

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

Vergleichende methodische Untersuchungen zur
Sauerstoffradikalbildung vaskulärer Zellen
durch Angiotensin II und Lipoproteine

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Mark Oliver Keil
aus Fulda

Würzburg, Juli 2002

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Galle
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. N. Gordjani
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2002

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Die Bedeutung der Atherosklerose am Übergang zum einundzwanzigsten Jahrhundert	1
I.2 Entstehung der Atherosklerose	2
I.2.1 Aufbau der Arterienwand	2
I.2.2 Risikofaktoren	2
I.2.3 Pathophysiologie	4
I.3 Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Mesangialzellen	5
I.4 O_2^- , NO und die Rolle der Superoxiddismutase	6
I.5 Lipoproteine	9
I.5.1 Lipoproteinstoffwechsel	9
I.5.2 Atherogene Lipoproteine: O_2^- -Freisetzung und Gefäßreaktion	11
I.6 Angiotensin II: O_2^- -Freisetzung und Gefäßreaktion	12
I.7 Der Lucigenin-Assay, der Cytochrom C-Assay und die Bedeutung verschiedener Methoden zum Nachweis von O_2^-	14
I.8 Zielsetzung	16
II. Material und Methoden	18
II.1 Methoden zum Nachweis von O_2^- -Freisetzung	18
II.1.1 Quantitativer Nachweis von O_2^- -Freisetzung durch ein Chemolumineszenzverfahren	18
II.1.1.1 Lumateichung	19
II.1.1.2 Substanztestung	20
II.1.2 Quantitativer Nachweis von O_2^- -Freisetzung durch einen Cytochrom C-Assay	21
II.2 Gefäßpräparation	22
II.3 Zellkulturen	23
II.3.1 Präparation und Kultivierung glatter Muskelzellen aus Rinderaorten	23
II.3.1.1 Charakterisierung der glatten Muskelzellen und Nachweis des AT_1 -Rezeptors durch Immunfärbung	23
II.3.2 Präparation und Kultivierung von Mesangialzellen aus Rattennieren	25
II.3.3 Kultivierung von Endothelzellen aus humanen Nabelschnüren	25

II.4	Versuchsabläufe	26
II.4.1	Lucigenin-Assay mit Rattenaortenringen	26
II.4.2	Lucigenin-Assay mit Zellkulturen	27
II.4.3	Cytochrom C-Assay mit Zellkulturen	28
II.5	Statistik	28
II.6	Präparation und Oxidation von Lipoproteinen	28
II.7	Substanzen	30
II.8	Lösungen	32
III. Ergebnisse		33
III.1	Ergebnisse mittels Lucigenin-Assay	33
III.1.1	Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O ₂ ⁻ -Freisetzung durch isolierte Rattenaorten	33
III.1.2	Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O ₂ ⁻ -Freisetzung durch Zellkulturen	35
III.1.2.1	Charakterisierung glatter Muskelzellen aus Rinderaorten und O ₂ ⁻ -Freisetzung durch dieselben	35
III.1.2.2	O ₂ ⁻ -Freisetzung durch Mesangialzellen aus Rattennieren	36
III.1.2.3	O ₂ ⁻ -Freisetzung durch humane Endothelzellen aus Nabelschnüren	37
III.2	Ergebnisse mittels Cytochrom C-Assay	39
III.2.1	Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O ₂ ⁻ -Freisetzung durch glatte Muskelzellen aus Rinderaorten	39
III.2.2	Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O ₂ ⁻ -Freisetzung durch Mesangialzellen aus Rattennieren	44
III.2.3	Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O ₂ ⁻ -Freisetzung durch humane Endothelzellen aus Nabelschnüren	44
IV. Diskussion		46
IV.1	Wirkungen von oxidiertem LDL und Angiotensin II auf die O ₂ ⁻ -Freisetzung durch Rattenaortenringe, glatte Muskelzellen, Mesangialzellen und Endothelzellen	47
IV.2	Die Rolle von O ₂ ⁻ in der Gefäßpathophysiologie	49
IV.3	Die Verlässlichkeit des Lucigenin-Assays	50

IV.4	Die Verlässlichkeit des Cytochrom C-Assays	59
IV.5	Therapeutische Möglichkeiten	61
V. Zusammenfassung		63
VI. Literaturverzeichnis		65
VII. Anhang		82
VII.1	Verzeichnis der Abkürzungen	82
VII.2	Verzeichnis der Abbildungen	84
Danksagung		
Lebenslauf		

I. Einleitung

I.1 Die Bedeutung der Atherosklerose am Übergang zum einundzwanzigsten Jahrhundert

In Deutschland sind gegenwärtig Krankheiten des Kreislaufsystems wie ischämische Herzkrankheiten und zerebrovaskuläre Krankheiten, die im wesentlichen auf atherosklerotischen Veränderungen basieren, die häufigste Todesursache (48,5 % aller Todesfälle, 43,5 % bei Männern bzw. 52,9 % bei Frauen, s. Tabelle 1).

	Männer	Frauen
Sterbefälle insgesamt	178 495	250 912
Sterbefälle an ischämischen Herzkrankheiten	88 170	95 629
Sterbefälle an akutem Myokardinfarkt	48 918	38 821
Sterbefälle am zerebrovaskulären System	36 228	64 806

Tabelle 1 (Bundesamt für Statistik: Todesursachenstatistik, Gesundheitsbericht für Deutschland 1998)

Bei den ischämischen Herzkrankheiten verursachten 1995 im wesentlichen Herzinfarkt und Angina Pectoris das Gros der Sterbefälle an Kreislaufkrankheiten. Auf sie entfielen in Deutschland 21,5 % der männlichen und 20,2 % der weiblichen Sterbefälle, wobei Männer im Durchschnitt 73,5 Jahre, Frauen 81,7 Jahre alt wurden. Innerhalb der ischämischen Herzkrankheiten ist der Herzinfarkt die häufigste Todesursache. 1995 war er für 55,5 % der Sterbefälle an ischämischen Herzkrankheiten der Männer und 40,6 % der Frauen verantwortlich. Der Anteil an allen Sterbefällen betrug bei Männern 11,9 %, bei Frauen 8,2 %.

Die Krankheiten des zerebrovaskulären Systems werden vornehmlich vom Schlaganfall, einer Krankheit des höheren Alters, bestimmt. Die altersspezifischen Sterberaten dieser Krankheit steigen mit zunehmendem Alter steil an. 1995 betrug der Anteil zerebrovaskulärer Krankheiten an allen Sterbefällen bei Männern 8,8 %, bei Frauen 13,7 % (Bundesamt für Statistik: Todesursachenstatistik, Gesundheitsbericht für Deutschland 1998).

Krankheiten atherosklerotischer Genese waren gemeinsam mit Krankheiten des Kreislaufsystems 1995 mit 48,5 % die häufigste Todesursache vor bösartigen Neoplasien mit 24,1 %, was die immense Bedeutung artherosklerotischer Veränderungen in der

Krankheitsgenese belegt und die gegenwärtig großen Anstrengungen der Forschung, die genauen Zusammenhänge und Pathogenese der Arterienverkalkung zu erkunden und neue Therapieansätze zu finden, erklärt.

I.2 Entstehung der Atherosklerose

I.2.1 Aufbau der Arterienwand

Der Aufbau der Arterienwand beruht vom Gefäßlumen nach außen hin betrachtet im Wesentlichen auf drei Abschnitten: Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia. Die Tunica intima besteht aus elastischen Fasern. Sie wird nach innen vom Endothel, nach außen zur Tunica media, die aus glatten Muskelzellen (SMCs) und wenigen elastischen Fasern besteht, durch die Membrana elastica interna begrenzt. Der Tunica media liegt die Membrana elastica externa auf. Die äußere Wandschicht wird von der Tunica adventitia, bestehend aus lockerem Bindegewebe und elastischen Fasern, gebildet (Junqueira und Carneiro 1991).

I.2.2 Risikofaktoren

Verschiedene Risikofaktoren beeinflussen nachhaltig die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen. Vier von ihnen (Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Nikotin und Diabetes mellitus) stehen dabei im Vordergrund.

Die Hyperlipidämie (insbesondere die Hypercholesterinämie, jedoch auch die Hypertriglyceridämie) scheint hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen (Ross 1995). So konnte z. B. im Tierversuch nachgewiesen werden, dass durch cholesterinreiches Futter atherosklerotische Veränderungen induziert werden können (Restori et al. 1990, Staprans et al. 1998). Weiterhin haben große epidemiologische Studien eine positive Korrelation zwischen dem Gesamtcholesterin- oder LDL-Spiegel im menschlichen Plasma und der Atheroskleroserate gezeigt (Tyroler 1987, Philipps et al. 1993). Demgegenüber sind solche Gefäßveränderungen bei Cholesterinspiegeln unter 150 mg/dl eher ungewöhnlich. Gleichzeitig kann durch Gabe von Lipidsenkern wie Statinen der atherosklerotische Prozess zum Sistieren bzw. zur Regression gebracht werden (Anderson et al. 1995, Treasure et al. 1995). Der Effekt beruht hierbei auf der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, was zu einer

Reduktion der zelleigenen Cholesterinproduktion führt. Als Antwort reagiert die Zelle mit einer verstärkten Expressierung von LDL-Rezeptoren, über welche LDL aufgenommen und somit dem Blutkreislauf entzogen wird, was schließlich zu einer Spiegelreduzierung führt.

Von weiterer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Wechselwirkung zwischen LDL und HDL. Das Ausmaß der Pathogenität erhöhter Cholesterinspiegel hängt entscheidend vom Verhältnis HDL zu LDL ab (Tornvall et al. 1996, Mack et al. 1996). In vitro Experimente zeigten eine protektive Wirkung von HDL vor dem pathogenetischen Einfluss durch oxLDL, wie z.B. die Abschwächung der endothelabhängigen Vasodilatation (Galle et al. 1994). HDL unterdrückt weiterhin die LDL-Aufnahme in Zellen, mobilisiert diese von Zellen, vermutlich auch von atheromatösen Plaques und transportiert es zur Leber (Brewer et Rader 1993), wo es mit der Galle ausgeschieden wird. Die Höhe des HDL-Spiegels korreliert negativ zur Entstehung atherosklerotischer Veränderungen.

Die Bedeutung der arteriellen Hypertonie als Risikofaktor nimmt mit steigendem Alter zu. Männer im Alter zwischen 45 und 62 Jahren, deren Blutdruck 160/95 mm HG übersteigt, unterliegen einer fünffach höheren Wahrscheinlichkeit, eine KHK zu erwerben, als solche mit einem Blutdruck von 140/90 mm HG oder niedriger (Robbins 1997).

Eingeatmeter Zigarettenrauch wirkt auf verschiedene Weise pathogen auf die Gefäßwand: er beeinträchtigt den Cholesterinspiegel, sein CO-Gehalt führt zu ischämischen Gewebeschädigungen, er enthält ein Glycoprotein, das den Faktor XII der Blutgerinnung aktiviert sowie mutagene Substanzen, welche den Proliferationsstoffwechsel von Gefäßwandzellen beeinflussen. Außerdem schädigen Bestandteile des Zigarettenrauchs das Endothel und verstärken die Gefäßkontraktion (Lassila et al. 1991).

Die Erkrankung an Diabetes Mellitus führt zu einer Dislipoproteinämie (Goff et al. 2000) sowie einer 50-prozentigen Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, eine Myokardischämie zu erleiden; ähnlich verhält es sich bezüglich der Apoplexie.

Weitere Risikofaktoren wie Adipositas, Bewegungsmangel, Streß, orale Kontrazeptivaeinnahme, Hyperuric- und Hyperhomocystinämie spielen eine eher untergeordnete Rolle. Zu beachten bleibt schließlich, dass bei gleichzeitigem Auftreten Risikofaktoren sich nicht addieren sondern potenzieren.

I.2.3 Pathophysiologie

Durch hämodynamische Verwirbelungen oder den negativen Effekt einer Hypercholesterinämie geschädigtes Endothel reagiert mit der Expressierung spezifischer Rezeptoren, an denen sich Monozyten anlagern (Mitchell und Sidawy 1998). Diese wandern zwischen Endothelzellen hindurch und sammeln sich im subendothelialen Raum.

Plasmalipoproteine, die sich im Gefäßlumen in ähnlicher Konzentration befinden wie in der Gefäßwand, erreichen die Intima durch vesikulären Transport durch das Endothel und konvektiven Transport innerhalb der Intima (Smith et al. 1990). Dort werden sie durch Enzyme von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen oxidativ modifiziert. Die imigrierten Monozyten transformieren zu Makrophagen, nehmen Lipoproteine (hauptsächlich LDL und mit großer Affinität oxLDL) auf und werden so zu Schaumzellen. Dies führt schließlich zu einer Ansammlung von Lipoproteinen in der Gefäßwand (Rosenfeld et al. 1990, Salonen et al. 1992).

Bereits zu einem frühen Zeitpunkt des atheromatösen Umbaus wandern SMCs aus der Media in die Intima, wo sie akkumulieren, proliferieren und teilweise ebenfalls durch Aufnahme von Lipoproteinen zu Schaumzellen werden.

Mit dem Fortbestehen einer Hypercholesterinämie laufen diese Vorgänge weiter ab, was im Laufe der Zeit zu einer massiven Aggregation von Schaumzellen in der Intima führt und makroskopisch als noch reversibler Fettstreifen sichtbar wird.

Die in Schaumzellen vorhandenen Lysosomen unterwerfen die Lipoproteine einer sauren Hydrolyse, was zur Freisetzung von gegenüber den Enzymen der Makrophagen inertem Cholesterin führt. Unterbleibt dessen Abtransport über HDL, bilden sich schließlich tafelförmige Kristalle. Dies hat eine Destruktion der Makrophagen und die Entstehung von Nekroseherden und fettigem Detritus zur Folge. Ein solcher Herd, dessen Umgebung im Laufe der Zeit zellarm und faserreich wird und schließlich verkalkt, wird als Atherom bezeichnet. Dieses Stadium des atheromatösen Umbaus der Gefäßwand ist in den meisten Fällen irreversibel und geht mit einem Elastizitätsverlust der Arterienwand einher.

I.3 Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Mesangialzellen

Die Inkubation von Gefäßen mit atherogenen Lipoproteinen (insbesondere oxLDL) führt zur Abnahme ihrer Dilatationsfähigkeit (Galle et al. 1994), was u. a. auf eine Freisetzung von O_2^- zurückgeführt wird. Auch Angiotensin II führt zu einer Vasokonstriktion und O_2^- -Freisetzung vaskulärer Zellen (Zhang et al. 1999, Touyz und Schiffrin 1999).

Aus diesen Gründen ist es von großem Interesse, die Reaktionen vaskulärer Zellen auf atherogene Lipoproteine und Angiotensin II genauer zu untersuchen. Hier sollen einführend die Aufgaben und Besonderheiten von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Mesangialzellen aufgeführt werden. Der Einfluß atherogener Lipoproteine bzw. Angiotensin II auf die O_2^- -Freisetzung, Funktion sowie Proliferation dieser Zellen wird in Kapitel I.5 bzw. I.6, ihre Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose in Kapitel I.2 genauer behandelt.

Endothelzellen kleiden das Gefäßlumen allseitig einschichtig aus. Sie sind sehr flach (0,1-1 μm) und wie auch ihre Zellkerne in Längsrichtung des Gefäßes ausgerichtet. Untereinander sind sie v.a. durch Zonulae occludentes bzw. Nexus verbunden. Das Endothel übernimmt die Rolle einer die biologischen Vorgänge des Gefäßes kontrollierenden Schicht zwischen Blut und Gewebe (Engelberg 1989). Zu den physiologischen Aufgaben des Endothels gehören die Bildung einer nicht thrombogenen Oberfläche und einer Permeabilitätsbarriere. Es bildet Materialien für subendotheliale Schichten (u.a. Kollegen, Proteoglycane und Elastin), die Blutgerinnung modulierende Stoffe (u.a. v. Willebrand-Faktor und Prostacyclin), den Gefäßtonus beeinflussende Stoffe (NO, Endothelin und Prastacyclin) sowie Wachstumsfaktoren und Zytokine. Es ist für Lipoproteine durchlässig und modifiziert diese.

Während Endothelzellen sich aus vaskulärem Gewebe differenzieren und somit aufgrund der gleichen aktiven und inaktiven Allele als untereinander genetisch fast identisch anzusehen sind, stammen die glatten Muskelzellen der Gefäßmedia vom ortständigen Organparenchym ab (Schwartz et al. 1990). Sie entwickeln sich aus verschiedenen Zellen, die zuvor in unterschiedlichen Organen sich voneinander differierende Reifeprozesse durchlaufen haben und unterscheiden sich daher in ihrem genetischen Code. Dies macht begreiflich, warum unterschiedliche Arterien sich in ihrer Antwort auf lokale Stimuli bezüglich der Entstehung der Atherosklerose unterscheiden (Hultgardh-Nilsson et al. 1991). Glatte Muskulatur besteht aus 30-200 μm langen, spindelförmigen, teils verzweigten Zellen, deren Querschnitt bei einem Durchmesser von 5-10 μm nahezu rund ist. Im Unterschied zu Endothelzellen sind die Zellkerne glatter Muskelzellen senkrecht zur Längsachse des Gefäßes ausgerichtet. Ihre Fähigkeit zur Kontraktion ist an Aktin- und Myosinfilamente gebunden. Es sind zwei

Phänotypen von glatten Muskelzellen bekannt: der kontraktile und der synthetisierende (Dilley et al. 1987), wobei eine mögliche Umdifferenzierung vom kontraktilen zum synthetisierenden Phänotyp beschrieben wurde (Sjolund et al. 1988). Erstere reagieren auf verschiedene Stimulantien (Angiotensin II, Endothelin, Katecholamine) mit Kontraktion. NO bedingt demgegenüber die Erschlaffung kontraktiler glatter Muskelzellen. Synthetisierende glatte Muskelzellen bilden u.a. Kollagen, Elastin, Proteoglycane, verschiedene wachstumregulierende Faktoren und Zytokine (Okada et al. 1993, Libby und Hansson 1991). Mit glatten Muskelzellen phänotypisch verwandt sind Mesangialzellen (Dubey et al. 1997). Noch 1976 wurden Mesangialzellen als glomeruläre glatte Muskelzellen bezeichnet (Scheinman et al. 1976). Mesangialzellen produzieren während der Embryonalentwicklung und im Zusammenhang mit einigen glomerulären Erkrankungen Alpha-Aktin glatter Muskelzellen (Stephenson et al. 1998). Die de novo Synthese von Alpha-Aktin wird außerdem in Zusammenhang mit vermehrtem Zellwachstum und Proliferation von Mesangialzellen gebracht (Elger et al. 1993). Sie liegen eingebettet in eine mesangiale Matrix zwischen den Kapillaren der Glomerula, haben kurze zytoplasmatische Fortsätze mit kontraktilen Filamenten und sind untereinander durch Nexus verbunden. Sie besitzen Stützfunktion und wirken gleichzeitig als Makrophagen.

I.4 O_2^- , NO und die Rolle der Superoxiddismutase

Der sog. „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) bewirkt die von Acetylcholin an muscarinergen Rezeptoren induzierte Vasodilatation. Er wird von intakten Endothelzellen generiert. Dies wurde entdeckt, als man feststellte, dass bei Untersuchungen zum Gefäßtonus die acetylcholinabhängige Dilatation von Rattenaorten von dem vorsichtigen Umgang mit der Gefäßintima bei der Präparation und somit dem Erhalten der Endothelzellen abhängt (Furchgott und Zawadski 1980). Aus L-Arginin gebildetes Stickstoffmonoxid (NO) ist mit dem EDRF identisch (Palmer et al. 1987). Dieses gelangt rasch zu seinen Zielzellen, z.B. glatten Muskelzellen, und induziert die Stimulation der cytosolischen Guanylcyclase, welche Guanosin Triphosphat (GTP) in zyklisches Guanosin 3,5-Monophosphat (cGMP) umwandelt und in diesem Falle zu einer Relaxation führt (Chappell et al. 1987). NO wird u.a. von der sog. endothelialen NO-Synthase (eNOS oder TypIII-Synthase), welche zuerst in Endothelzellen gefunden wurde (Schmidt et al. 1991), gebildet.

Zwei weitere NO-Synthasen sind bekannt. Typ I der NO-Synthase oder nNOS wurde in neuronalem Gewebe nachgewiesen (Hiki et al. 1992) und ist im gesamten Nervensystem zu finden. Typ II der NO-Synthase oder iNOS konnte zuerst in Makrophagen (Yui et al. 19991), später in vielen weiteren Zelltypen wie z.B. Mesangialzellen (Schultz et al. 1994) und glatten Muskelzellen (Fleming et al. 1991) gefunden werden. Die Typen I- (Feron 1999) und III-Synthase werden konsekutiv exprimiert und durch an Calmodulin intrazellulär gebundenes Ca^{2+} aktiviert. Demgegenüber wird Typ II-Synthase durch bakterielle Endotoxine und γ -Interferon induziert und ist Ca^{2+} -unabhängig. Seine Aktivität wird auf Transkriptionsebene reguliert (Kroncke et al. 1995). Gemeinsam für alle drei Synthasen ist Tetrahydrobiopterin essentieller Co-Faktor (Klatt et al. 1992). Den wichtigsten Reiz für die NO-Synthase in vivo stellt „shear stress“ durch Blutstrom auf das Endothel dar (Moncada und Higgs 1993).

NO geht mit anderen freien Radikalen chemische Bindungen ein, wodurch es seine physiologischen Eigenschaften verliert. Ein wichtiger Vertreter der NO inaktivierenden Radikale ist O_2^- (Katusic 1996). Die Bedeutung von atheromatösen Lipoproteinen und Angiotensin II an der O_2^- -Bildung wird unter I.5 und I.6 abgehandelt.

In der vorliegenden Arbeit untersuchtes O_2^- entsteht im Zellstoffwechsel aus molekularem Sauerstoff durch univalente Reduktion (s. Abb. 1).

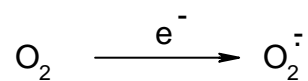


Abb.1

Die hierfür benötigten Elektronen werden beispielsweise durch Übergangsmetalle, wie Eisen oder Kupfer oder biologische Redoxsysteme wie NADH-NAD⁺ zur Verfügung gestellt.

Das nach Abb.1 primär entstehende O_2^- kann nun auf unterschiedlichen Wegen weiterreagieren (s. Abb.2).

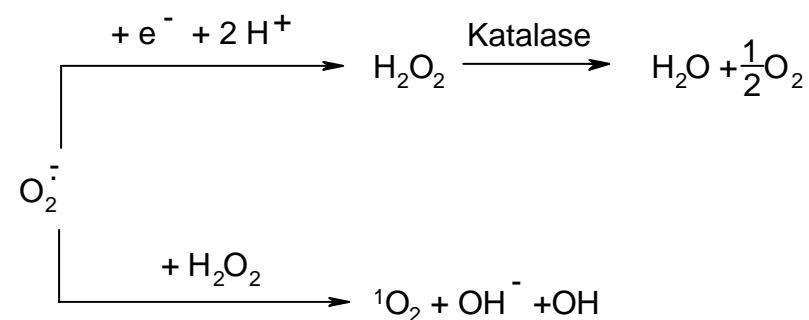


Abb.2

O_2^- kann sowohl die im Versuch genutzte Rolle eines Reduktionsmittels z.B. von Ferricytochrom C als auch eines Oxidationsmittels zur Bildung von Wasserstoffperoxid übernehmen (s. Abb. 2).

O_2^- und NO reagieren stöchiometrisch zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) (Halliwell 1993), welches in seiner protonierten Form zu Stickstoffdioxid (NO_2) und dem Hydroxylradikal (OH^\cdot) zerfällt (s. Abb. 3).

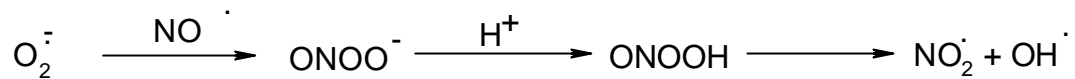


Abb. 3

Diese chemische Reaktion hat verschiedene Konsequenzen. Zum einen führt die Abnahme des NO-Gehalts zu Vasokonstriktion, zum anderen ist der Haupteffekt von $ONOO^-$ in der Auslösung einer Endotheldysfunktion zu sehen (Beckmann et al. 1990). Auf der anderen Seite kann $ONOO^-$ unter bestimmten Umständen vasodilatierend wirken (Liu et al. 1994), was jedoch einer ausgeprägten Tachyphylaxie unterliegt (Villa et al. 1994).

Während des physiologischen Zellstoffwechsels entstehendes O_2^- wird durch die Superoxiddismutase (SOD), einem protektiven Enzym, welches in allen aeroben Lebensformen gefunden werden kann, entgiftet (s. Abb. 4).

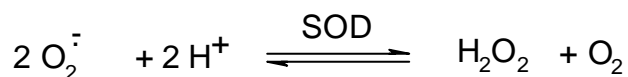


Abb. 4

Die Allgegenwart solcher schützenden Enzyme sorgt für die Inaktivierung von O_2^- , um dessen intrazellulären Bestand nicht 0,1 - 1,0 nM übersteigen zu lassen (Katusic 1996).

Verschiedene SOD-Subtypen sind bekannt. Während sich im Zytoplasma Cu und Zn enthaltende SOD findet (Liochev und Fridovich 2000), weisen Mitochondrien Mn-SOD auf. Weitere extrazelluläre SODs sind bekannt, sollen hier jedoch nicht näher aufgeführt werden, da die innerhalb der Versuche beurteilten Vorgänge primär intrazellulär stattfinden.

Dabei gebildetes Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist wie auch O_2^- zytotoxisch (Hancock 1997) und wird durch Katalase zu unschädlichen Metaboliten abgebaut (s. Abb. 2).

Exogene Faktoren nehmen Einfluss auf die Expression der SODs. So hat oxidativer Streß eine Zunahme der Enzymaktivität zur Folge (Ichikawa et al. 1994). Weiterhin wird vermutet, dass

starker Blutfluss die Expression von für SOD codierende mRNA induziert (Woodman et al. 1999).

Mit Diethyldithiocarbamat (DDC) steht ein mit dem Kupferion ein Chelat bildender irreversibler Inhibitor der Cu/Zn-SOD zur Verfügung (Brandes et al. 1994).

I.5 Lipoproteine

I.5.1 Lipoproteinstoffwechsel

Mit der Nahrung aufgenommene Lipide werden durch die Pankreasenzyme Lipase und Phospholipase A in Fettsäuren, Phospholipide, Monoglyceride und Cholesterin gespalten. Lipase wird in aktiver Form sezerniert. Phospholipase wird durch Enteropeptidase, einem Enzym der Duodenalschleimhaut, aus dem Proenzym Prophospholipase A aktiviert. Die Inkorporation in Mizellen führt zur Löslichkeit der Lipolyseprodukte durch Anlagerung amphiphiler Stoffe. Nach der durch Mizellen ermöglichten Aufnahme der Nahrungsfette in Enterozyten des Dünndarms findet eine Resynthese statt. Phospholipide und Cholesterin werden erneut verestert, Fettsäuren und Monoglyceride in Triglyceride und Lipide umgewandelt.

Ein Transport von Lipiden im Blut ist nur in Form von Lipoproteinen möglich. Dies sind durch kovalente Bindung entstandene Lipid-Protein-Komplexe, deren Einteilung nach der durch Ultrazentrifugentrennung ermittelten Dichte und nach der elektrophoretischen Mobilität erfolgt. Dabei bilden mit polaren Gruppen ausgestattete hydrophile Lipide (Phospholipide, freies Cholesterin) die Oberfläche eines solchen Komplexes, während hydrophobe Lipide wie Triglyceride und Cholesterinester den Kern bilden. An der Oberfläche der Lipoproteine befinden sich außerdem sog. Apolipoproteine, die in Leber und Darm gebildet werden und als Regulatoren und Aktivatoren im Transport und Metabolismus dienen. Ihre Einteilung erfolgt nach immunologischen Eigenschaften, der Aminosäuresequenz und dem Kohlenhydratanteil. Die Enterozyten geben die resorbierten und umgewandelten Lipide in Form von sog. Chylomikronen in die Lymphe und damit in den großen Körperkreislauf ab. Chylomikronen bestehen zu 90 % aus Triglyceriden, 7 % aus Phospholipiden, 2 % aus Cholesterin und zu 1 % aus Proteinen. Ihr Apolipoprotein ist Apo B-48. Im Blut wird ihnen Apo C und Apo E von „high density lipoprotein“ (HDL) übertragen. Apo C II aktiviert die endothelständige Lipoproteinlipase, woraufhin es zur Hydrolyse der in Chylomikronen enthaltenen Triglyceride

kommt. Gleichzeitig kommt es zu einem Verlust des Apo C- und einer Zunahme des Apo E-Gehalts. Auf diesem Weg entstehen Chylomikronen-Restpartikel (remnants).

Die Leber sezerniert „very low density lipoprotein“ (VLDL), welches zu 88 % aus Lipiden (davon 56 % Triglyceride, 20 % Phospholipide, 16 % Cholesterin und -ester) sowie zu 12 % aus Proteinen besteht. Seine Apolipoproteine sind Apo C I-III, Apo B 100 und APO E. In die Blutbahn entlassen, werden auch diesem Lipoprotein von HDL Apo E und C übertragen, was durch den nun hohen Gehalt an Apo C zum Abbau von VLDL durch kapillarendothelständige Lipoproteinlipasen und somit der Entstehung von „intermediate density lipoprotein“ (IDL) führt.

Aus diesem wird „low density lipoprotein“ (LDL) gebildet, welches nur noch Apo B 100 enthält. LDL enthält von allen Lipoproteinen am meisten Cholesterin und Cholesterinester, welche zu extrahepatischem Gewebe transportiert und dort u.a. als Bestandteil von Zellmembranen verwendet werden. Um dies zu ermöglichen, werden LDL-Partikel über spezifische Rezeptoren innerhalb von sog. „Coated Vesikeln“ in die Zelle aufgenommen.

Im Körperkreislauf überschüssiges Cholesterin wird von HDL zur Leber zurücktransportiert. HDL wird als HDL3 (Lipidanteil: 50 %, davon Triglyceride 20 %, Phospholipide 50 %, Cholesterin und Cholesterinester 32 %; Proteinanteil: 50 %) von der Leber gebildet und enthält Apo A I, Apo A II und LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase). Freies Cholesterin passiert die Zellmembran und wird nach Veresterung durch LCAT in HDL eingebaut. So entsteht HDL2, welches Apo E aufnimmt und zur Leber zurückwandert.

Die Rolle des dem in seiner Zusammensetzung dem LDL ähnlichen Lp(a) innerhalb des Lipoproteinstoffwechsels ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

	VLDL	LDL	HDL3
Durchmesser (nm)	40 - 70	20 -30	9 - 12
spezifische Dichte (g/ml)	1,006	1,063	1,210
elektrophoretische Mobilität	Prä - β	β	α
Proteinanteil (%)	12	25	50
Anteil an Lipoproteinen (%)	10 - 20	40	30 - 50

Tabelle 2: Charakteristische Daten einzelner Lipoproteinklassen (Krück, Pathophysiologie-Pathobiochemie, 1994)

I.5.2 Atherogene Lipoproteine: O_2^- -Freisetzung und Gefäßreaktion

Hypercholesterinämische Patienten weisen eine Endotheldysfunktion auf (Shiode et al. 1996). Dabei spielen atherogene Lipoproteine vorwiegend in oxidiert Form eine Rolle bei der Pathogenese der gestörten Endothelfunktion. Das vaskuläre Endothel produziert bei normaler Funktionsfähigkeit NO, welches vasodilatatorische Eigenschaften besitzt.

Der pathogenetische Effekt der Lipoproteine setzt an verschiedenen Ebenen gleichzeitig an. So inhibieren oxidierte Lipoproteine die NO-Synthese zeit- und dosisabhängig (Fogliatto et al. 1995, Rubanyi und Vanhoutte 1986). Weiterhin inaktivieren oxidierte Lipoproteine bereits freigesetztes NO (Galle und Bassenge 1991) und nehmen Einfluß auf glatte Muskelzellen der Gefäßmedia, was sich auf die Vasomotorik durch Verstärkung der Gefäßkontraktion auswirkt (Galle et al. 1990, Ahn et al. 1999). Außerdem konnte z.B. an Zellkulturen von Umbilicalvenenendothelzellen nachgewiesen werden, dass oxidiertes LDL (oxLDL) zeit- und dosisabhängig die Freisetzung von Endothelin, einem stark vasokonstriktorisches und auf glatte Muskulatur mitogen wirkenden Polypeptid, steigert (Horio et al. 1993).

Eine bedeutende Rolle bei der Einflussnahme auf die Vasomotorik scheint der durch atherogene Lipoproteine hervorgerufenen Stimulation der O_2^- -Bildung verschiedener Zelltypen zuzukommen. Zu diesen gehören Mesangialzellen (Greiber et al. 1997), juxtaglomeruläre Zellen (Galle et al. 1997), ebenso glatte Muskelzellen und Endothelzellen der arteriellen Gefäßwand (Galle et al. 1995). In diesem Zusammenhang sind Lipoproteine nach oxidativer Modifikation, welche z.B. in Gefäßwänden stattfindet (Palinski et al. 1989), besonders potent. So gebildetes O_2^- inaktiviert wie oben erwähnt NO und kann das Endothel direkt schädigen (Darley-Usmar et al. 1996).

Neben der Induzierung einer Endotheldysfunktion und O_2^- -Produktion nehmen atherogene Lipoproteine auch Einfluß auf die Zellproliferation von Mesangialzellen und vaskulären Zellen. Dabei sind sowohl die Konzentration als auch das Ausmaß der oxidativen Modifizierung von Bedeutung. Sowohl proliferationsfördernde (Lahteenmaki et al. 1998, Chatterjee 1992) als auch -hemmende (Bjorkerud B und Bjorkerud S 1996) Wirkungen auf glatte Muskelzellen wurden beobachtet. Mit Mesangialzellen verhält es sich gleichsam (Tashiro et al. 1999, Gupta et al. 1992).

Die bereits bekannten Interaktionen zwischen oxLDL und Angiotensin II werden unter I.6 beschrieben.

I.6 Angiotensin II: O₂⁻-Freisetzung und Gefäßreaktion

Bei einer Abnahme der Serumnatriumkonzentration und bei einer Einschränkung der Nierenfunktion wird aus den Epitheloidzellen der Vasa afferentia in der Niere Renin ausgeschüttet. Diese Protease spaltet aus Angiotensinogen, einem in der Leber gebildeten α -Globulin, das Dekapeptid Angiotensin I ab. Dieses wird durch eine im Blut und insbesondere in der Lunge, jedoch auch in anderem Gewebe vorkommende Peptidase, das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), in das physiologisch wirksame Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II hat eine stark vasokonstriktorische Wirkung (s.u.) und stimuliert die Freisetzung von Aldosteron, einem Mineralokortikoid aus der Zona Glomerulosa der Nebennierenrinde, welches die Natriumresorption im distalen Tubulus und im Sammelrohrsystem und damit die renale Wasserretention erhöht. Über diesen Mechanismus werden der Natriumbestand, das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen und der Blutdruck reguliert.

Von besonderer Bedeutung ist die Rolle von Angiotensin II als Vasokonstriktor, der über den AT₁-Rezeptor die cytosolische Ca²⁺-Konzentration erhöht und so zur Kontraktion glatter Muskelzellen führt. Die Rezeptoraktivierung induziert die Hydrolyse von Phosphinositiden durch Phospholipase C und somit die Bildung von Inositolphosphat, welches Ca²⁺ aus cytosolischen Beständen freisetzt. Die Erhöhung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration kann auch durch eine Interaktion zwischen AT₁-Rezeptor und einem G-Protein, mit dem Effekt einer Aktivierung von Ca²⁺-Kanälen, erfolgen (Takeuchi 1999). Neben der Vasokonstriktion führt Angiotensin II auch zur Proliferation glatter Muskelzellen (Inagami und Eguchi 2000). Der AT₁-Rezeptor wird auch auf Endothelzellen (Muscella et al. 1999) sowie Mesangialzellen, wo seine Aktivierung sowohl zu Zellhypertrophie als auch Proliferation führt (Orth et al. 1995), exprimiert.

Die Erforschung der Rolle des AT₂-Rezeptors ist noch nicht so weit vorangeschritten. Auch er wird auf glatten Muskelzellen (Nakajima et al. 1995), Mesangialzellen (Goto et al. 1997) und Endothelzellen (Muller et al. 1998) exprimiert und scheint u.a. in die Regulation des Blutdrucks einzugreifen. Seine Aktivierung führt zur Freisetzung von NO, Bradykinin und cGMP, was zu Vasodilatation führt (Sosa-Canache et al. 2000, Siragy und Carey 1999). Außerdem scheint er dem durch den AT₁-Rezeptor eingeleiteten wachstumsfördernden Effekt entgegenzuwirken und Apoptose einzuleiten (Nakajima et al. 1995, De Gasparo und Siragy 1999).

Von besonderer Bedeutung ist der auf die Endothelfunktion und somit den Gefäßtonus einwirkende Effekt von Angiotensin II, welcher auf einer Abschwächung der endothelabhängigen Dilatation beruht (Rajagopalan et al. 1996). Dieser pathologische Effekt konnte durch ACE-Hemmer im Rahmen klinischer Studien (Schlaifer et al. 1997) und AT₁-Rezeptorantagonisten wie Losartan in Rahmen von tierexperimentellen Studien (Morton et al. 1992) abgeschwächt werden.

Ein weiterer indirekt vasoaktiver Effekt von Angiotensin II ist die Induktion der Expression von mRNA für Endothelin 1, einem vasokonstriktorisch und an glatten Muskelzellen mitogen wirkenden Polypeptid (D'Uscio et al. 1998).

Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass Angiotensin II über Aktivierung membrangebundener NADH-NADPH-Oxidasen zu verstärkter O₂⁻-Bildung führt (Harrison 1997, Zhang et al. 1999). Weiterhin gilt die Beteiligung chronisch erhöhter Angiotensin II-Spiegel an der Pathogenese arterieller Hypertonie durch O₂⁻-Freisetzung und die so eingeleitete Inaktivierung von NO als wahrscheinlich (Laursen et al. 1997).

Gegenwärtig erhärten sich Hinweise auf mögliche Interaktionen zwischen Angiotensin II und oxLDL, welche nebeneinander in Makrophagen atherosklerotischer Plaques gefunden werden können (Potter et al. 1998). Im Rahmen der TREND- (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Studie (Mancini et al. 1996) und der QUIET- (QUinapril Ischemic Event Trial) Studie (Cashin Hemphill et al. 1999) wurde der Effekt von ACE-Hemmern auf die endotheliale Funktion bei Menschen untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass bei hypercholesterinämischen Patienten mit hohen LDL-Spiegeln (>125 mg/dl) der positive Effekt von ACE-Hemmern auf die Endothelzell-Funktion besonders deutlich war. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass durch reduzierte Angiotensin II- Spiegel die O₂⁻-Freisetzung durch Angiotensin II und die damit einhergehende Generierung von oxLDL vermindert werden können (Galle und Heermeier 1999). Neben diesen Studien weisen Untersuchungen zu Rezeptorexpressionen auf Interaktionen zwischen Angiotensin II und oxLDL hin. So wurde in Aorten hypercholesterinämischer Kaninchen und in Zellkulturen glatter Muskelzellen in Anwesenheit von LDL eine verstärkte Expression des AT₁-Rezeptors nachgewiesen (Nickening et al. 1997). Umgekehrt stimuliert Angiotensin II eine verstärkte Expression des oxLDL-Rezeptors LOX-1 sowie eine vermehrte Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen (Morawietz et al. 1998).

I.7 Der Lucigenin-Assay, der Cytochrom C-Assay und die Bedeutung verschiedener Methoden zum Nachweis von O_2^-

Da O_2^- an der Entstehung von Atherosklerose sowie endothelialer Dysfunktion beteiligt ist, kommt dessen spezifischer Nachweis in biologischen Systemen eine große Bedeutung zu. Dieser Nachweis ist jedoch aus mehreren Gründen problematisch. So übersteigt die intrazelluläre O_2^- -Konzentration aufgrund der Balance zwischen endogener Reduktion von O_2 zu O_2^- und dessen Eliminierung durch hoch effiziente zytoplasmatische und mitochondriale Superoxiddismutasen kaum 10 nmol/l (Brawn und Fridovich 1980). Außerdem wird die Freisetzung geringer Mengen intrazellulär gebildeten O_2^- in den Extrazellulärraum aufgrund Diffusion durch Anionen-Kanäle beobachtet (Rosen und Freeman 1984). Weiterhin ist in vaskulärem Gewebe die Konzentration von O_2^- , welches durch an Plasmamembran gebundene Oxidasen gebildet wird, relativ niedrig, was auf im Serum und Extrazellulärraum zu findende niedermolekulare Scavenger-Enzyme sowie Heparin bindende extrazelluläre SOD zurückgeführt wird (Marklund und Karlsson 1990).

Seit vielen Jahren wird Lucigenin (Bis-N-Methylacridinium-Nitrat oder Luc^{2+}) als Indikator für die O_2^- -Bildung in enzymatischen Systemen, Zellkulturen und vaskulärem Gewebe verwendet. Erste Studien über den Mechanismus der O_2^- -abhängigen Chemilumineszenz mittels Lucigenin haben gezeigt, dass Lucigenin erst einer univalenten Reduktion zu Luc^+ bedarf, bevor eine weitere Reaktion mit O_2^- zu einer Lichtemission führt (Faulkner und Fridovich 1993).

Da Lucigenin Zellmembranen durchdringt, kann es sowohl intra- als auch extrazelluläres O_2^- binden. Ein Lucigenin-Assay ist in der Lage, nanomolare Konzentrationen von O_2^- nachzuweisen (Omar et al. 1991).

Seit dem Ende der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts ist der Lucigenin-Assay jedoch in den Blickpunkt einer Diskussion über dessen Verlässlichkeit, die Detektion von O_2^- zu gewährleisten, geraten. So wurde nachgewiesen, dass Lucigenin als Generator von O_2^- in enzymatischen Systemen fungieren kann (Vasquez-Vivar et al. 1997). Dies wird u.a. durch die Möglichkeit der Autooxidation von Luc^+ und damit einhergehenden gleichzeitigen O_2^- -Generation begründet (Liochev und Fridovich 1997). Außerdem wurde gezeigt, dass Lucigenin die O_2^- - und H_2O_2 -Produktion in Endothelzellkulturen steigern, die O_2^- -Generierung isolierter Rattenaortenringen erhöhen, sowie deren endothelabhängige Relaxation erniedrigen kann, was jeweils durch SOD inhibiert werden konnte (Tarpey et al.

1999). Diese unerwünschten Effekte von Lucigenin zeigen dabei eine klare Dosis-Abhängigkeit.

Aufgrund der gegenwärtig kontrovers geführten Diskussion über die Validität des Lucigenin-Assays ist die Suche nach Alternativen von zunehmender Bedeutung.

Bereits seit Ende der sechziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wird die Reduktion von Ferricytochrom C zu Ferrocycytochrom C durch O_2^- zu dessen Detektion (Mc Cord und Fridovich 1968, Rosen und Klebanoff 1976) und zur Beurteilung der SOD-Aktivität (Forman und Fridovich 1973) eingesetzt.

Cytochrome sind Bestandteile von Reaktionszentren der Proteinkomplexe I-IV, welche als Oxireduktasen der mitochondrialen Atmungskette fungieren. Diese Komplexe enthalten Reaktionszentren mit Flavinen, Eisenschwefelkomplexen und Eisenporphyrinen (Cytochromen). In den Komplexen I, III und IV finden an den Reaktionszentren Elektronenübergänge mit sehr unterschiedlichen Redoxpotentialen statt.

Bei der Zellatmung wird primär NADH mit Sauerstoff zu NAD^{2+} oxidiert, wobei Wasser entsteht. Die bei dieser Elektronenübertragung freiwerdende Energie von bis 219 kJ/mol wird nicht in einem Schritt freigesetzt, da ein so großer Energiebetrag für Zellen nicht nutzbar ist. Statt dessen wird NADH schrittweise oxidiert, indem die Elektronen kaskadenartig über die Hilfssubstrate Coenzym Q, Cytochrom B und C zu Cytochrom AA_{3+} wandern und von dort aus auf Sauerstoff übertragen werden. Die terminale Reaktion mit Sauerstoff ist irreversibel, was einen stetigen Fluss durch das Gesamtsystem gewährleistet. Die Funktion der Cytochrome besteht im Valenzwechsel des Häm-Eisens.

Die gewonnene Energie wird dazu verwendet, H^+ -Ionen nach außen zu transportieren und somit einen Protonengradienten über der mitochondrialen Membran aufzubauen (pH-Differenz zwischen innen und außen im Gleichgewicht bei ca. 1,4). Das vorhandene Redoxpotential wird somit in ein elektrochemisches Potential umgewandelt. Der geschaffene Protonengradient wird neben der ATP-Gewinnung auch für andere Prozesse (z.B. Ionentransport durch die Membran) genutzt. Die Synthese von ATP aus ADP und P_i als Sekundärreaktion der oxidativen Phosphorylierung wird Atmungskettenphosphorylierung oder oxidative Phosphorylierung genannt.

Der Cytochrom C-Assay dieser Arbeit beruht auf der Messung des Wechsels der Absorption in einem Spektrometer bei 550 nm Wellenlänge nach abgelaufener Reduktion von Ferricytochrom C (Rosen et al. 1982). Diese chemische Reaktion läuft als Ein-Elektronen-Transfer-Prozess ab, der auf diese Weise mit großer Sensitivität und Spezifität bewertet werden kann (Vandervalle und Petersen 1987).

I.8 Zielsetzung

O_2^- wird während des physiologischen Zellstoffwechsels durch Autooxidation reduzierter Elektronentransfersysteme oder unter Enzyimbeteiligung gebildet.

Daneben wird eine Steigerung der O_2^- -Bildung verschiedener Zelltypen durch Stimulation mit atherogenen Lipoproteinen beobachtet. Zu diesen gehören Mesangialzellen (Greiber et al. 1997), juxtaglomeruläre Zellen (Galle et al. 1997), ebenso glatte Muskelzellen und Endothelzellen der arteriellen Gefäßwand (Galle et al. 1995). Auch Angiotensin II ist an der O_2^- -Bildung vaskulärer Zellen beteiligt (Laursen et al. 1997).

Die physiologische Aufgabe dieser Radikale für die Vasomotorik besteht zum einen in ihrem wachstumsstimulierenden Effekt auf glatte Muskelzellen über die Aktivierung von Proteinkinasen (Irani 2000, Bbaas und Berk 1995). Zum anderen ist ihre Beteiligung im Rahmen immunologischer Vorgänge gesichert (Liu et al. 1996). Ihre Rolle als mögliches Signalmolekül wird kontrovers diskutiert, da sie bei einer Halbwertszeit von nur 50 msec in dieser Zeit im Durchschnitt lediglich 40 μ m durch Diffusion zurücklegen können (Saran und Bors 1994). Weiterhin gilt als gesichert, dass O_2^- Apoptose bei Zellen induziert (Irani 2000, Buttke und Sandstrom 1994). O_2^- inaktiviert NO (Landmesser und Harrison 2001, Rubanyi und Vanhoutte 1986), einen potenten von Endothelzellen gebildeten Vasodilatator, was zu Vasokonstriktion und somit einer Störung des Gefäßtonus führt. Außerdem kann O_2^- die endotheliale Zellmembran direkt schädigen (Darley-Usmar et al. 1996).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in vergleichenden Untersuchungen mit der Detektion von O_2^- , welches durch verschiedene Stimulanzen wie oxLDL und Angiotensin II in Zellkulturen von Mesangialzellen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen sowie Rattenaortenringen zu generieren versucht wurde. Dabei wurden oxLDL und Angiotensin II getrennt sowie gemeinsam als Stimulanzen eingesetzt, um potentielle Modelle für eine mögliche Interaktion von oxLDL und Angiotensin II bei der O_2^- -Bildung vaskulärer Zellen zu identifizieren. Bereits bekannte Interaktionen dieser Substanzen wie gegenseitige Beeinflussung der Rezeptorexpression, gleichzeitiges Vorkommen in atherosklerotischen Plaques sowie positiver Effekt von ACE-Hemmern auf die endotheliale Funktion hypercholesterinämischer Patienten geben Anlass zu weiteren, die Interaktion von oxLDL und Angiotensin II näher erforschenden Untersuchungen (Galle und Heermeier 1999).

Gleichzeitig sollten zwei Methodiken zur Messung von O_2^- , der Lucigenin-Assay, welcher in den Blickpunkt einer Diskussion über dessen Verlässlichkeit gerückt ist (Vasques Vivar et al. 1997, Liochev und Fridovich 1997), und der Cytochrom C-Assay auf ihre Verlässlichkeit

geprüft und insbesondere der Cytochrom C-Assay etabliert werden. Diese Versuche stellen eine wichtige Basis für weitere Projekte zur O_2^- -Bildung und Interaktion von oxLDL und Angiotensin II dar.

II. Material und Methoden

II.1 Methoden zum Nachweis von O_2^- -Freisetzung

II.1.1 Quantitativer Nachweis von O_2^- -Freisetzung durch ein Chemolumineszenzverfahren

Als Indikator für die Bildung von O_2^- durch die Versuchszellen und das Versuchsgewebe wurde Lucigenin (Luc^{2+}) verwendet. Dieses bedarf zunächst einer univalenten Reduktion zu Luc^+ , bevor eine weitere Reaktion mit O_2^- zur Freisetzung von Photonen führt (s. Abb. 5) (Faulkner und Fridovich 1993, Cherry et al. 1990).

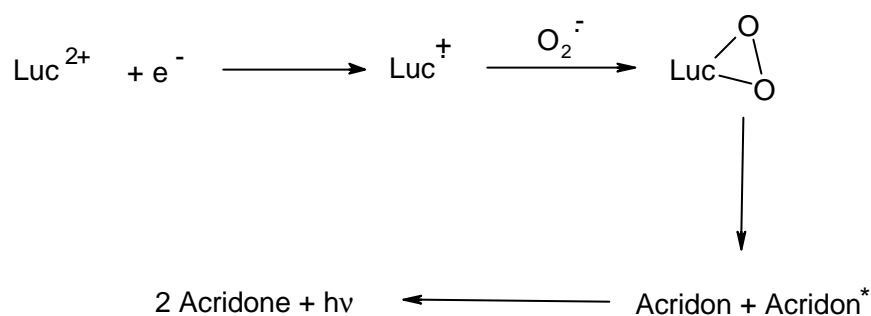


Abb. 5

Unter Berücksichtigung der in Abb. 5 dargestellten chemischen Reaktion wurde als Voraussetzungen für den Versuchsablauf definiert, dass

- pro gebildetem O_2^- ein Photon emittiert wird,
- Lucigenin in ausreichend großer Menge in der Messlösung vorliegen muß, um als im Versuchsablauf aufgebrauchte Substanz nicht zum limitierenden Faktor zu werden,
- der pH-Wert der Lösung aufgrund der Möglichkeit der Photonenfreisetzung durch OH^- konstant gehalten werden muß.

Das während des Versuchsablaufs emittierte Licht wurde mit einem Photomultiplier (Lumat LB 9501/16, Berthold, Wildbad, FRG), einem ultraschnellen Photonenzähler, dessen spektraler Empfindlichkeitsbereich zwischen 390 und 620 nm liegt, gemessen. Das Messprinzip dieses Gerätes beruht auf der Erfassung von in der Messkammer freigesetzten

Photonen, welche an der Kathode Photoelektronen auslösen. Diese wiederum werden über eine Dynodenkette vervielfacht und lösen an der Anode einen Impuls aus. Ein Schwellendiskriminator unterdrückt dabei niederenergetische Einzelimpulse, die durch das Rauschen des Photomultipliers entstehen können. Überschwellige Impulse, deren Gesamtzahl zu der emittierten Lichtmenge direkt proportional ist, werden schließlich digital gezählt.

II.1.1 Lumateichung

Die Eichung des Chemilumineszenz-Messgerätes erfolgte mit Hilfe eines zellfreien Xanthin-Xanthinoxidase-Systems zur synthetischen O_2^- -Bildung (Ohara et al 1993). Dabei wurde folgende Reaktion genutzt:

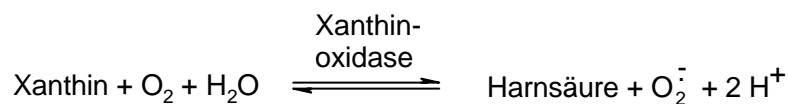


Abb. 6

Zunächst wurde zur Bestimmung des Anteils des tatsächlich freigesetzten O_2^- (theoretischer Grundwert: ein Radikal pro Molekül Xanthin) ein Cytochrom C-Assay durchgeführt, dessen Prinzip auf der Reduktion des dreiwertigen Eisenatoms von Cytochrom C zu einem zweiwertigen Eisenatom durch O_2^- beruht. Diese Ladungsänderung bedingt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Cytochroms bei 550 nm Wellenlänge, was mit einem UV/VIS Spektrometer (Lambda 12, Perkin Elmer GmbH, Langen, FRG) erfasst wurde.

Zur definierten O_2^- -Freisetzung wurden 100 bzw. 200 μM Xanthin mit 0,002 U Xanthinoxidase in einem jeweiligen Gesamtvolumen von 1 ml Krebs-Hepes Puffer im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Um nun nach der Bestimmung von Δ Absorbance am Photometer den tatsächlichen Anteil freigesetzter und detektierter Radikale im Vergleich zur theoretischen Menge von einem O_2^- pro Molekül Xanthin zu ermitteln, wurde folgende Formel (Van Gelder und Slater 1962) herangezogen (s. Abb. 7):

$$c(O_2^-) = \frac{\Delta \text{ Abs.}}{21,1}$$

Abb. 7

Auf diese Weise wurde ein detektierter Anteil von 27 % nach der Messung berechnet.

Anschließend erfolgte bei gleichen Konzentrationen von Xanthin und Xanthinoxidase am Lumaten mit 250 μM Lucigenin als Indikator eine Messung der O_2^- -Freisetzung.

So wurde ermittelt, dass 1000 Signale am Lumaten 18,4 pmol O_2^- entsprechen (s. Abb. 8).

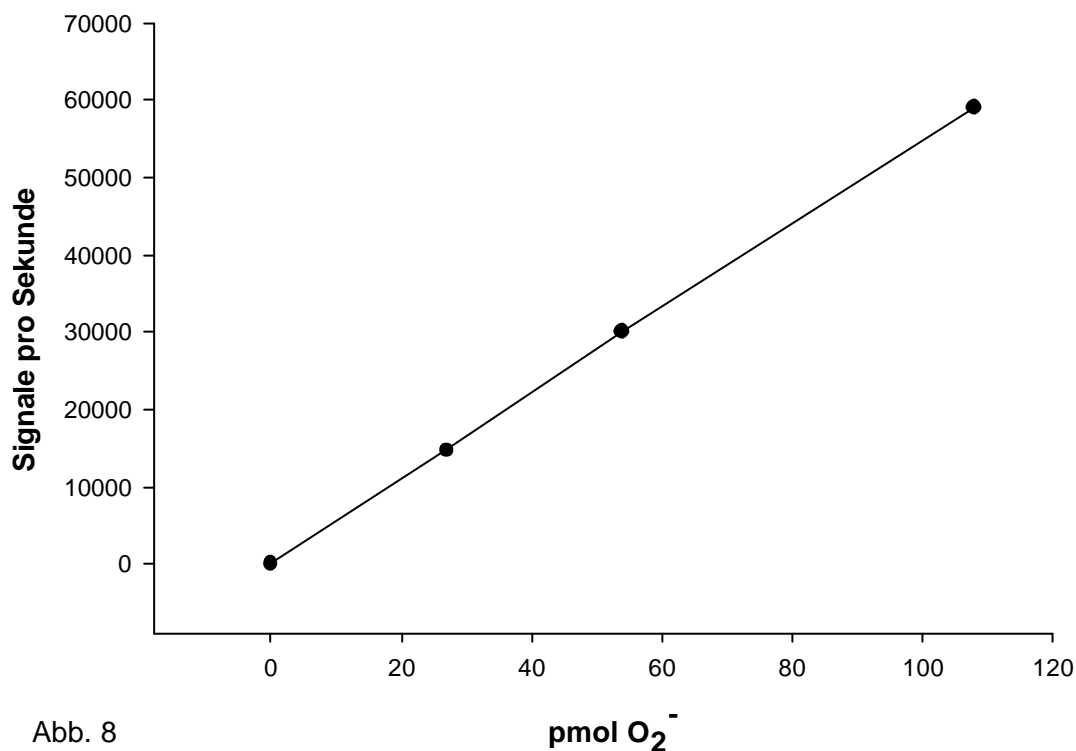


Abb. 8

II.1.1.2 Substanztestung

Bevor Versuche mit verschiedenen Substanzen durchgeführt werden konnten, wurden diese in einem zellfreien System getestet, um sowohl signalverstärkende Eigenschaften durch Interaktion mit Lucigenin als auch signalvermindernde Eigenschaften durch Neutralisierung von Radikalen auszuschließen. Nur solche Substanzen, die diese Bedingungen erfüllten, wurden verwendet.

Als zellfreies System diente hierbei wie schon bei der Lumateichung die Xanthin-Xanthinoxidase-Reaktion. Zur Gewährleistung einer zuverlässigen Standardisierung wurden

drei Ansätze verschiedener Konzentrationen von Xanthin (20, 40, 80 nmol) mit 250 μM Lucigenin in 1 ml Krebs-Hepes Puffer verwendet. Über das Autoinjektionssystem des Messgerätes, welches eine exogene Lichtzufuhr beim Öffnen der Messkammer verhinderte, wurden jeweils 0,08 U Xanthinoxidase zugeführt. Diesem Versuchsaufbau entsprechend wurde eine zweite Messreihe mit der jeweils zu testenden Substanz zusätzlich im Ansatz durchgeführt.

Gemäß den oben angeführten Bedingungen kamen nur Substanzen zum Einsatz, deren Testkurve mit der Standardkurve deckungsgleich waren.

II.1.2 Quantitativer Nachweis von O_2^- -Freisetzung durch einen Cytochrom C-Assay

O_2^- reagiert mit Ferricytochrom C zu Ferrocycytochrom C (s. Abb. 9), wobei beim Ablauf dieser chemischen Reaktion die Bildung einer Peroxidspezies nicht beobachtet werden kann (Butler et al. 1982).

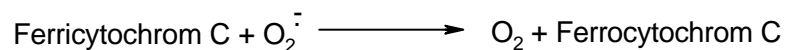


Abb. 9

Diese Reaktion unterliegt einer Temperatur- und pH-Abhängigkeit. Mit steigendem pH-Wert sowie steigender Temperatur sinkt die Geschwindigkeitskonstante. Die Aktivierungsenergie liegt bei 31 ± 5 kJ/mol (Butler et al. 1982).

Zunächst wurden zellfreie Vorversuche durchgeführt mit dem Ziel, über ein Xanthin-Xanthinoxidase-System zur synthetischen O_2^- -Bildung nachzuweisen, dass mittels der durchgeführten Methode O_2^- detektiert wurde. Gleichzeitig sollte eine mögliche Reduktion von Cytochrom C und damit Ergebnisverfälschung durch zum einen direkt im Zellstoffwechsel zum anderen durch Weiterreaktion von O_2^- entstehendes H_2O_2 ausgeschlossen werden. Hierzu dienten als Messlösung in Küvetten jeweils 1 ml phenolrotfreies Kulturmedium, Cytochrom C (200 μM) sowie die Testsubstanzen. Als Hintergrund-Messlösung diente jeweils der gleiche Ansatz ohne die die Reaktion antreibende Substanz (Xanthinoxidase oder H_2O_2). Nach 45 min Inkubation im Brutschrank und danach

variierenden Reaktionszeiten wurde das Absorptionsmaximum an einem UV/VIS Spektrometer (Lambda 12, Perkin Elmer GmbH, Langen FRG) bei 550 nm bestimmt.

Im zellfreien Xanthin-Xanthinoxidase-System konnte so Cytochrom C reduziert und das Signal durch Gabe von SOD nahezu vollständig gehemmt werden, was die Spezifität des Assays belegte. H_2O_2 reduzierte Cytochrom C nicht.

II.2 Gefäßpräparation

Die Versuche wurden mit Aortenstücken 250 bis 300 g schwerer und ca. 6 Wochen alter Wistar-Ratten beider Geschlechter durchgeführt. Dafür wurden die Tiere zunächst intraperitoneal durch Injektion von 0,5 ml Barbituratlösung / 100 g Körpergewicht betäubt. Vor Präparationsbeginn wurde der Narkoseerfolg durch Überprüfung der Schmerzreflexe an den besonders empfindlichen Pfoteninnenseiten der Ratten überprüft und falls erforderlich erneut Betäubungsmittel appliziert.

Anschließend wurden die Ratten auf einer Präparationsunterlage fixiert, vom ventralen Brustfell großzügig befreit und der Thorax am Processus xiphoideus beginnend eröffnet. Das noch schlagende Herz, das bis zu diesem Zeitpunkt die Versorgung des Zielorgans Aorta aufrechterhielt, wurde vom umgebenden Bindegewebe befreit und entnommen. Danach wurde die Trachea durchtrennt und die Lungen nach kaudal geklappt und fixiert. Die nun freiliegende Hauptschlagader wurde vom Aortenbogen bis zum Übergang in die Aorta abdominalis über der Wirbelsäule freigelegt und entnommen.

Im Anschluß daran wurde das Gefäßteil mit Krebs-Hepes Puffer zur Befreiung von Blutgerinnseln gespült, unter einem Kaltlichtmikroskop von anheftendem Bindegewebe freipräpariert und in ca. 0,5 cm lange Ringe zerteilt. Es folgte eine einstündige Lagerung derselben auf Eis in mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begastem Krebs-Hepes Puffer.

II.3 Zellkulturen

II.3.1 Präparation und Kultivierung glatter Muskelzellen aus Rinderaorten

Die Aorta wurde zunächst mit steriler PBS-Lösung, mit zugesetztem Penicillin und Streptomycin gespült, um eventuell vorhandene Blutreste zu beseitigen und Bakterienwachstum zu verhindern. Anschließend wurde sie im Bereich der abgehenden Gefäße der Länge nach aufgeschnitten und unter einer sterilen Werkbank auf einer Präparationsunterlage (Styroporunterlage mit Aluminiumüberzug) mit der Lumeninnenseite nach oben fixiert. Mit einem Skalpell wurde mehrmals u-förmig (ca. 3 cm lang, 1 cm breit) die Tunika intima durchtrennt und bis zur Tunika media in die Gefäßwand eingeschnitten. Kleine u-förmige Gewebestücke wurden in Höhe der Tunika media nach Anheben mit einer chirurgischen Pinzette am Einschnitttrand mit einer kleinen Schere freipräpariert, zur Seite geklappt und fixiert. Nun wurden aus der freigelegten mittleren Wandschicht der Aorta, die primär aus glatten Muskelzellen besteht, kleine Gewebestücke entnommen, in eine sterile Petrischale mit Kulturmedium überführt und mit einem Skalpell zerkleinert.

Durch Absaugen des Mediums bis auf ein möglichst kleines Restvolumen wurde in der Petrischale eine sog. feuchte Kammer erzeugt, welche das Anheften der Gewebestücke während des folgenden zweistündigen Aufenthalts im Brutschrank (10 % CO₂ , 37 °C) förderte. Anschließend wurde Kulturmedium hinzu gegeben und auf das Auswachsen glatter Muskelzellen gewartet.

Diese wurden in Kulturmedium mit 20 % FCS (Sigma Deisenhofen FRG) in Flaschen bis zur 5. Passage kultiviert. Für die Lucigenin-Assays und Cytochrom C-Assays wurden sie auf Petrischalen ausgesät und auf vollständiges Auswachsen auf der Unterlage gewartet.

II.3.1.1 Charakterisierung der glatten Muskelzellen und Nachweis des AT₁-Rezeptors durch Immunfärbung

Um die durch Präparation einer Rinderaorta gewonnenen Zellen zu typisieren, wurde eine Immunfärbung in der 6. Passage durchgeführt.

Dafür wurden die Zellen auf 24-well-plates ausgesät und auf deren Auswachsen zu einem Monolayer gewartet. Nach Absaugen des Überstands wurden sie mit PBS / 1 % BSA gewaschen und in drei 5 min langen Schritten durch jeweilige Zugabe von 80 % Aceton/Ethanol, 80 % Aceton, und 50 % Aceton bei -20 °C fixiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit PBS / 1 % BSA und das Blockieren für 30 min in PBS / 10 % BSA.

Für die eigentlichen Immunfärbungen wurden als jeweils 1. Antikörper verwendet:

- Anti-Aktin (Progen, Biotech GmbH Heidelberg, FRG, Quelle: Maus) zum Nachweis glatter Muskelzellen,
- Anti-AT₁ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, Quelle: Kaninchen) zum Nachweis des Rezeptors,
- Anti-von Willebrand-Faktor (DAKO Hamburg, FRG, Quelle: Maus)

Letzterer wurde genutzt um zu belegen, dass nicht jede Antikörperzugabe zu einem Positivergebnis führte. Der von Willebrand-Faktor, als Untereinheit des Faktor VIII der Blutgerinnung, befindet sich an Endothelzellen, was seinen Nachweis im vorliegenden Verfahren unwahrscheinlich machte. Einer vierten Reihe Zellen wurde zur Kontrolle kein Antikörper zugeführt.

Die Zugabe erfolgte verdünnt in 250 µl PBS / 1 % BSA bei Raumtemperatur für 1 h, worauf erneut dreimalig mit PBS / 1 % BSA gewaschen wurde.

Als Zweitantikörper gegen Maus-IgG wurden monoklonale Anti-Maus-Immunglobuline (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet, denen das Vitamin Biotin angekoppelt war. Diese wurden als Stocklösung zusammen mit PBS / 1 % BSA für 20 min Inkubation bei Raumtemperatur den Zellen zugeführt. Nach einem anschließenden Waschvorgang wurde Avidin (Vector Laboratories, Burlingame, USA), ein Glycoprotein mit hoher Affinität zu Biotin, dem zur Farbreaktion das Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) angekoppelt war, hinzu gegeben. Es folgten erneut 20 min Inkubation und dreimaliges Waschen bevor das Substrat Diaminbenzidin (DAB, Sigma Deisenhofen FRG) zur Farbentwicklung zugesetzt wurde. Im Falle einer Bindung der Zweitantikörper an Maus-IgG erfolgte eine Braunfärbung, welche unter dem Mikroskop verfolgt wurde.

Als Zweitantikörper gegen Kaninchen-IgG wurden monoklonale Anti-Kaninchen-Immunglobuline (DAKO, Hamburg, FRG) verwendet. Die Farbreaktion erfolgte wie oben beschrieben, hier war HRP jedoch direkt an den Antikörper gekoppelt.

Nach Absaugen des Überstands und zweimaligem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen abschließend mit Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, FRG) abgedeckt.

II.3.2 Präparation und Kultivierung von Mesangialzellen aus Rattennieren

Als Organspender dienten ca. zwei Tage alte neugeborene Wistar-Ratten, deren Tötung durch Decapitation erfolgte. Anschließend wurden sie zur Sterilisierung für einige Sekunden in 70 % Ethanol getaucht und unter einer sterilen Werkbank mit dem Rücken nach oben auf einer Präparationsunterlage fixiert. Mit einer Schere wurde über dem Schwanzursprung die dorsale Haut eingeschnitten und bis zum Hals abgezogen. Über der erwarteten oberflächlichen Projektionsstelle der Nieren wurden der Körper in Wirbelsäulennähe mit einem Skalpell eröffnet und die oberflächlich liegenden Zielorgane freipräpariert sowie von Ureter und Gefäßen getrennt. In einem Becherglas mit Kulturmedium und zugesetztem Penicillin und Streptomycin zur Prävention von Bakterienwachstum wurden die Rattennieren gesammelt und nach Absaugen des Mediums mit einem Skalpell zerkleinert.

Da die Mesangialzellen aus Glomerula auswachsen sollten, mußten diese nun weitgehend isoliert werden um ein Auswachsen anderer Zelltypen zu verhindern. Dies geschah mechanisch durch Sieben. Dabei wurden die Nieren jeweils zwei mal mit einem Erlenmeyerkolben durch Siebe mit abnehmender Porengröße (Durchmesser 125 µm, 75 µm) gedrückt. Letztlich wurden die Glomerula auf einem weiteren Sieb (Durchmesser der Porengröße: 22 µm) aufgefangen. Danach wurden sie in Kulturmedium für 10 min bei 1600 U/min und 20 °C zentrifugiert und nach Absaugen des Überstands auf Petrischalen mit Kulturmedium (10 % FCS, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) überführt.

Das Auswachsen der Mesangialzellen erfolgte im Brutschrank (10 % CO₂ , 37 °C). Nach Kultivierung bis zur 4. Passage in Flaschen wurden sie für die Versuche in der 5. Passage auf Petrischalen ausgesät und auf vollständiges Auswachsen auf der Unterlage gewartet.

II.3.3 Kultivierung von Endothelzellen aus humanen Nabelschnüren

Die Lucigenin-Assays und Cytochrom C-Assays wurden mit Endothelzellen der Firma Clometrics durchgeführt. In der 1. Passage bezogen wurden sie in Flaschen mit Kulturmedium (10 % FCS, Promocell) bis zur 4. Passage kultiviert und für die Versuche in der 5. Passage auf Petrischalen ausgesät.

II.4 Versuchsabläufe

II.4.1 Lucigenin-Assay mit Rattenaortenringen

Die vorbereiteten Gefäßringe (s. III.1) wurden 60 min in 1 ml Krebs-Hepes Puffer, dem zuvor 10 mM Diethyldithiocarbamic Acid (DDC) zur irreversiblen Hemmung der SOD sowie die jeweils zu testenden Substanzen in entsprechenden Konzentrationen zugesetzt wurden, bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Gleichzeitig wurde ebenso die später für den Ansatz der Messlösung benötigte Puffermenge (1 ml) erwärmt.

Die quantitative Erhebung der O_2^- -Freisetzung erfolgte wie unter II. 1.1 beschrieben durch ein Chemolumineszenzverfahren am Lumaten. Dabei wurde zunächst der Leerwert der Messlösung (d.h. ohne Aortenring) bestimmt. Diese setzte sich aus der Inkubationslösung mit den zu testenden Substanzen und der Indikatorsubstanz Lucigenin (250 μ M) anstelle DDCs, welches als Radikalfänger das Signal unspezifisch vermindert hätte, zusammen. Da sowohl der Lichteinfall beim Öffnen der Messkammer, als auch die Stimulation des Lucigenins durch das Tages- sowie künstliche Licht vor Einbringen in die dunkle Messkammer das Signal zu Messbeginn artefiziell erhöhte, mußte die Leerwertbestimmung über mehrere Minuten erfolgen, bis ein konstantes Niveau erreicht wurde.

Anschließend wurden die Gefäßringe der Inkubationslösung entnommen, der Messlösung zugesetzt und die O_2^- -Freisetzung in Abhängigkeit von der jeweilig zu testenden Substanz minütlich über 20 min bestimmt.

Den Abschluss der Versuche bildete die Überprüfung der Spezifität des Experiments. Dies erfolgte durch Zugabe von 10 mM 4,5-Dihydroxy-1,3-Benzene-Disulfonic Acid (Tiron), einem nichtenzymatischen Radikalfänger (Gyllenhammer1987). Senkte sich das Signal nach einigen Minuten auf die Höhe des zuvor ermittelten Leerwertes, wurde so belegt, dass die vorausgegangene Signalerhöhung auf eine zelluläre O_2^- -Freisetzung zurückzuführen war. Dies gelang ausnahmslos.

Als Kontrolle diente der gleiche Versuchsablauf ohne Testsubstanzen.

Um das Trockengewicht der Gefäßringe bestimmen zu können, wurden sie bei 60 °C getrocknet.

II.4.2 Lucigenin-Assay mit Zellkulturen

Für die Versuche wurden humane Endothelzellen aus Nabelschnüren (HUVECs), Mesangialzellen aus Rattennieren (MCs) und glatte Muskelzellen aus Rinderaorten (SMCs) verwendet. Den auf Petrischalen ausgewachsenen Zellen wurde nach einem Mediumwechsel die zu testende Substanz in entsprechender Konzentration zugeführt, worauf eine zeitlich variierende Inkubation im Brutschrank erfolgte.

Das Ablösen der verschiedenen Zellarten von ihren Wells gestaltete sich aufgrund differierenden Ansprechens auf lösende Substanzen unterschiedlich.

MCs und HUVECs wurden mittels eines in destilliertem Wasser gelösten Gemischs aus Kollagenase (zum schonenden Andauen der Zellfortsätze, 0,16 U/ml), Trypsin-Inhibitor (1 mg/ml) und bovinem Serumalbumin (2 mg/ml) von ihrer Unterlage getrennt. Dabei wurde den Zellen zunächst diese Lösung zusammen mit DDC (10 mM) vor einem 30-minütigen Aufenthalt im Brutschrank zugesetzt.

SMCs wurden durch in PBS gelöstes Trypsin und EDTA abgelöst, was die Zellmembranen stärker angriff und deshalb nur ca. 5 min Inkubation bedurfte. Da DDC hier nicht im Rahmen des Ablösevorgangs hinzu gegeben werden konnte, wurde es bereits 30 min vor Beginn des Löseverfahrens appliziert.

Anschließend wurden die Zellen von ihren Petrischalen abgewaschen und lagen nach zweimaligem Zentrifugieren (5 min, 1000 U/min, 4 °C) und Spülen (HUVECs und MCs mit BSS, SMCs zunächst mit PBS / 5% FCS zur Inaktivierung des Trypsins, anschließend BSS) als Zellsuspension in Tyrode-Puffer vor, der zu einer Proteindoppelbestimmung zwei Proben (jew. 10 µl) entnommen wurden.

Um die Zellen nach dieser starken Beanspruchung dem physiologischen Stoffwechsel näherzubringen, wurden sie nach der Zugabe eines Glucose-BSA-Tyrode-Puffer (mit doppeltem Glucosegehalt) für 10 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Die quantitative Erhebung der O_2^- -Freisetzung (s. II. 1.1) erfolgte durch ein Chemolumineszenzverfahren am Lumaten. Dabei wurde zunächst der Leerwert bestehend aus Glucose-BSA-Tyrode-Puffer, Lucigenin (250 µM) und der zu testenden Substanz wie unter II. 4.1 beschrieben bestimmt. Diese Leerwertlösung wurde danach der Zellsuspension zugeführt und die O_2^- -Freisetzung für 20 min bestimmt.

Abschließend wurde zur Überprüfung der Spezifität der Versuche durch Zugabe von 10 mM Tiron das Messsignal auf Höhe des Leerwerts zu senken versucht, was ausnahmslos gelang. Als Kontrolle diente der gleiche Versuchsablauf ohne Testsubstanzen.

II.4.3 Cytochrom C-Assay mit Zellkulturen

Zur Durchführung der Zellversuche erfolgte zunächst unter der sterilen Werkbank das Ansetzen der Messlösung, die sich aus Kulturmedium, den Versuchssubstanzen in jeweiliger Konzentration sowie Cytochrom C (200 μM) zusammensetzte. Nach der anschließenden sterilen Filtration der Messlösung wurden die Zellen (auch hier SMCs, MCs und HUVECs) zweimal mit PBS gespült und ihnen die Messlösung zugeführt. Es folgte zusammen mit einer zellfreien Hintergrund-Messlösung eine zeitlich variierende Inkubation im Brutschrank (10 % CO_2 , 37 °C) unter gleichen Bedingungen.

Nach Inkubationsende wurde den Zellen und dem Hintergrundansatz jeweils 1 ml Messlösung entnommen und zentrifugiert (5 min, 1000 U/min, 4 °C). Abschließend wurde am Spektrometer das Absorptionsmaximum bei 550 nm bestimmt.

Der gleiche Versuchsablauf ohne Testsubstanzen diente als Kontrolle.

II.5 Statistik

Die Ergebnisse wurden in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Die Säulen stellen die Summe des jeweils detektierten O_2^- zu den in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Messzeitpunkten dar. Die Daten sind als arithmetisches Mittel der unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuche \pm Standardfehler (SEM=Standardabweichung / \sqrt{n}) aufgeführt. Hierbei entspricht n der Anzahl der zugehörigen Versuchsdurchführungen und wird in den zugeordneten Tabellen und Abbildungen aufgeführt. Der Standardfehler wird durch vertikale Fehlerbalken graphisch dargestellt.

II.6 Präparation und Oxidation von Lipoproteinen

Die Gewinnung der Lipoproteine (hier: LDL) erfolgte aus frischem, nicht gefrorenem Plasma gesunder Blutspender, welchem umgehend NaCl (3 mmol/l), EDTA (2 mmol/l, pH 7,4) zur Prävention von Autooxidation, Trasylol (11 U / ml) als Proteaseinhibitor zur Verhütung von Proteolyse und Natriumazid (0,2 %) zum Schutz vor Keimwachstum zugesetzt wurde.

Die Isolierung der Lipoproteine erfolgte durch mehrfache Ultrazentrifugation in einem Beckmann Vti 50 Rotor. Dafür wurde nach Bestimmung der Ist-Dichte des Zentrifugats mittels eines Aräometers die Wunsch-Dichte jeweils durch Zugabe von KBr eingestellt. Die Berechnung der benötigten Menge Kaliumbromids erfolgte durch folgende Formel:

$$\frac{\text{Vol. (ml)} * (\text{Wunsch-Dichte} - \text{Ist-Dichte})}{0,733 * (\text{Wunsch-Dichte} + \text{Ist-Dichte})} = \text{KBr (g)}$$

2

Abb. 10

Anschließend wurde der Serinproteaseinhibitor PMSF (5 mg/ 12 ml Plasma) zugesetzt.

Im ersten Trennungsschritt erfolgte die Zentrifugation bei 50000 rpm, 4 °C und einer Dichte von 1,063 g/ml für 8 h. LDL, mit einer niedrigeren spezifischen Dichte von ca. 1,055 g/ml, akkumulierte zusammen mit VLDL, Chylomikronen und Triglyceriden oberhalb der Pufferschicht. Unterhalb derselben sammelte sich HDL aufgrund seiner höheren spezifischen Dichte von ca. 1,19 g/ml.

Die obere Bande wurde anschließend abgenommen und mit einem PBS-Puffer für den zweiten Trennungsschritt unterschichtet. Dieser erfolgte bei 50000 rpm, 4°C und einer Dichte von 1,04 g/ml für 3 h, um LDL von VLDL (ca.1,004 g/ml), Chylomikronen (ca. 0,9 g/ml) und Triglyceriden zu separieren. Dabei sammelte sich LDL in der Mitte des Zentrifugationsröhrchens, während VLDL zusammen mit Chylomikronen und Triglyceriden die Deckschicht bildeten.

Es folgte wiederum die Abnahme der LDL enthaltenden Bande und eine Ankonzentration in Millipore 30000 NMWL Biomax-30 (Amicon Bioseparations, Centricon Plus-20) bei 500 rpm und 4 °C für 45 min. Das gewonnene Konzentrat wurde in zwei Schritten steril filtriert (Porengröße: 0,45 µm und 0,2 µm).

Um das so isolierte native LDL (nLDL) von den zu Beginn der Präparation zugegebenen Salzen zu befreien, folgte eine Dialyse (Schläuche: MWCO 50000, Spectrapor 6) gegen steriles PBS und 200 µM EDTA für 24 h bei 4 °C. Zur Bestimmung des Oxidationsgrades schloß sich eine Lipidelektrophorese (s.u.) bei 22 °C für 22 h an, wodurch das Ausbleiben einer Oxidation der Lipoproteine nachgewiesen wurde. Die Lagerung erfolgte bis zu 3 Wochen in Dunkelheit bei 4 °C.

Die Versuche wurden mit oxidierten Lipoproteinen durchgeführt. Die Oxidierung von nLDL erfolgte mittels CuSO₄ als Oxidationsmittel.

Um den Oxidationsvorgang einleiten zu können, mußte zunächst der Lipoproteinansatz von EDTA weitgehend befreit werden. Dabei wurde eine Dialyse gegen einen PBS-Puffer mit EDTA (1 μM) bei 4 °C mit zweifachem Pufferwechsel für 3 Tage durchgeführt. Nach einer Proteinbestimmung (Lowry et al 1951) und Einstellung der Lipoproteinkonzentration zur Standardisierung der Oxidation auf 1 mg/ml folgte die eigentlich Oxidierung durch Dialyse von LDL 1 mg/ml gegen einen PBS-Puffer mit CuSO_4 2 μM bei Raumtemperatur für 22 h. Durch anschließende Überführung der Dialyseschläuche in einen PBS-Puffer mit EDTA 100 μM bei 4°C für 2 Tage wurde der Oxidationsvorgang gestoppt. Nach erneuter Ankonzentration in Millipore und zweimaliger steriler Filtration folgte abschließend eine letzte Proteinbestimmung.

Der Oxidationsgrad der Lipoproteine wurde durch Lipidelektrophorese auf einem albuminhaltigen Agarmedium (Lipodophor, Immuno AG, Wien, Österreich) bei 22 °C im Inkubator bestimmt. Das Laufverhalten von nLDL ist innerhalb dieses Elektrophorese-Systems standardisiert. Durch die negativere Ladung oxidiertes Lipoproteine (Steinberg et al. 1987) betrug deren relative Mobilität im Vergleich zu nativen 2,0 bis 2,3. Die anschließende Darstellung der Banden erfolgte durch chemische Präzipitation mit Polyanionen, was eine Färbung überflüssig machte.

Das so gewonnene oxLDL wurden wie auch nLDL bis zu 3 Wochen in Dunkelheit bei 4°C gelagert.

II.7 Substanzen

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

von Sigma, München, Deutschland:

Angiotensin II, Bis-N-Methylacridinium Nitrat (Lucigenin), Bovines Serum Albumine (BSA), Cytochrom C, Diaminbenzidin (DAB), Diethyldithiocarbamic Acid (DDC), 4,5-Dihydroxy-1,3-Benzene-Disulfonic Acid (Tiron), Hepes (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N-(2-ethanesulfonic Acid))), Kulturmedium für MCs, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), Soybean trypsin inhibitor Lowry test kit, Trypsin-EDTA, Xanthin (2,6-Dihydroxypurine), Xanthinoxidase

von Merck, Darmstadt, Deutschland:

Calciumchlorid (CaCl_2), Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Glyceringelatine, Kaliumbromid (KBr), Kaliumchlorid (KCl), Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), Kupfersulfat (CuSO_4), Magnesiumsulfat (MgSO_4), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)

von Byk, Gulden Konstanz:

Inactin

von Boehringer, Mannheim, Deutschland:

Kollagenase A

von Biochrom, Deutschland:

Trypsin/EDTA, Penicillin/Streptomycin, FCS

von Promocell, Deutschland:

FCS (Fetales Kälber-Serum)

von PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria:

Kulturmedium für MCs

von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA:

Anti-AT₁-Rezeptor Antikörper (Rabbit polyclonal IgG)

von Progen Biotechnik, Heidelberg, Deutschland:

Anti-Aktin Antikörper (Mouse polyclonal IgG)

von DAKO, Dänemark:

Anti-Rabbit-Antikörper (Swine monoclonal IgG), Anti-von Willebrand-Faktor-Antikörper (Mouse polyclonal IgG)

von Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA:

Vectastain ABC-Kit

II.8 Lösungen

Hepes-Tyrode-Puffer

CaCl₂·2H₂O 2,65g/l, KCl 2,00g/l, MgCl₂·6H₂O 1,02g/l, NaCl 80,00g/l, Hepes 23,80g/l,
NaH₂PO₄ 0,5g/l

Krebs-Hepes-Puffer

1,87 mM CaCl₂, 11,1 mM C₆H₁₂O₆, 4,7 mM KCl, 1,7 mM K₂HPO₄, 1,2 mM MgSO₄, 10
mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 20 mM C₈H₁₇N₂O₄SNa

Glucose-Lösung (einfach)

50ml einfache Hepes-Tyrode (pH 7,35), 0,09g C₆H₁₂O₆, 0,045 Bovines Serum Albumin

Glucose-Lösung (doppelt)

50 ml einfache Hepes-Tyrode (pH 7,35), 0,18g C₆H₁₂O₆, 0,09g Bovines Serum Albumin

Barbituratlösung

0,5 g Inactin in 10 ml H₂O gelöst

III. Ergebnisse

III.1 Ergebnisse mittels Lucigenin-Assay

III.1.1 Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O_2^- -Freisetzung durch isolierte Rattenaorten

Sowohl die Anwesenheit von Angiotensin II 10^{-8} M als auch oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$ führten zu einer verstärkten O_2^- -Freisetzung durch die eingesetzten Gefäße (Messung jeweils 5, 10 und 15 min nach Gabe der Versuchssubstanz). Ebenso verhielt es sich bei der gleichzeitigen Gegenwart von Angiotensin II 10^{-8} M und oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$.

Es zeigte sich, dass die O_2^- -Freisetzung durch oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$ deutlich stärker stimuliert wurde als durch Angiotensin II 10^{-8} M. Bei simultaner Donation von Angiotensin II 10^{-8} M und oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$ stieg die Menge freigesetzter O_2^- stärker an, als die Summe der freigesetzten O_2^- bei jeweils isolierter Gabe der beiden Versuchssubstanzen. Während das Signal der Kontrolle während der drei Messzeitpunkte konstant blieb, stieg die O_2^- -Freisetzung bei Anwesenheit der jeweiligen Versuchssubstanzen von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt (s. Abb. 11, 12, 13).

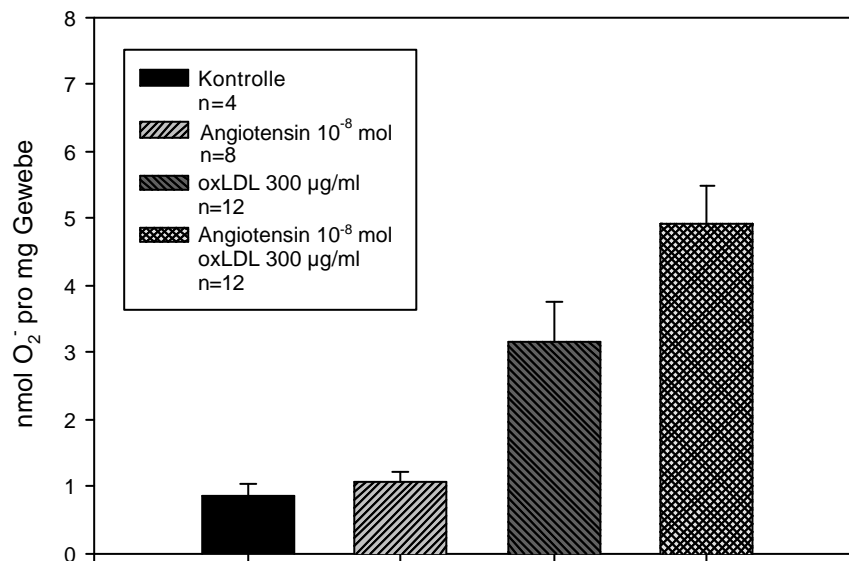


Abb. 11: O_2^- -Freisetzung von Gefäßringen durch Angiotensin 10^{-8} mol, oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 5 min nach Versuchsbeginn

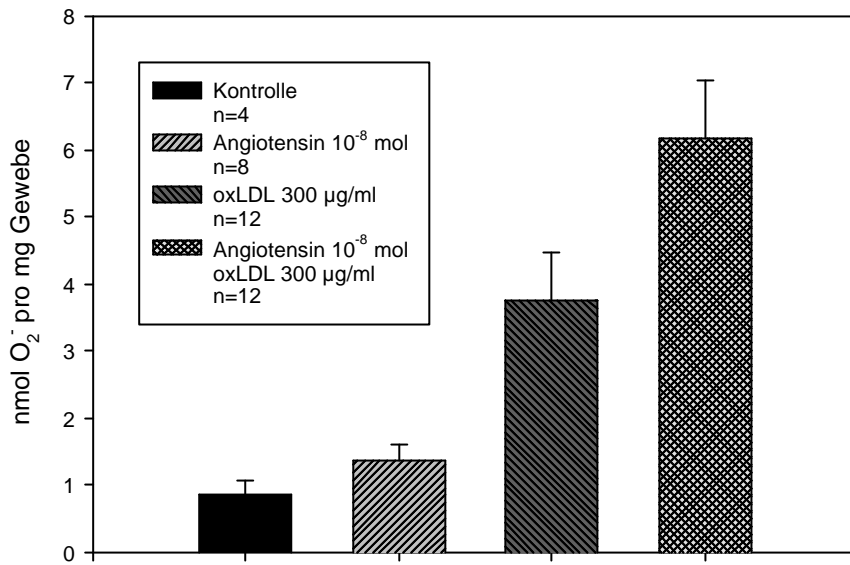


Abb. 12: O_2^- -Freisetzung von Gefäßringen durch Angiotensin 10^{-8} mol, oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 10 min nach Versuchsbeginn

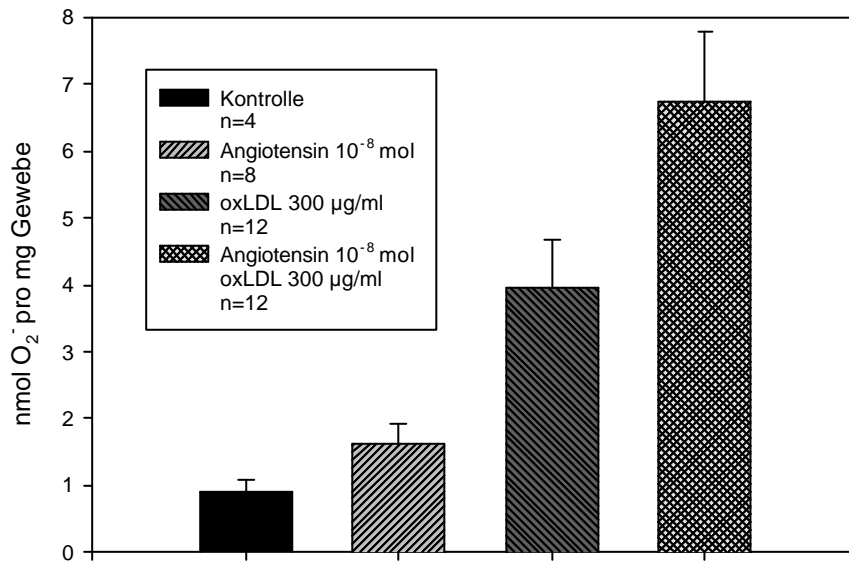


Abb. 13: O_2^- -Freisetzung von Gefäßringen durch Angiotensin 10^{-8} mol, oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 15 min nach Versuchsbeginn

III.1.2 Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O_2^- -Freisetzung durch Zellkulturen

III.1.2.1 Charakterisierung glatter Muskelzellen aus Rinderaorten und O_2^- -Freisetzung durch dieselben

Wie unter II.3.1.1 beschrieben wurde mittels Immunfärbung eine Typisierung der Zellen vorgenommen, bei der diese als glatte Muskelzellen identifiziert werden konnten. Auch die Exprimierung des AT_1 -Rezeptors konnte nachgewiesen werden. In Anwesenheit von Angiotensin II oder oxLDL in verschiedenen Konzentrationen sowie PMA konnte jedoch keine erhöhte O_2^- -Freisetzung nachgewiesen werden. Die Inkubationszeit betrug jeweils eine Stunde (s. Tabelle 3).

Versuchssubstanz	Versuchszahl
Angiotensin II 10^{-7} M	n = 2
Angiotensin II 10^{-8} M	n = 2
Angiotensin II 10^{-9} M	n = 2
oxLDL 30 μ g/ml	n = 2
oxLDL 50 μ g/ml	n = 2
oxLDL 100 μ g/ml	n = 2
PMA 10^{-5} M	n = 4

Tabelle 3

Schließlich wurde das Medium bei variierender Inkubationszeit mitsamt der Versuchssubstanz Angiotensin II $\frac{1}{2}$ -stündlich gewechselt, was jedoch nicht zu einer Stimulation führte (s. Tabelle 4).

Versuchssubstanz	Versuchszahl		
	2 h Inkubationszeit	3 h Inkubationszeit	4 h Inkubationszeit
Ang. II 10^{-8} M	n = 2	n = 2	n = 2

Tabelle 4

III.1.2.2 O₂⁻-Freisetzung durch Mesangialzellen aus Rattennieren

Die Anwesenheit sowohl von Angiotensin II als auch von oxLDL in verschiedenen Konzentrationen führte in keinem Versuchsteil zu einer verstärkten O₂⁻-Freisetzung. Die Inkubationszeit betrug jeweils eine Stunde (s. Tabelle 5).

Versuchssubstanz	Versuchsanzahl
Angiotensin II 10 ⁻⁷ M	n = 2
Angiotensin II 10 ⁻⁸ M	n = 2
Angiotensin II 10 ⁻⁹ M	n = 2
oxLDL 30 µg/ml	n = 4
oxLDL 50 µg/ml	n = 4
oxLDL 100 µg/ml	n = 6

Tabelle 5

Da im Rahmen der oben beschriebenen Versuche mit kultivierten glatten Muskelzellen sowie Mesangialzellen weder durch Angiotensin II noch oxLDL eine verstärkte O₂⁻-Freisetzung erzielt werden konnte, wurden im Folgenden Endothelzellen eingesetzt.

III.1.2.3 O₂⁻-Freisetzung durch humane Endothelzellen aus Nabelschnüren

Sowohl die Gegenwart von Angiotensin II 10⁻⁸ M als auch oxLDL 100 µg/ml führten zu einer verstärkten O₂⁻-Freisetzung durch die ausgewachsenen Zellkulturen (Messung jeweils 5, 10 und 15 min nach Gabe der Versuchssubstanz). Ebenso verhielt es sich bei der gleichzeitigen Gegenwart von Angiotensin II 10⁻⁸ M und oxLDL 100 µg/ml (s. Abb. 14, 15,16).

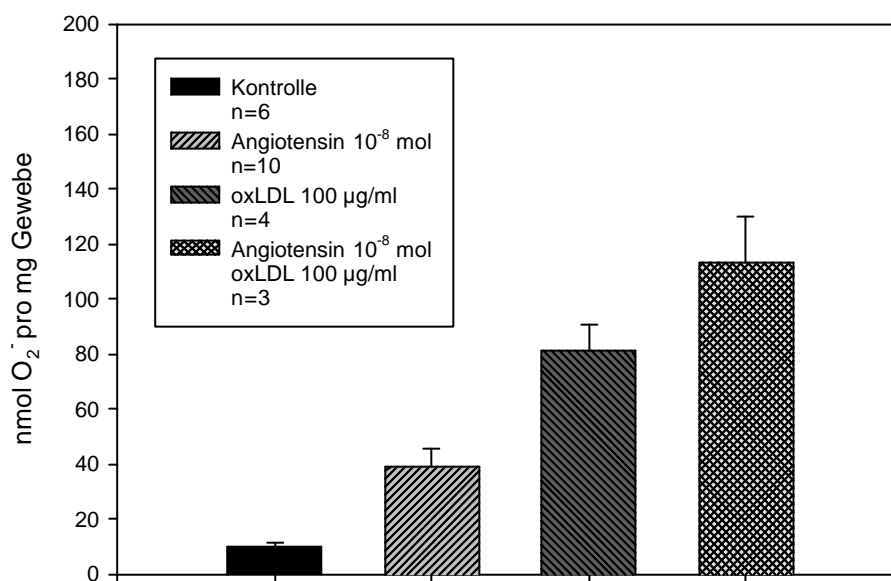


Abb. 14: O₂⁻-Freisetzung von HUVECs durch Angiotensin 10⁻⁸ mol, oxLDL 100 µg/ml sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 5 min nach Versuchsbeginn

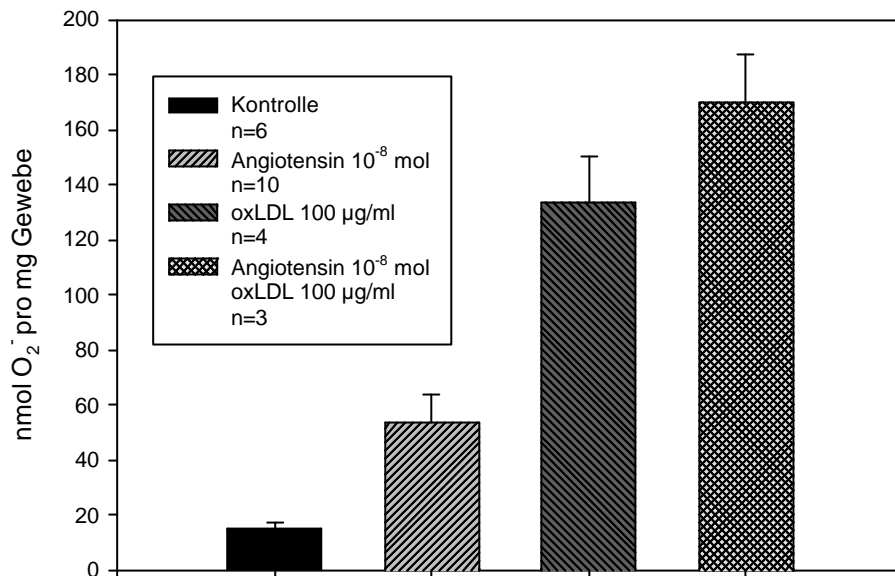


Abb. 15: O₂⁻-Freisetzung von HUVECs durch Angiotensin 10⁻⁸ mol, oxLDL 100 µg/ml sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 10 min nach Versuchsbeginn

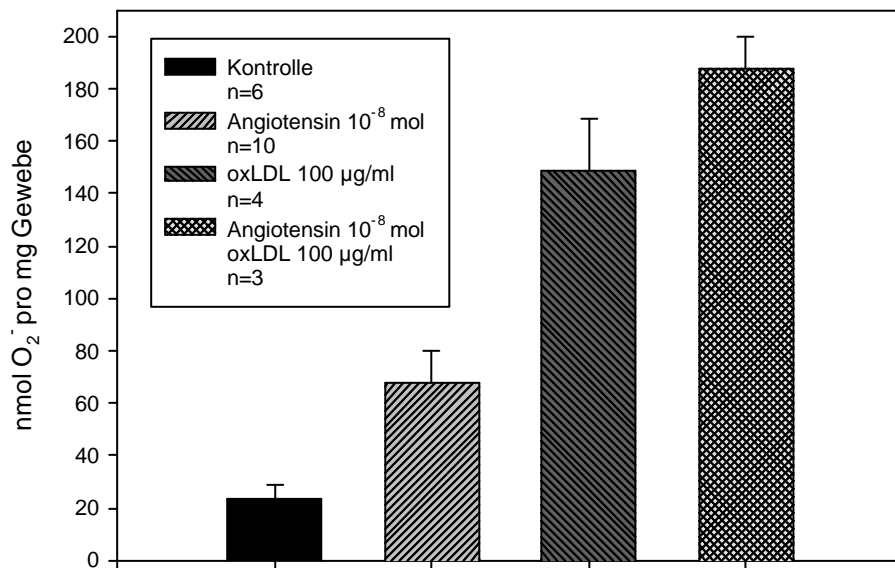


Abb. 16: O₂⁻-Freisetzung von HUVECs durch Angiotensin 10⁻⁸ mol, oxLDL 100 µg/ml sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 15 min nach Versuchsbeginn

III.2 Ergebnisse mittels Cytochrom C-Assay

Die unter II. 1.2 beschriebenen Vorversuche zeigten, dass Cytochrom C im zellfreien Xanthin-Xanthinoxidase-System reduziert wurde und dieses Signal durch SOD nahezu vollständig gehemmt werden konnte (s. Abb. 17). Dies belegte die Spezifität des Cytochrom C Assays zur Messung von O_2^- . Im Folgenden durch SOD hemmbare Signale waren demnach auf eine O_2^- -Bildung zurückzuführen.

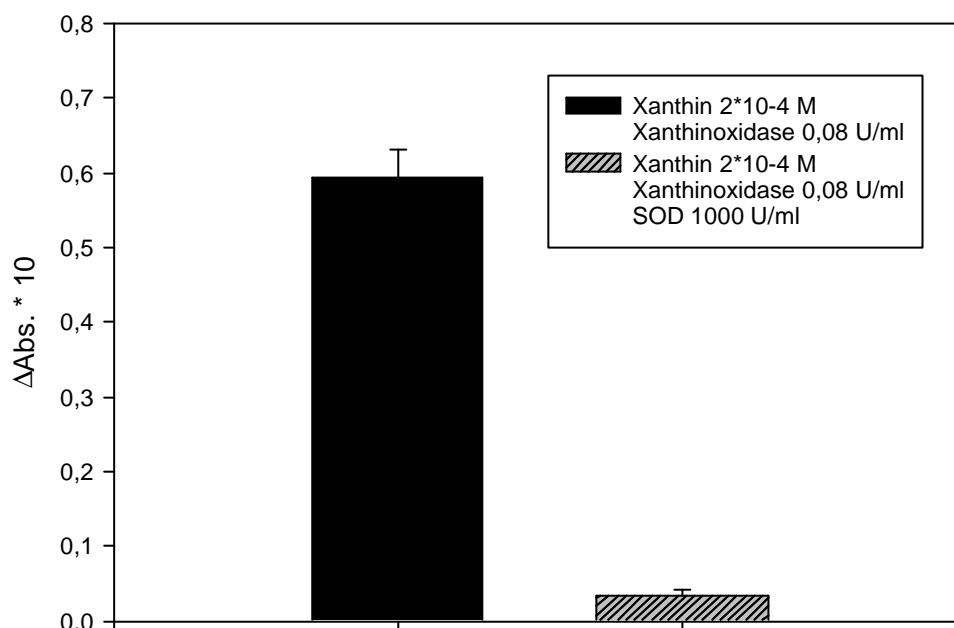


Abb. 17: Signal im zellfreien Xanthin-Xanthinoxidase-System vor und nach Gabe von SOD; n=9; 1,5 h Reaktionszeit

III.2.1 Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O_2^- -Freisetzung durch glatte Muskelzellen aus Rinderaorten

Zunächst wurde die Spezifität des Assays belegt, indem durch Zusetzen von SOD das Absorptionsmaximum gesenkt werden konnte. So wurden die Zellen der Kontrolle jeweils 1½, 2, 2½ und 3h ohne Versuchssubstanz und im zweiten Versuchsteil mit SOD (1000 U/ml) inkubiert (s Tabelle 6). Es zeigte sich, dass nach 2h eine signifikantes basales Signal von durchschnittlich 5,1 nmol O_2^- /mg Protein vorlag, welches in Anwesenheit von SOD nur noch 2,6 nmol O_2^- /mg Protein betrug (s. Tabblle 7, Abb. 18).

Versuchssubstanz	Versuchsanzahl			
	1 ½ h Ink.	2 h Ink.	2 ½ h Ink.	3 h Ink.
Kontrolle	n=5	n=5	n=10	n=10
SOD 1000 U/ml	n=5	n=5	n=10	n=10

Tabelle 6

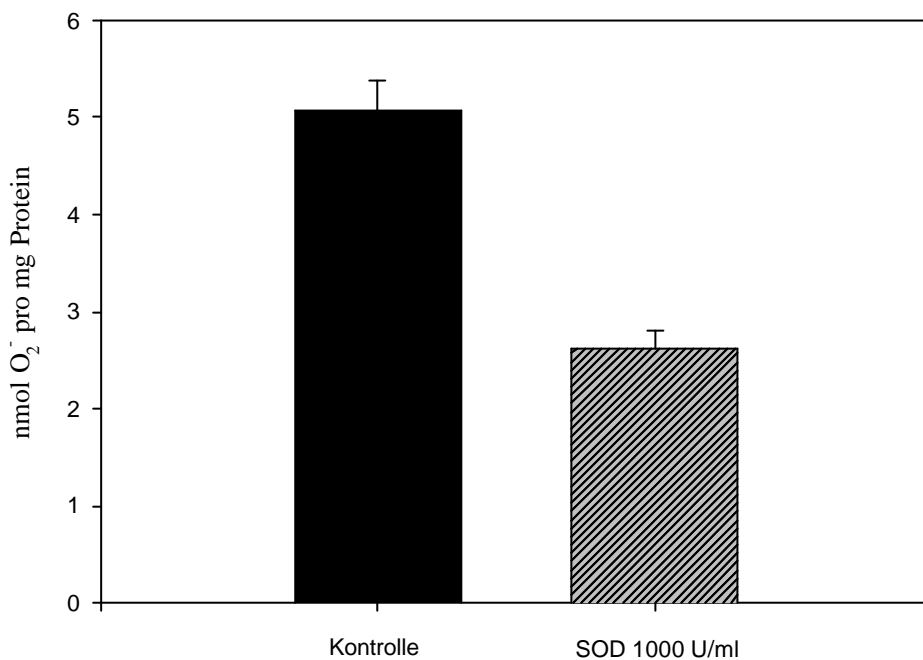


Abb. 18: Nachweis der Spezifität des Cytochrom C-Assays als Methode zum Nachweis von O₂⁻-Bildung in biologischen Systemen durch Reduzierung des Absorptionsmaximums der Kontrolle nach Gabe von SOD

Bei Inkubationszeiten von 6, 12 und 24 h wurde versucht, durch Angiotensin II, oxLDL und PMA die O₂⁻-Freisetzung der Zellen zu stimulieren.

Gleichzeitig wurde der Einfluss der Anwesenheit von Phenolrot im Ansatz der Messlösung auf das Messergebnis untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Farbstoff, der als makroskopische Indikatormittel für Bakterienbefall von Zellkulturen dient, das Absorptionsmaximum beeinflusste. In den folgenden Versuchen wurde aufgrund dessen ausschließlich phenolrotfreies Kulturmedium verwendet. Die Versuchssubstanzen stimulierten unter diesen Bedingungen die O₂⁻-Freisetzung nicht (s. Tabelle 7).

Versuchssubstanz	Versuchsanzahl					
	phenolrotfreies Medium			phenolrothaltiges Medium		
	6 h Ink.	24 h Ink.	48 h Ink.	6 h Ink.	24 h Ink.	48 h Ink.
Ang. II 10^{-7} M	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
Ang. II 10^{-8} M	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
oxLDL 50 μ g/ml	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
PMA 10^{-5} M	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2

Tabelle 7

Aufgrund des Verdachtes, zellmembranständige Flavoproteine und Cytochrom C-Reduktasen reduzierten Cytochrom C auch ohne O_2^- -Beteiligung, wurden vergleichende Versuche mit acetyliertem Cytochrom C durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass Δ Abs. in der Versuchsreihe mit acetyliertem Cytochrom C nicht erhöht war. Die O_2^- -Freisetzung der Zellen sollte mit oxLDL stimuliert werden, was nicht gelang. Das ermittelte Signal konnte jedoch durch SOD verringert werden (s. Tabelle 8).

Versuchssubstanzen	Versuchsanzahl bei 6 h Inkubation	
	nicht acetyliertes Cytochrom C	acetyliertes Cytochrom C
SOD 1000 U/ml	n=3	n=3
oxLDL 50 μ g/ml	n=3	n=3
oxLDL 50 μ g/ml, SOD 1000 U/ml	n=3	n=3

Tabelle 8

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Es zeigte sich, dass nach 6h das ermittelte Signal am stärksten war. Die O_2^- -Freisetzung der Kontrolle lag hier bei durchschnittlich 5,0 nmol O_2^- /mg Protein. Mit zunehmender Inkubationszeit nahm sie ab, bis sie nach 24 h bei 0,9 nmol O_2^- /mg Protein lag.

Desweiteren wurde versucht, die O_2^- -Freisetzung der Zellen durch Anwesenheit von Angiotensin II, verschiedener Lipoproteine und PMA zu erhöhen. Gleichzeitig sollte durch Zugabe von SOD die Beteiligung von O_2^- nachgewiesen werden (s. Tabelle 9).

Da eine signifikante reproduzierbare Anregung der O_2^- -Freisetzung auch unter diesen Bedingungen jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, die Stimulationsergebnisse also im Bereich der Kontrolle lagen, konnte das Signal durch SOD nur schwach vermindert werden.

Versuchssubstanz	Versuchszahl				
	6 h Ink.	8 h Ink.	10 h Ink.	24 h Ink.	48 h Ink.
Angiotensin II 10^{-7} M	n=10	n=2	n=2	n=2	n=2
Angiotensin II 10^{-8} M	n=16	n=2	n=2	n=2	n=2
Angiotensin II 10^{-9} M	n=8	n=2	n=2	n=2	n=2
oxLDL 10 μ g/ml	n=6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
oxLDL 10 μ g/ml, SOD 1000 U/ml	n=1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
oxLDL 50 μ g/ml	n=16	n=2	n=2	n=2	n=2
oxLDL 50 μ g/ml, SOD 1000 U/ml	n=4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
oxLDL 100 μ g/ml	n=4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
nLDL 50 μ g/ml	n=2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PMA 10^{-5} M	n=2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 9

Bei Versuchen mit 6h überschreitenden Inkubationszeiten kam es im Vorfeld zu einer Verringerung des Signals, was auf einer Affektion von Cytochrom C durch die Zellen oder die Messlösung zurückgeführt wurde. Aufgrund dieses Verdachts wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, bei denen die Cytochrom C-Zugabe erst 2h vor Inkubationsende erfolgte, um es möglichen Einwirkungen nur für kurze Zeit auszusetzen. Weiterhin bestand die Möglichkeit, dass die zelleigene SOD nach gelungener Stimulation der O_2^- -Freisetzung die O_2^- vor deren Nachweis eliminierte. Daher wurde gleichzeitig der Effekt der irreversiblen Hemmung der zelleigenen SOD durch Zugabe von DDC $\frac{1}{2}$ h vor Versuchsbeginn erkundet (s. Tabelle 10).

Weder die kürzere Beteiligung von Cytochrom C am Inkubationsvorgang noch der Einsatz von DDC nahmen auf die Ergebnisse Einfluss.

Versuchssubstanzen	Versuchszahl	
	6 h Inkubation, davon 2 h mit Cytochrom C	
	Hemmung der zelleigenen SOD durch DDC	keine Hemmung der zelleigenen SOD
Angiotensin II 10^{-7} M	n=2	n=2
Angiotensin II 10^{-8} M	n=2	n=2
Angiotensin II 10^{-9} M	n=2	n.d.
oxLDL 10 μ g/ml	n=2	n=5
oxLDL 10 μ g/ml, SOD 1000 U/ml	n.d.	n=3
oxLDL 50 μ g/ml	n=2	n=5
oxLDL 50 μ g/ml, SOD 1000 U/ml	n.d.	n=3

Tabelle 10

Zur Unterstützung der Ernährung der Zellen enthielt das Kulturmedium, mit dem auch die Versuche durchgeführt wurden, 20 % FCS, was möglicherweise die Expressierung der Angiotensin II-Rezeptoren reduzierte. Um dies zu verhindern und somit die Rezeptordichte zu erhöhen, wurden die Zellen 24 h vor Versuchsbeginn mit FCS-freiem bzw. -armem Nährmedium versorgt, welches dann auch zum Ansatz der Messlösung verwendet wurde. Diese Maßnahme gewährleistete keine gesteigerte O_2^- -Freisetzung (s. Tabelle 11).

Versuchssubstanzen	Versuchszahl bei 6h Inkubation		
	0 % FCS im Nährmedium	0,2 % FCS im Nährmedium	0,4 % FCS im Nährmedium
Angiotensin II 10^{-7} M	n=2	n.d.	n=2
Angiotensin II 10^{-8} M	n=2	n=2	n=2
Angiotensin II 10^{-9} M	n.d.	n.d.	n=2
Angiotensin II 10^{-8} M, SOD 1000 U/ml	n.d.	n=1	n.d.
oxLDL 10 μ g/ml	n=2	n.d.	n=2
oxLDL 50 μ g/ml	n=2	n.d.	n=2

Tabelle 11

III.2.2 Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O_2^- -Freisetzung durch Mesangialzellen aus Rattennieren

Bei einer Inkubationszeit von 6 h konnte keine erhöhte O_2^- -Freisetzung von Mesangialzellen durch die Anwesenheit von Angiotensin II, oxLDL oder PMA nachgewiesen werden (s. Tabelle 12).

Versuchssubstanz	Versuchszahl
Angiotensin II 10^{-7} M	n = 2
Angiotensin II 10^{-8} M	n = 2
oxLDL 50 μ g/ml	n = 2
PMA 10^{-5} M	n = 2

Tabelle 12

III.2.3 Wirkungen von Angiotensin II und Lipoproteinen auf die O_2^- -Freisetzung durch humane Endothelzellen aus Nabelschnüren

Die Anwesenheit von oxLDL 50 μ g/ml führte zu einer verstärkten O_2^- -Freisetzung durch die ausgewachsenen Endothelzellen (Messung 22 h nach Zugabe der Versuchssubstanz), welche das Kontrollniveau um das 1,42 fache überstieg (s. Tabelle 13, Abb. 19).

Versuchssubstanz	X-fache Erhöhung der O_2^- -Freisetzung über das Kontrollniveau	Versuchszahl
Kontrolle	0	n = 2
oxLDL 50 μ g/ml	1,42	n = 3

Tabelle 13

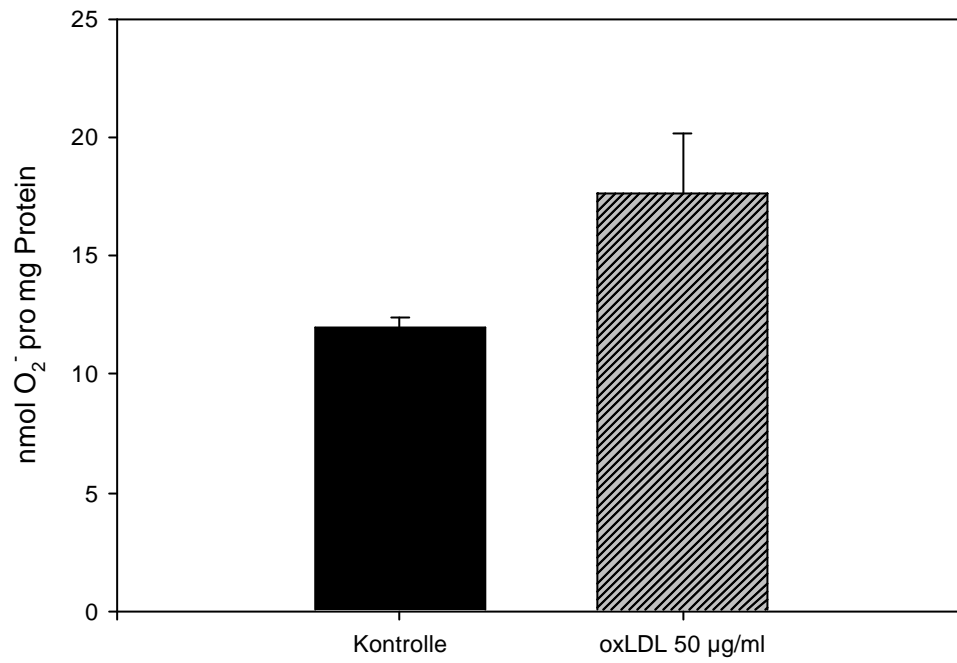


Abb. 19: O_2^- -Freisetzung von HUVECs durch oxLDL 50 µg/ml

IV. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Detektion der Bildung von O_2^- , deren spezifischer Nachweis in biologischen Systemen aufgrund der Beteiligung an der Entstehung von Atherosklerose sowie endothelialer Dysfunktion (Kownatzki et al. 1991) von großer Bedeutung, gleichzeitig jedoch aus mehreren Gründen problematisch ist. Aufgrund der Balance zwischen endogener Reduktion von O_2 zu O_2^- und dessen Eliminierung durch hoch effiziente zytoplasmatische und mitochondriale Superoxiddismutasen übersteigt die intrazelluläre O_2^- -Konzentration kaum 10 nmol/l (Brawn und Fridovich 1980). Außerdem wird die Freisetzung geringer Mengen intrazellulär gebildeten O_2^- in den Extrazellulärraum aufgrund Diffusion durch Anionen-Kanäle beobachtet (Rosen und Freeman 1984).

Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche sollte die O_2^- -Bildung durch Mesangialzellen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen sowie Rattenaortenringen durch Angiotensin II und oxLDL getrennt sowie gemeinsam angeregt werden, um den stimulierenden Effekt beider Substanzen zu untersuchen sowie potentielle Modelle für die Interaktion von oxLDL und Angiotensin II zu identifizieren. Gleichzeitig sollten mit dem Lucigenin-Assay, der in den Blickpunkt einer Diskussion über dessen Verlässlichkeit gerückt ist (Vasques Vivar et al. 1997, Liochev und Fridovich 1997), und dem Cytochrom C-Assay zwei Methodiken zur Messung von O_2^- auf ihre Verlässlichkeit geprüft und insbesondere der Cytochrom C-Assay etabliert werden. Diese Versuche stellen eine wichtige Basis für weitere Projekte zur O_2^- -Bildung und Interaktion von oxLDL und Angiotensin II dar. Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Lucigenin-Assay mit isolierten Rattenaorten zeigte sowohl in Anwesenheit von Angiotensin II als auch oxLDL eine verstärkte O_2^- -Freisetzung durch die eingesetzten Gefäße. Bei simultaner Gabe beider Stimulanzen stieg die Menge des freigesetzten O_2^- stärker an, als die Summe des freigesetzten O_2^- bei jeweils isolierter Gabe der beiden Versuchssubstanzen. Auch im Rahmen des durchgeführten Lucigenin-Assays mit HUVECs konnte eine verstärkte O_2^- -Freisetzung durch Angiotensin II und oxLDL nachgewiesen werden. Eine erhöhte O_2^- -Produktion durch HUVECs unter dem Einfluss von oxLDL konnte im Cytochrom C-Assay gezeigt werden.

IV.1 Wirkungen von oxidiertem LDL und Angiotensin II auf die O₂⁻-Freisetzung durch Rattenaortenringe, glatte Muskelzellen, Mesangialzellen und Endothelzellen

Die Beteiligung von oxLDL an der Entstehung von Atherosklerose ist bereits nachgewiesen (Steinberg et al. 1987). Es ist denkbar, dass diese pathologische Potenz u.a. auf der Freisetzung von O₂⁻ beruht.

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Lucigenin-Assay mit isolierten Rattenaorten zeigte in Anwesenheit von Angiotensin II 10⁻⁸ M eine verstärkte O₂⁻-Freisetzung, welche nach 10 minütiger Inkubation diejenige der Kontrolle um das 1,58-fache übertraf. Die Stimulation durch oxLDL 300 µg/ml führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer 4,33-fach stärkeren O₂⁻-Freisetzung. Somit zeigte oxLDL 300 µg/ml eine deutlich größere stimulatorische Potenz als Angiotensin II 10⁻⁸ M. Bei simultaner Gabe beider Stimulanzen übertraf die Menge des freigesetzten O₂⁻ die Kontrolle um das 7,10-fache und stieg somit stärker an, als die Summe des freigesetzten O₂⁻ bei jeweils isolierter Gabe der beiden Versuchssubstanzen. Letzteres Ergebnis gibt entscheidende Hinweise auf der Suche nach möglichen Modellen der im folgenden kurz angeführten bereits bekannten Interaktionen von Angiotensin II und oxLDL. Diese können nebeneinander in Makrophagen atherosklerotischer Plaques gefunden werden (Potter et al. 1998). Daneben wurde im Rahmen der TREND- (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Studie (Mancini et al. 1996) und der QUIET- (QUinapril Ischemic Event Trial) Studie (Cashin Hemphill et al. 1999) der Effekt von ACE-Hemmern auf die endotheliale Funktion bei Menschen untersucht und ein besonders positiver Effekt von ACE-Hemmern auf die Endothelzell-Funktion bei hypercholesterinämischen Patienten mit hohen LDL-Spiegeln (>125 mg/dl) aufgezeigt. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass durch reduzierte Angiotensin II- Spiegel die O₂⁻-Freisetzung durch Angiotensin II und die damit einhergehende Generierung von oxLDL vermindert werden können (Galle und Heermeier 1999). Weiterhin weisen Untersuchungen zu Rezeptorexpressionen auf Interaktionen zwischen Angiotensin II und oxLDL hin. So wurde in Aorten hypercholesterinämischer Kaninchen und in Zellkulturen glatter Muskelzellen in Anwesenheit von LDL eine verstärkte Expression des AT₁-Rezeptors nachgewiesen (Nickening et al. 1997). Umgekehrt stimuliert Angiotensin II eine verstärkte Expression des oxLDL-Rezeptors LOX-1 sowie eine vermehrte Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen (Morawietz et al. 1998). Neben diesen bereits bekannten Interaktionen von Angiotensin II und oxLDL wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Interaktion auf der Ebene der Induktion verstärkter O₂⁻-Bildung vaskulärer Zellen belegt, da

die O_2^- -Freisetzung bei gleichzeitiger Gabe der Stimulanzien die Summe der O_2^- -Freisetzung bei jeweils isolierter Gabe übertraf. Diese Ergebnisse können, wie unter IV.5 diskutiert, neue Möglichkeiten der Therapie und Prävention der Atherosklerose und Folgeerkrankungen ergeben.

Diese Interaktion konnte durch den Lucigenin-Assay mit HUVECs nicht nachgewiesen werden, jedoch überstieg das Signal nach 10-minütiger Stimulation auch hier das der Kontrolle nach Gabe von Angiotensin II 10^{-8} M um das 3,70-fache und nach Gabe von oxLDL 100 $\mu\text{g/ml}$ um das 9,04-fache. Der Lucigenin-Assay erwies sich als stabil reproduzierbare Methodik zur Detektion von O_2^- , ist jedoch in der jungen Vergangenheit in den Blickpunkt einer Diskussion über dessen Verlässlichkeit gerückt (Vasques Vivar et al. 1997, Liochev und Fridovich 1997). Diese Thematik wird unter IV.3 abgehandelt.

Als weitere alternative Methodik zur Messung von O_2^- wurde der Cytochrom C-Assay etabliert. Hierbei wurde zunächst in zellfreien Vorversuchen die Spezifität der durchgeführten Versuche belegt: In einem Xanthin-Xanthinoxidase-System wurde O_2^- gebildet, was zu einer Reduktion von Cytochrom C führte und durch SOD nahezu vollständig gehemmt werden konnte. In anschließenden Versuchen mit SMCs konnte das Signal der Kontrolle durch SOD vermindert werden und so das Ausmaß der Beteiligung von O_2^- an der Signalgebung ermittelt werden. Hierbei gelang es jedoch nicht, durch Angiotensin II oder oxLDL eine Verstärkung der O_2^- -Bildung erreichen. Dies gelang jedoch schließlich im Rahmen des durchgeführten Cytochrom C-Assays mit HUVECs. Hierbei führte eine 22-stündige Inkubation mit oxLDL 50 $\mu\text{g/ml}$ zu einer die Kontrolle um das 1,42-fache übersteigende O_2^- -Freisetzung. Somit konnte der Cytochrom C-Assay als Methodik zur Messung von O_2^- erfolgreich durchgeführt werden. Die Diskussion zur Verlässlichkeit des Cytochrom C-Assays findet sich unter IV.4.

Beeinflußt LDL auch nicht ortsständige Zelltypen arterieller Gefäße?

Couffinhal et al. zeigten eine Aktivierung von Monozyten in Gegenwart dieses Lipoproteins mit dem Effekt einer verstärkten Anlagerung dieser nicht ortsständigen Zellen an kultivierte Endothelzellen (Couffinhal et al. 1993). Gleichzeitig nimmt oxLDL Einfluß auf die Oberflächenstruktur von Endothelzellen mit dem Effekt einer verstärkten Adhäsivität von Monozyten (Jeng et al. 1993). Diese Erkenntnisse lassen auf die positive Beeinflussung von LDL auf die Affinität von Monozyten zu Endothelzellen schließen mit der Folge eines Beitrags zur Entstehung der Atherosklerose.

Welche weiteren pathogenen Eigenschaften hat oxLDL?

Oxidierete Lipoproteine inhibieren die NO-Synthese zeit- und dosisabhängig (Fogliatto et al. 1995, Rubanyi und Vanhoutte 1986). Weiterhin inaktivieren oxidierte Lipoproteine bereits freigesetztes NO (Galle und Bassenge 1991) und nehmen Einfluss auf glatte Muskelzellen der Gefäßmedia (Ahn et al. 1999). All dies wirkt sich auf die Vasomotorik durch Verstärkung der Gefäßkontraktion aus. Außerdem konnte z.B. an Zellkulturen von Umbilicalvenen-endothelzellen nachgewiesen werden, dass oxidiertes LDL zeit- und dosisabhängig die Freisetzung von Endothelin, einem stark vasokonstriktorisch und auf glatte Muskulatur mitogen wirkenden Polypeptid, steigert (Horio et al. 1993). OxLDL nimmt Einfluß auf die Zellproliferation von Mesangialzellen und vaskulären Zellen, wobei sowohl die Konzentration als auch das Ausmaß der oxidativen Modifizierung von Bedeutung sind. Sowohl proliferationsfördernde (Lahteenmaki et al. 1998, Chatterjee 1992) als auch proliferationeshemmende (Bjorkerud und Bjorkerud 1996) Wirkungen auf glatte Muskelzellen wurden beobachtet. Mit Mesangialzellen verhält es sich gleichsam (Tashiro et al. 1999, Gupta et al. 1992). Bei kultivierten Endothelzellen konnte durch oxLDL induzierte Apoptose festgestellt werden (Dimmeler et al. 1997).

Welche intrazellulären Folgen hat der Kontakt mit LDL?

Die Reaktionen innerhalb der Zelle nach der Anlagerung von LDL sind bisher nicht vollständig bekannt. In vitro Studien ergaben Hinweise auf eine nicht LDL-Rezeptor vermittelte intrazelluläre Erhöhung des Calcium-Spiegels und des pHs-Werts (Sachinidis et al. 1990). Dies könnte zu der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Freisetzung von O_2^- durch in ihrer Aktivität veränderte cytoplasmatische Enzyme führen.

Die Folgen einer verstärkten O_2^- -Freisetzung werden in Kapitel IV.2 abgehandelt.

IV.2 Die Rolle von O_2^- in der Gefäßpathophysiologie

O_2^- nimmt durch die Inaktivierung von NO maßgeblichen Einfluss auf den Gefäßtonus. Von intakten Endothelzellen aus L-Arginin gebildetes NO bewirkt die von Acetylcholin an muscarinergen Rezeptoren induziert Vasodilatation. Es entspricht dem „endothelium derived relaxing factor“ (ERDF) (Hutchinson et al. 1987). An den Zielzellen, in diesem Fall glatten Muskelzellen der Gefäßmedia, führt NO über Stimulierung der cytosolischen Guanylcyclase zur Umwandlung von GTP in cGMP, welches für die Relaxation von Gefäßen verantwortlich gemacht wird (Chappell et al. 1978). Weitere einer Entstehung von Atherosklerose entgegenwirkende Eigenschaften von NO sind die Hemmung der Plättchenaggregation, die

Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen und die Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen (Khan et al. 1996, Radomski et al. 1991, Radomski et al. 1987). Durch chemische Bindung mit O_2^- verliert NO unter Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) seine physiologischen Eigenschaften, was zu einer Vasokonstriktion führt und die Entstehung von Atherosklerose begünstigt. $ONOO^-$ wiederum bewirkt eine Endotheldysfunktion (Beckmann et al. 1990). Neben dem indirekten Weg über die Inaktivierung von NO wirkt O_2^- auch direkt vasokonstriktorisch auf glatte Muskelzellen. Dies geschieht über eine erleichterte Mobilisierung von cytosolischem Ca^{2+} oder eine Sensibilisierung kontraktiler Zellbestandteile für Ca^{2+} (Jin et al. 1992, Suzuki und Ford 1992).

In gesunden Gefäßen besteht ein Gleichgewicht zwischen antioxidativen Schutzmechanismen und ROS („Reactive Oxygen Species“), zu denen O_2^- zu zählen ist. Von oxidativem Stress spricht man bei einer Verschiebung dieses Gleichgewichts zugunsten der ROS. Dies kann zum einen durch eine Erschöpfung der antioxidativen Schutzmechanismen, zum anderen durch eine verstärkte Bildung von ROS hervorgerufen werden. Eine Erhöhung der O_2^- -Freisetzung vaskulärer Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit durch Angiotensin II und oxLDL induziert. ROS können LDL zu oxLDL, der weitaus toxischeren Form dieses Lipoproteins, peroxidieren, was in einer Art circulus vitiosus zu einer verstärkten Bildung von O_2^- führt.

IV.3 Die Verlässlichkeit des Lucigenin-Assays

Der Lucigenin-Assay wird seit vielen Jahren zur Detektion und quantitativen Bestimmung von O_2^- verwendet. Bereits vor 40 Jahren wurde die Xanthinoxidase-Reaktion als Auslöser der Chemolumineszenz von Lucigenin beschrieben und auf diesem Weg eine Verbindung zur Beteiligung von O_2^- an der Lichtemission hergestellt. Weitere Studien belegten die wahrscheinliche Beteiligung von reduziertem Lucigenin (Luc^+) und O_2^- an dieser Reaktion (Liochev und Fridovich 1997). Heute gilt als gesichert, dass Lucigenin (Luc^{2+}) einer univalenten Reduktion zu Luc^+ bedarf, bevor eine weitere Reaktion mit O_2^- zur Bildung eines instabilen Dioxetan-Intermediates führt. Dieses zerfällt zu einem Acridon und einem Acridon im angeregten Zustand, welches unter Lichtemission in den Grundzustand relaxiert (Allen 1986, Faulkner und Fridovich 1993).

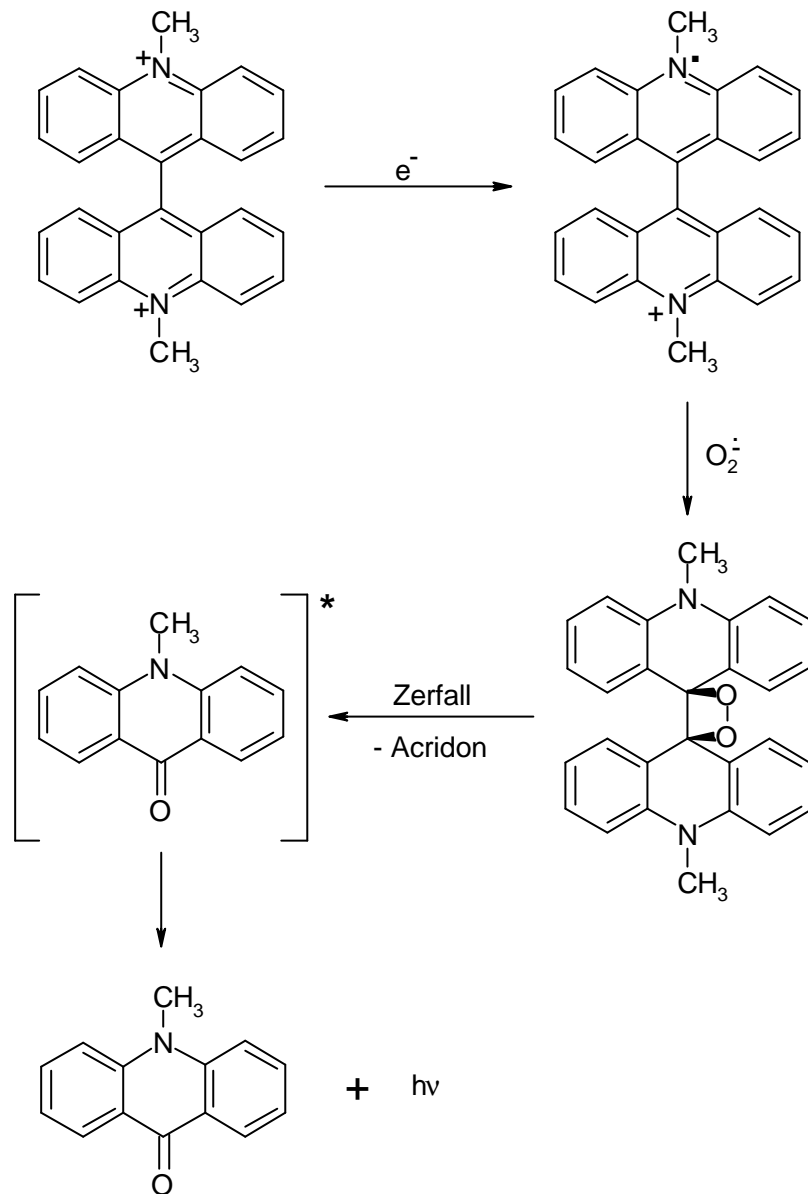


Abb. 20: Schematische Darstellung des zu einer Photonenemission führenden Reaktionsweges von Lucigenin

Dieser Ablauf der Reaktion lässt sich mit alten elektrochemischen Untersuchungen voll in Einklang bringen. Dabei emittiertes Licht kann mit einem Photonen-zähler erfaßt werden. Die hierbei gemessenen Impulse sind direkt proportional zu der Anzahl des gebildeten O_2^- , da bei deren Entstehung jeweils ein Photon emittiert wird.

Seit dem Beginn der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wird die Validität des Lucigenin-Assays jedoch hinterfragt. Bis heute hat sich in der Fachliteratur keine Bewertung (weder eine positive noch eine negative) der Verlässlichkeit Lucigenins durchgesetzt. Gegner der Lucigenin-Chemilumineszenz als Indikator der O_2^- -Freisetzung sehen in der Notwendigkeit der Reduktion von Luc^{2+} zu Luc^+ , welches autooxidieren und dabei artefiziell

O₂ reduzieren kann, den kritischen Schritt des Assays. Eine Fülle von Untersuchungen zum Verhalten Lucigenins in enzymatischen und biologischen Systemen wurden aus diesem Grund jüngst durchgeführt. Im folgenden soll diesbezüglich zunächst auf zellfreie enzymatische Systeme eingegangen werden:

So wurde in zellfreien Systemen der Einfluss von Xanthin-Xanthinoxidase- und Xanthinoxidase-NADH-Systemen, bei dem NADH als Elektronendonator fungierte, auf Lucigenin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Xanthinoxidase Luc²⁺ univalent reduzierte, woraufhin das dabei gebildete Luc⁺ autooxidierte und somit O₂ zu O₂⁻ reduzierte. Die Reduktion von Cytochrom C im Xanthinoxidase-NADH-System durch hier gebildetes O₂⁻ wurde in Gegenwart von Lucigenin verstärkt. Diese Reaktion war jedoch nur teilweise durch SOD zu inhibieren. Mit Erniedrigung der Cytochrom C-Konzentration stieg die Potenz von SOD, die Reduktion von Cytochrom C zu inhibieren, was mit der Konkurrenz zwischen Cytochrom C und O₂⁻ bei der Reaktion mit Luc⁺ begründet wurde. Bei hohen Cytochrom C-Konzentrationen überwog die direkte Reduktion von Cytochrom C durch Luc⁺, während bei niedrigen Cytochrom C-Konzentrationen die Autooxidation von Luc⁺ mit der Bildung von O₂⁻ im Vordergrund stand und dann mehr O₂⁻ an der Reduktion von Cytochrom C beteiligt war, was die Reaktion durch SOD inhibierbar machte. Es wurde in diesem Zusammenhang geschätzt, dass die Geschwindigkeitskonstante für die direkte Reduktion von Cytochrom C durch Luc⁺ das 50- bis 60-fache derjenigen für die Reduktion von O₂ durch Luc⁺ beträgt (Liochev und Fridovich 1997).

In weiteren Versuchen mit Xanthinoxidase-NADH-Systemen wurde die Bildung von O₂⁻ näher untersucht. Dabei wurde in drei verschiedenen O₂⁻-Messsystemen (Cytochrom C-, L-012- und Lucigenin-Assay) zunächst das Signal dieser Systeme ohne und im Anschluss mit Xanthin als Antreiber der O₂⁻-Bildung bestimmt. Ohne Xanthin war die Radikalbildung im Cytochrom C- und L-012-Assay niedrig und bei der Zugabe von Xanthin erheblich erhöht. Dem gegenüber zeigte der Lucigenin-Assay bereits in Abwesenheit von Xanthin ein deutliches Signal und nach Zugabe von Xanthin einen weitaus geringeren Signalanstieg als die beiden anderen Assays. Da die Lucigenin-Chemilumineszenz bereits durch das Xanthinoxidase-NADH-System in Abwesenheit von Xanthin beträchtlich erhöht war, wies dies auf eine durch Luc⁺ induzierte O₂⁻-Bildung hin (Sohn et al 1999).

Auch im Glucose-Glucoseoxidase-System, welches normalerweise keine O₂⁻ produziert (Massey et al. 1969), konnte eine Lucigenin abhängige O₂⁻-Bildung nachgewiesen werden. In diesem System wurde in Abwesenheit von Lucigenin Cytochrom C reduziert, was nicht durch SOD gehemmt werden konnte und somit eine mögliche Beteiligung ausschloss. In

Anwesenheit von Lucigenin wurde Cytochrom C in erheblichem Maße verstärkt reduziert. Gleichzeitig konnte dieses System eine durch SOD inhibierbare Chemilumineszenz hervorrufen, was die Lucigenin-abhängige Generierung von O_2^- bewies (Liochev und Fridovich 1997). Auch die Lipoamid-Dehydrogenase, welche u.a. O_2^- generieren kann (Grinblat et al. 1991), die Aldehyd-Oxidase und die bakterielle Dehydroorotat-Dehydrogenase (Liochev und Fridovich 1997) können Luc^{2+} reduzieren, worauf bei dessen Reoxidation artifiziell O_2^- gebildet werden kann. Ebenso unter aeroben Bedingungen im eNOS/NADPH-System generiert Lucigenin O_2^- . Dies unterliegt einem Mechanismus der vollständig von der Flavin-Komponente der eNOS-Reduktase-Domäne abhängt (Vasquez-Vivar et al. 1997).

Neben den angeführten zellfreien Systemen wurden auch biologische Systeme bezüglich einer Lucigenin-abhängigen O_2^- -Bildung untersucht:

So wurde in einem Chemolumineszenz-Assay mit einer anderen lumineszierenden Substanz (MCLA) nachgewiesen, dass in Endothelzell-Lysaten die Zugabe von Lucigenin (250 μ M) das Hintergrundsignal des Assays verdoppelte, was durch SOD inhibiert werden konnte und somit eine Beteiligung von O_2^- nachwies. (Sohn et al. 1999). Auch die endothelabhängige Relaxation isolierter Aortenringe wurde durch Lucigenin (100 μ M, 250 μ M) inhibiert, was ebenfalls durch SOD-Gabe verhindert werden konnte (Tarpey et al. 1999). Die zellabhängige Freisetzung von H_2O_2 aus Endothelzellen wurde durch Zugabe von Lucigenin (50 μ M, 250 μ M) signifikant erhöht. Dies zeigte, dass sich Lucigenin sequentiellen Zyklen von Reduktion und Reoxidation durch zelluläre Oxireduktasen mit einer letztlich Beschleunigung des Elektronentransfers auf molekularen Sauerstoff unterzog, was zu verstärkter Produktion von O_2^- durch vaskuläre Zellen und der Akkumulierung seines Abbauproduktes H_2O_2 führte. Die Zugabe von Katalase inhibierte diese H_2O_2 -Akkumulierung (Tarpey et al. 1999). H_2O_2 kann wiederum pH-abhängig bei pH 9,5 (oder pH 7,8) nicht jedoch bei pH 7 von Chemilumineszenz im Lucigenin-Assay hervorrufen, was zu fehlerhaft hoch interpretierten Ergebnissen führen kann (Liochev und Fridovich 1997).

Weiterhin können organische Reduktionsmittel auf die für die Chemilumineszenz notwendigen Redoxreaktionen Einfluß haben. Viele solche Substanzen inhibieren die Chemilumineszenz in einem von ihrer molekularen Struktur und ihrer reduzierenden Fähigkeit abhängigem Maß. Einige dieser reduzierenden Verbindungen sind in picomolaren Mengen nachweisbar (Cui et al 1999).

Als Referenz für die Bestimmung von O_2^- zur Kontrolle der Validität des Lucigenin-Assays diente in den meisten der angeführten Prüfungen die Reduktion von Cytochrom C und die Inhibierung des Signals durch SOD als Beweis für eine Beteiligung von O_2^- .

Wie bereits oben erwähnt, sehen die Kritiker des Lucigenin-Assays in der Fähigkeit von Luc^+ , welches über O_2^- -unabhängigen Elektronentransfer gebildet werden kann, sich in Luc^{2+} zurück zu verwandeln und dabei O_2 zu reduzieren (s. Abb. 21), den strittigen Faktor der Lucigenin-verstärkten Chemolumineszenz.

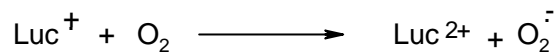


Abb. 21

Dies gilt insbesondere in Systemen niedriger O_2^- -Produktion, wie bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Systemen mit Zellkulturen oder Gefäßringen. Bei starker O_2^- -Produktion, wie zum Beispiel im Xanthin-Xanthinoxidase-System, sieht man vornehmlich den in Abb. 22 dargestellten, nicht artefiziellen Sachverhalt.

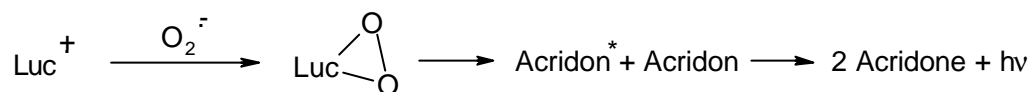


Abb. 22

So ist nach den Kritikern des Lucigenin-Assays für das Signal dieses Messsystems unter Umständen die Reduktion von Luc^{2+} durch verschiedene Elektronen-Transfer Systeme (s.o.) eher als ein tatsächliches Level der O_2^- -Konzentration verantwortlich. Dies macht in ihren Augen den Lucigenin-Assay als Methode zur Detektion der O_2^- -Konzentration obsolet.

Eine weitere die Validität des Lucigenin-Assays in Frage stellende Tatsache ist die vielfach beschriebene von der Konzentration des eingesetzten Lucigenins abhängige unterschiedliche Höhe des gemessenen Signals unter ansonsten gleichen Bedingungen (Liochev und Fridovich 1998). So beschreiben Barbacanne et al. in einem Versuch mit Rinderaorten-Endothelzellen nach Stimulation der O_2^- -Produktion durch Calcium Ionophore A23187 konzentrationsabhängig eine 46-fach höhere Chemolumineszenz bei einer Lucigeninkonzentration von 250 μM im Vergleich zu 5 μM , einem fünfzigstel der erstgenannten Konzentration (Barbacanne et al 2000).

Neben all diesen die Validität des Lucigenin-Assays bezweifelnden Ausführungen liegen der Fachliteratur eine große Anzahl von Untersuchungen vor, die zu der Schlussfolgerung führen,

dass unter bestimmten Rahmenbedingungen der Lucigenin-Assay nach wie vor eine sehr sensible und verlässliche Methodik zur Bestimmung von O_2^- ist.

Den Ausführungen von Liochev und Fridovich bezüglich des Redox-Prozesses von Lucigenin mit einhergehender Produktion von O_2^- entgegen Afanas'ev et al., dies sei ein reversibler Prozess und daher die Bedeutung des Lucigenins als Produzent oder Abfänger von O_2^- von der Differenz zwischen den Reduktionspotentialen der (O_2/O_2^-) - und (Luc^{2+}/Luc^+) -Paare abhängig. Unter thermodynamischen Gesichtspunkten liegt das Gleichgewicht der Reaktion (s. Abb. 23)

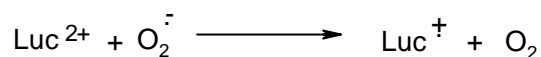


Abb. 23

komplett auf der rechten Seite ($K_{eq} = 10^6$), was die Rate der Rückreaktion insignifikant (Afanas'ev et al. 1999) und einen Redox-Kreisprozess von Lucigenin bedeutungslos macht.

Li et al. veröffentlichten später, dass der Redoxprozess Lucigenins konzentrationsabhängig ist. Bei Konzentrationen unter $20 \mu M$ kann er vernachlässigt werden, bei höheren Konzentrationen allerdings nicht (Li et al. 1997).

Redox-Cycling von Lucigenin kann z.B. unter folgenden Umständen stattfinden (s. Abb. 24):

- Lucigenin konkurriert mit O_2 um die univalente Reduktion durch Xanthinoxidase
- Luc^+ kann O_2 zu O_2^- reduzieren

Nach Afanas'ev et al. hängt die Konkurrenz von Lucigenin und O_2 in von Xanthinoxidase katalysierten Reaktionen u.a. von den Substraten ab. So wird z.B. in Gegenwart von Lucigenin die Cytochrom C-Reduktion im Xanthin-Xanthinoxidase-System nahezu komplett durch SOD inhibiert. Bei Wechsel des Substrats auf NADH ist die gesehene Cytochrom C-Reduktion nicht durch SOD zu hemmen.

Dies lässt darauf schließen, dass im NADH-XO-System, in welchem Luc^+ als Reduktionsmittel von Cytochrom C fungiert, Lucigenin mit O_2 um die univalente Reduktion konkurriert, nicht jedoch im Xanthin-XO-System. Diese Ergebnisse decken sich mit der Entdeckung der durch Lucigenin bewirkten Stimulation des O_2^- -Verbrauchs im NADH-XO-, nicht jedoch im Xanthin-XO-System (Afanas'ev et al. 1999).

So kann Lucigenin nur dann als bedeutender Ein-Elektronen-Akzeptor in XO-katalysierten Reaktionen dienen, wenn die Rate des Elektronentransfers vom Enzym zum molekularen Sauerstoff gering ist. Ein Redox-Kreisprozess Lucigenins kann jedoch nur stattfinden, wenn das Luc^+ O_2 reduzieren kann. Ein Elektronen-Transfer von positiv geladenem Lucigenin auf O_2 ist hingegen nach Li et al. kaum möglich (Li et al. 1997).

Afanas'ev et al. zeigten mit steigender Lucigenin-Konzentration im Xanthin-XO-System eine steigende Cytochrom C-Reduktion sowie steigende Chemolumineszenz. Hierbei kann der stimulierende Effekt von Lucigenin im XO-System basieren auf:

- einem Elektronen-Transfer von XO auf Lucigenin (nach Liochev und Fridovich, s. Abb. 24, Reaktion(3)) oder
- einer Erhöhung der Elektronen-Transfer-Rate von O_2^- auf Lucigenin (nach Afanas'ev et al., s. Abb. 24, Reaktion (1)).

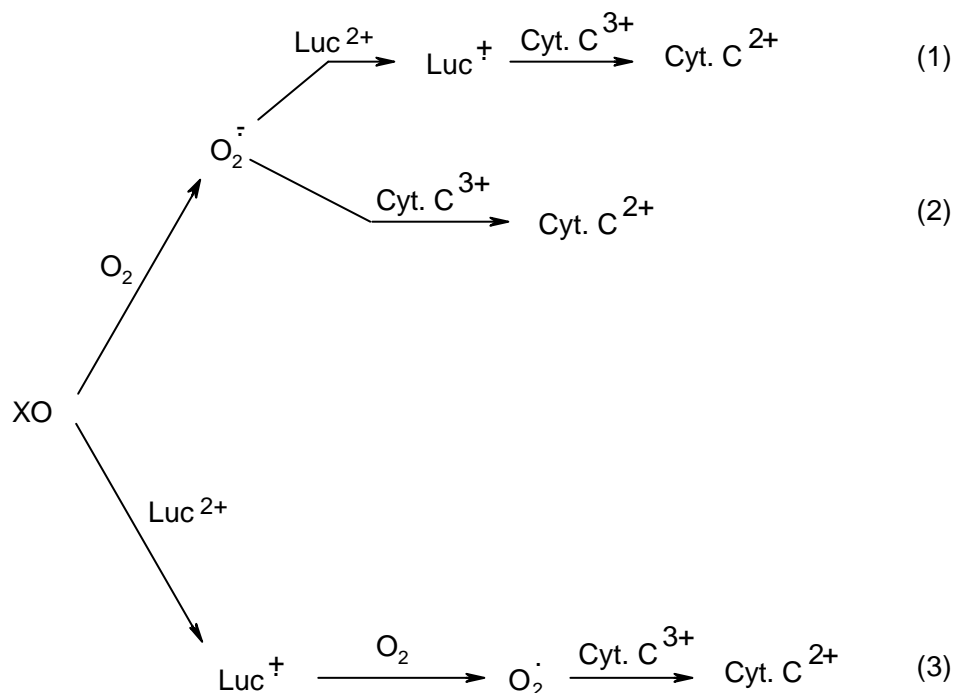


Abb. 24: Drei mögliche Mechanismen der Cytochrom C-Reduktion durch Xanthinoxidase in Anwesenheit von Luc^{2+} und O_2

Einige Untersuchungen zeigten, dass die Steigerung der Cytochrom C-Reduktion in Gegenwart von Lucigenin nicht von einer gesteigerten XO-Aktivität begleitet wurde. Dies

widerspricht dem in Abb. 24, Reaktion (2) angeführten Mechanismus der Cytochrom C-Reduktion, da nach dieser Theorie eine Erhöhung des Elektronentransfers vom Enzym zu Lucigenin mit gesteigerter Xanthin-Oxidation einhergehen müsste. Ein Ausbleiben dieser gesteigerten Xanthine-Oxidation bei verstärkter Cytochrom C-Reduktion kann nur durch die unter Abb. 24, (1) und (3) dargestellten Reaktionen erklärt werden. Dabei wird der die Cytochrom C-Reduktion verstärkende Effekt Lucigenins durch die Konkurrenz zwischen diesen gleichzeitig ablaufenden Reaktionen interpretiert.

Generell liegt die exothermische Rate-Konstante für einen Ein-Elektronen-Transfer bei 10^8 - 10^9 /M/s, was auch für exothermische Reaktionen zwischen O_2^- und organischen Molekülen gilt. Für Reaktionen von Semiquinonen mit Cytochrom C liegt sie ebenfalls bei 10^8 - 10^9 /M/s (Afanas'ev et al. 1999). Die Rate-Konstante für Reaktion (2) Abb. 24 liegt jedoch nur bei $2,6 \cdot 10^5$ /M/s, also rund einem Drittel (Butler et al. 1982). Somit könnte Lucigenin als Mediator und Beschleuniger des Elektronen-Transfers von O_2^- auf Cytochrom C dienen und über diesen Mechanismus Cytochrom C zu einem effektiveren Abfänger von O_2^- machen.

Einfluss auf eine mögliche artifizielle O_2^- -Produktion durch Lucigenin kann außerdem dessen verwendete Konzentration haben. Bei bis zu $20 \mu\text{M}$ führt Lucigenin im Xanthin-XO-System nicht zu einem vermehrten O_2 Verbrauch, was einen möglichen Redox-Kreisprozess in diesen Konzentrationen ausschließt. Die molekulare Bindungsaffinität und die Rate-Konstante einer Reaktion zwischen Luc^+ und O_2^- ist als viel höher einzuschätzen als diejenige zwischen Luc^+ und O_2 . Dies könnte das Unvermögen Lucigenins, sich bei niedrigen Konzentrationen einem Redoxkreisprozesses zu unterziehen erklären (Li et al. 1997).

Entgegen der bei pH 9,5 berichteten O_2^- -Produktion durch Lucigenin im Glucose-Glucoseoxidase-System, welches normalerweise keine O_2^- produziert (Liochev und Fridovich 1997), konnten Li et al. bei physiologischem pH dies nicht nachweisen.

Unter Berücksichtigung der für und gegen die Validität des Lucigenin-Assays sprechenden Untersuchungen lässt sich die in Abb. 25 dargestellte Zusammenfassung möglicher Interaktionen von Lucigenin in Redox-Systemen zusammenstellen.

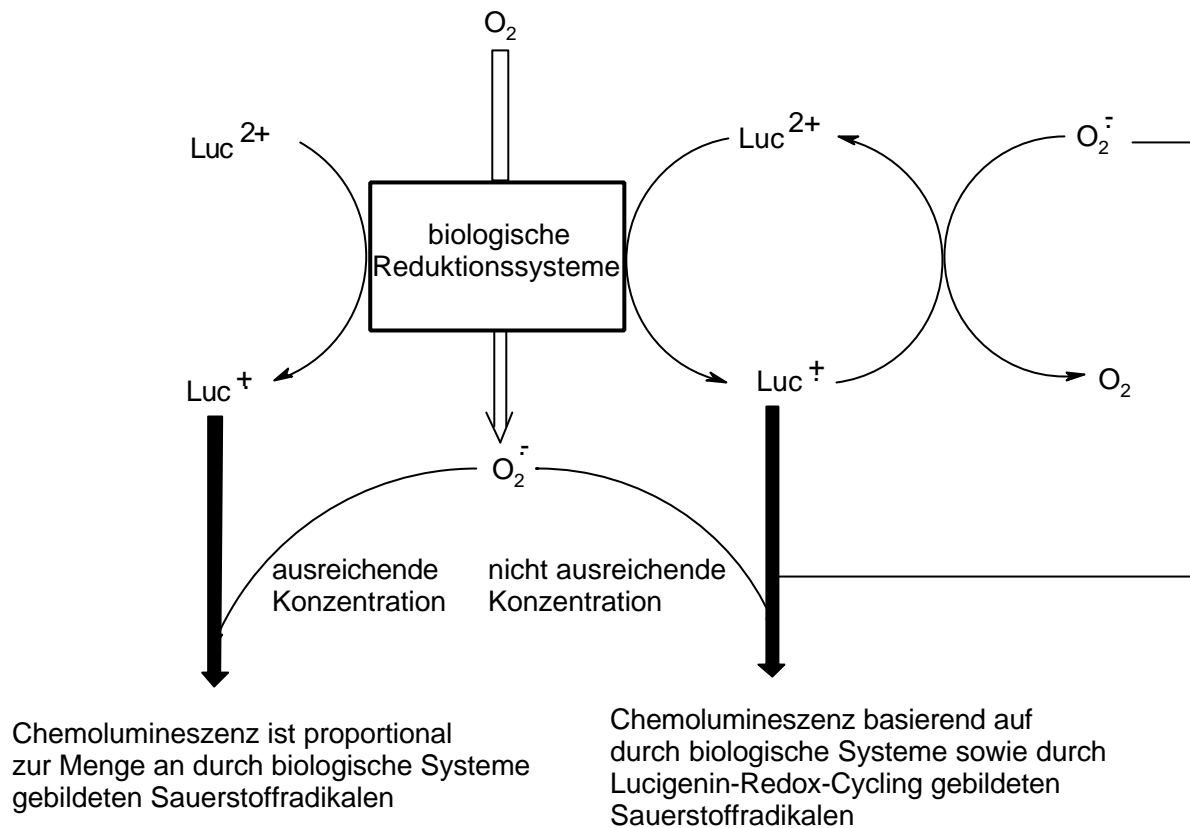


Abb. 25: Darstellung von hypothetischen Abläufen der Einflussnahme von $O_2^{\cdot-}$ auf einen möglichen Redoxkreisprozess Lucigenins

Abb. 25 zeigt, dass sowohl die relative Rate der Produktion von $Luc^{\cdot+}$ als auch von $O_2^{\cdot-}$ durch biologische Ein-Elektron-Reduktionssysteme bestimmen, ob das im Lucigenin-Assay freigesetzte Licht ausschließlich biologisch freigesetztes $O_2^{\cdot-}$ widerspiegelt oder gleichzeitig biologisch freigesetztes $O_2^{\cdot-}$ und durch Autooxidation Lucigenins gebildetes $O_2^{\cdot-}$. Die Rate der Produktion von $Luc^{\cdot+}$ und die von verschiedenen Autoren beschriebene Autooxidation Lucigenins, welche einen solchen Assay invalide macht, hängt von verschiedenen Faktoren ab:

- Konzentration Lucigenins
- pH-Wert des Milieus
- Redox-System

Folglich bleibt zu empfehlen, bei der Durchführung von Lucigenin-Assays Versuchsbedingungen zu schaffen, bei denen kein Redox-Kreisprozess Lucigenins stattfindet. Unter dieser Voraussetzung bleibt der Lucigenin-Assay eine verlässlich und sinnvoll durchzuführende Methodik zur Bestimmung der Bildung von $O_2^{\cdot-}$. Als weitere Vorteile des

Lucigenin-Assays sind ein stabiles Hintergrundsignal, einfacher Gebrauch und gute Sensitivität zu nennen.

Im Gegensatz zu Cytochrom C wird Lucigenin nicht durch in vaskulären Zellen gebildetes Peroxynitrit beeinflusst (Davidson et al. 1997).

IV.3 Die Verlässlichkeit des Cytochrom C-Assays

Aufgrund der unkomplizierten Versuchsdurchführung wird der Cytochrom C-Assay häufig verwendet, um das Ausmaß der O_2^- -Produktion in verschiedenen Zellsystemen zu ermitteln (Newburger et al. 1984, Dri et al. 1985).

Die Reduktion von Cytochrom C durch O_2^- ist ein schneller Ein-Elektronen-Prozess, der mit großer Sensitivität und Spezifität durch Bestimmung des Wechsels der Absorption im Spektrometer bei 550 nm Wellenlänge gemessen werden kann (Vanderwalle und Petersen 1986, Björquist et al. 1994).

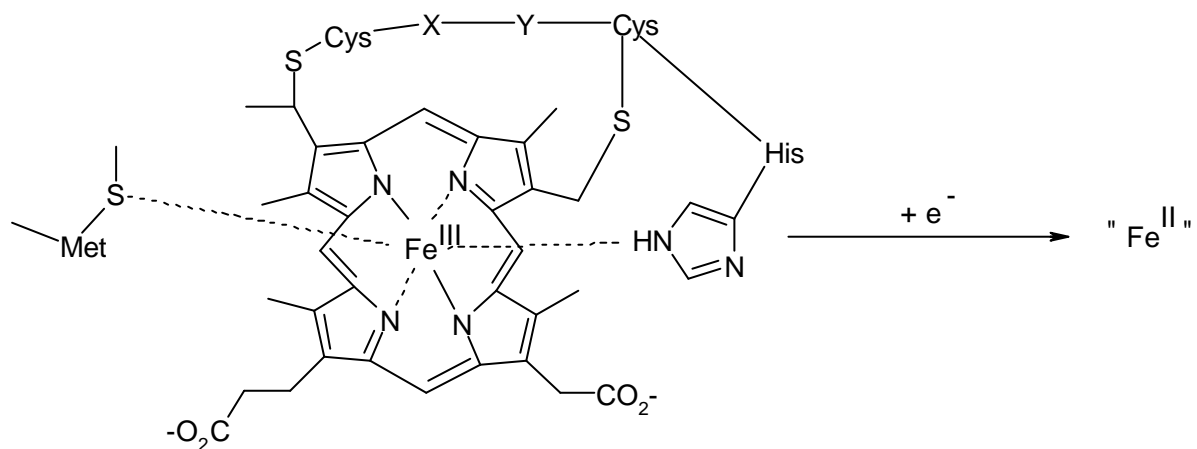


Abb. 26: Reduktion von Ferricytochrom C

Im Folgenden soll die Verlässlichkeit des Cytochrom C-Assays diskutiert werden. Gegner dieser Methode zur Detektion von O_2^- erklären, dass bestenfalls ein Viertel des in biologischen und nicht-biologischen Systemen produzierten O_2^- Cytochrom C reduziert. Dies beruhe auf dem schnellen, spontanen Zerfall des restlichen Anteils bei physiologischem pH (Bielski und Arudi 1983). Der Assay könne daher lediglich verlässlich für vergleichende Untersuchungen eingesetzt werden, nicht jedoch zur quantitativen Bestimmung von O_2^- , da aufgrund der Konkurrenz zwischen spontaner Weiterreaktion von O_2^- und der Reduktion von Cytochrom C durch O_2^- das Ausmaß der O_2^- -Produktion unterbewertet wird (Fridovich 1970).

Ebenfalls zu einer Unterschätzung der O_2^- -Bildung führt die mögliche Reoxidation von bereits reduziertem Cytochrom C durch H_2O_2 und OH. Dies kann zumindest partiell durch die Gabe von Katalase verhindert werden (Kownatzki et al. 1991, Arthur et al. 1986). Bereits in älteren Studien wurde in diesem Zusammenhang die Gabe von Katalase erwähnt (Mc Cord und Fridovich 1968), was damals jedoch nicht begründet werden konnte. Erschwerend kommt die Möglichkeit der Adsorption von Cytochrom C an Zellen während des Versuchsablaufs hinzu. In diesem Fall wird nur ein Teil von Cytochrom C mit der Messlösung zum Spektrometer überführt und im Falle einer Reduktion von Cytochrom C die O_2^- -Bildung unterschätzt (Tarpey et al. 1999).

Zu einer Überschätzung der O_2^- -Freisetzung kann jegliche artefiziell zur Reduktion von Cytochrom C führende Reaktion (wie z.B. beschrieben in O_2^- -unabhängigen Elektronen-Transfer-Systemen) führen (Radi et al 1991). Außerdem können Zellbestandteile nicht SOD-sensitiv Cytochrom C direkt reduzieren (Tarpey et al. 1999).

Diesen die Effektivität des Cytochrom C-Assays hinterfragenden Ausführungen stehen folgende Ergebnisse entgegen:

20 % des O_2 - Verbrauchs im Xanthin-XO-System bei pH 7.0 führen zu einer direkten Bildung von O_2^- , während die restlichen 80 % von O_2 in einem Zwei-Elektronen-Schritt zu Hydrogen-Peroxid reduziert werden. Mit steigendem pH-Wert, sowie bei hoher Konzentration von O_2 und niedriger Konzentration von Xanthin steigt der Anteil des gebildeten O_2^- (Fridovich 1970). Außerdem zeigte Fridovich, dass Cytochrom C (16 μ M) in einem Xanthin (0.4 mM) und XO (5.3 nM) enthaltenden System alle gebildeten O_2^- wegpufferte. Im Falle des spontanen Zerfalls von O_2^- vor der Reaktion mit Cytochrom C ist das Ergebnis des Assays als zu niedrig zu bewerten. Diesbezüglich muss jedoch als kinetische Basis der Reaktion von Cytochrom C mit O_2^- die ausreichend hohe Rate-Konstante von 10^5 /M/s (Land und Swallow 1971) beachtet werden, welche bereits mikromolaren Konzentrationen von Cytochrom C erlaubt, mit dem spontanen Zerfall von O_2^- effektiv zu konkurrieren (Fridovich 1970).

Den Kritikern des Cytochrom C-Assays, die in der Möglichkeit von H_2O_2 , Cytochrom C zu oxidieren einen kritischen Aspekt des Assays sehen, entgegnet Mc Cord und Fridovich, dass in vielen Fällen H_2O_2 nur durch Weiterreaktion von O_2^- gebildet wird, nicht durch gleichzeitige Produktion (Mc Cord und Fridovich 1968, Chance et al. 1979). Unter dieser Voraussetzung wird in Gegenwart von Cytochrom C kein H_2O_2 gebildet, da O_2^- durch die Reaktion mit Cytochrom C zu molekularem Sauerstoff rückoxidiert wird. In diesen Fällen spiegelt die durch SOD hemmbare Cytochrom C-Reduktion die tatsächliche O_2^- -Produktion wieder. Bei gleichzeitiger Bildung von H_2O_2 und O_2^- müsste im Xanthin-XO-System die Rate

der Erzeugung von H_2O_2 diejenige von O_2^- um das 100 fache übersteigen, um die initiale Rate der Cytochrom C-Reduktion zu beeinflussen. Unter Berücksichtigung der Rate-Konstanten und der Annahme, dass 80 % der vorhandenen O_2 Menge zur Bildung von H_2O_2 beitragen, würde die Generierung ausreichender, den Assay beeinflussender Mengen H_2O_2 sehr lange dauern und die Menge standardmäßig verwendeten Xanthins dafür nicht annähernd ausreichen (Turrens und Mc Cord 1987).

Der durch SOD hemmbare Cytochrom C-Assay kann verlässlich als Methode zur Messung von O_2^- herangezogen werden, jedoch sollte der den Assay durch Reduktion von Cytochrom C beeinflussenden Anwesenheit von H_2O_2 durch Gabe von Katalase begegnet werden.

IV.5 Therapeutische Möglichkeiten

Der Einfluss von Angiotensin II auf den vaskulären Tonus sowie vaskuläre Zellen beruht auf verschiedenen z. T. von einander unabhängigen Wirkungsebenen. So nimmt Angiotensin II durch die Stimulierung der Freisetzung von Aldosteron, einem in der Zona Glomerulosa der Nebennierenrinde gebildeten Mineralokortikoid, welches die Natriumresorption im distalen Tubulus und im Sammelrohrsystem der Niere und damit die renale Wasserretention erhöht, Einfluss auf den Natriumbestand, das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen und den Blutdruck.

Der vasokonstriktische Effekt von Angiotensin II beruht auf

- der Induktion der Kontraktion von sich in der Gefäßwand befindenden glatten Muskelzellen,
- der verstärkten Bildung von Endothelin 1, einem vasokonstriktisch und an glatten Muskelzellen mitogen wirkenden Polypeptid (D'Uscio et al. 1998),
- der Abschwächung der endothelabhängigen Dilatation (Rajagopalan et al. 1996) und
- der Bildung von O_2^- durch vaskuläre Zellen (Harrison 1997, Zhang et al. 1999), was zur Inaktivierung von NO, einem potenten Vasodilatator, führt (Katusic 1996).

All diese Wirkungen von Angiotensin II tragen zur Entstehung sowie Erhaltung von arterieller Hypertonie bei.

Die medikamentöse Therapie des erhöhten Blutdrucks kann mittels unterschiedlicher Pharmaka erfolgen. Hier soll aufgrund der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Eigenschaften von Angiotensin II auf den Eingriff in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (s. I.6) durch Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer) oder AT_1 -

Rezeptor Antagonisten (Sartane) näher eingegangen werden. Diese Maßnahme gilt als besonders wirksam und senkt außerdem das Risiko der Entstehung sowie des Fortschreitens von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose.

In verschiedenen klinischen Studien konnten die protektiven Eigenschaften von ACE-Hemmern belegt werden. So zeigte die TREND-Studie, dass bei Patienten mit bereits bestehender koronarer Gefäßkrankheit ACE-Hemmer die Endothelfunktion verbessert (Mancini et al. 1996). Die QUIET-Studie beschäftigte sich mit dem Fortschreiten der koronaren Atherosklerose. Dieser gefäßpathologische Vorgang kann insbesondere bei Patienten mit 130 mg/dl übersteigenden LDL-Spiegeln durch Gabe von ACE-Hemmern verhindert werden (Cashin-Hemphill et al. 1999).

An hyperlipidämischen Kaninchen konnte ein deutlich positiver Effekt von ACE-Hemmern auf die Verdickung der Tunica intima und den Cholesterin- und Zellgehalt in atherosklerotischen Läsionen sowie auf die endothelabhängige Dilatation nachgewiesen werden (Chobanian et al. 1992).

Während ACE-Hemmer die Bildung von Angiotensin II vermindern, wirken die zur Klasse der Imidazolderivate gehörenden Sartane als kompetitive Antagonisten am AT₁-Rezeptor. Somit reduzieren diese Substanzen die von Angiotensin II induzierte Kontraktion glatter Muskelzellen sowie die Ausschüttung von Aldosteron. Das zu den Sartanen gehörende Losartan inhibiert die Angiotensin II vermittelte O₂⁻-Bildung glatter Muskelzellen (Rajagopalan et al. 1996). Neben dem Antagonismus des AT₁-Rezeptors wird Losartan bei hypercholesterinämischen Patienten die Hemmung der Aufnahme von oxLDL in Monozyten und Makrophagen zugeschrieben. Dies vermindert die Bildung von Schaumzellen, einem Bedeutenden Schritt bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques (s. I.2.3).

Somit hat der Eingriff in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System durch ACE-Hemmer und Sartane neben einer anti-hypertensiven Wirkung einen auf verschiedenen Ebenen ansetzenden protektiven Effekt bei der Entstehung von Atherosklerose.

V. Zusammenfassung

Gegenwärtig sind ischämische Herzkrankheiten und zerebrovaskuläre Krankheiten, die im wesentlichen auf atherosklerotischen Veränderungen basieren, die häufigste Todesursache in Mitteleuropa. Hinweise auf eine maßgebliche Beteiligung von O_2^- an diesen pathologischen Vorgängen des Gefäßsystems erhärten sich. Angiotensin II und oxLDL induzieren eine verstärkte Bildung von O_2^- in vaskulären Zellen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich daher in vergleichenden Untersuchungen mit der Detektion möglicher O_2^- -Bildung durch arterielle Gefäßringe, glatte Muskelzellen, Mesangialzellen und Endothelzellen nach Stimulierung durch oxLDL und Angiotensin II. Dabei wurden diese Stimulanzen getrennt sowie gemeinsam eingesetzt, um potentielle Modelle für eine mögliche Interaktion von oxLDL und Angiotensin II bei der O_2^- -Bildung vaskulärer Zellen zu identifizieren. Bereits bekannte Interaktionen dieser Substanzen wie gegenseitige Beeinflussung der Rezeptorexpression, gleichzeitiges Vorkommen in atherosklerotischen Plaques sowie positiver Effekt von ACE-Hemmern auf die endotheliale Funktion hypercholesterinämischer Patienten geben Anlass zu weiteren, die Interaktion von oxLDL und Angiotensin II näher erforschenden Untersuchungen (Galle und Heermeier 1999). Gleichzeitig sollten zwei Methodiken zur Messung von O_2^- , der Lucigenin-Assay, welcher in den Blickpunkt einer Diskussion über dessen Verlässlichkeit gerückt ist (Vasques Vivar et al. 1997, Liochev und Fridovich 1997), und der Cytochrom C-Assay auf ihre Verlässlichkeit geprüft und insbesondere der Cytochrom C-Assay etabliert werden.

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Lucigenin-Assay mit isolierten Rattenaorten zeigte sowohl in Anwesenheit von Angiotensin II als auch oxLDL eine verstärkte O_2^- -Freisetzung. Bei simultaner Gabe beider Stimulanzen übertraf die quantitative O_2^- -Freisetzung die Summe derjenigen bei getrennter Donation der Stimulanzen, was entscheidende Hinweise auf der Suche nach möglichen Modellen der bereits bekannten Interaktionen von Angiotensin II und oxLDL gibt. So wurde in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion auf der Ebene der Induktion verstärkter O_2^- -Bildung vaskulärer Zellen belegt. Diese Ergebnisse können neue Möglichkeiten der Therapie zur Prävention der Atherosklerose und Folgeerkrankungen ergeben.

Als neben dem Lucigenin-Assay alternative Methodik zur Messung von O_2^- wurde der Cytochrom C-Assay etabliert. Hierbei wurde zunächst in zellfreien Vorversuchen die Spezifität der durchgeführten Versuche belegt: In einem Xanthin-Xanthinoxidase-System wurde O_2^- gebildet, was zu einer Reduktion von Cytochrom C führte und durch SOD nahezu

vollständig gehemmt werden konnte. Nach Gabe von oxLDL konnte eine Verstärkung der O_2^- -Bildung durch HUVECs nachgewiesen werden. Somit konnte der Cytochrom C-Assay als Methodik zur Messung von O_2^- erfolgreich durchgeführt werden. Die Validität des Lucigenin-Assays wird sowohl von der relativen Rate der Produktion von Luc^+ als auch von O_2^- durch biologische Ein-Elektron-Reduktionssysteme bestimmt. Ist die Rate des gebildeten O_2^- ausreichend hoch und die Rate des gebildeten Luc^+ adäquat, spiegelt das im Lucigenin-Assay freigesetzte Licht ausschließlich biologisch freigesetztes O_2^- wieder. Ist die Rate des gebildeten O_2^- im Verhältnis zum gebildeten Luc^+ zu niedrig, spiegelt das freigesetzte Licht gleichzeitig biologisch freigesetztes O_2^- und durch Autooxidation Lucigenins gebildetes O_2^- wieder. Die Rate der Produktion von Luc^+ und die von verschiedenen Autoren beschriebene Autooxidation Lucigenins, welche einen solchen Assay invalide unter bestimmten Umständen machen kann, hängt von der Konzentration Lucigenins, dem pH-Wert des Milieus und der Art des Redox-Systems ab. Bei der Durchführung von Lucigenin-Assays sollten daher Versuchsbedingungen geschaffen werden, bei denen kein Redox-Kreisprozess Lucigenins stattfindet. Unter dieser Voraussetzung bleibt der Lucigenin-Assay eine verlässlich und sinnvoll durchzuführende Methodik zur Bestimmung der Bildung von O_2^- .

Auch der Cytochrom C-Assay kann zu Fehlinterpretationen über das Ausmaß von in biologischen Systemen gebildetem O_2^- führen. Bis heute ist nicht verlässlich geklärt, welche Bedeutung die spontane Weiterreaktion von O_2^- vor der Reduktion von Cytochrom C hat, was zu einer Unterschätzung der quantitativen Bildung von O_2^- führen kann. Ebenfalls zu einer Unterschätzung der O_2^- -Bildung führen die potentielle Absorption von Cytochrom C an Zellen während des Versuchsablaufs und die mögliche Reoxidation von bereits reduziertem Cytochrom C durch H_2O_2 und OH^- . Dies kann zumindest partiell durch die Gabe von Katalase verhindert werden. Der Cytochrom C-Assay kann somit nur dann als Methode zur Messung von O_2^- herangezogen werden, wenn er durch SOD hemmbar ist und der den Assay durch Reoxidation von Cytochrom C beeinflussenden Anwesenheit von H_2O_2 durch Gabe von Katalase begegnet wird.

VI. Literaturverzeichnis

Afanas'ev IB; Ostrachovitch EA; Korkina Lucigenin is a mediator of cytochrome C reduction but not of superoxide production. Arch Biochem Biophys, 1999, 366(2): 267-274

Ahn TY, Gomez-Coronado D, Martinez V, Cuevas P, Goldstein I, Saenz de Tejada I: Enhanced contractility of rabbit corpus cavernosum smooth muscle by oxidized low density lipoproteins. Int. J. Impot. Res. 1999, 11: 9-14

Allen RC: Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. Methods Enzymol, 1986, 133: 449-493

Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P: The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. N. Engl. J. Med. 1995, 332: 488-493

Arthur MJ; Kowalski-Saunders P; Gurney S; Tolcher R; Bull FG; Wright R: Reduction of ferricytochrome C may underestimate superoxide production by monocytes. J Immunol Methods, 1987, 98(1): 63-69

Baas AS, Berk BC: Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H_2O_2 and O_2^- in vascular smooth muscle cells. Circ Res, 1995, 77(1): 29-36

Barbacanne M; Souchard J; Darblade B; Iliou J; Nepveu F; Pipy B; Bayard F; Arnal J: Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. Free Radic Biol Med, 2000, 29(5): 388-396

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1990, 87: 1620-1624

Bielski BH, Arudi RL: Preparation and stabilization of aqueous/ethanolic superoxide solutions. Anal Biochem, 1983, 133(1): 170-178

Bjorkerud B, Bjorkerud S: Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996, 16: 416-424

Bjorquist P; Palmer M: Measurement of superoxide anion production using maximal rate of cytochrome (III) C reduction in phorbol ester stimulated neutrophils, immobilised to microtiter plates. *Biochem Pharmacol*, 1994, 48(10): 1967-1972

Brandes T, Schweitzer L, Kramer B:Multifractal wave functions and inelastic scattering in the integer quantum Hall effect.*Physical Review Letters*, 1994, 72(22): 3582-3585

Brawn K, Fridovich I: Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1980, 492: 9-18

Brewer HB Jr, Rader DJ: HDL: Structure, function and metabolism. *Prog. Lipid. Res.* 1991, 30: 139-144

Bundesamt für Statistik: Todesursachenstatistik, Gesundheitsbericht für Deutschland 1998

Butler J, Jayson GG, Swallow AJ: The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 408(3): 215-222

Butler J, Koppenol WH, Margoliash E: Kinetics and mechanism of the reduction of ferricytochrome c by the superoxide anion. *J Biol Chem*, 1982, 257(18): 10747-10750

Buttke TM, Sandstrom PA:Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, 1994, 15(1): 7-10

Cashin-Hemphill L; Holmvang G; Chan RC; Pitt B; Dinsmore RE; Lees RS: Angiotensin-converting enzyme inhibition as antiatherosclerotic therapy: no answer yet. QUIET Investigators. Quinapril Ischemic Event Trial. *Am J Cardiol*, 1999, 83(1): 43-47

Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979, 59(3): 527-605

Chappell SP, Lewis MJ, Henderson AH: Effect of lipid feeding on endothelium dependent relaxation in rabbit aortic preparations. *Cardiovasc. Res.* 1987, 21: 34-38

Chatterjee S: Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* 1992, 111: 143-147

Chobanian AV; Haudenschild CC; Nickerson C; Hope S: Trandolapril inhibits atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension*, 1992, 20(4): 473-477

Couffinhal T, Duplaa C, Labat L, Moreau C; Bietz I; Bonnet J: Effect of low density lipoprotein on monocyte adhesiveness to endothelial cells in vitro. *Atherosclerosis*, 1993, 99(1): 35-45

Cui H; Meng R; Jiang H; Sun Y; Lin X: Inhibition of luminol and lucigenin chemiluminescence by reducing organic compounds. *Luminescence*, 1999: 14(3): 175-182

Cashin-Hemphill L, Holmvang G, Chan RC: Angiotensin-converting enzyme inhibition as antiatherosclerotic therapy: no answer yet. QUIET Investigators. QUinapril Ischemic Event Trial. *Am J Cardiol*, 1999, 83(1): 43-47

Darley-Usmar V, Halliwell B: Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm. Res.* 1996, 13: 649-662

Davidson CA, Kaminski PM, Wolin MS: Endogenous peroxynitrite generation causes a subsequent suppression of coronary arterial contraction to serotonin. *Nitric Oxide*, 1997, 1(3): 244-253

De Gasparo M, Siragy HM: The AT₂ receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul. Pept.* 1999, 81: 11-24

Dilley RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ: A review of the proliferative behaviour, morphology and phenotypes of vascular smooth muscle. *Atherosclerosis*, 1987, 63(2-3): 99-107

Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM: Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation*, 1997, 95(7): 1760-1763

Dri P; Soranzo MR; Cramer R; Menegazzi R; Miotti V; Patriarca P: Role of myeloperoxidase in respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes. Studies with myeloperoxidase-deficient subjects. *Inflammation*, 1985, 9(1): 21-31

Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD: Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1997, 6(1): 88-105

D'Uscio LV, Shaw S, Barton M, Luscher TF: Losartan but not verapamil inhibits angiotensin II-induced tissue endothelin-1 increase: role of blood pressure and endothelial function. *Hypertension* 1998, 31: 1305-1310

Elger M, Drenckhahn D, Nobile R: Cultured rat mesangial cells contain smooth muscle alpha-actin not found in vivo. *Am J Pathol*, 1993, 142(2): 497-509

Engelberg H: Endothelium in health and disease. *Semin Thromb Hemost*, 1989, 15(2): 178-183

Faulkner K; Fridovich: Luminol and lucigenin as detectors for O_2^- . *Free Radic Biol Med* 1993, 15(4): 447-451

Feron O: Intracellular localization and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1999, 8: 55-59

Fleming I, Gray GA, Schott C, Stoclet JC: Inducible but not constitutive production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1991, 200: 375-376

Fogliatto G, Musanti R, Pirillo A, Ghiselli G: Oxidized lipoproteins induce long-lasting inhibition of nitric oxide synthase from a murine endothelioma cell line (bEnd.4). *Cardiovasc. Risk.* 1995, 2: 123-130

Forman HJ; Fridovich I: Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. Arch Biochem Biophys 1973, 158(1): 396-400.

Fridovich I: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J Biol Chem, 1970, 245(16): 4053-4057

Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, 1980, 288: 373-376

Galle J, Bassenge E: Effects of native and oxidized low-density lipoproteins on endothelium-dependent and endothelium-independent vasomotion. Basic. Res. Cardiol. 1991, 86 Suppl 2: 127-142

Galle J, Bassenge E, Busse R: Oxidized low density lipoproteins potentiate vasoconstrictions to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle. Circ. Res. 1990, 66: 1287-1293

Galle J, Bengen J, Schollmeyer P, Wanner C: Impairment of endothelium-dependent dilation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein(a). Role of oxygen-derived radicals. Circulation 1995, 92: 1582-1589

Galle J, Heermeier K: Angiotensin II and oxidized LDL: an unholy alliance creating oxidative stress. Nephrol Dial Transplant (England) 1999, 14(11): 2585-2589

Galle J, Heinloth A, Schwedler S, Wanner C: Effect of HDL and atherogenic lipoproteins on formation of O_2^- and renin release in juxtaglomerular cells. Kidney Int. 1997, 51: 253-260

Galle J, Öchslen M, Schollmeyer p, Wanner C: Oxidized lipoproteins inhibit endothelium-dependent vasodilation: effects of pressure and high-density lipoprotein. Hypertension 1994, 23: 556-564

Goff DC Jr, D'Agostino RB Jr, Haffner SM, Saad MF, Wagenknecht: Lipoprotein concentrations and carotid atherosclerosis by diabetes status: results from the Insulin Resistance. Diabetes Care 2000, 23: 1006

Goto M, Mukoyama M, Suga S, Matsumoto T, Nakagawa M, Ishibashi R, Kasahara M, Sugawara A, Tanaka I, Nakao K: Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells. *Hypertension* 1997, 30: 358-362

Greiber S, Kreusel M, Pavenstadt H, Schollmeyer P, Wanner C: Lipoprotein(a) induces glomerular superoxide anion production. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12: 1330-1335

Grinblat L, Sreider CM, Stoppani AO: Superoxide anion production by lipoamide dehydrogenase redox-cycling: effect of enzyme modifiers. *Biochem Int*, 1991, 23(1): 83-92

Gupta S, Rifici V, Crowley S, et al.: Interactions of LDL and modified LDL with mesangial cells and matrix. *Kidney Int*, 1992, 41(5): 1161-1169

Gyllenhammer H: Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J. Immunol. Methods* 1987, 97: 209-213

Halliwell B: The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993, 1: 118-126

Hancock JT: Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules: their production and role in disease. *Br J Biomed Sci*, 1997, 54(1): 38-46

Harrison DG: Endothelial function and oxidant stress. *Clin. Cardiol.* 1997, 20: 11-17

Hiki K, Hattori R, Kawai C, Yui Y: Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum. *J. Biochem. (Tokyo)* 1992, 111: 556-558

Horio T, Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Ikeda M, Fukui T, Takeda T: Stimulation of endothelin-1 release by low density and very low density lipoproteins in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis* 1993, 101: 185-190

Horio T, Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Ikeda M, Fukui T, Takeda T: Stimulation of endothelin-1 release by low density and very low density lipoproteins in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis* 1993, 101: 185-190

Hultgardh-Nilsson A, Krondahl U, Querol-Ferrer V: Differences in growth factor response in smooth muscle cells isolated from adult and neonatal rat arteries. *Differentiation*, 1991, 47(2): 99-105

Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T: Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int*, 1994, 45(1): 1-9

Inagami T, Eguchi S: Angiotensin II-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2000, 33: 619-624

Irani K: Oxidant Signaling in Vascular Cell Growth, Death, and Survival, A Review of the Roles of Reactive Oxygen Species in Smooth Muscle and Endothelial Cell Mitogenic and Apoptotic Signaling. *Circ. Res.* 2000, 87: 179-183

Jeng JR, Chang CH, Shieh SM, Chiu HC: Oxidized low-density lipoprotein enhances monocyte-endothelial cell binding against shear-stress-induced detachment. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1178(2): 221-227

Jin N, Packer CS, Rhoades RA: Reactive oxygen-mediated contraction in pulmonary arterial smooth muscle: cellular mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol*, 1991, 69(3): 383-388

Junqueira LC, Caneiro J: *Histologie*, 1991: 291-293

Kajiyama G, Shiode N, Kato M, Hiraoka A, Yamagata T, Matsuura H: Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels in hypercholesterolemic. *Intern. Med.* 1996, 35: 89-93

Katusic ZS: Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free. Radic. Biol. Med.* 1996, 20: 443-448

Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW; Medford RM: Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(17): 9114-9119

Klatt P, Heinzl B, Mayer B, Ambach E, Werner-Felmayer G, Wachter H, Werner ER: Stimulation of human nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin and selective binding of the cofactor. *FEBS Lett.* 1992, 305: 160-162

Kownatzki E; Uhrich S; Bethke P: Assessment of ferrocyclochrome C oxidation by hydrogen peroxide. *Agents Actions*, 1991, 34(3-4): 393-396

Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1995, 376(6): 327-343

Krück: Charakteristische Daten einzelner Lipoproteinklassen, Pathophysiologie-Pathobiochemie, 1994

Lahteenmaki TA, Korpela R, Tikkanen MJ, Karjala K, Laakso J, Solatunturi E, Vapaatalo H: Proliferative effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells: role of dietary habits. *Life Sci.* 1998, 63: 995-1003

Land EJ, Swallow AJ; One-electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis. V. Cytochrome c. *Arch Biochem Biophys*, 1971, 145(1): 365-372

Landmesser U, Harrison DG; Oxidant Stress as a Marker for Cardiovascular Events. *Circulation* 2001, 104: 2638-2640

Lassila R, Koskenvuo M, Kaprio J, Laustiola KE: Interaction between the arterial wall and thrombocytes in smokers. *Nord. Med.* 1991, 106: 8-10

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG: Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension comments. *Circulation* 1997, 95: 588-593

Li Y; Zhu H; Kuppasamy P; Roubaud V; Zweier JL; Trush MA: Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem*, 1998, 273(4): 2015-2023

Libby P, Hansson GK: Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest*, 1991, 64(1): 5-15

Liochev SI, Fridovich I: Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. *J Biol Chem*, 2000, 275(49): 38482-38485

Liochev SI; Fridovich I: Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys* 1997, 337(1): 115-120

Liu S, Beckman JS, Ku DD: Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, 268: 1114-1121

Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH: Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1992, 89: 6711-6715

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193: 265-275

Mack WJ, Krauss RM, Hodis HN: Lipoprotein subclasses in the Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). Treatment, effects and relation to coronary angiographic progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996, 16: 697-704

Mancini,GB, Henry,GC, Macaya,C, O'Neill,BJ, Pucillo,AL, Carere,RG, Wargovich,TJ, Mudra,H, Luscher,TF, Klibaner,MI, Haber,HE, Uprichard,AC, Pepine,CJ, Pitt,B Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation*, 1996, 94(3): 258-265

Marklund SL, Karlsson K: Extracellular-superoxide dismutase, distribution in the body and therapeutic applications. *Adv Exp Med Biol*, 1990, 264, 1-4

Massey V; Strickland S; Mayhew SG; Howell LG; Engel PC; Matthews RG; Schuman M; Sullivan PA: The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*, 1969, 36(6): 891-897

Massy ZA, Keane WF: Pathogenesis of atherosclerosis.: *Semin. Nephrol.* 1996, 16: 12-20

McCord JM; Fridovich I: The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968, 243(21): 5753-5760.

Mitchell ME, Sidawy AN: The pathophysiology of atherosclerosis: *Semin. Vasc. Surg.* 1998, 11: 134-141

Moncada S, Higgs A: Mechanisms of disease. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993, 329: 2002-2012

Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B: Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*, 1999, 100(9): 899-902

Morton JJ, Beattie EC, MacPherson F: Angiotensin II receptor antagonist losartan has persistent effects on blood pressure in the young spontaneously hypertensive rat: lack of relation to vascular structure. *J. Vasc. Res.* 1992, 29: 264-269

Muller C, Endlich K, Helwig JJ: AT2 antagonist-sensitive potentiation of angiotensin II-induced constriction by NO blockade and its dependence on endothelium and P450 eicosanoids in rat renal vasculature. *Br. J. Pharmacol.* 1998, 124: 946-952

Muscella A, Marsigliante S, Vilella S, Jimenez E, Storelli C: Angiotensin II stimulates the Na⁺/H⁺ exchanger in human umbilical vein endothelial cells via AT1 receptor. *Life Sci.* 1999, 65: 2385-2394

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ: The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995, 92: 10663-10667

Newburger PE; Speier C; Borregaard N; Walsh CE; Whitin JC; Simons ER: Development of the superoxide-generating system during differentiation of the HL-60 human promyelocytic leukemia cell line. *J Biol Chem*, 1984, 259(6): 3771-3776

Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F: Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 1997, 95(2): 473-478

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases superoxide anion production. *J Clin. Invest.* 1993, 91: 2546-2551

Okada Y, Katsuda S, Watanabe H, et al.: Collagen synthesis of human arterial smooth muscle cells: effects of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1. *Acta Pathol Jpn*, 1993, 43(4): 160-167

Omar HA; Cherry PD; Mortelliti MP; Burke-Wolin T; Wolin MS: Omar HA; Cherry PD; Mortelliti MP; Burke-Wolin T; Wolin MS. *Circ Res*, 1991 ,69(3): 601-608

Orth SR, Weinreich T, Bonisch S, Weih M, Ritz E: Angiotensin II induces hypertrophy and hyperplasia in adult human mesangial cells. *Exp. Nephrol.* 1995, 3: 23-33

Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL: Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1989, 86: 1372-1376

Phillips NR, Waters D, Havel RJ: Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events: *Circulation* 1993, 88: 2762-2770

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327(6122): 524-526

Potter DD, Sobey CG, Tompkins PK: Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation*, 1998, 98(8): 800-807

Pou S, Nguyen SY, Gladwell T, Rosen GM: Does peroxynitrite generate hydroxyl radical? *Biochim. Biophys. Acta.* 1995, 1244: 62-68

Radi R; Thomson L; Rubbo H; Prodanov E : Cytochrome c-catalyzed oxidation of organic molecules by hydrogen peroxide, *Arch Biochem Biophys*, 1991, 288(1): 112-117

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci*, 1991, 12(3): 87-88

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 1987, 92(3): 639-646

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH-NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* 1996, 97: 1916-1923

Restori G, Boiardi L, Barbagallo M, Novo S, Passeri M, Strano: Progression of induced aortic atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Int. Angiol.* 1990, 9: 263-265

Robbins AC: Selections from current literature: mild hypertension. *Fam Pract*, 1997, 14(1): 73-77

Rosen GM, Freeman BA: Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81(23): 7269-7273

Rosen GM; Finkelstein E; Rauckman EJ: A method for the detection of superoxide in biological systems. Arch Biochem Biophys 1982, 215(2): 367-278.

Rosen H; Klebanoff SJ: Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase-deficient leukocytes. J Clin Invest 1976, 58(1): 50-60.

Rosenfeld ME, Palinski W, Yla-Herttuala S, Carew TE: Macrophages, endothelial cells, and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis. Toxicol. Pathol. 1990, 18: 560-571

Ross R: Cell biology of atherosclerosis. Annu. Rev. Physiol. 1995, 57: 791-804

Rubanyi GM, Vanhoutte PM: Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. Am J Physiol, 1986, 250, 822-827

Sachinidis A, Locher R, Mengden T, Vetter W: Low-density lipoprotein elevates intracellular calcium and pH in vascular smooth muscle cells and fibroblasts without mediation of LDL receptor.:Biochem Biophys Res Commun, 1990, 167(1): 353-359

Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyysönen K, Palinski W, Witztum JL: Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. Lancet 1992, 339: 883-887

Saran M, Bors W: Signalling by O_2^- and NO.: how far can either radical, or any specific reaction product, transmit a message under in vivo conditions? Chem Biol Interact, 1994, 90(1): 35-45

Scheinman JI, Fish AJ, Brown DM: Human glomerular smooth muscle (mesangial) cells in culture. Lab Invest, 1976, 34(2): 150-158

Schlaifer JD; Wargovich TJ; O'Neill B; Mancini GB; Haber HE; Pitt B; Pepine CJ: Effects of quinapril on coronary blood flow in coronary artery disease patients with endothelial dysfunction. Trend Investigators. Trial on Reversing Endothelial Dysfunction, Am J Cardiol, 1997, 80(12):1594-1597

Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U, Murad F: Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1991, 88: 365-369

Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW: Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev*, 1990, 70(4): 1177-1209

Shiode N, Kato M, Hiraoka A: Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels in hypercholesterolemic patients. *Intern Med*, 1996, 35(2): 89-93

Shultz PJ, Archer SL, Rosenberg ME: Inducible nitric oxide synthase mRNA and activity in glomerular mesangial cells. *Kidney Int*, 1994, 46(3): 683-689

Siragy HM, Carey RM: Protective role of the angiotensin AT₂ receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension*, 1999, 33(5): 1237-1242

Sjolund M, Hedin U, Sejersen T: Arterial smooth muscle cells express platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, secrete a PDGF-like mitogen, and bind exogenous PDGF in a phenotype- and growth state-dependent manner. *J Cell Biol*, 1988, 106(2): 403-413

Skatchkov MP; Sperling D; Hink U; Mulsch A; Harrison DG; Sindermann I; Meinertz T; Munzel T: Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 254(2): 319-324

Smith EB: Transport, interactions and retention of plasma proteins in the intima: the barrier of the internal elastic lamina. *Eur. Heart. J.* 1990, 11: 72-81

Sohn HY; Gloe T; Keller M; Schoenafinger K; Pohl U: Sensitive superoxide detection in vascular cells by the new chemiluminescence dye L-012. *J Vasc Res*, 1999, 36(6): 456-464

Sosa-Canache B, Cierco M, Gutierrez CI, Israel A: Role of bradykinins and nitric oxide in the AT₂ receptor-mediated hypotension. *J. Hum. Hypertens.* 2000, 1: 40-46

Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR: Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18: 977-983

Steinberg D, Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S: Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-modulated metabolism. *Arteriosclerosis* 1987, 7: 135-143

Stephenson LA, Haney LB, Hussaini IM: Regulation of smooth muscle alpha-actin expression and hypertrophy in cultured mesangial cells. *Kidney Int.* 1998, 54(4): 1175-1187

Suzuki YJ, Ford GD: Superoxide stimulates IP3-induced Ca²⁺ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1992, 262: H114-116

Takeuchi K: Signal transduction systems of angiotensin II receptors. *Nippon Rinsho.* 1999, 57: 1070-1077

Tarpey MM; White CR; Suarez E; Richardson G; Radi R; Freeman BA: Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res* 1999, 84(10): 1203-1211

Tashiro K, Makita Y, Shike T, Shirato I, Sato T, Cynshi O, Tomino Y: Detection of cell death of cultured mouse mesangial cells induced by oxidized low-density lipoprotein. *Nephron* 1999, 82: 51-58

Tashiro K, Makita Y, Shike T, Shirato I, Sato T, Cynshi O, Tomino Y, Gupta S, Rifici V, Crowley S, Brownlee M, Shan Z, Schlondorff D: Interactions of LDL and modified LDL with mesangial cells and matrix. *Kidney Int.* 1992, 41: 1161-1169

Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D: Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 2000, 35: 1069-1073

Tornvall P, Karpe F, Proudler A, Bavenholm P, Landou C, Olivecrona T, Hamsten A: High-density lipoprotein: relations to metabolic parameters and severity of coronary artery disease. *Metabolism*. 1996, 45: 1375-1382

Tornvall P, Karpe F, Proudler A, Bavenholm P, Landou C, Olivecrona T, Hamsten A: High-density lipoprotein: relations to metabolic parameters and severity of coronary artery disease. *Metabolism* 1996, 45: 1375-1382

Touyz RM, Schiffrin EL: Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1999, 34: 976-982

Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm: Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 1995, 332: 481-487

Turrens JF; McCord JM: How relevant is the reoxidation of ferrocyanochrome c by hydrogen peroxide when determining superoxide anion production? *FEBS Lett*, 1988, 227(1): 43-46

Tyroler HA: Lowering plasma cholesterol levels decreases risk of coronary heart disease: An overview of clinical trials. *Hypercholesterolemia and Atherosclerosis* 1987, 99-116

Vandewalle PL; Petersen: NO Oxidation of reduced cytochrome c by hydrogen peroxide. Implications for superoxide assays. *FEBS Lett* 1987, 210(2): 195-198

Vasquez-Vivar J; Hogg N; Pritchard KA Jr; Martasek P; Kalyanaraman B: Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett*, 1997, 403(2): 127-130

Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S: Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994, 91: 12383-12387

Woodman CR, Muller JM, Rush JW: Flow regulation of eNOS and Cu/Zn SOD mRNA expression in porcine coronary arterioles. *Am J Physiol*, 1999, 276: 1058-1063

Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C: Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J. Biol. Chem.* 1991, 266: 12544-12547

Zhang H, Schmeisser A, Garlisch CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, Daniel WG: Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc. Res.* 1999, 44: 215-222

VII. Anhang

VII.1 Verzeichnis der Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ADP	Adenosin Di Phosphat
Apo	Apolipoprotein
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin Typ 1 Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin Typ 2 Rezeptor
ATP	Adenosin Tri Phosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
cGMP	Zyklisches Guanosin 3,5-Monophosphat
CO	Kohlenmonoxid
CSF	Colony Stimulating Factor
Cu	Kupfer
DAB	Diaminbenzidin
DAG	Diazylglyzerol
DDC	Diethyldithiocarbamat
DNA	Desoxyribonuclein Acid
EDRF	Endothelial Derived Relaxing Factor
eNOS	endotheliale Nitric Oxide Synthase
FCS	Fetales Kälber-Serum
GTP	Guanosin Triphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoprotein
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Humane Umbilical Vein Endothelial Cells
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
Luc ⁺	reduziertes Lucigenin
Luc ²⁺	Lucigenin

mRNA	messenger ribonuclein acid
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamiddehydrogenase
nLDL	native Low Density Lipoprotein
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	neuronale Nitric Oxide Synthase
NO ₂	Stickstoffdioxid
O ₂	molekularer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH ⁻	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rotationen pro Minute
SMC	Smooth Muscle Cell
SOD	Superoxiddismutase
Tiron	4,5-Dihydroxy-1,3-Benzene-Disulfonic Acid
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
X	Xanthin
XO	Xanthinoxidase
Zn	Zink

VII.2 Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1: Univalente Reduktion molekularen Sauerstoffs, Entstehung von O_2^-
- Abb. 2: Mögliche Reaktionen von O_2^-
- Abb. 3: Reaktion von O_2^- mit NO
- Abb. 4: Entgiftung von O_2^- durch SOD
- Abb. 5: Lucigenin-Chemolumineszenz
- Abb. 6: O_2^- -Bildung im zellfreien Xanthin-Xanthinoxidase-System
- Abb. 7: Berechnung des tatsächlich Anteils freigesetzter Radikale im Lucigenin-Assay
- Abb. 8: Eichgerade
- Abb. 9: Reaktion von Ferricytochrom C zu Ferrocycytochrom C in durch Elektronenabgabe von O_2^-
- Abb. 10: Berechnung der benötigten Menge Kaliumbromids bei der Isolierung von Lipoproteinen
- Abb. 11: O_2^- -Freisetzung von Gefäßringen durch Angiotensin 10^{-8} mol, oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 5 min nach Versuchsbeginn
- Abb. 12: O_2^- -Freisetzung von Gefäßringen durch Angiotensin 10^{-8} mol, oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 10 min nach Versuchsbeginn
- Abb. 13: O_2^- -Freisetzung von Gefäßringen durch Angiotensin 10^{-8} mol, oxLDL 300 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 15 min nach Versuchsbeginn
- Abb. 14: O_2^- -Freisetzung von HUVECs durch Angiotensin 10^{-8} mol, oxLDL 100 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 5 min nach Versuchsbeginn
- Abb. 15: O_2^- -Freisetzung von HUVECs durch Angiotensin 10^{-8} mol, oxLDL 100 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 10 min nach Versuchsbeginn
- Abb. 16: O_2^- -Freisetzung von HUVECs durch Angiotensin 10^{-8} mol, oxLDL 100 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen, bestimmt 15 min nach Versuchsbeginn
- Abb. 17: Signal im zellfreien Xanthin-Xanthinoxidase-System vor und nach Gabe von SOD; n=9; 1,5 h Reaktionszeit

- Abb. 18: Nachweis der Spezifität des Cytochrom C-Assays als Methode zum Nachweis von O_2^- -Bildung in biologischen Systemen durch Reduzierung des Absorptionsmaximums der Kontrolle nach Gabe von SOD
- Abb. 19: O_2^- -Freisetzung von HUVECs durch oxLDL 50 $\mu\text{g/ml}$
- Abb. 20: Schematische Darstellung des zu einer Photonenemission führenden Reaktionsweges von Lucigenin
- Abb. 21: In einer Bildung von O_2^- resultierende Reduktion von O_2 durch Luc^+
- Abb. 22: Darstellung der in einer Lichtemission resultierenden Reduktion von Luc^+
- Abb. 23: Redoxkreisprozess Lucigenins
- Abb. 24: Drei mögliche Mechanismen der Cytochrom C-Reduktion durch Xanthinoxidase in Anwesenheit von Luc^{2+} und O_2
- Abb. 25: Darstellung von hypothetischen Abläufen der Einflussnahme von O_2^- auf einen möglichen Redoxkreisprozess Lucigenins
- Abb.26: Reduktion von Ferricytochrom C

Danksagung

Diese Arbeit konnte in der vorliegenden Form nur durch die Unterstützung verschiedener Personen zustande kommen. Besonders herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Galle für die Möglichkeit, experimentelles Arbeiten erlernen zu können und für die enge Betreuung. Weiterhin grosser Dank gilt allen Mitarbeitern des nephrologischem Labors der Universität Würzburg, die mich warmherzig in ihr Team aufgenommen haben und jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hatten. Dabei möchte ich besonders Frau Dr. U. Raff und Frau E. Baumeister hervorheben, die mir beim Erlernen der praktischen Arbeit eine grosse Hilfe waren. Weiterer Dank für die fachliche Unterstützung in chemischen Fragen gilt Herrn D. Schumacher. Für die Geduld beim Korrekturlesen danke ich meinem Vater und meiner Freundin Sandra Pietsch.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Mark Oliver Keil
Geburtsdatum	06.11.1972
Geburtsort	Fulda
Familienstand	ledig

Schulbildung

1979 - 1983	Grundschule Lehnerz
1983 - 1989	Domgymnasium Fulda
1989 - 1992	Marianum Fulda

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

10/1992 - 12/1993	Caritas Fulda, Betreuung geistig und körperlich Behinderter
-------------------	---

Pflegepraktika

02/1994 - 03/1994	Geriatrische Abteilung, Elisabethenkrankenhaus Fulda
08/1995	Chirurgische Abteilung, Herz-Jesu-Krankenhaus Fulda

Famulaturen

08/1996	Chirurgische Abteilung, Herz-Jesu-Krankenhaus Fulda
03/1997 - 04/1997	Abteilung für Chinesische Medizin, Japanisch-chinesisches Freundschaftshospital Peking

08/1998 - 09/1998 Internistische Praxis in Beirut, Libanon
08/1999 - 09/1999 Kardiologische Abteilung, Medizinische Klinik der
Universität Würzburg

Hochschulbildung

04/1994 - 03/1996 Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
03/1996 Physikum
04/1996 -05/2001 Klinisches Studium an der Universität Würzburg
03/1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2000 -03/2001 Praktisches Jahr:
1. Terial: Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie
und Psychotherapie der Universität Würzburg
2. Terial: Medizinische Klinik der Universität Würzburg
3. Terial: Chirurgische Abteilung der Universitätsklinik Würzburg
05/2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

10/1997 - 7/2002 Experimentelle Arbeit im nephrologischen Labor der Medizinischen
Klinik der Universität Würzburg
Thema: Vergleichende methodische Untersuchungen zur
Sauerstoffradikalfreisetzung vaskulärer Zellen durch
Angiotensin II und Lipoproteine

Ärztliche Tätigkeit

seit 06/2001 Arzt im Praktikum der Klinik und Poliklinik für Kinder- und
Jugendpsychiatrie und Psychotherapie der Universitätsklinik
Würzburg