

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

**Sensitive Messung von Superoxidanionen in kardiovaskulären
Geweben**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Klaus Valentin Hubertus
aus Würzburg
Würzburg, August 2011

Referentenblatt

Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Widder

Korreferentin: Prof. Dr. C. Förster

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:
27. Januar 2012

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG:	1
1.1 Die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies	1
1.2 Messmethoden von Superoxidanionen	4
Cytochrom C–Reduktion	4
Chemolumineszenz-basierte Messungen	5
Elektronen-Spin-Resonanz	6
Messung des intrazellulären Superoxidanionen-Spiegels mit Dihydroethidium und High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	7
1.3 Aufbau und Funktionsweise des HPLC-Systems	8
Funktionsprinzip einer HPLC	8
Die Detektion	9
Aufbau eines herkömmlichen HPLC-Systems	10
Aufbau unseres HPLC-Systems	10
2 MATERIAL UND METHODEN:	13
2.1 Chemikalien und Lösungen	13
2.2 Eine einfache und schnelle HPLC-Methode zur Messung von Dihydroethidium und seinen Produkten in biologischen Systemen	13
2.3 Herstellung der Proben	14
HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in Rattenaorten nach induziertem Myokardinfarkt mittels elektrochemischem Detektor bzw. Fluoreszenz-Detektor	14
HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in kultivierten humanen Endothelzellen mittels elektrochemischem Detektor	16
HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in Mauseorten nach Stimulation mit Angiotensin II mittels elektrochemischem Detektor	17
Proteinbestimmung	19
2.4 Statistik	20

3	ERGEBNISSE:	21
3.1	HPLC-basierte Messung von Superoxidanionen in Rattenaorten nach induziertem Myokardinfarkt mittels elektrochemischem Detektor und Vergleich mit einer Messung mittels Fluoreszenz-Detektor	21
	Messung mittels elektrochemischem Detektor:	21
	Messung mittels Fluoreszenz-Detektor:	23
3.2	HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in kultivierten humanen Endothelzellen mittels elektrochemischem Detektor.....	23
	Messung nach Stimulation mit Glukose	23
	Messung nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor α (TNF α).....	25
3.3	HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in Aorten von Mäusen nach chronischer Angiotensin II-Infusion mittels elektrochemischem Detektor	27
4	DISKUSSION:	29
4.1	HPLC-basierte Messung von Superoxidanionen in Rattenaorten nach induziertem Myokardinfarkt mittels elektrochemischem Detektor und Vergleich mit einer Messung mittels Fluoreszenz-Detektor	31
4.2	HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in gezüchteten humanen Endothelzellen mittels elektrochemischem Detektor.....	32
	Messung nach Stimulation mit Glukose	32
	Messung nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor α (TNF α).....	33
4.3	HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in Aorten von Mäusen nach dauerhafter Angiotensin II-Infusion mittels elektrochemischem Detektor	33
5	ZUSAMMENFASSUNG:	35
6	LITERATUR:	37

1 Einleitung:

1.1 Die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies

Mehrere Stoffwechselfvorgänge im menschlichen Körper führen zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Aufgrund einer fehlerhaften Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff können sich bei diversen Reaktionen verschiedener Enzymsysteme Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bilden. Diese sind Vorläufer weiterer ROS wie etwa Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$) oder dem Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) (7).

Es existieren verschiedene Enzymsysteme, die konstitutiv oder induzierbar ROS produzieren. Zu diesen zählen unter anderem die NAD(P)H-Oxidasen, Xanthin-Oxidasen, Stickstoff-monoxid (NO)-Synthasen, Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Zyklooxygenasen, Hämoxygenasen, Lipoxygenasen und Cytochrom-P450-Monooxygenasen (s. Abb.1) (14).

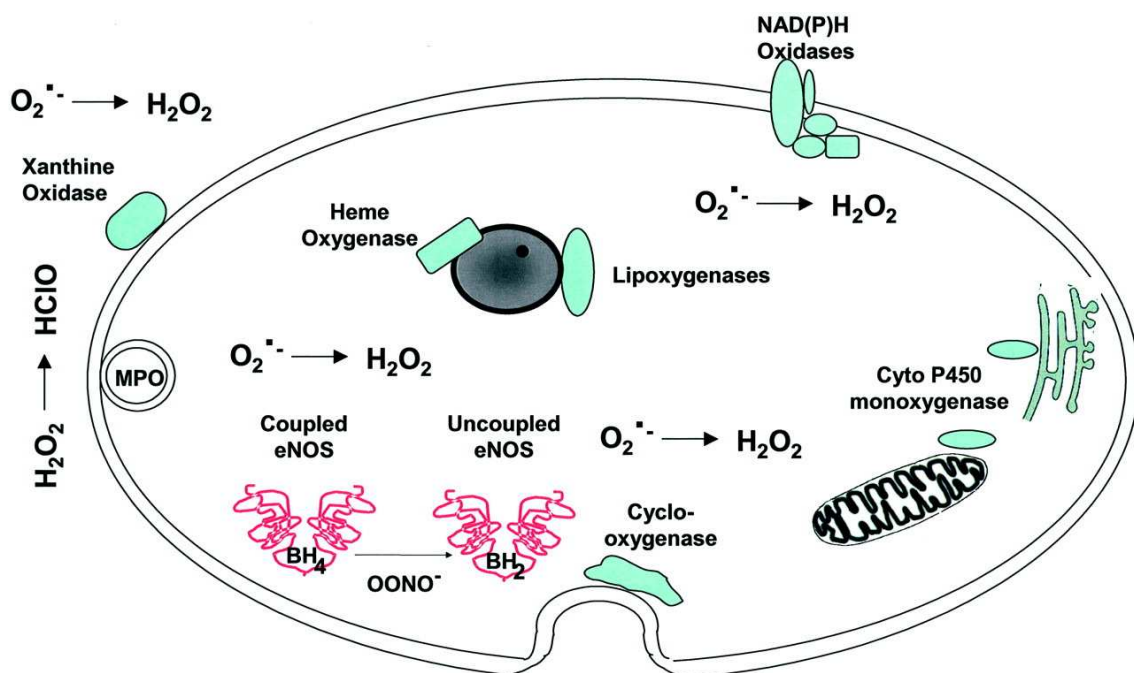


Abb. 1: Mögliche ROS-Quellen: ROS entstehen unter anderem durch Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Xanthin-Oxidasen, Zyklooxygenasen, Lipoxygenasen, Myeloperoxidasen, Cytochrom-P450-Monooxygenasen, entkoppelte NO-Synthasen, Hämoxygenasen sowie NAD(P)H-Oxidasen. Je nach Lokalisation in der Zelle werden ROS intra- oder extrazellulär gebildet. Abbildung aus: (14).

1 Einleitung

ROS sind sehr reaktive Substanzen, die benachbarte Lipide, DNA und auch Proteine angreifen und schädigen können (5). Besonders das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) wird für derartige Schädigungen verantwortlich gemacht.

ROS spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen und sind ursächlich an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt, wie sie bei Diabetes und bei chronischer Herzinsuffizienz häufig auftritt. Verschiedene Radikale und insbesondere Superoxidanionen können mit NO reagieren und vermindern so die Bioverfügbarkeit dieses wichtigen Botenstoffes der Blutgefäßwand. So findet sich bei Diabetikern ein erhöhter ROS-Spiegel in der Gefäßwand, welcher wesentlich zur endothelialen Dysfunktion beiträgt (10). Eine erniedrigte Bioverfügbarkeit von NO bei gleichzeitig erhöhten Superoxidanionenspiegeln gilt als Hauptursache für die endotheliale Dysfunktion. Die vermehrte ROS-Produktion scheint hier darüber hinaus zu einer verminderten Mobilisation und Funktion von endothelialen Progenitorzellen zu führen, was einen möglichen weiteren Mechanismus der gestörten vaskulären Homöostase bei Diabetes darstellt (30).

Neben vaskulären Schädigungen sind ROS beim Typ2-Diabetes in die Entstehung der Insulin-Resistenz sowie in Störungen der β -Zellen des Pankreas verwickelt. Außerdem werden sie für die Spätfolgen sowohl des Typ1-, als auch des Typ2-Diabetes (Nephropathie, Retinopathie, Neuropathie, Mikro- und Makrovaskulopathie) verantwortlich gemacht. Da endotheliales NO darüber hinaus ein Modulator von Thrombozyten ist, führt ein verringerter NO-Spiegel zu einer verstärkten Thrombozyten-Aktivierung. Die Folge ist ein erhöhtes Risiko für thrombembolische Ereignisse bei Herzinsuffizienz (4). Auch bei der Entstehung des Typ1-Diabetes spielen ROS eine Rolle (22).

Verantwortlich für die Unausgeglichenheit von NO und Superoxidanionen bei Herzinsuffizienz ist die mit ihr vergesellschaftete neurohumorale Aktivierung (4). Die Folge ist eine verminderte Dilatationsfähigkeit der Gefäße (5). Es konnte außerdem experimentell gezeigt werden, dass bei chronischer Herzinsuffizienz durch Hemmung der p38 MAP-Kinase und der damit verbundenen Absenkung des Superoxidanionspiegels einer vasomotorischen Fehlfunktion von Gefäßen vorgebeugt werden kann (33).

1 Einleitung

Neben kardiovaskulären Erkrankungen gelten ROS auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson und M. Alzheimer als ursächlich beteiligt (31). Durch Schädigung der DNA sind ROS darüber hinaus bei der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt (23).

Nicht selten kommt es zwischen ROS und den von ROS in ihrer Entstehung und Progression begünstigten Krankheiten zu einer Wechselwirkung im Sinne einer gegenseitigen Verstärkung, einem so genannten Circulus Vitiosus. So findet sich z.B. bei Diabetikern eine erhöhte ROS-Produktion in den Gefäßen, was wiederum die Progression der Krankheit und ihre Folgen verstärkt (5, 10, 17, 27).

Um den negativen Eigenschaften von ROS entgegen zu wirken, gibt es verschiedene Abwehrmechanismen, welche die gebildeten ROS abfangen und der Zelle so diese schädigenden Substanzen entziehen. Zu diesen gehören etwa die Superoxid-Dismutasen, Katalase und die Thiol-vermittelten Redox-Systeme (14, 32). Dieser Schutz ist in bestimmten pathophysiologischen Situationen aber nur begrenzt ausreichend.

Betrachtet man die Bedeutung von ROS bei der Entstehung und Progredienz multipler Erkrankungen, wird klar, wie wichtig es ist, Systeme zu entwickeln, um die unterschiedlichen ROS, insbesondere Superoxidanionen, spezifisch und sensitiv in Geweben und Zellen messen zu können. Zu diesem Zwecke wurden einige Methoden in den letzten Jahren entwickelt und angewandt, von denen jede ihre Vor- und ihre Nachteile hat. Im Folgenden möchte ich die am weitesten verbreiteten Methoden zur Messung von Superoxidanionen vorstellen.

1.2 Messmethoden von Superoxidanionen

Cytochrom C-Reduktion

Die Cytochrom C-Reduktion kann angewendet werden, um $O_2^{\cdot-}$ -Konzentrationen zu bestimmen. Diese Methode wird häufig zur Messung von $O_2^{\cdot-}$ in verschiedenen Geweben angewandt (2, 8, 13, 17). Ferricytochrom C hat ein höheres Elektronenpotential als $O_2^{\cdot-}$. Daher gibt $O_2^{\cdot-}$ ein Elektron an Ferricytochrom C ab. Ferricytochrom C wird so zu Ferrocycytochrom C reduziert. Das entstandene Ferrocycytochrom C hat spezifische photometrische Eigenschaften mit einem Absorptionsmaximum bei 550nm und kann mittels eines Spektrophotometers gemessen werden.

Ein Nachteil dieser Methode ist aber, dass Ferricytochrom C auch durch Elektronen, die ihm von anderen Enzymen oder Molekülen übertragen werden reduziert wird. Deshalb muss immer eine Vergleichsmessung mit einem Sauerstoffradikalfänger wie etwa Superoxiddismutase (SOD) gemacht werden. Die Differenz der beiden Signale stellt dann die durch $O_2^{\cdot-}$ verursachte Ferricytochrom C-Reduktion dar (1).

Große Mengen $O_2^{\cdot-}$, wie sie etwa bei der Phagozytose vorkommen, können mit dieser Methode sehr genau gemessen werden. Da der Extinktionskoeffizient für Ferrocycytochrom C bekannt ist, wird kein Standard für die Auswertung benötigt (35). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass sie mit relativ einfachen Mitteln durchzuführen ist, die in nahezu jedem Labor standardmäßig verfügbar sind.

In Blutgefäßen, deren glatter Muskulatur, Endothelzellen und Herzmuskelgewebe sind die $O_2^{\cdot-}$ -Spiegel aber vergleichsweise gering. Sie bewegen sich an der unteren Grenze der Messbarkeit mit dieser Methode. Kleinste Fehler in der Messung oder der Gewebepreparation führen hier zu falschen Interpretationen. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass man immer zur Validierung einen spezifischen Sauerstoffradikalfänger wie SOD einsetzen muss (1). Da es faktisch nie gelingt, zwei identische Gewebestücke zu präparieren, kommt es somit zu verzerrten Messergebnissen. Des Weiteren muss man berücksichtigen, dass die beschriebene Methode nur extrazelluläres $O_2^{\cdot-}$ erfasst (7).

1 Einleitung

Chemolumineszenz-basierte Messungen

Unter $O_2^{\cdot-}$ -Exposition setzen chemolumineszierende Proben ein Photon frei, welches in einem „scintillation counter“ oder einem Luminometer gemessen werden können. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Lucigenin-verstärkte Chemolumineszenz.

Folgende Reaktionen finden hierbei statt:

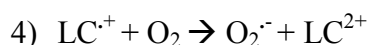
- 1) $O_2^{\cdot-} + LC^{2+} \rightarrow LC^{\cdot+} + O_2$
- 2) $LC^{\cdot+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow LCO_2$
- 3) $LCO_2 \rightarrow 2N\text{-methylacridon} + h\nu$

LC^{2+} = Lucigenin

Bei Reaktion 3) wird ein Photon freigesetzt (7).

Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie eine beachtliche Spezifität für $O_2^{\cdot-}$ hat. Außerdem wird keine zweite Probe mit SOD benötigt, da das Signal primär durch $O_2^{\cdot-}$ ausgelöst wird. Als Stärke ist auch zu nennen, dass mit der Chemolumineszenz-basierten Messung sowohl intra-, als auch extrazelluläre $O_2^{\cdot-}$ gemessen werden, wobei bei der Lucigenin-verstärkten Chemolumineszenz eine höhere Spezifität für die Messung von extrazellulären $O_2^{\cdot-}$ vorliegt (6). Des Weiteren ist sie vergleichsweise billig und kann mit den in den meisten Labors vorhandenen Geräten durchgeführt werden.

Die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion kann aber überschätzt werden durch ein Phänomen, das sich „redox cycling“ nennt (29). In einer vierten Reaktion reagiert das Lucigenin-Radikal mit Sauerstoff, und bildet dabei $O_2^{\cdot-}$:



Es ist derzeit noch unklar, wie viel dieses Phänomen nun letztendlich zum Gesamtsignal beiträgt und die Reduktion der eingesetzten Menge an chemolumineszierender Probe reduziert dieses Problem. Vermutlich ist die Menge an durch „redox cycling“

1 Einleitung

entstandenem O_2^- vernachlässigbar gering, v.a. bei insgesamt geringen O_2^- -Spiegeln in intakten Geweben. Dieses Phänomen muss aber stets bedacht werden. Des Weiteren gibt es aber auch immer noch Zweifel an der Spezifität für O_2^- .

Elektronen-Spin-Resonanz

Die Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) basiert auf der Absorption von Mikrowellenstrahlung durch Moleküle mit ungepaarten Elektronen. Diese Absorption wird dadurch ausgelöst, dass die zu untersuchende Probe in ein elektromagnetisches Feld gegeben wird. Dadurch richten sich die ungepaarten Elektronen wie winzige Kompassnadeln entweder parallel oder antiparallel zum elektromagnetischen Feld aus und es ergeben sich für sie zwei verschiedene Energielevel. Die Absorption der Mikrowellenstrahlung bewirkt den Übergang von dem niedrigeren in das höhere Level. Je mehr Moleküle mit ungepaarten Elektronen also in einer Probe vorhanden sind, desto mehr Mikrowellenstrahlen werden absorbiert. Die Amplitude des ESR-Signals ist also proportional zur Anzahl ungepaarter Elektronen in der Probe (7).

Da die meisten biologisch relevanten Radikale sehr kurzlebig sind, werden den Proben sogenannte „spin traps“ zugegeben, die mit den Radikalen stabile Produkte bilden.

Bei der ESR handelt sich um eine exzellente Methode zur Messung von Radikalen, die eine Quantifizierung der gesuchten Moleküle erlaubt. Ihre Sensitivität liegt bei bis zu 1nmol/l und ist damit sehr hoch.

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch, dass die derzeitig verfügbaren „spin traps“ nicht hochspezifisch für bestimmte Radikale sind. Dies macht es stets notwendig, zusätzlich Versuche mit verschiedenen Antioxidantien und spezifischen Inhibitoren durchzuführen, um ein bestimmtes Radikal zu quantifizieren (7).

Des Weiteren sind die benötigten Spektrometer sehr teuer. Sie kosten oft mehrere hundert tausend Dollar und benötigen aufgrund ihrer Größe viel Platz im Labor. Ein weiterer Nachteil ist, dass es große Erfahrung beziehungsweise eine sehr gute

1 Einleitung

Einweisung braucht, um mit dem Spektrometer richtig umzugehen und sie korrekt zu bedienen.

Messung des intrazellulären Superoxidanionen-Spiegels mit Dihydroethidium und High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Dihydroethidium (DHE) reagiert mit O_2^- zu 2-Hydroxyethidium ($2-OH-E^+$) mit einem Molekulargewicht, das um 16 U größer ist als das von DHE. Die Reaktionskonstante liegt bei $2,6 \times 10^6 \text{ mol/l}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. Gleichzeitig wird unabhängig von der O_2^- -Konzentration aus DHE auch Ethidium (E^+) gebildet (38).

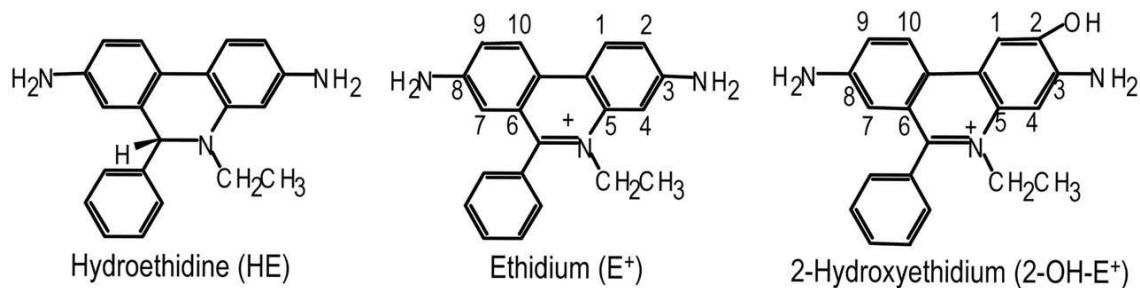


Abb.2: aus (37). Hydroethidine und Dihydroethidium können synonym verwendet werden.

Mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) können $2-OH-E^+$ und Ethidium voneinander und von ihrem Ursprung DHE getrennt werden und mit Hilfe unterschiedlicher Detektionsverfahren können die Verhältnisse dargestellt werden. Am weitesten verbreitet ist die hierbei die Anwendung eines Fluoreszenz-Detektors.

$2-OH-E^+$ ist ein sehr spezifisches Produkt von O_2^- und DHE. Es liefert also, wenn gut von DHE und Ethidium getrennt, eine gute Schätzung des O_2^- -Spiegels. Dabei hat diese Methode gegenüber beispielsweise der Cytochrom C-Reduktion den Vorteil, dass sie intrazelluläres O_2^- misst (37). Diese Methode kann in den meisten Forschungseinrichtungen durchgeführt werden, sofern Kenntnisse über den Umgang mit HPLC-Systemen vorhanden sind.

1 Einleitung

Es wurde gezeigt, dass Licht zu einer verstärkten Oxidation von DHE und damit einer verstärkten Bildung von E^+ führt (39). Deshalb sollten alle Schritte möglichst im Dunkeln durchgeführt werden.

1.3 Aufbau und Funktionsweise des HPLC-Systems

Funktionsprinzip einer HPLC

HPLC steht für High Pressure Liquid Chromatography. Sie gehört zur Gruppe der Säulenchromatographien und wird zur Auftrennung und Analyse von Stoffgemischen eingesetzt. In der Medizin wird sie in spezialisierten Labors unter anderem zum Nachweis von Aminosäuren (v.a. bei Stoffwechselkrankheiten), Vitaminen, Medikamenten, Drogen, Catecholaminen und deren Metaboliten sowie Porphyrinen eingesetzt.

Das Prinzip der HPLC gleicht anderen Chromatographie-Verfahren. Es basiert darauf, dass das zu analysierende Stoffgemisch in einer Flüssigkeit („Liquid“) durch die Chromatographiesäule gespült wird. Die verwendete Flüssigkeit wird auch als mobile Phase oder Eluent bezeichnet. Die einzelnen Bestandteile wandern dabei unterschiedlich schnell durch die Säule, da sie je nach ihrer Polarität, Ladung und Größe mit der stationären Phase interagieren und entsprechend unterschiedlich stark gebremst werden.

Nach Durchlaufen der Chromatographiesäule können die nun getrennten Stoffe mit einem der HPLC nachgeschalteten Detektor nachgewiesen werden.

Um die Auftrennung zu verbessern und zu beschleunigen, wird bei der HPLC die mobile Phase mit

einem hohen Druck („High Pressure“) durch die Säule gepumpt. Dies ermöglicht zum einen die Verwendung von kleineren Partikeln als stationäre Phase, was die Trennung

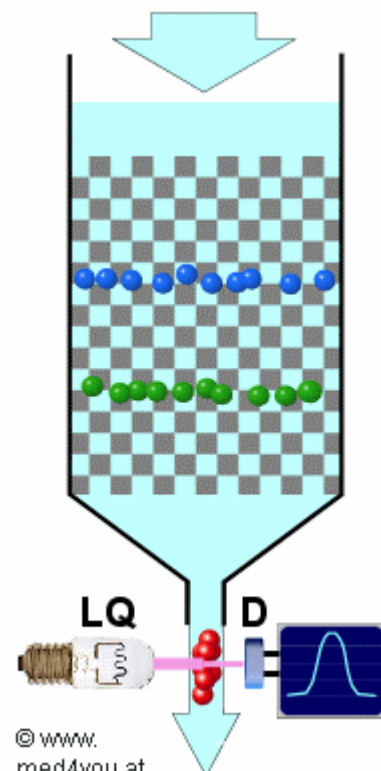


Abb.3: von www.med4u.at

1 Einleitung

verbessert. Zum anderen können kürzere Säulen verwendet werden und der Trennvorgang läuft schneller ab.

Die Detektion

Der der HPLC nachgeschaltete Detektor liefert nun eine Kurve, auf der die getrennten Substanzen entsprechend ihren Retentionszeiten (=Zeit von der Injektion bis zur Messung) aufgetragen sind:

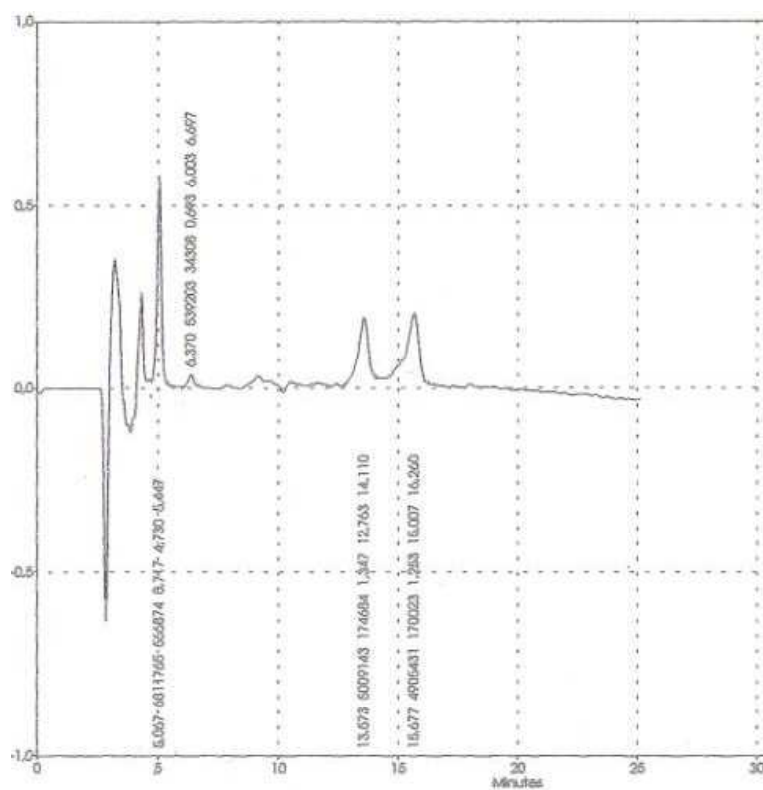


Abb.4: Beispiel einer Messung mit elektrochemischem Detektor

Dies erlaubt jedoch noch keine Aussage darüber, bei welchem Ausschlag (Peak) es sich um welche Substanz handelt. Um dies zu ermöglichen, müssen Messungen durchgeführt werden, bei denen in der Probe ausschließlich eine der gesuchten Substanzen enthalten ist, zum Beispiel 3,4-Dihydroxyzimtsäure. Sieht man nun nach 5min einen klaren Peak, weiß man, dass 5min die Retentionszeit für 3,4-Dihydroxyzimtsäure ist und kann den 3,4-Dihydroxyzimtsäure-Peak bei allen

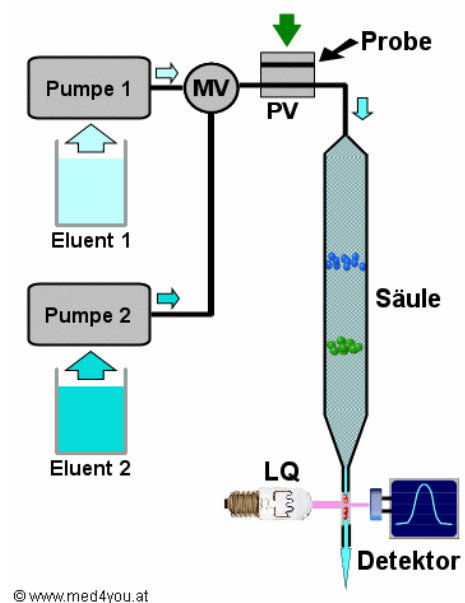
1 Einleitung

Messungen identifizieren. Entsprechend wird auch mit den anderen gesuchten Stoffen verfahren. Werden an dem System Veränderungen vorgenommen, müssen auch die Retentionszeiten wieder neu bestimmt werden.

Aufbau eines herkömmlichen HPLC-Systems

In einem HPLC-System wird das zu analysierende Stoffgemisch in einer mobilen Phase mit Hilfe von Pumpen mit hohem Druck durch die Chromatographie-Säule gepumpt. Durch Interaktionen mit der stationären Phase werden die verschiedenen Stoffe nach Ladung, Größe und Polarität voneinander getrennt und anschließend von einem Detektor erkannt.

Ein häufiges Problem bei HPLC-Systemen ist, dass die Stoffe sich sehr stark in ihren Retentionszeiten unterscheiden. Um das Ziel zu erreichen, einerseits die Stoffe mit ähnlicher Retentionszeit gut zu trennen und keine sich überlappenden Peaks zu erhalten, gleichzeitig aber die Zeit bis zur Messung eines langsamen Stoffes möglichst kurz zu halten, bedient man sich einer umständlichen Lösung: Die mobile Phase muss während des Messvorgangs verändert werden. Hierfür werden zwei oder mehr unterschiedliche Eluenten verwendet. Das nächste Eluent wird dabei dem vorherigen im Laufe der Trennung langsam zugeführt. Entsprechend werden für diesen HPLC-Aufbau auch mehrere Pumpen benötigt (s. Abb.5). Man spricht hier auch von einem Gradientensystem.



© www.med4you.at

Abb.5: Aufbau eines herkömmlichen HPLC-Systems; www.med4u.at

Aufbau unseres HPLC-Systems

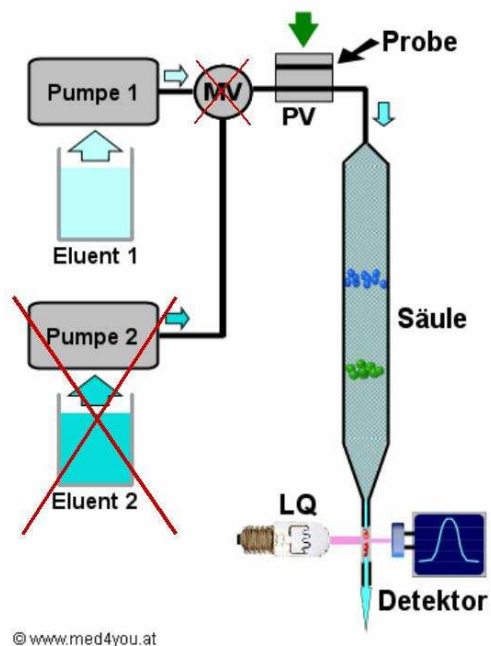
Die bisher beschriebenen HPLC-Methoden zur Messung von Superoxidanionen basieren meist auf einem Gradienten-System, bei dem die mobile Phase während des Trennvorgangs nicht konstant bleibt, sondern verändert wird (11-12). Dies ist nötig,

1 Einleitung

wenn die zu messenden Substanzen stark verzögert aufgetrennt werden. Die Analysezeiten können durch diese Veränderung der mobilen Phase verkürzt werden. Außerdem zeichnet sich diese Methode durch eine gute Flexibilität aus. Allerdings werden für diese Methode zwei Pumpen benötigt.

Eines unserer Ziele war die Entwicklung einer HPLC-Methode, für die nur eine Pumpe benötigt wird, ohne dass dadurch der Trennvorgang verlängert wird. Dies bedeutet, dass die Substanzen durch isokrate Elution getrennt werden müssen. Das heißt, dass die mobile Phase während des Trennvorgangs konstant gehalten wird.

Vorteil einer HPLC-Methode, die nur eine Pumpe benötigt, ist zum einen, dass sie sich durch eine geringere Fehleranfälligkeit beim Trennvorgang auszeichnet, da sich die Bedingungen während der Messung nicht verändern. Ein weiterer Vorteil der isokraten Elution ist, dass hierbei das System über einen langen Zeitraum stabil bleibt, da die mobile Phase nicht verändert wird und die Chromatographie-Säule nur von einem einzigen, sich nicht verändernden Elutionsmittel



© www.med4you.at

Abb.6: vereinfachte Darstellung unseres HPLC-Systems mit nur einer Pumpe; www.med4u.at

durchlaufen wird. Es muss also nicht nach jeder Auftrennung gewartet werden, bis sich das System wieder für eine erneute Messung stabilisiert hat, was eine enorme Zeitersparnis zur Folge hat. Außerdem ist die Methode mit einer Pumpe kostengünstiger.

Um die isokrate Elution effektiv anzuwenden, muss also erreicht werden, dass die Substanzen sich in ihrer Retentionszeit nicht so stark unterscheiden, dass eine Veränderung der mobilen Phase notwendig wird. Gleichzeitig müssen sie ausreichend aufgetrennt sein, sodass sich ihre Signale nicht überlagern. Die Schwierigkeit dieser Methode liegt also darin, ein geeignetes Elutionsmittel zu finden, in dem die zu

1 Einleitung

messenden Substanzen in zufriedenstellender Weise aufgetrennt werden. Dies ist uns bei der Auftrennung und Messung von DHE, 2-OH-E⁺ und Ethidium gelungen. Da unsere mobile Phase ein Ionen-Paar-Reagens enthielt, konnten DHE und seine Produkte nicht nur eindeutig aufgetrennt werden, sondern die Auftrennung erfolgte auch sehr schnell in nur etwa 15min, was gegenüber den vorhandenen HPLC-Methoden einen eindeutigen Zeitvorteil bringt.

Wir geben 3,4-Dihydroxymzimtsäure gemischt mit Methanol in einer definierten Konzentration zu jeder Probe als internen Standard hinzu. Dies ermöglicht es zu erkennen, wenn durch etwaiges Verdampfen des Lösungsmittels Methanol die Konzentrationen der zu messenden Substanzen ungewollt ansteigen, da in diesem Fall die Konzentration von 3,4-Dihydroxymzimtsäure sich im gleichen Verhältnis erhöht wie die der Substanzen DHE, 2-OH-E⁺ und Ethidium. Auch etwaige Fehler bei der Herstellung der Proben und Probleme mit dem HPLC-System können so frühzeitig erkannt werden, da das Signal des internen Standards 3,4-Dihydroxymzimtsäure in jeder Probe gleich groß sein sollte und der Quotient aus der zu messenden Substanz und 3,4-Dihydroxymzimtsäure stets gleich bleibt.

Zur Detektion von DHE, 2-OH-E⁺ und Ethidium kann ein Fluoreszenzdetektor oder ein elektrochemischer Detektor verwendet werden. Letzterer ist deutlich sensitiver als ein Fluoreszenz-Detektor. Außerdem ist der von uns verwendete interne Standard (3,4-Dihydroxymzimtsäure) aufgrund fehlender Fluoreszenz mit einem Fluoreszenz-Detektor nicht nachweisbar. Ein weiterer Vorteil eines elektrochemischen Detektors ist, dass die Sensitivität durch Veränderung des Ionisationsgrundstroms erhöht oder erniedrigt werden kann. Somit können auch kleine Mengen eines Stoffes sehr genau gemessen und leicht mit dem internen Standard in Relation gesetzt werden. Aus diesen Gründen verwendeten wir zur Detektion von DHE, 2-OH-E⁺ und Ethidium einen elektrochemischen Detektor.

Ziel dieser Ausarbeitung ist es, zu zeigen, dass mit dieser neuen Variante der HPLC mit einem Elutionsmittel, das ein Ionen-Paar-Reagens enthält eine einfache, zuverlässige und sensitive Methode zur Quantifizierung von O₂⁻ zur Verfügung steht.

2 Material und Methoden:

2.1 Chemikalien und Lösungen

Dihydroethidium wurde von der Firma Invitrogen bezogen, die 3,4-Dihydroxymzimtsäure von der Firma Fluka. Hepes (free acid Ultrol 1M solution) war von der Firma Calbiochem. Der Biorad Protein Assay wurde von der Firma Biorad bezogen. Sämtliche anderen Chemikalien wurden in dem höchstmöglichen Reinheitsgrad von der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland bezogen.

10x Hepes- Puffer: Hepes 1M, NaCl 132mM, Glukose 5,0mM, KCL 4,0mM, MgCl₂ 0,49mM, CaCl₂ 1,0mM, aqua dest.

pH 7,4 bei 37°C mit NaOH einstellen und bei –80°C aufbewahren.

3,4-Dihydroxymzimtsäure-Lösung: 3,4-Dihydroxymzimtsäure (10ng/ml), 100%Methanol
Aufbewahrung bei 4°C.

DHE-Lösung: 1xHEPES-Puffer, DHE (25mM)

2.2 Eine einfache und schnelle HPLC-Methode zur Messung von Dihydroethidium und seinen Produkten in biologischen Systemen

Wir haben eine neue, einfache, sehr schnelle und sensitive HPLC-Methode entwickelt, mit der Dihydroethidium (DHE) und seine Produkte in Endothelzellen und aortalem Gewebe gut zu messen sind.

Die Chromatographie wurde mit einer C-18-Umkehrphasen-Säule (Nucleosil 250, 4,5mm Säulendurchmesser, 5µm Partikeldurchmesser; Sigma-Aldrich) durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus Oktansulfonat (30mg/l), mit 85% (w/v) Phosphorsäure, auf pH 2.7 eingestelltes NaH₂PO₄ (7g/l) und enthielt 35% (v/v) Acetonitril. Sie wurde mittels 0,45-µm-Filter (Millipore) gefiltert und vor Gebrauch Vakuum entgast. Die

2 Material und Methoden

Auftrennung erfolgte mit einer Flussrate von 0,9ml/min bei Umgebungstemperatur. Es handelte sich hier um eine isokrate Elution.

Für die Detektion wurde die ESA Modell 5011 Analyse-Zelle verwendet. Die erste Elektrode wurde auf 0,00V und die zweite Elektrode auf +0,35V eingestellt.

Die Pumpe und der elektrochemische Detektor wurden unter Umgehung der Chromatographie-Säule täglich mit destilliertem Wasser gewaschen. In größeren Zeiträumen ohne Messung wurde das ganze System mit destilliertem Wasser und anschließend mit Methanol gewaschen.

2.3 Herstellung der Proben

HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in Rattenaorten nach induziertem Myokardinfarkt mittels elektrochemischem Detektor bzw. Fluoreszenz-Detektor

Infarktoperation

Für die Infarktoperationen wurden Ratten der Firma Harlan/Winkelmann (Borchen Deutschland) verwendet.

Zur Induktion einer Herzinsuffizienz wurde die Ligatur der linken Koronararterie nach der Methode von Pfeffer et al. gewählt (24). Die Ratten wurden vor der Operation in einem Plastikbehälter mit Isofluran narkotisiert, anschließend gewogen und auf einer beheizten Unterlage an den Extremitäten fixiert. Nach endotrachealer Intubation wurden sie an einen Respirator (Rodent Ventilator Typ UB 7025) angeschlossen und volumenkontrolliert mit einem Atemzugvolumen von 2,5 ml und einer Frequenz von 90/min beatmet. Im linken Thoraxbereich wurde nach Alkoholdesinfektion das Fell scharf durchtrennt und die Pectoralmuskulatur bis auf die Rippen stumpf präpariert. Das Herz konnte, nachdem die Interkostalmuskulatur und das Perikard vorsichtig durchtrennt wurden, durch seitlichen Druck auf die Thoraxwand herausluxiert werden. Durch Drehung auf die linke Seite war es dann möglich den Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie aufzusuchen. Das Gefäß wurde mit einem Prolene monofil 5-0-Faden umstochen und ligiert. Die Scheinoperation erfolgte in gleicher

2 Material und Methoden

Weise mit der Ausnahme, dass keine Ligatur vorgenommen wurde. Danach wurde das Herz zügig reponiert und die Pectoralmuskulatur mit einer Tabaksbeutelnaht verschlossen. Die vollständige Entfaltung der Lunge wurde durch kurzfristige PEEP-Beatmung sichergestellt. Nach Absetzen der Ätherzufuhr und nochmaliger Desinfektion im Operationsgebiet konnte die Haut durch Klammernähte verschlossen werden. Anschließend wurde der Schwanz zur späteren Identifizierung der Tiere tätowiert. Die Extubation erfolgte nach Einsetzen einer ausreichenden Spontanatmung. Die Ratten wurden noch 5h beobachtet und bei Bedarf einer Herz-Druckmassage unterzogen.

Probenvorbereitung

10 Wochen nach der Infarktoperation wurden hämodynamische Messungen durchgeführt. Dies geschah zum Nachweis der induzierten Herzinsuffizienz.

Jeder Ratte wurden zwei gleich große Aortenringe mit einer Länge von circa 2-3mm entnommen. Mittels Planimetrie wurde darüber hinaus die relative Infarktgröße des Herzens ermittelt. Auch dies diente zur Überprüfung der Effektivität der vorausgegangenen Infarktoperation.

Die Aortenringe wurden bei 37°C für 20min in 1,5 ml DHE-Lösung (10µmol/l) in lichtundurchlässigen Eppendorf Safe Lock Tubes inkubiert. Als Inkubator diente der Environmental Shaker ES-20 (Peqlab), der auf 37°C vorgewärmt war. Die Aortenringe wurden anschließend 60s lang mit Hapes-Puffer gewaschen und in 200 µl 3,4-Dihydroxyzimtsäure-Lösung aufgenommen und dann homogenisiert (Kontess Glas Co. Größe 21). In der Folge wurden die Homogenisate mittels einer Pasteurpipette in 0,5 ml-Eppendorf-Gefäße übertragen und bei 20160g und 4°C für 12min zentrifugiert (Universal 32R von Hettich). Der Überstand wurde nun mittels 1ml Einmalspritzen (Omnifix) durch einen Acrodisc CR 4mm Syringe-Filter filtriert und für die späteren Messungen bei -20°C aufbewahrt. Die nach dem Filtrieren des Überstandes gebliebenen Pellets wurden für eine später folgende Proteinbestimmung in 300 µl 1M NaOH gelöst und aufbewahrt.

2 Material und Methoden

HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in kultivierten humanen Endothelzellen mittels elektrochemischem Detektor

Kultivierung von humanen aortalen Endothelzellen (HAEC)

Die humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) sind primäre Endothelzellen aus der Aorta und stammten von der Firma LONZA (Basel, Schweiz). Sie wurden von der Firma aus humanem Gewebe (aortalem Endothel) isoliert und im Labor bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff für die weitere Anzucht aufbewahrt.

Die Kultivierung der HAEC erfolgte in T75-Flaschen in antibiotikahaltigem Endothelzell-Basal-Medium-2 (EBM-2) mit einem FCS-Gehalt von 2% sowie geringeren Mengen an Hydrokortison, Wachstumsfaktoren, Ascorbinsäure, Gentamycin/Amphotericin B und Heparin in einem Brutschrank bei 37°C und 95% O_2 sowie 5% CO_2 . Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Für die Durchführung der Versuche wurden die HAEC dann weiter in 6-Loch-Platten kultiviert. Hierfür wurden die Endothelzellen mit sterilem PBS gewaschen, mit 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst, wieder in Kulturmedium aufgenommen und entsprechend in die gelatinisierten (0,05% Gelatin) Gefäße bzw. 6-Loch-Platten überführt.

Stimulation mit Glukose beziehungsweise Tumornekrosefaktor α (TNF α)

Die humanen Endothelzellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert, bis sie konfluent waren. Danach wurde durch Zugabe von D-Glukose der Glukose-Gehalt des Mediums in einem Teil der Zellen auf 30mmol/l angehoben. Die Kontrollzellen wurden bei einem Glukosespiegel von 5mmol/l kultiviert. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und jeweils erneut Glukose zugegeben. Nach 5 Tagen wurden die Zellen für die Messungen verwendet.

Für die Stimulation mit TNF α wurden die Zellen ebenfalls in 6-Loch-Platten kultiviert, bis sie konfluent waren. Anschließend wurden die Endothelzellen mit TNF α (10ng/ml) sowie Cycloheximid (10 $\mu\text{g/ml}$) über 3h beziehungsweise 6h stimuliert und danach für die Messungen verwendet. Die Kontrollgruppe wurde nicht stimuliert.

2 Material und Methoden

Für die Messungen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und es erfolgte dann unter Lichtschutz die Zugabe von 2ml HEPES-Lösung mit 10µmol/l DHE, in der die Zellen im Brutschrank für 20min inkubiert wurden. Danach wurde die HEPES-Lösung von den Zellen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber abgelöst und in 200µl 3,4-Dihydroxymethylsäure-Lösung (bestehend aus Methanol und 3,4-Dihydroxymethylsäure) in Eppendorf-Gefäße aufgenommen. Alle diese Schritte geschahen auf Eis.

Probenvorbereitung

Die Proben wurden zu Beginn kurz in einer Qualitron-Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend gevortext. Nun wurden die Zellen mit einem Eppendorf-Stößel zerkleinert und dieser in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß mit 150 µl 1M NaOH gegeben. Dies geschah, damit Proteine, die nach dem Stößeln noch dem Stößel anhafteten, von diesem gelöst werden und für eine später folgende Proteinbestimmung verwendet werden konnten. Die Eppendorf-Gefäße wurden nun mitsamt den darin befindlichen zerstückelten Zellen gevortext und anschließend bei 20160g und 4°C für 12min zentrifugiert (Universal 32R von Hettich). Der so entstandene Überstand wurde nun mittels 1ml Einmalspritzen (Omnifix) durch einen Acrodisc CR 4mm Syringe-Filter filtriert und für die oben beschriebenen Messungen mittels HPLC und elektrochemischem Detektor verwendet. Für die später folgende Proteinbestimmung wurden die 150 µl 1M NaOH, in denen die restlichen dem Stößel anhaftenden Proteine gelöst worden waren mittels einer Pasteurpipette zu dem Pellet gegeben und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in Mausextrakten nach Stimulation mit Angiotensin II mittels elektrochemischem Detektor

Infusion von Angiotensin II mittels osmotischer Minipumpen

Es wurden 12 Wochen alte männliche C56Bl/6 Mäuse der Firma Harlan Winkelmann (Borchen Deutschland) verwendet. Zur dauerhaften Infusion von Angiotensin II wurde

2 Material und Methoden

den Mäusen subkutan osmotische Minipumpen der Firma ALZET implantiert. Bei diesen osmotischen Pumpen handelte es sich um Miniaturpumpen, welche verschiedene Substanzen kontinuierlich und in kontrollierter Dosis in die Mäuse freisetzen können. In unserem Modell wurden die Minipumpe Alzet 2002 (Alzet Corp., Palo Alto, USA) (siehe Abb. 7) verwendet.

Die Pumpe förderte über einen Zeitraum von 14 Tagen eine Stoffmenge von $0.50 \pm 0.02 \mu\text{l}$ pro Stunde. Die osmotischen Pumpen wurden unter sterilen Bedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers mit Angiotensin II (Val5-Angiotensin II in 0,1% Essigsäure mit 15mmol/l NaCl) in einer Dosis befüllt, die zu einer kontinuierlichen Freisetzung von 400ng/kg Körpergewicht per min in den Mäusen führte. Für die Implantation der Minipumpen wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und nach Rasur des Fells ein kleiner Hautschnitt zwischen der rechten und linken Scapula durchgeführt, die Haut nach proximal stumpf präpariert und ein Hautsack gebildet, in den die Pumpe implantiert wurde. Der Hautschnitt wurde danach mittels Clips verschlossen.

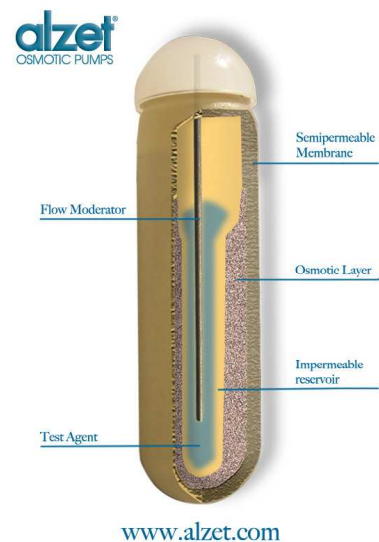


Abb.7: www.alzet.com

Nach 14 Tagen wurden die Tiere mit Isofluran in tiefe Narkose versetzt und die Aorta entnommen. Es wurde der Thorax und das Abdomen eröffnet, nach Abheben der beiden Lungenflügel wurde die thorakale Aorta vorsichtig frei präpariert. Nachdem die Darmschlingen behutsam beiseite geschoben wurden, konnte die Aorta abdominalis freipräpariert werden. Es erfolgte die Entnahme der Aorta. Unverzüglich danach wurden die Gefäße unter einem Operationsmikroskop mit Mikroschere und Pinzette in kalter Krebs-Henesleit-Lösung präpariert. Die Präparationen fanden unter strikter Vermeidung von Längszug und Kompression des Gefäßes statt, um das Endothel nicht zu beschädigen. Die Aorten wurden dann in Segmente von 3-4 mm Länge geschnitten.

2 Material und Methoden

Probenvorbereitung

Jeder Maus wurden fünf gleich große Aortenringe entnommen. Diese wurden 20min lang in 1,5ml DHE-Lösung (10 μ mol/l) in lichtundurchlässigen Eppendorf Safe Lock Tubes inkubiert. Als Inkubator diente ein auf 37°C vorgewärmter Environmental Shaker ES-20 (Peqlab). Die Aortenringe wurden anschließend 60s lang mit Hepes-Puffer gewaschen und in 200 μ l 3,4-Dihydroxymzimtsäure-Lösung aufgenommen und dann homogenisiert (Kontess Glas Co. Größe 21). In der Folge wurden die Homogenisate mittels einer Pasteurpipette in 0,5 ml-Eppendorf-Gefäße übertragen und bei 20160g und 4°C für 12min zentrifugiert (Universal 32R von Hettich). Der Überstand wurde nun mittels 1ml Einmalspritzen (Omnifix) durch einen Acrodisc CR 4mm Syringe-Filter filtriert und für die späteren Messungen bei -20°C aufbewahrt.

Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurden die Proben zu Beginn gevortext und anschließend 4min bei 16000g und Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5415C von Eppendorf).

Je 25 μ l (bzw. 50 μ l) der Probe wurden zusammen mit 5ml Biorad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat in 11,5 ml Sarstedt-Tubes gegeben, nachdem zuvor das Biorad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat 1:4 mit H₂O verdünnt worden war. Anschließend wurde die Probe gevortext.

Als Standard wurde Biorad Protein Assay Standard 1 verwendet. Es wurden je 0 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l, 60 μ l und 80 μ l des Standards zusammen mit dem wie oben beschrieben verdünnten 5ml Biorad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat in Sarstedt-Tubes gegeben und anschließend gevortext. Die entsprechenden Proteinmengen sind Tab.1 zu entnehmen. Gemessen wurde mit dem Ultrospec 3100 pro Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595nm und einer Integrationszeit von 2s. Der Nullabgleich wurde mit H₂O durchgeführt.

2 Material und Methoden

Tab.1: Proteinkonzentrationen für die Proteinbestimmung

Standard	0µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl
Biorad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (1:4 mit H₂O verdünnt)	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
Entspricht der Proteinmenge	0µM	13,4µM	26,8µM	53,6µM	80,4µM	107,2µM

2.4 Statistik

Es wurde eine zwei Faktoren Varianzanalyse (ANOVA) bzw. t-Test durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle Daten in den gezeigten Tabellen und Abbildungen sind als Mittelwerte \pm Standardfehler aufgetragen; mit $n =$ Anzahl der einzelnen Beobachtungen.

3 Ergebnisse:

3.1 HPLC-basierte Messung von Superoxidanionen in Rattenaorten nach induziertem Myokardinfarkt mittels elektrochemischem Detektor und Vergleich mit einer Messung mittels Fluoreszenz-Detektor

Messung mittels elektrochemischem Detektor:

Die Probe wurde wie oben beschrieben aus einem Stück Rattenaorta nach einer Operation gewonnen, bei der auf die Ligatur der linken Koronararterie verzichtet wurde (Sham-Gruppe). Die zu messenden Substanzen wurden mittels HPLC getrennt und mit einem elektrochemischen Detektor erfasst. Als interner Standard wurde 3,4-Dihydroxyzimtsäure verwendet.

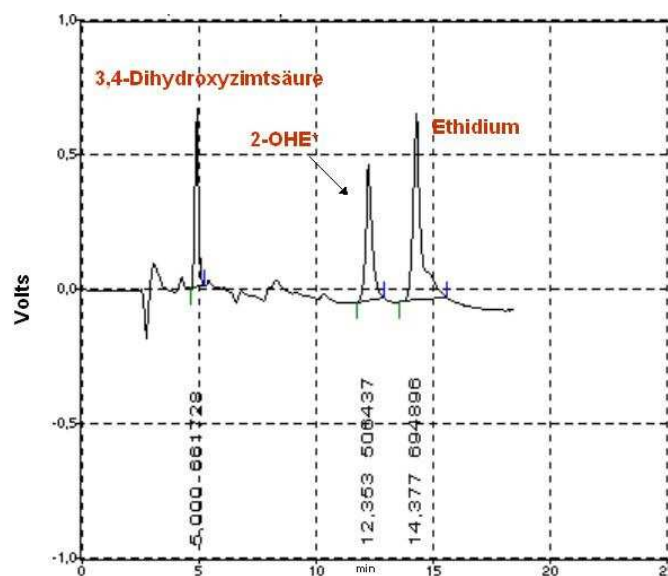


Abb.8: HPLC-basierte Messung von $O_2^{\cdot-}$ in Rattenaorta nach einer Operation ohne Ligatur der linken Koronararterie (Sham-Gruppe) mittels elektrochemischem Detektor.

Die nächste Abbildung zeigt die Messung einer Probe, die wie oben beschrieben aus einem Stück Rattenaorta nach einer Operation gewonnen, bei der eine Ligatur der linken Koronararterie durchgeführt wurde (PlaCHF-Gruppe).

3 Ergebnisse

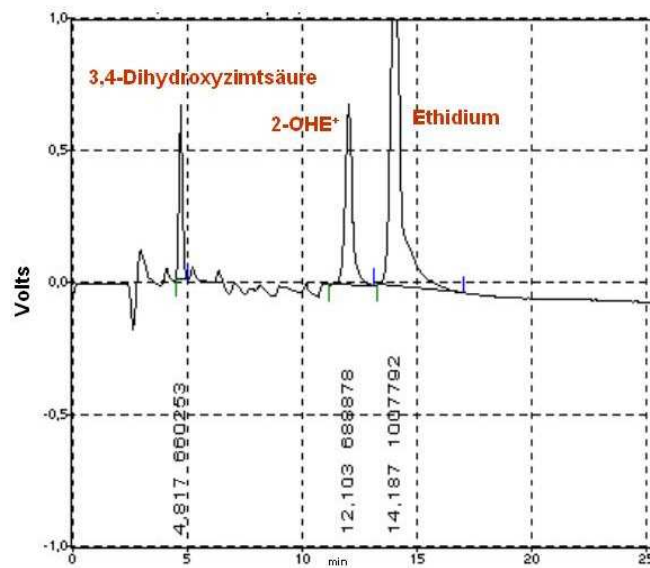


Abb.9: HPLC-basierte Messung von $O_2^{\cdot -}$ in Rattenaorta nach induziertem Myokardinfarkt mittels elektrochemischem Detektor. Die Probe stammt aus der PlaCHF-Gruppe.

Um die Werte der Messungen miteinander vergleichen zu können, wurden sie auf die Proteinmenge normalisiert. Dies ergab folgendes Schaubild:

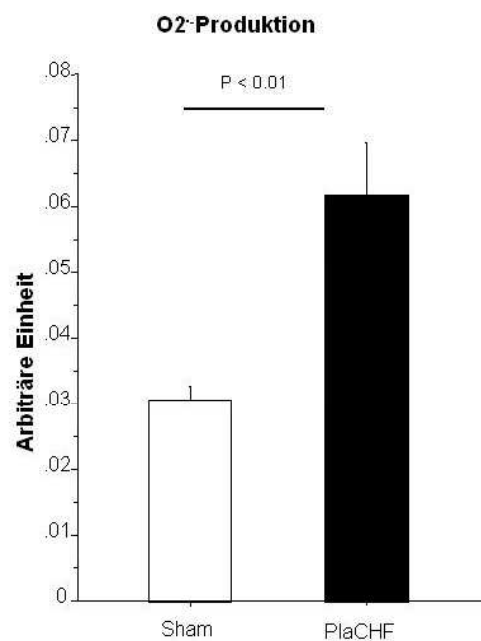


Abb.10: 2-Hydroxy-Ethidium-Menge als Marker für die Superoxidanionen-Produktion in Rattenaorten nach Scheinoperation (Sham-Gruppe) bzw. nach induziertem Herzinfarkt (PlaCHF-Gruppe). N=6

3 Ergebnisse

Messung mittels Fluoreszenz-Detektor:

Eine Probe aus der Sham-Gruppe wurde zum Vergleich ebenfalls mittels HPLC aufgetrennt, aber anstatt mit einem elektrochemischen Detektor mit einem Fluoreszenz-Detektor gemessen. Im Unterschied zur Messung mit einem elektrochemischen Detektor war der nicht fluoreszierende interne Standard 3,4-Dihydroxymzimtsäure hier nicht messbar.

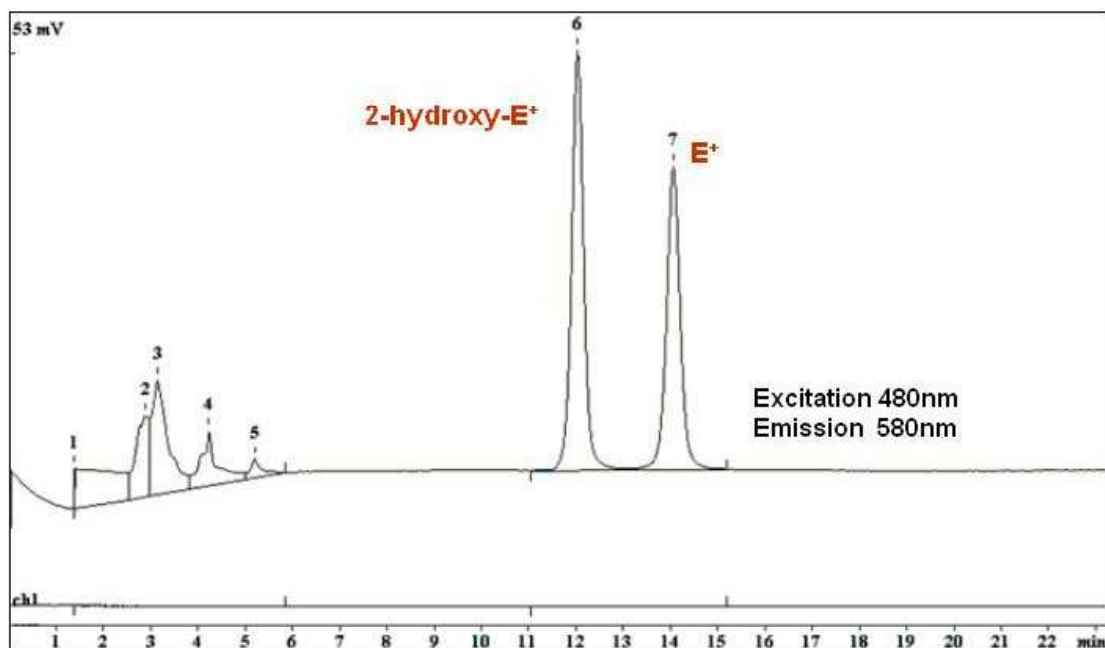


Abb.11: HPLC-basierte Messung von $O_2^{\bullet -}$ in Rattenaorta nach einer Operation ohne Ligatur der linken Koronararterie (Sham-Gruppe) mittels Fluoreszenz-Detektor. Für den internen Standard 3,4-Dihydroxymzimtsäure ist kein Peak zu sehen.

3.2 HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in kultivierten humanen Endothelzellen mittels elektrochemischem Detektor

Messung nach Stimulation mit Glukose

Für diesen Versuch wurden humane Endothelzellen wie im Methodenteil beschrieben gezüchtet. Sie wurden in zwei Gruppen aufgeteilt.

3 Ergebnisse

1. Gruppe: Die Zellen wurden 5 Tage lang mit 5mmol/l Glukose behandelt
2. Gruppe: Die Zellen wurden 5 Tage lang mit 30mmol/l Glukose behandelt

Die Proben wurden wie vorher beschrieben vorbereitet, um die Menge an durch die Glukose-Behandlung entstandenen Superoxidationen zu messen. Hierfür wurden 10µl der Probe in das HPLC-System injiziert. Während der ersten 10min wurde ein Ionisationsgrundstrom von 1µA angelegt. Nach 10min Laufzeit wurde der Ionisationsgrundstrom auf 20nA reduziert. Diese Reduktion um den Faktor 50 bedeutete eine dem entsprechend höhere Empfindlichkeit des elektrochemischen Detektors in der zweiten Hälfte der Messung. Dies war notwendig, da die zu messenden Substanzen 2-OH-E⁺ und E⁺ in relativ geringen Mengen im Vergleich zu unserem internen Standard 3,4-Dihydroxizimtsäure erwartet wurden.

Im Folgenden werden 2 Beispiele der Messungen dargestellt und erläutert:

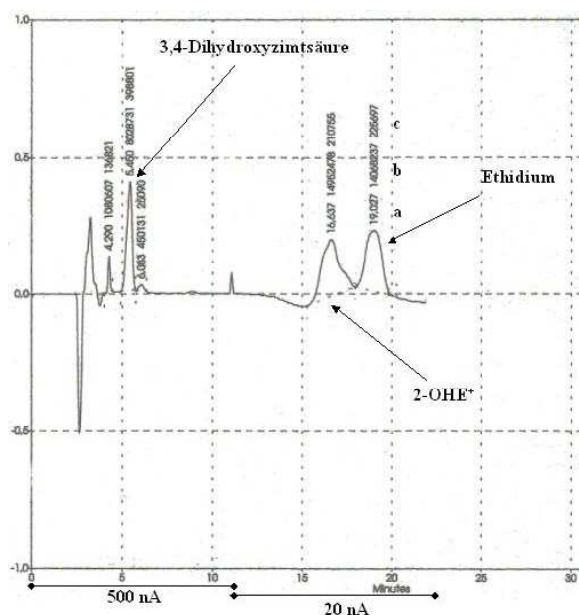


Abb.12

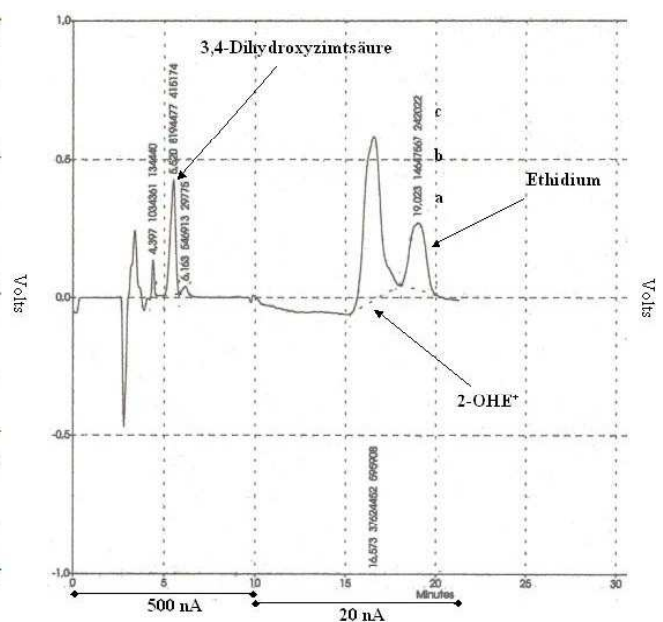


Abb.13

HPLC-basierte Messungen von O₂^{•-} in gezüchteten, mit 5mmol/l Glukose (Abb.12) bzw. mit 30mmol/l Glukose (Abb.13) stimulierten humanen Endothelzellen mittels elektrochemischem Detektor. Nach ca. 11min wurde der Ionisationsgrundstrom von 1µA auf 20nA erniedrigt. Die Messungen endeten nach 22min.

a: exakter Zeitpunkt der Peakspitze in min

b: Flächeninhalt des Peaks

c: Höhe des Peaks

3 Ergebnisse

Um die Werte der Messungen miteinander vergleichen zu können, wurden sie auf die Proteinmenge normalisiert. Dies ergab folgendes Schaubild:

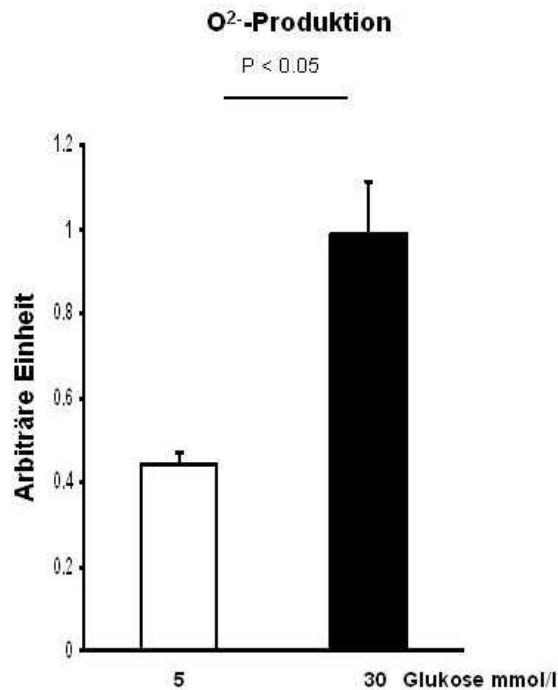


Abb.14: 2-Hydroxy-Ethidium-Menge als Marker für die Superoxidanionen-Produktion in unter niedrigen (5mmol/l) bzw. erhöhten Glukosekonzentration (30mmol/l) kultivierten humanen aortalen Endothelzellen. N=6

Durch Stimulation der gezüchteten Endothelzellen für 5 Tage mit 30mmol/l Glukose ergab sich eine signifikante Zunahme von 2-OH-E⁺.

Messung nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor α (TNF α)

Für diesen Versuch wurden humane Endothelzellen wie vorher beschrieben gezüchtet. Sie wurden diesmal in drei Gruppen aufgeteilt:

1. Gruppe: Kontrollgruppe
2. Gruppe: Zellen wurden 3h lang mit TNF α behandelt
3. Gruppe: Zellen wurden 6h lang mit TNF α behandelt

3 Ergebnisse

Die Proben wurden wie beschrieben weiterverarbeitet und die Messung von Superoxidanionen mittels DHE-HPLC vorgenommen.

Im Folgenden sollen 3 Beispiele der Messungen dargestellt und erläutert werden:

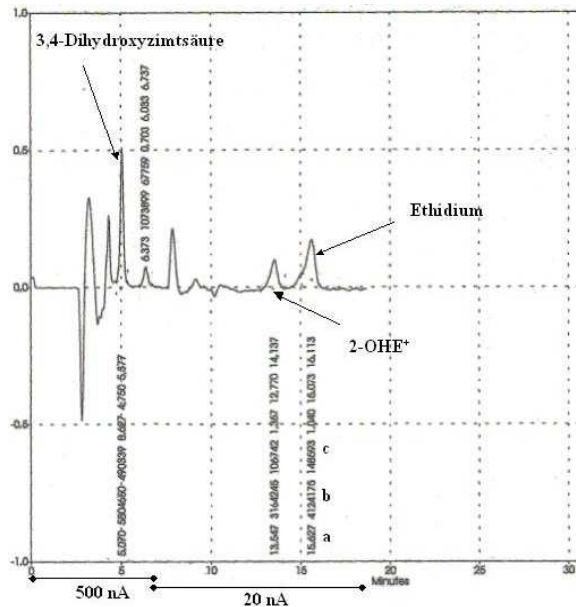


Abb.15

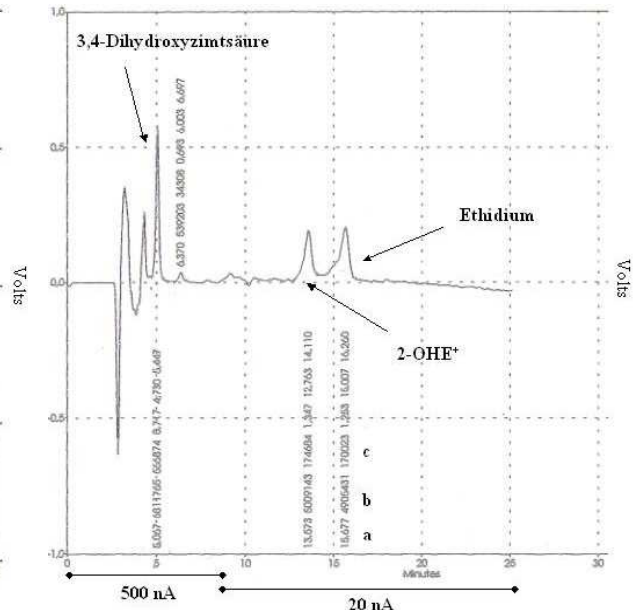
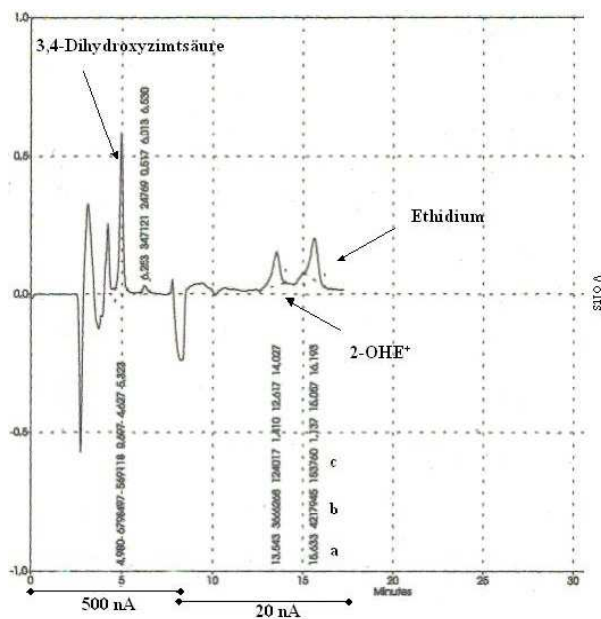


Abb.16



3 Ergebnisse

Um die Werte der Messungen miteinander vergleichen zu können, wurden sie auf die Proteinmenge normalisiert. Dies ergab folgendes Schaubild:

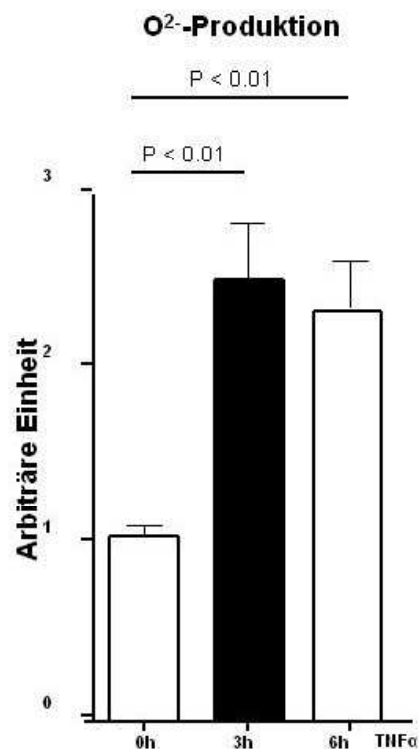


Abb.18: 2-Hydroxy-Ethidium-Menge als Marker für die Superoxidanionen-Produktion in unstimulierten sowie für 3h bzw. 6 h mit TNF α stimulierten humanen aortalen Endothelzellen. N=6

Die Stimulation der Endothelzellen mit TNF α über 3h sowie 6h führt zu einer signifikanten Zunahme von 2-OH-E⁺ als Marker für die O₂⁻-Produktion.

3.3 HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in Aorten von Mäusen nach chronischer Angiotensin II-Infusion mittels elektrochemischem Detektor

Es wurden 10 männliche C56Bl/6 Mäuse der Firma Harlan Winkelmann (Borchen Deutschland) in 2 Gruppen unterteilt:

1. Gruppe: Kontrollgruppe: Die Tiere wurden einer Scheinoperation unterzogen, bei der keine Pumpe implantiert wurde

3 Ergebnisse

2. Gruppe: Den Tieren wurde wie vorher beschrieben eine Pumpe implantiert, die kontinuierlich Angiotensin II freisetzt

Für die Untersuchungen wurden die Tiere nach 14 Tagen wie im Methodenteil beschrieben behandelt, die Aorten präpariert und die Proben entsprechend für die Messung vorbereitet.

Die Werte wurden auf die Ringanzahl (5 Ringe pro Tier) normalisiert.

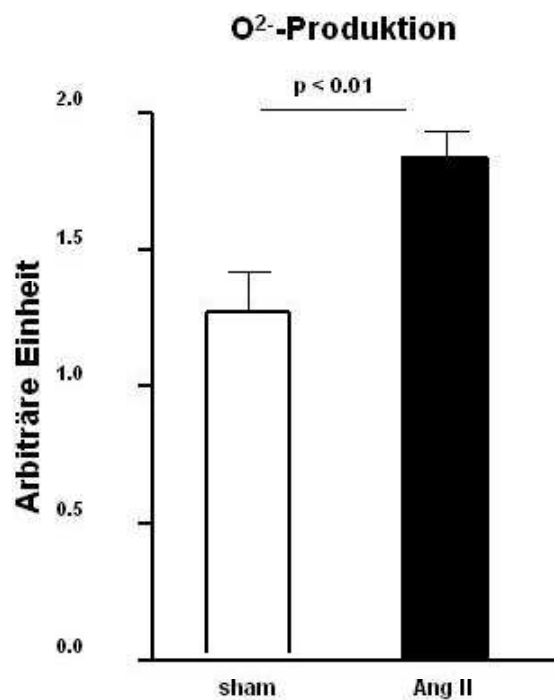


Abb.19: 2-Hydroxy-Ethidium-Menge als Marker für die Superoxidanionen-Produktion in Mauseaorten nach Scheinoperation (sham) bzw. nach Implantation einer Angiotensin II-Pumpe (Ang II). N=5

Die kontinuierliche Infusion von Angiotensin II führte zu einem signifikanten Anstieg von 2-OH-E⁺ als Marker für die O₂⁻-Produktion.

4 Diskussion:

Wichtig bei der Messung von Substanzen mittels HPLC ist immer, dass die zu messenden Substanzen gut voneinander getrennt werden. Diese Auftrennung erfolgt aufgrund unterschiedlicher Interaktionen mit der stationären Phase, wie sie durch Ladung, Polarität oder auch Molekülgröße auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass mit der von uns neu etablierten HPLC-Methode Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) in Aorten als auch in kultivierten humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) nachweisbar sind. Das durch die Reaktion von DHE mit $O_2^{\cdot-}$ entstandene 2-OH-E⁺ wurde durch die HPLC-Methode mittels isokrater Elution gut von Ethidium, DHE sowie 3,4-Dihydroxycimtsäure, die wir als internen Standard verwendeten, getrennt. Es konnte ein gutes, klares Signal erreicht werden, welches es uns ermöglichte, die Mengen der gesuchten Substanzen miteinander zu vergleichen als auch sie mit den Mengen in anderen Proben in Relation zu setzen. Es handelt sich hierbei nicht um absolute Mengen. Vielmehr erhielten wir Werte, die ein Vergleichen der Gruppen untereinander möglich machten. Wie erhofft blieb das System über einen langen Zeitraum stabil, sodass keine Veränderungen an der Zusammensetzung der mobilen Phase durchgeführt werden mussten. Somit wurde nur eine Pumpe benötigt. Vorteil einer HPLC-Methode, die nur eine Pumpe benötigt ist zum einen, dass sie sich durch eine geringere Fehleranfälligkeit beim Trennvorgang auszeichnet, da sich die Bedingungen während der Messung nicht verändern. Ein weiterer Vorteil der isokraten Elution ist, dass hierbei das System über einen langen Zeitraum stabil bleibt, da die mobile Phase nicht verändert wird und die Chromatographie-Säule nur von einem einzigen, sich nicht verändernden Elutionsmittel durchlaufen wird. Es muss also nicht nach jeder Auftrennung gewartet werden, bis sich das System wieder für eine erneute Messung stabilisiert hat, was eine enorme Zeitersparnis zur Folge hat. Außerdem ist die Methode mit einer Pumpe kostengünstiger.

In den bisher bestehenden HPLC-Methoden zur Bestimmung von Superoxidanionen mittels DHE wurde auf die Verwendung eines internen Standards bisher verzichtet. Die Einführung eines internen Standards bringt aber einen entscheidenden Vorteil. Da das Lösungsmittel Methanol sehr flüchtig ist kann sich das Volumen der Proben bei der

4 Diskussion

Messung leicht verändern. Damit steigt die enthaltene Konzentration von DHE, 2-OH-E⁺ und Ethidium an und die Messungen werden somit verfälscht. Durch die Verwendung eines internen Standards werden diese falschen, erhöhten Ergebnisse erkannt und können auf den internen Standard normalisiert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass Schwankungen im HPLC-System, wie sie etwa bei langen Messreihen durch Auswaschungs-Effekte oder Verunreinigungen auftreten können, ausgeglichen werden, auch hier mittels Normalisierung auf den internen Standard. Darüber hinaus können schwankende 3,4-Dihydroxymzimtsäure-Werte auf Ungenauigkeiten bei der Präparation wie zum Beispiel Pipettierfehler bei der Herstellung der Proben hinweisen, die ohne internen Standard verborgen geblieben wären. Dem zu Folge sind Messungen mit einem internen Standard gegenüber solchen ohne internen Standard deutlich valider.

Schwierigkeiten bereitet oft die Suche nach einem geeigneten internen Standard. Die Benutzung eines elektrochemischen Detektors bietet hierbei den Vorteil, deutlich mehr Substanzen als internen Standard verwenden zu können als bei Benutzung eines Fluoreszenz-Detektors, da die Auswahl an geeigneten fluoreszierenden Substanzen eingeschränkt ist. So ist etwa 3,4-Dihydroxymzimtsäure ein nicht fluoreszierender Stoff und somit für eine Fluoreszenz-Detektor-Messung nicht verwendbar. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist, dass der interne Standard nicht bereits *in vivo* vorhanden ist. Dies würde die Messergebnisse natürlich beeinträchtigen, zum Beispiel 3,4-Dihydroxymzimtsäure als interner Standard bei Untersuchungen eines Kaffee-Trinkers (3,4-Dihydroxymzimtsäure=Kaffeensäure). Außerdem ist zu beachten, dass sich der interne Standard hinsichtlich seiner Retentionszeit ausreichend von den zu untersuchenden Substanzen (in unserem Fall 2-OH-E⁺ und Ethidium) unterscheidet, damit sich gut voneinander getrennte Peaks ergeben. Für unsere Messungen erwies sich 3,4-Dihydroxymzimtsäure als ein überaus geeigneter interner Standard. Sie ergab ein starkes, klares, gut von den anderen Substanzen getrenntes Signal.

Die Verwendung eines elektrochemischen Detektors zeichnete sich durch folgende Vorteile aus: er ist deutlich sensitiver als etwa ein Fluoreszenz-Detektor. Außerdem ist der von uns verwendete interne Standard (3,4-Dihydroxymzimtsäure) aufgrund fehlender Fluoreszenz mit einem Fluoreszenz-Detektor nicht nachweisbar. Ein weiterer Vorteil eines elektrochemischen Detektors ist, dass die Sensitivität durch Veränderung des Ionisationsgrundstroms erhöht oder erniedrigt werden kann. Somit können auch kleine

4 Diskussion

Mengen eines Stoffes sehr genau gemessen und leicht mit dem internen Standard in Relation gesetzt werden.

4.1 HPLC-basierte Messung von Superoxidanionen in Rattenaorten nach induziertem Myokardinfarkt mittels elektrochemischem Detektor und Vergleich mit einer Messung mittels Fluoreszenz-Detektor

Chronische Herzinsuffizienz führt zu einer erhöhten aortalen Sauerstoffradikalproduktion. Bauersachs et al zeigten 1999 einen signifikanten Anstieg von $O_2^{\cdot-}$ in Rattenaorten nach einem induziertem Herzinfarkt gegenüber der Kontrollgruppe, die eine Scheinoperation erhalten hatte. Die Messungen wurden mittels Lucigenin-verstärkter Chemolumineszenz durchgeführt (3). Widder et al kamen 2004 zu demselben Ergebnis. Auch hier waren die Messungen mittels Lucigenin-verstärkter Chemolumineszenz durchgeführt worden (33).

Wir konnten dies mit unserer neu etablierten HPLC-Methode in ähnlicher Ausprägung sehen. In der PlaCHF-Gruppe, die einer Infarktoperation unterzogen wurde, wurden signifikant höhere Werte von 2-OH- E^+ und damit $O_2^{\cdot-}$ gemessen als in der einer Scheinoperation unterzogenen Kontrollgruppe (Sham-Gruppe). Die zu messenden Substanzen 2-OH- E^+ und E^+ sowie der interne Standard 3,4-Dihydroxyzimtsäure wurden gut aufgetrennt und ergaben ein klares Signal. Somit konnten zuverlässige Aussagen zur $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration in den untersuchten Proben getroffen werden.

Zum Vergleich wurde eine Messung mit einem Fluoreszenz-Detektor zur Darstellung gebracht. Es fällt auf, dass der interne Standard 3,4-Dihydroxyzimtsäure hier nicht nachweisbar war.

4.2 HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in gezüchteten humanen Endothelzellen mittels elektrochemischem Detektor

Messung nach Stimulation mit Glukose

Anhand der gezeigten Beispiele sieht man, dass die zu messenden Substanzen 2-OH-E⁺ und E⁺ sowie der interne Standard 3,4-Dihydroxymzimtsäure gut aufgetrennt wurden. Somit konnten zuverlässige Aussagen zur O₂^{•-}-Konzentration in den untersuchten Proben getroffen werden.

Die Erniedrigung des Ionisationsgrundstromes war nötig, da die zu messenden Substanzen 2-OH-E⁺ und E⁺ in relativ geringen Mengen im Vergleich zu unserem internen Standard 3,4-Dihydroxymzimtsäure in der Probe vorhanden waren. Bewusst wurde der Zeitpunkt dieser Umstellung so gewählt, dass das Signal für 3,4-Dihydroxymzimtsäure einerseits und 2-OH-E⁺ und E⁺ andererseits eindeutig dem entsprechenden Ionisationsgrundstrom zuzuordnen sind.

Toyoshi Inoguchi et al. zeigten im Jahre 2000, dass hohe Glukose-Konzentrationen bei kultivierten Zellen der aortalen Gefäßmuskulatur sowie kultivierten Endothelzellen zu einem Anstieg von ROS führen (19). Die Messungen erfolgten mittels Electron-Spin-Resonanz (ESR). Als Ursache für die gesteigerte ROS-Bildung wird eine gesteigerte Aktivität der NAD(P)H-Oxidase angenommen, die von Mohazzab et al. sowie Rajagopalan et al. als wichtigste ROS-Bildner in den Blutgefäßzellen identifiziert wurde (21, 26).

Mit unserer Methode konnte ebenfalls gezeigt werden, dass erhöhte Glukose-Spiegel zu einer gesteigerten ROS-Bildung führen (Abb.14). Jene Zellen, die mit 30mmol/l Glukose stimuliert worden waren, zeigten einen signifikanten Anstieg von 2-OH-E⁺ gegenüber den Zellen, die mit lediglich 5mmol/l Glucose stimuliert worden waren. Dies ist gleichbedeutend mit einem erhöhten O₂^{•-}-Spiegel in Gruppe 2.

Es handelt sich also um eine Methode, die sich zur Messung von durch Glukose-Stimulation erhöhten O₂^{•-}-Spiegeln eignet.

Messung nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor α (TNF α)

TNF α ist ein bekannter Induktor für die Bildung von ROS (28). Andrea Picchi et al. sahen 2006 eine Verbindung zwischen hohen TNF α -Spiegeln und erhöhten O₂^{•-}-Konzentrationen, was wiederum ursächlich mit der endothelialen Dysfunktion in Verbindung gebracht wurde (25). Als Enzym, das für die vermehrte O₂^{•-}-Bildung verantwortlich zeichnete, wurde auch hier die NAD(P)H-Oxidase genannt. Hennet et al. zeigten bereits 1993 ebenfalls, dass TNF α ein guter Induktor der O₂^{•-}-Produktion ist (18). Für die Messung war hier das Chemolumineszenz-Verfahren angewandt worden.

Unser Ziel war es also, diesen gut untersuchten Zusammenhang zwischen TNF α und hohen O₂^{•-}-Spiegeln auch mit unserer geänderten HPLC- Methode darzustellen. Hierfür wurden wie in Kap.2.2 beschrieben HAEC kultiviert und über 3h beziehungsweise 6h mit TNF α stimuliert.

Es zeigten sich sowohl für die HAEC, die für 3h mit TNF α stimuliert worden waren, als auch für jene, die für 6h mit TNF α stimuliert worden waren eine signifikante Zunahme von O₂^{•-} gegenüber der Kontrollgruppe, die keiner Stimulation unterzogen wurde (Abb.18). Dies ist vor allem auf eine Stimulation der NAD(P)H-Oxidase zurückzuführen, die als stärkster ROS-Bildner in den Zellen der Blutgefäße gilt (21, 26).

Auch bei diesem Versuch hat sich unsere Methode als praktikabel erwiesen und ein Anstieg der O₂^{•-}-Konzentration konnte wie erwartet nachgewiesen werden.

4.3 HPLC-basierte Messungen von Superoxidanionen in Aorten von Mäusen nach dauerhafter Angiotensin II-Infusion mittels elektrochemischem Detektor

Angiotensin II ist einer der bekanntesten Stimuli für die Produktion von ROS. Griendling et al beschrieben 1994 erstmals, dass Angiotensin II zu einer gesteigerten Aktivität der NAD(P)H-Oxidase führt, was eine erhöhte Bildung von O₂^{•-} nach sich

4 Diskussion

zieht (15). Auch Zhang et al. sahen 1999 diesen Zusammenhang (36). Die $O_2^{\cdot-}$ -Messungen waren hier im Luminometer durchgeführt worden. Die chronische Angiotensin-Infusion bei der Maus ist ein etabliertes Modell erhöhter vaskulärer Sauerstoffradikal-Produktion, welches mittels verschiedenster Messmethoden (DHE-basierten HPLC-Methoden, Lucigenin basierter Chemolumineszenz u.a.) beschrieben wurde (9, 13, 20, 34).

Auch bei der Verwendung von Mauseorten ließen sich die zu messenden Substanzen 2-OH- E^+ und E^+ sowie der interne Standard 3,4-Dihydroxymzimtsäure gut auftrennen. Somit konnten zuverlässige Aussagen zur $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration in den untersuchten Proben getroffen werden. Der Ionisationsgrundstrom musste nach der Hälfte der Messung gesenkt werden, da die zu messenden Substanzen 2-OH- E^+ und E^+ in relativ geringen Mengen im Vergleich zu unserem internen Standard 3,4-Dihydroxymzimtsäure in der Probe vorhanden waren. Bewusst wurde der Zeitpunkt dieser Umstellung so gewählt, dass das Signal für 3,4-Dihydroxymzimtsäure einerseits und 2-OH- E^+ und E^+ andererseits eindeutig dem entsprechenden Ionisationsgrundstrom zuzuordnen sind. Die Ergebnisse wurden auf die Anzahl der untersuchten Aortenringe normalisiert.

Die Auswertung ergab hier einen signifikanten Anstieg von $O_2^{\cdot-}$ in den Aorten der Mäuse, die 14 Tage lang Angiotensin II infundiert bekamen, gegenüber den Aorten der Mäuse, die lediglich eine Scheinoperation erhalten hatten. Der gemessenen Anstieg von $O_2^{\cdot-}$ in den Mauseorten war vergleichbar mit Arbeiten, in denen die erstbeschriebene fluoreszenz-basierten DHE-HPLC verwendet wurde (12, 16, 20, 34), bzw. andere Messmethoden für Superoxidanionen verwendet wurden (13). Auch hier zeigte sich also, dass unsere Methode sehr gut und valide zur Detektion von $O_2^{\cdot-}$ geeignet ist und mit ihr die erwarteten Ergebnisse erzielt wurden.

5 Zusammenfassung:

Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) sind eine von mehreren sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies, die im menschlichen Körper intra-, aber auch extrazellulär vorkommen. Verschiedene Enzyme, z.B. in der mitochondrialen Atmungskette, die NADPH-Oxidase oder endotheliale NO-Synthasen bilden $O_2^{\cdot-}$. Da es sich um eine sehr reaktive Substanz handelt, die mit der DNA sowie mit Proteinen und Lipiden interagiert und diese schädigen kann, spielt sie bei kardiovaskulären Erkrankungen wie etwa der chronischen Herzinsuffizienz, Hypertonie oder Arteriosklerose eine große Rolle, ist aber auch an vielen anderen Erkrankungen wie z.B. dem Diabetes mellitus pathophysiologisch beteiligt. Dies macht verständlich, dass es für die Forschung von entscheidender Bedeutung ist, Methoden zu entwickeln, die zur Erkennung und Quantifizierung von $O_2^{\cdot-}$ geeignet sind. Bereits heute gibt es verschiedene Methoden, $O_2^{\cdot-}$ nachzuweisen. Jede dieser Methoden hat jedoch ihre ganz spezifischen Vor- aber auch Nachteile.

Wir haben eine neue, einfache, sehr schnelle und sensitive HPLC-Methode mit einem internen Standard entwickelt, mit der die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion in Endothelzellen und aortalem Gewebe gut zu messen ist. Sie beruht auf der Tatsache, dass Dihydroethidium (DHE) mit $O_2^{\cdot-}$ zu 2-Hydroxyethidium (2-OH-E⁺) reagiert. Nach Trennung mittels HPLC wurde die Menge an entstandenem 2-OH-E⁺ durch einen elektrochemischen Detektor gemessen.

Die Proben wurden durch isokrate Elution aufgetrennt, was bisher bei der Detektion von 2-OH-E⁺, DHE und $O_2^{\cdot-}$ mit vielen Nachteilen verbunden war. Durch eine spezielle mobile Phase, die ein Ionen-Paar-Reagens enthielt, konnte diese Form der Elution nun auch zur Erkennung von $O_2^{\cdot-}$ angewandt werden. DHE und seine Reaktionsprodukte konnten nicht nur eindeutig aufgetrennt werden, sondern die Auftrennung erfolgte auch sehr schnell in nur etwa 15min, was gegenüber älteren Methoden einen eindeutigen Zeitvorteil bringt.

Anstatt zwei benötigten wir darüber hinaus nur eine Pumpe, was ebenfalls ein Vorteil der isokraten Elution ist. Wir erreichten auch über längere Messreihen stabile Bedingungen, da für die isokrate Elution die mobile Phase nicht verändert werden muss. Des Weiteren haben wir 3,4-Dihydroxymzimtsäure als internen Standard eingeführt, der

5 Zusammenfassung

sich hinsichtlich seiner Retentionszeit als sehr geeignet erwies und mit einem elektrochemischen Detektor klar und eindeutig nachweisbar war. Dies bietet große Vorteile gegenüber Methoden ohne internen Standard. Veränderungen der Konzentrationen von DHE, 2-OH-E⁺ und Ethidium aufgrund von Verdampfen des Lösungsmittels Methanol können ebenso erkannt werden wie Ungenauigkeiten während der Präparation sowie Schwankungen im HPLC-System, wie sie etwa bei langen Messreihen durch Auswaschungs-Effekte oder Verunreinigungen auftreten können. Da sich die Konzentration des internen Standards 3,4-Dihydroxymizinsäure stets mitverändert, können die Messwerte normalisiert werden und somit die Verfälschungen aufgehoben werden. Dem zu Folge sind Messungen mit einem internen Standard gegenüber solchen ohne internen Standard deutlich valider.

Sowohl die Stimulation von humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) mit Glukose bzw. Tumornekrosefaktor α , als auch die Infusion von Angiotensin II bei männlichen Mäusen mit anschließender Untersuchung der Aorta führt bekanntermaßen zu einem Anstieg von O₂^{•-}. Dieser Effekt konnte nun auch mit unserer neu etablierten HPLC-Methode nachgewiesen werden. Ebenfalls war ein Anstieg des aortalen O₂^{•-}-Spiegels bei Ratten nach induziertem Myokardinfarkt bereits in mehreren früheren Arbeiten beschrieben worden. Dieser lag auch bei Messung mit unserer neu etablierten HPLC-Methode eindeutig vor. Die Signale waren hierbei für die untersuchten Substanzen 2-OH-E⁺, DHE sowie für den internen Standard 3,4-Dihydroxymizinsäure eindeutig und gut voneinander getrennt.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass sich anhand mehrerer etablierter in vitro und in vivo Modelle erhöhter Sauerstoffradikal-Produktion der Anstieg von O₂^{•-} auch mit unserer neuen Variante der HPLC mit isokrater Elution, internem Standard und Messung mittels elektrochemischem Detektor nachweisen ließ. Es handelt sich um eine zuverlässige und sensitive Methode, die zusätzliche Vorteile für die Messung von O₂^{•-} mit sich bringt.

6 Literatur:

1. **Arthur MJ, Kowalski-Saunders P, Gurney S, Tolcher R, Bull FG, and Wright R.** Reduction of ferricytochrome C may underestimate superoxide production by monocytes. *J Immunol Methods* 98: 63-69, 1987.
2. **Barbacanne MA, Souchard JP, Darblade B, Iliou JP, Nepveu F, Pipy B, Bayard F, and Arnal JF.** Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radic Biol Med* 29: 388-396, 2000.
3. **Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, and Ertl G.** Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 100: 292-298, 1999.
4. **Bauersachs J, and Widder JD.** Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmacol Rep* 60: 119-126, 2008.
5. **Cai H, and Harrison DG.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840-844, 2000.
6. **Caldefie-Chezet F, Walrand S, Moinard C, Tridon A, Chassagne J, and Vasson MP.** Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. *Clin Chim Acta* 319: 9-17, 2002.
7. **Dikalov S, Griendling KK, and Harrison DG.** Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49: 717-727, 2007.
8. **Dudley SC, Jr., Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, Harrison DG, Dikalov SI, and Langberg J.** Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation* 112: 1266-1273, 2005.

6 Literatur

9. **El Midaoui A, and de Champlain J.** Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens* 23: 581-588, 2005.
10. **Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, and Grodsky GM.** Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52: 1-8, 2003.
11. **Fernandes DC, Wosniak J, Jr., Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FR, and Santos CX.** Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C413-422, 2007.
12. **Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, and Dikalov S.** Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C895-902, 2004.
13. **Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, and Harrison DG.** Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension* 48: 473-481, 2006.
14. **Griendling KK, and FitzGerald GA.** Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912-1916, 2003.
15. **Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, and Alexander RW.** Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 1141-1148, 1994.
16. **Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, and Harrison DG.** Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 204: 2449-2460, 2007.

6 Literatur

17. **Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, and Channon KM.** Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105: 1656-1662, 2002.
18. **Hennet T, Richter C, and Peterhans E.** Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem J* 289 (Pt 2): 587-592, 1993.
19. **Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, and Nawata H.** High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49: 1939-1945, 2000.
20. **Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, and Harrison DG.** Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 40: 511-515, 2002.
21. **Mohazzab KM, Kaminski PM, and Wolin MS.** NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 266: H2568-2572, 1994.
22. **Nomikos IN, Wang Y, and Lafferty KJ.** Involvement of O₂ radicals in 'autoimmune' diabetes. *Immunol Cell Biol* 67 (Pt 1): 85-87, 1989.
23. **Pelicano H, Carney D, and Huang P.** ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 7: 97-110, 2004.
24. **Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, and Braunwald E.** Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44: 503-512, 1979.
25. **Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, and Zhang C.** Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res* 99: 69-77, 2006.

6 Literatur

26. **Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, and 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* 97: 1916-1923, 1996.
27. **Sambuceti G, Morbelli S, Vanella L, Kusmic C, Marini C, Massollo M, Augeri C, Corselli M, Ghersi C, Chiavarina B, Rodella LF, L'Abbate A, Drummond G, Abraham NG, and Frassoni F.** Diabetes impairs the vascular recruitment of normal stem cells by oxidant damage, reversed by increases in pAMPK, heme oxygenase-1, and adiponectin. *Stem Cells* 27: 399-407, 2009.
28. **Sidoti-de Fraisse C, Rincheval V, Risler Y, Mignotte B, and Vayssiere JL.** TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* 17: 1639-1651, 1998.
29. **Spasojevic I, Liochev SI, and Fridovich I.** Lucigenin: redox potential in aqueous media and redox cycling with O₂(-2) production. *Arch Biochem Biophys* 373: 447-450, 2000.
30. **Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD, Tsikas D, Ertl G, and Bauersachs J.** Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes* 56: 666-674, 2007.
31. **Tieu K, Ischiropoulos H, and Przedborski S.** Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life* 55: 329-335, 2003.
32. **Wassmann S, Wassmann K, and Nickenig G.** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44: 381-386, 2004.
33. **Widder J, Behr T, Fraccarollo D, Hu K, Galuppo P, Tas P, Angermann CE, Ertl G, and Bauersachs J.** Vascular endothelial dysfunction and superoxide anion production in heart failure are p38 MAP kinase-dependent. *Cardiovasc Res* 63: 161-167, 2004.

6 Literatur

34. **Widder JD, Guzik TJ, Mueller CF, Clempus RE, Schmidt HH, Dikalov SI, Griending KK, Jones DP, and Harrison DG.** Role of the multidrug resistance protein-1 in hypertension and vascular dysfunction caused by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 762-768, 2007.
35. **Yonetani T.** Studies on cytochrome c peroxidase. II. Stoichiometry between enzyme, H₂O₂, and ferrocytochrome c and enzymic determination of extinction coefficients of cytochrome c. *J Biol Chem* 240: 4509-4514, 1965.
36. **Zhang H, Schmeisser A, Garlichs CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, and Daniel WG.** Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 44: 215-222, 1999.
37. **Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, and Kalyanaraman B.** Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5727-5732, 2005.
38. **Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, and Kalyanaraman B.** Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34: 1359-1368, 2003.
39. **Zielonka J, Vasquez-Vivar J, and Kalyanaraman B.** The confounding effects of light, sonication, and Mn(III)TBAP on quantitation of superoxide using hydroethidine. *Free Radic Biol Med* 41: 1050-1057, 2006.