (2000): 598-604.
121. Guney, H. Z., Gorgun,C.Z., Hodoglugil,U. and Zengil,H. "Effects of auro-detoxin treatment on vascular responses in mouse aorta." *Gen.Pharmacol.* 29.2 (1997): 261-64.
122. Barton, M., Vos,I., Shaw,S., Boer,P., d'Uscio,L.V., Grone,H.J., Rabelink,T.J., Lattmann,T., Moreau,P. and Lüscher,T.F. "Dysfunctional renal nitric oxide synthase as a determinant of salt-sensitive hypertension: mechanisms of renal artery endothelial dysfunction and role of endothelin for vascular hypertrophyandGlomerulosclerosis." *J.Am.Soc.Nephrol.* 11.5 (2000): 835-45.
123. Hafner, D., E. Heinen, and E. Noack. "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.* 27.10 (1977): 1871-73.
124. Wallenstein, S., C. L. Zucker, and J. L. Fleiss. "Some statistical methods useful in circulation research." *Circ.Res.* 47.1 (1980): 1-9.
125. Oparil, S., Levine,R.L., Chen,S.J., Durand,J. and Chen,Y.F. "Sexually dimorphic response of the balloon-injured rat carotid artery to hormone treatment." *Circulation* 95.5 (1997): 1301-07.
126. Cheng, D. Y. and C. A. Gruetter. "Chronic estrogen alters contractile responsiveness to angiotensin II and norepinephrine in female rat aorta." *Eur.J.Pharmacol.* 215.2-3 (1992): 171-76.
127. Vedernikov, Y. P., Liao,Q.P., Jain,V., Saade,G.R., Chwalisz,K. and Garfield,R.E. "Effect of chronic treatment with 17beta-estradiol and progesterone on endothelium-dependent and endothelium-independent relaxation in isolated aortic rings from ovariectomized rats." *Am.J.Obstet.Gynecol.* 176.3 (1997): 603-08.

128. Florian, M., A. Freiman, and S. Magder. "Treatment with 17-beta-estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats." *Steroids* 69.13-14 (2004): 779-87.
129. Moura, M. J. and F. K. Marcondes. "Influence of estradiol and progesterone on the sensitivity of rat thoracic aorta to noradrenaline." *Life Sci.* 68.8 (2001): 881-88.
130. Chataigneau, T., Zerr, M., Chataigneau, M., Hudlett, F., Hirn, C., Pernot, F. and Schini-Kerth, V.B. "Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats." *Menopause.* 11.3 (2004): 255-63.

# Curriculum Vitae

## JAN MICHAEL WILIMSKY

### PERSÖNLICHE ANGABEN:

---

- Geburtsdatum: 09.11.1977
- Geburtsort: Schweinfurt
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Eltern: Reinhard Wilimsky, Studiendirektor a. D.  
Angelika Wilimsky, geb. Hennig, Oberstudienrätin

### SCHULISCHE AUSBILDUNG:

---

- 1984 – 1988 Grundschule Bad Königshofen
- 1988 – 1997 Naturwissenschaftliches Gymnasium Bad Königshofen
- Juni 1997 Abitur mit den Prüfungsfächern M, F, G und Mu

### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG:

---

- 05/1999 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 04/2001 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
- 08/2002 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 04/2003 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 11/2005 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### KLINISCHE AUSBILDUNG:

---

- 10/04-02/05 1. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Spital Zofingen (Schweiz), Dr. med. M. Fartab

02/05-04/05 2. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin Spital  
Zofingen (Schweiz), Dr. med. H.-J. Vonesch

04/05-05/05 2. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Universitäts-  
klinik Würzburg, Prof. Dr. H. Klinker

06/05-09/05 3. Tertial des Praktischen Jahres, Wahlfach Anästhesie,  
Universitätsklinik Würzburg, Prof. Dr. N. Roewer

seit 12/05 Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik des Spital Zofingen,  
Dr. med. J. Gurzeler

#### APPROBATION :

---

Mit Wirkung vom 07.11.2005 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Seit 01.12.2005 arbeite ich als Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik des Spital  
Zofingen, Aargau, Schweiz.







