

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. Georg Ertl**

**Verbesserung der vaskulären Dysfunktion bei Diabetes mellitus durch
Aktivierung der Guanylatzyklase**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Christian Roland Jens Vogt
aus Großostheim**

Würzburg, Januar 2009

Referent: Prof. Dr. Johann Bauersachs

Koreferent: Prof. Dr. Kai Schuh

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.7.2009

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Definition und Einteilung	1
1.1.2 Klinischer Verlauf	2
1.1.3 Epidemiologie	3
1.1.4 Auswirkungen auf das Gesundheitswesen	3
1.2 Die physiologische Endothelfunktion	4
1.2.1 Stickstoffmonoxid (NO) als zentrales Signalmolekül	4
1.2.2 NO-Synthese	5
1.2.3 NO-Signalkaskade	6
1.2.4 NO-Wirkung auf den Gefäßtonus	7
1.2.5 Oxidative und antioxidative Wirkungen von NO	7
1.2.6 Vasoprotektive und antiatherosklerotische Effekte von NO	8
1.3 Pathophysiologische Veränderungen an diabetischen Blutgefäßen	10
1.3.1 Hyperglykämie und oxidativer Stress	10
1.3.2 Dyslipidämie	11
1.3.3 Arterioskleroseentstehung	12
1.4 Therapeutische Möglichkeiten	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Tiere und Tierhaltungsbedingungen	16
2.2 Induktion des Diabetes mellitus	16
2.3 Behandlung mit HMR1766 und Isoniazid	17
2.4 Gefäßpräparation und Probengenerierung	17
2.5 Vasculäre Reaktivitätsmessungen im Organbad	18
2.5.1 Versuchsanordnung	18
2.5.2 Versuchsprotokolle	19
2.5.2.1 Kontraktionsprotokolle	20
2.5.2.2 Relaxationsprotokolle	20
2.5.2.3 Protokoll zur Messung der Dehnungs-induzierten NO-Bildung	21
2.6 Superoxidbestimmung in Aortensegmenten	21
2.7 Tandem-Massenspektrometrie	22
2.8 Microarray-Analyse	23
2.9 Immunoblotting	24
2.10 Statistik	25
2.11 Substanzen	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Schubspannungsvermittelte NO-Bioverfügbarkeit	26
3.2 Agonisten-vermittelte Relaxationsstudien	27
3.2.1 Endothel-abhängige Relaxation	27
3.2.2 Endothel-unabhängige Relaxation	29

3.3 Vaskuläre Sauerstoffradikale	31
3.3.1 Luminometrie	31
3.3.2 Fluoreszenz-Mikrotopographie	32
3.3.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	33
3.3.4 NADPH-Oxidase als Superoxidquelle	34
3.4 Kontraktionsstudien	35
3.4.1 Vasokonstriktoren im Organbad	35
3.4.2 Microarray und Western Blot	39
3.5 Cytochrom-P450-Isoenzyme im Arachidonsäurestoffwechsel	40
3.5.1 Einführung	40
3.5.2 Nachweis von 20-HETE (20-Hydroxyeicosatetraensäure)	42
3.5.3 Vasokonstriktion unter Substitution von 20-HETE	42
3.5.4 Vaskuläre Studien nach Isoniazidbehandlung	44
4. Diskussion	47
4.1 NO-Signalverstärkung und Verbesserung der vaskulären Dysfunktion	47
4.2 Beeinflussung oxidativer Prozesse	49
4.3 Einfluss von HMR1766 auf die Vasokonstriktion	50
4.3.1 Phänotypmodulation und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen	51
4.3.2 Regulation des Arachidonsäuremetabolismus	53
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	57

Abkürzungsverzeichnis

AGEs	Advanced glycation end products
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cRNA	complementary RNA
CYP	Cytochrom P450
DEA NONOate	2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid diethylammoniumsalz
DHE	Dihydroethidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	halbmaximale Effektivkonzentration
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FAD	Flavin Adenin Dinucleotid
FMN	Flavin Mononucleotid
GDP	Guanosindiphosphat
GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High density lipoprotein
HE	Hydroethidium
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LDL	Low density lipoprotein
L-NNA	N ^G -Nitro-L-Arginin
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nicotinsäureamid Adenin Dinucleotid Phosphat

NF-κB	Nuclear factor κB
nNOS	neuronale-Stickstoffmonoxid Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
oxLDL	oxidiertes LDL
PGI ₂	Prostazyklin
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
RAGE	AGE Rezeptor
R _{max}	maximale Relaxation
RNA	Ribonukleinsäure
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SMC	glatte Gefäßmuskelzellen
SOD	Superoxiddismutase
STZ	Streptozotozin
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	Very low density lipoprotein
WK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition und Einteilung

Diabetes mellitus ist der Oberbegriff für ätiologisch und pathogenetisch unterschiedliche Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel, die alle zu einem erhöhten Blutzuckerspiegel führen.

Die Bezeichnung Diabetes mellitus ist griechisch-lateinischen Ursprungs und bedeutet wörtlich übersetzt „honigsüßer Durchfluss“. Damit wird ein wesentliches Hauptsymptom der Erkrankung beschrieben: eine gesteigerte Ausscheidung von Urin mit hohem Zuckergehalt. In früheren Zeiten nutzte man dieses Merkmal auch zur Erkennung der Erkrankung: Ein süßlich schmeckender Urin war der wichtigste Hinweis auf die „Zuckerkrankheit“.¹

Heute entscheidet die Höhe des Zuckerspiegels im Blut über die Diagnose. Von Diabetes mellitus spricht man, wenn der Blutzuckerspiegel bei Nüchternmessung über 126 mg/dl liegt oder – unabhängig von den Mahlzeiten gemessen – Werte über 200 mg/dl annimmt.²

Die Ätiologie des Diabetes mellitus ist sehr unterschiedlich. Je nach zugrunde liegender Ursache für die Hyperglykämie wird die Erkrankung von der American Diabetes Association in insgesamt vier Gruppen aufgeteilt.² Die zwei wichtigsten sind die Typen I und II, die zusammengenommen über 90 % der Diabetes mellitus-Fälle in Deutschland ausmachen.^{3;4} In beiden Fällen ist die mangelhafte Wirkung des Insulins auf seine Zielstrukturen die Ursache einer diabetischen Stoffwechselstörung. Die unzureichende Insulinwirkung beruht dabei entweder auf einer ungenügenden beziehungsweise fehlenden Insulinausschüttung und / oder einer verminderten Reaktion der Zielzellen auf Insulin.

Das Resultat ist ein dauerhaft erhöhter Blutzuckerspiegel. Dieser Zustand führt neben weiteren Stoffwechselveränderungen auch zur Ankopplung von Glukosemolekülen an verschiedene Proteine, die dadurch nicht nur eine

Strukturveränderung erfahren, sondern auch in ihrer Funktion beeinträchtigt werden können. Auf diese Weise entstehen auf Dauer pathologische Veränderungen an verschiedenen Organen, die sich nach Jahren als sogenannte diabetische Spätschäden klinisch manifestieren können.⁵⁻¹²

1.1.2 Klinischer Verlauf

Die besondere Bedeutung der Erkrankung ergibt sich aus dem chronischen Verlauf und den damit verbundenen Langzeitfolgen. Im Mittelpunkt stehen dabei die Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System. Diabetes mellitus ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose und ihren Folgeerkrankungen.¹³⁻¹⁷

Durch die chronische Hyperglykämie, Dyslipidämie und Insulinresistenz entstehen Veränderungen und Schäden an den Blutgefäßen. Es kommt zu Fehlfunktionen von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Thrombozyten. Verschiedene Mechanismen der Gefäßregulation werden grundlegend verändert und gestört. Dies begünstigt die Entstehung der Arteriosklerose und führt dazu, dass über 75 % aller Diabetiker an kardiovaskulären Komplikationen sterben.^{5;18;19} Die Betroffenen haben zum

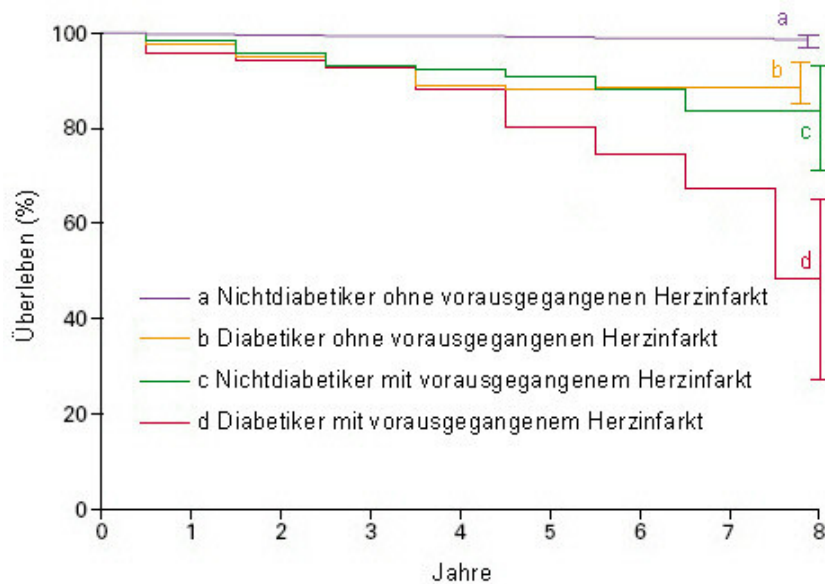


Abbildung 1: Überlebenswahrscheinlichkeiten von Diabetikern und Nichtdiabetikern mit koronarer Herzkrankung (modifiziert nach Haffner, N Engl J Med, 1998).

Beispiel ein drastisch erhöhtes Risiko für die koronare Herzerkrankung und für einen akuten Myokardinfarkt: Das Risiko für einen Diabetiker, einen Herzinfarkt zu erleiden, entspricht dem eines Nichtdiabetikers mit bereits manifester koronarer Herzerkrankung (Abb. 1).^{16;20}

Insgesamt ist die kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit Diabetes mellitus bis zu viermal höher als bei Nichtdiabetikern.⁵ Selbst wenn bei einem Patienten schon mehrere andere Risikofaktoren in Kombination oder in besonders starker Ausprägung vorliegen, stellt der Diabetes mellitus immer noch eine zusätzliche Risikoerhöhung für die Betroffenen dar.²¹

1.1.3 Epidemiologie

Die besondere gesellschaftliche und gesundheitspolitische Bedeutung des Diabetes mellitus erwächst auch aus der immer weiter zunehmenden Häufigkeit der Erkrankung. Eine Hochrechnung ergab, dass vom Jahr 1995 bis ins Jahr 2025 weltweit mit einer Verdopplung der Diabetes-Fälle auf dann 300 Millionen zu rechnen ist.²² Dabei wird allein in der entwickelten Welt ein Anstieg um 47 % erwartet.²² Schon jetzt ist bekannt, dass die Prävalenzrate weltweit innerhalb der letzten Jahre deutlich angestiegen ist.^{22;23}

In Deutschland lag nach einer Auswertung von Krankenkassendaten die Diabetes-Prävalenz 1988 bei ca. 4,7 %.²⁴ Im Zeitraum von 1998 bis 2001 wurde in einer erneuten Datenanalyse ein Anstieg der Prävalenz von 6,0 % auf 6,9 % erfasst. Demnach waren im Jahr 2001 fast sechs Millionen Menschen in Deutschland wegen Diabetes mellitus in ärztlicher Behandlung.²⁵ Zusätzlich muss man von einer hohen Dunkelziffer von Patienten mit noch nicht diagnostiziertem Diabetes mellitus ausgehen,^{3;26} so dass auch in Zukunft mit einer weiter steigenden Zahl von Diabetes-Fällen zu rechnen ist.

1.1.4 Auswirkungen auf das Gesundheitswesen

Nicht nur die zunehmende Häufung der Diabetes-Fälle, auch der chronische Verlauf, die Notwendigkeit einer langjährigen Therapie sowie die Behandlung

der auftretenden Komplikationen stellen eine Herausforderung für das Gesundheitssystem dar.

Im Rahmen der CODE-2-Studie (Costs of Diabetes in Europe – Type 2) wurden 1998 die Gesamtkosten für die Behandlung von Typ-2-Diabetikern in Deutschland detailliert erfasst und analysiert.^{27;28} Es zeigte sich, dass auf die Behandlung von Diabetes-Patienten etwa 9,4 Milliarden Euro oder 8 % der Gesamtausgaben der gesetzlichen Krankenversicherung entfielen, während im gleichen Zeitraum eine Diabetes-Prävalenz von nur 4,2 % ermittelt wurde.²⁷ Allein der Anteil der Arzneimittelausgaben für Diabetiker war fast doppelt so hoch wie für die restliche Bevölkerung. Nur 7 % dieser Kosten entfielen aber auf Antidiabetika.²⁹ Erstmals konnte dadurch gezeigt werden, dass vorrangig die Diabetes-bedingten Komplikationen und Folgeerkrankungen für die hohen Kosten verantwortlich sind. Durch die in der Folge zwangsläufig erhöhte Inanspruchnahme von Leistungen erreichten die Aufwendungen für Diabetes-Patienten mit vaskulären Komplikationen das 4,1-fache der mittleren Ausgaben für gesetzlich Versicherte in Deutschland.²⁷

1.2 Die physiologische Endothelfunktion

Die Blutgefäße sind innen mit einer einzelnen Schicht von Endothelzellen ausgekleidet. Diese spezialisierten Zellen sind die aktive Schnittstelle zwischen dem zirkulierenden Blut und der eigentlichen Gefäßwand beziehungsweise dem umgebenden Gewebe. Die Endothelzellen sind zur Steuerung und Regulation verschiedener Gefäßfunktionen mit unterschiedlichen Rezeptoren ausgestattet und sezernieren eine Reihe von bioaktiven Substanzen wie Prostaglandine, Endothelin und Angiotensin II.^{5;30}

1.2.1 Stickstoffmonoxid (NO) als zentrales Signalmolekül

Einer der bedeutendsten Stoffe, der von Endothelzellen synthetisiert wird, ist das Stickstoffmonoxid (NO). Im Jahr 1980 wurde erstmals von Furchgott und Zawadzki die Existenz einer vom Endothel gebildeten Substanz postuliert, die

zur Relaxation von Blutgefäßen führt. Sie wurde damals „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) genannt, und konnte später als NO identifiziert werden.³¹⁻³⁵

NO spielt eine zentrale Rolle als inter- und intrazelluläres Signalmolekül für die kardiovaskuläre Homöostase. Es reguliert die Gefäßwandspannung, hemmt die Thrombozytenaktivierung und die Leukozytenanheftung an die Gefäßwand, moduliert Proliferation und Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen, beeinflusst das intrazelluläre Oxidationsgleichgewicht und wird darüber hinaus von Makrophagen als antibakterielles Molekül zur unspezifischen Abwehr sezerniert.³⁶⁻⁴³

1.2.2 NO-Synthese

Das freie Radikal NO wird von der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und ihren Isoenzymen produziert. Dazu gehören die neuronale nNOS, die induzierbare iNOS und die endotheliale eNOS.⁴⁴ Alle drei NO-Synthasen katalysieren die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO.⁴⁵ Dazu sind unter anderem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin

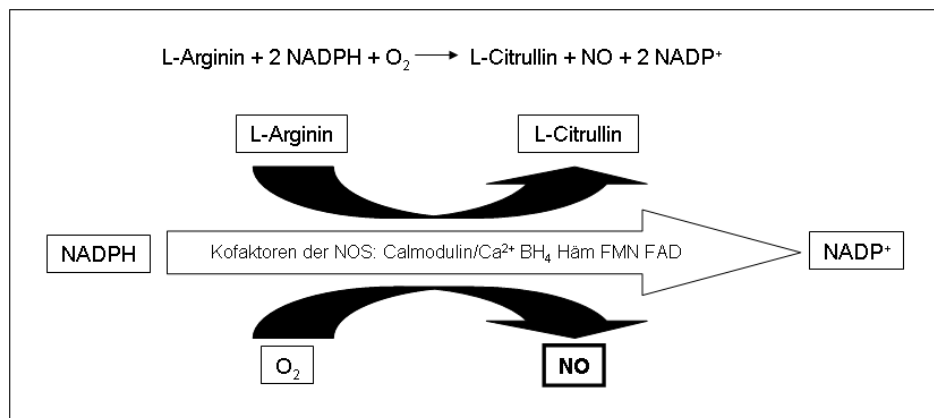


Abbildung 2: Der NO-Syntheseweg (modifiziert nach Bruckdorfer, Mol Aspects Med, 2005)

(BH₄), Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Flavin-Mononucleotid (FMN) als Kofaktoren nötig (Abb. 2).⁴⁶ Sowohl eNOS als auch nNOS produzieren

Calcium- und stimulationsabhängig NO-Konzentrationen im nanomolaren Bereich. Die iNOS dagegen wird durch externe Stimulation – beispielsweise durch bakterielle Lipopolysaccharide – angeregt und produziert Calcium-unabhängig sehr viel größere Mengen von NO, bis in den mikromolaren Bereich.^{37;43} Daher wird die iNOS generell mit zytotoxischen Effekten des freien Radikals NO in Verbindung gebracht.

Die eNOS-Aktivität im Endothel wird einerseits Rezeptor-vermittelt durch Agonisten wie Acetylcholin erhöht, andererseits steigern auch mechanische Stimuli wie die laminäre Schubspannung die Aktivität des Enzyms.^{37;43;47} Hierunter versteht man den Druck, der durch den Blutfluss von innen auf die Blutgefäßwände ausgeübt wird.⁴⁸

Beide Aktivierungswege führen zur Phosphorylierung der eNOS an Serin1179, wodurch es zur Dissoziation des Enzyms von der Plasmamembran mit Aktivierung des Enzyms und Beginn der NO-Synthese kommt.⁴⁷

1.2.3 NO-Signalkaskade

Das aus dem Endothel freigesetzte NO erreicht zuerst die glatten Gefäßmuskelzellen, die der Endothelschicht abluminal direkt anliegen, und die Thrombozyten, die sich luminal im Blutstrom nahe an der Gefäßwand bewegen. NO diffundiert sehr schnell durch die Zellmembran und gelangt zu seinem Zielprotein, der im Zytosol befindlichen löslichen Guanylatzyklase.^{37;41;43;46;49} Das auch soluble Guanylatzyklase (sGC) genannte Enzym beinhaltet in seiner chemischen Struktur eine Häm-Gruppe, zu der NO eine sehr hohe Affinität besitzt.⁴¹ Durch die chemische Bindung von NO an den Protoporphyrinring wird die sGC aktiviert und katalysiert die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP). Dabei wird zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) produziert.^{37;40;41} Dieses Protein führt zur Aktivierung von Proteinkinasen und beeinflusst verschiedene Transportproteine in der Zellmembran. cGMP gibt so das NO-Signal intrazellulär weiter und ist das wesentliche Signalmolekül, das die Wirkung von NO vermittelt.⁴¹ Wie NO selbst

ist auch cGMP sehr kurzlebig, da es schnell durch verschiedene Isoenzyme der Phosphodiesterase abgebaut wird.³⁷

1.2.4 NO-Wirkung auf den Gefäßtonus

NO ist einer der wichtigsten endogenen Vasodilatoren und stellt das Gegengewicht zu den vasokonstriktorisches Eigenschaften des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems dar.⁵⁰

Die Aktivierung der sGC durch NO führt in glatten Muskelzellen zu einem Anstieg von cGMP, das dort einen Abfall des intrazellulären Calciumspiegels bewirkt: Zum einen durch Verminderung des Calciumeinstroms über eine direkte Hemmung spannungsabhängiger Calciumkanäle und zum anderen durch Aktivierung der Proteinkinase G (PKG).⁵¹⁻⁵³ Die PKG phosphoryliert Calcium-abhängige Kaliumkanäle und verschiedene andere Proteine im sarkoplasmatischen Retikulum.⁵³ Dadurch kommt es zu einer geringeren Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und folglich zur weiteren Abnahme des intrazellulären Calciums.^{54;55}

Der Calciumabfall zieht eine reduzierte Bildung des Calcium-Calmodulin-Komplexes und der Myosin-Leichtketten-Kinase nach sich, wodurch die Phosphorylierung der regulatorischen Myosin-Leichtketten vermindert stattfindet. Dies verhindert eine Kontraktion der glatten Muskelzellen und führt zur Vasorelaxation.^{37;43;56;57}

1.2.5 Oxidative und antioxidative Wirkungen von NO

Reaktive Sauerstoffverbindungen sind für den Organismus potentiell gefährlich, da sie Oxidationsprozesse fördern und dadurch Proteine, Lipide und die DNA schwer beschädigen und zu Funktionseinschränkungen dieser Makromoleküle führen. Die Gesamtheit aller oxidationsfördernden Prozesse wird als oxidativer Stress bezeichnet.^{58;59}

Die Bildung Sauerstoff-basierter freier Radikale und anderer reaktiver Sauerstoffverbindungen ist bis zu einem gewissen Grad ein physiologischer

Vorgang. Zum Beispiel wird in den Mitochondrien ca. 1% des molekularen Sauerstoffs nicht vollständig zu Wasser reduziert und es entstehen kontinuierlich Superoxidanionen (O_2^-).³⁷

Zum Schutz vor freien Radikalen gibt es mehrere wirkungsvolle Abwehrmechanismen. Dazu gehört unter anderem die Superoxiddismutase (SOD). Dieses Enzym katalysiert die Dismutation von O_2^- zu H_2O_2 , das durch weitere Enzymsysteme zu Wasser abgebaut wird.³⁷

NO ist selbst ein freies Radikal und beeinflusst das Redoxpotential vaskulärer Zellen. Dabei hat NO dosisabhängig gegensätzliche Effekte: niedrige, von der eNOS produzierte NO-Konzentrationen unterstützen den Abbau von O_2^- , indem sie die Expression der extrazellulären SOD induzieren.⁶⁰ Darüber hinaus erhöht NO auch die Expression der Hämoxigenase-I, die Bilirubin produziert, das ebenfalls Superoxidanionen abfangen kann.^{43;61;62}

Sehr hohe NO-Konzentrationen dagegen, wie sie durch die iNOS synthetisiert werden, können den oxidativen Stress sogar noch verstärken.^{63;64} Dies ist ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Körperabwehr und dient der Bekämpfung bakterieller Zellen.

Als freies Radikal kann NO allerdings auch direkt mit O_2^- zum sehr reaktiven Peroxynitrit ($ONOO^-$) reagieren und auf diesem Weg den oxidativen Stress noch deutlich erhöhen. Physiologischerweise ist die SOD-Konzentration im Vergleich zur Superoxidmenge allerdings sehr viel höher, so dass das Superoxid abgefangen wird und die Produktion von $ONOO^-$ in der Regel nur gering ausfällt.^{43;65}

1.2.6 Vasoprotektive und antiatherosklerotische Effekte von NO

NO besitzt zahlreiche vasoprotektive und antiatherosklerotische Eigenschaften, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnten.^{50;66}

Im Blutgefäßlumen wirkt NO als starker Inhibitor der Aggregation, Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten.⁶⁷ Eine zentrale Rolle in der Regulation der Thrombozytenaktivierung spielt die NO-abhängige VASP-Phosphorylierung.⁶⁸ Die Phosphorylierung des „Vasodilator-stimulated phosphoprotein“ (VASP)

korreliert eng mit der Hemmung der Fibrinogenbindung an den thrombozytären Glykoprotein (GP) IIb/IIIa-Rezeptor.^{69;70} Die Phosphorylierung von VASP an Serin 239 über die NO/cGMP-abhängige PKG greift in die Interaktion der Proteine des Zytoskeletts^{68;71;72} ein und hemmt die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten.^{51;73;74} Da die Thrombozytenaktivierung nicht nur zur Entstehung eines prokoagulatorischen Milieus führt, sondern auch die Leukozytenadhäsion begünstigt und einen essentiellen Schritt zur Bildung arteriosklerotischer Läsionen darstellt,^{75;76} spielt die NO-abhängige Thrombozyteninhibition eine entscheidende antiatherosklerotische Rolle.^{67;76;77} Darüber hinaus hemmt NO die Expression der Oberflächen-Adhäsionsmoleküle CD11 und CD18,⁷⁸ P-Selektin,^{79;80} Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)^{63;81} und Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)⁸⁰ und vermindert die Expression des chemotaktischen Zytokins Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1).^{82;83} Dadurch werden die Leukozytenadhäsion an das Endothel und die Leukozytenmigration in die Gefäßwand gehemmt. Des Weiteren vermindert NO die Permeabilität der Endothelschicht für Makromoleküle,⁶⁶ reduziert die Einlagerung von Lipoproteinen in die Gefäßwand und verringert die Ansammlung von Low density lipoprotein (LDL) und Cholesterin in der subendothelialen Schicht.^{84;85} In Anwesenheit von NO findet eine geringere Oxidierung von LDL zu oxLDL statt und die Bildung dieses stark proatherogen wirkenden Moleküls wird deutlich reduziert.⁸⁶⁻⁸⁸ Ferner hemmt NO über cGMP die DNA-Synthese, Mitogenese und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen.⁸⁹⁻⁹² Durch Thrombozyteninhibition schützt NO die glatten Gefäßmuskelzellen vor thrombozytären Wachstumsfaktoren, die bei der Plättchenaktivierung freigesetzt werden und die glatten Muskelzellen zur Proliferation und zur Produktion von Matrixmolekülen stimulieren.⁵⁰ NO wird heute aufgrund all dieser Eigenschaften als ein grundlegender Protektionsfaktor gegen die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen angesehen.^{6;37;43;50;66;76} Daher ist eine ausreichende NO-Bioverfügbarkeit von zentraler Bedeutung für die Integrität des Gefäßsystems.⁶

1.3 Pathophysiologische Veränderungen an diabetischen Blutgefäßen

Das Endothel ist die vorderste Verteidigungslinie des Körpers gegen die Entstehung der Arteriosklerose.^{66;93} Diabetes mellitus führt zu einer starken Beeinträchtigung der normalen Endothelfunktion. Sowohl bei Patienten als auch in experimentellen Diabetes-Modellen kommt es zu einer eingeschränkten Endothel-abhängigen, NO-vermittelten Vasodilatation.^{94;95} Dies wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Sie geht mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit einher und prädisponiert für die Entstehung der Arteriosklerose.^{6;36} Der endothelialen Dysfunktion liegen beim Diabetes mellitus verschiedene Mechanismen zugrunde.

1.3.1 Hyperglykämie und oxidativer Stress

Die Hyperglykämie führt auf zellulärer Ebene zu einer Serie von Ereignissen, die eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale zur Folge haben und die NO-Bioverfügbarkeit reduzieren.^{96;97} Zunächst erhöht sich durch die Hyperglykämie die O_2^- -Produktion in der mitochondrialen Elektronentransportkette.⁹⁷ Die entstandenen Superoxidanionen bewirken über verschiedene zelluläre Mechanismen die weitere Produktion von Sauerstoffradikalen.⁶ O_2^- stimuliert über die Proteinkinase C (PKC)⁹⁷ die NADPH-Oxidase zur Produktion von weiteren Superoxidanionen.^{14;98} Durch ansteigende O_2^- -Konzentrationen wird die SOD-Kapazität überschritten und aus O_2^- - und NO-Molekülen entsteht das sehr reaktive Peroxynitrit.⁶⁵ Peroxynitrit kann den NOS-Kofaktor Tetrahydrobiopterin oxidieren und so zur Entkopplung der NO-Synthase führen.⁹⁹⁻¹⁰¹ Unter der Entkopplung versteht man die bei erniedrigten Spiegeln von Tetrahydrobiopterin beobachtete Produktion signifikanter Mengen von Superoxidanionen durch die NO-Synthase.¹⁰² Steht nicht ausreichend Tetrahydrobiopterin zur Verfügung wird in der eNOS die Elektronentransportkette während der Reduktion von Sauerstoff unterbrochen oder „entkoppelt“, wodurch letztlich die Reaktion nicht vollständig abläuft und nicht NO, sondern O_2^- entsteht.¹⁰² Dieser Zusammenhang zwischen eNOS-

Entkopplung und endothelialer Dysfunktion wird sowohl in experimentellen Diabetes-Modellen als auch bei Diabetes-Patienten beobachtet^{14;103} und trägt signifikant zum oxidativen Stress bei Diabetes mellitus bei.

Insgesamt kommt es durch die beschriebenen Mechanismen zu einer sich immer weiter verstärkenden Zunahme der NO-Inaktivierung und Superoxidproduktion. Besonders durch Letzteres wird das Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen stark begünstigt.¹⁰⁴

Die mitochondriale Produktion von Superoxid steigert auch die intrazelluläre Produktion sogenannter Advanced glycation end products (AGEs).⁹⁷ AGEs sind Proteine oder Lipide, die eine nichtenzymatische Glykation oder Oxidierung erfahren haben und dadurch Modifikationen ihrer chemischen Struktur aufweisen.⁷ AGEs entstehen *in vivo* im Zuge von Alterungsprozessen und in hyperglykämischer Umgebung.^{9;105} Die glykierten Proteine steigern *per se* die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale und erhöhen über den Rezeptor für AGEs (RAGE) zusätzlich die intrazelluläre enzymatische Superoxidproduktion über die NADPH-Oxidase.^{11;106;107} AGEs können NO auch direkt inaktivieren und die endotheliale Produktion von Prostazyklin (PGI₂) vermindern. Sie tragen bei Diabetes mellitus wesentlich zur Entstehung der vaskulären Dysfunktion bei.^{7;9;105}

Eine weitere Auswirkung der Hyperglykämie ist die erhöhte Produktion des second-messengers Diacylglycerol, der die verstärkte Aktivierung der PKC nach sich zieht. Dadurch wird nicht nur über die NADPH-Oxidase wie oben beschrieben der oxidative Stress direkt verstärkt, sondern die PKC hemmt auch den Phosphatidylinositol-3-Kinase Stoffwechselweg. Infolgedessen kann die Akt-Kinase nur noch begrenzt aktiviert werden, und es kommt zu einer verminderten Phosphorylierung der NOS mit verringerter NO-Produktion.¹⁰⁸⁻¹¹¹

1.3.2 Dyslipidämie

Beim Diabetes mellitus sind neben dem Glucosespiegel auch die Blutspiegel freier Fettsäuren erhöht. Sie werden verstärkt aus dem Fettgewebe freigesetzt und von den Skelettmuskelzellen nur zum Teil wieder aufgenommen.^{112;113}

Freie Fettsäuren beeinflussen die Endothelfunktion auf unterschiedliche Weise. Sie aktivieren das Signalezym PKC, hemmen den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg, erhöhen direkt die Produktion von Sauerstoffradikalen und führen zur Ausbildung einer Dyslipidämie.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Als Reaktion auf die hohen Spiegel freier Fettsäuren werden in der Leber verstärkt Cholesterinester und Very-low-density-lipoprotein-(VLDL-)Partikel produziert.¹⁰ Aus der erhöhten Produktion triglyceridreicher Proteine und ihrem verminderten Abbau durch die Lipoproteinlipase entsteht die Diabetes-typische Hypertriglyceridämie.¹¹⁷ Sie führt zur Abnahme von High density lipoprotein (HDL) und zu erhöhten Spiegeln von kleinen, dichten, sehr atherogenen LDL-Partikeln.¹¹⁷⁻¹²¹ Die Hypertriglyceridämie und das niedrige HDL verstärken die endotheliale Dysfunktion.^{120;121} Die modifizierten LDL-Partikel erfahren bei Diabetes-Patienten darüber hinaus besonders leicht eine zusätzliche Glykierung und Oxidierung, wodurch sich das atherogene Potential der Dyslipoproteinämie noch weiter potenziert.¹⁰

1.3.3 Arterioskleroseentstehung

Die Arteriosklerose wird heute als eine inflammatorische Erkrankung betrachtet, da in allen Stadien der Erkrankung Entzündungsprozesse eine entscheidende Rolle spielen.^{17;122} Bei der Entstehung von Diabetes-assoziierten makrovaskulären Komplikationen spielen Entzündungsprozesse ebenfalls eine wichtige Rolle.¹²³ Die Inflammation wird durch Hyperglykämie, oxidativen Stress^{124;125} und AGEs begünstigt und weiter verstärkt.¹²

Gesunde Endothelzellen verhindern die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an die Gefäßwand. Pathologische Zustände wie Diabetes mellitus führen zur Inflammation und zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen.

Thrombozyten binden vor allem über den GPIIb/IIIa-Rezeptor an entzündlich veränderte Endothelzellen und werden dadurch aktiviert.⁷⁵ Es kommt zur Degranulation und zur Expression weiterer Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche, wie P-Selektin und CD40-Ligand.¹²⁶ P-Selektin führt zur Bildung

von Aggregaten aus Thrombozyten und Leukozyten und ermöglicht die Anheftung von Leukozyten an das Endothel.^{127;128} Die Thrombozytenaktivierung stellt also einen entscheidenden Schritt bei der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen dar, da sie der Leukozytenadhäsion vorausgeht.^{18;76}

Die Leukozyten können nach diesem ersten Kontakt fest an das endotheliale Adhäsionsmolekül VCAM-1 binden.¹²⁹ Bei der Entstehung der Arteriosklerose kommt VCAM-1 eine besondere Bedeutung zu, da es die Anheftung speziell der Leukozytenklassen an das Endothel ermöglicht, die in entstehenden arteriosklerotischen Läsionen gefunden werden: Monozyten und T-Lymphozyten.^{17;130-132}

Inflammatorische Prozesse, wie sie unter anderem durch die Ablagerung von Lipoproteinen in der Gefäßwand verursacht werden, begünstigen die Thrombozytenadhäsion und induzieren die VCAM-1-Expression. In einer frühen Phase der Arterioskleroseentstehung sammeln sich Lipoprotein-Partikel in der arteriellen Intima an. Durch Oxidationsprozesse entstehen oxidierte Phospholipide und kurzkettige Aldehyde. Diese Verbindungen können über einen Nuclear-factor- κ B-(NF- κ B-)vermittelten Stoffwechselweg die transkriptionale Aktivierung des VCAM-1-Gens induzieren.¹³³ Auch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1b oder TNF α können auf dem gleichen Weg die VCAM-1-Expression induzieren und sind in arteriosklerotischen Läsionen vermehrt nachweisbar.¹⁷

Nach der Adhäsion an das Endothel dringen die Leukozyten in die Intima ein. Für diese Migration wurde neben weiteren Chemokinen, die die Leukozyteninfiltration begünstigen, das MCP-1¹³⁴ als Hauptstimulus identifiziert, dessen Sekretion wiederum von aktivierten Thrombozyten induziert wird.^{135;136}

Durch die eingewanderten inflammatorischen Zellen werden die Entzündungsprozesse in der Gefäßwand weiter aufrechterhalten. In den aktivierten Leukozyten wie auch in den Zellen der Gefäßwand induziert dies die Freisetzung unterschiedlichster Mediatoren, darunter verschiedene Wachstumsfaktoren, die die glatten Gefäßmuskelzellen zur Proliferation und zur Ausbildung einer dichten extrazellulären Matrix anregen.¹²² So entstehen aus

den frühen Läsionen die charakteristischen arteriosklerotischen Plaques, die dauerhaft zur Einengung des Gefäßlumens führen.

1.4 Therapeutische Möglichkeiten

Zur Therapie der verminderten NO-Bioverfügbarkeit sind prinzipiell drei Methoden denkbar: Die Substitution von NO durch Zufuhr von NO-Donoren, die Verstärkung des NO-Signals durch Aktivierung des Zielenzym sGC oder die Hemmung des Abbaus von cGMP.¹³⁷

Exogene NO-Donoren wie z.B. organische Nitrate sind vor allem zur kurzfristigen und akuten Therapie gut geeignet, haben bei einer dauerhaften Therapie aber viele Nachteile. Dazu zählt vor allem die Toleranzentwicklung gegenüber Nitraten, die bei wiederholter Gabe schnell auftritt.¹³⁸

Der Versuch, das cGMP-Signal durch Hemmung der Phosphodiesterase zu verstärken, ist vor allem in Zuständen mit erhöhtem oxidativem Stress – wie beim Diabetes mellitus – nicht ausreichend wirksam. Um von NO aktiviert zu werden und in der Folge cGMP zu produzieren, muss das Eisen-Ion in der Häm-Gruppe der sGC zweiwertig sein (Fe^{2+}). Reaktive Sauerstoffspezies können das Eisenion oxidieren und in den dreiwertigen Zustand (Fe^{3+})

überführen. Eine basale Aktivität des Enzyms bleibt dann zwar noch erhalten, aber eine Aktivierung durch NO ist nicht mehr möglich und das cGMP-Restsignal ist bereits stark vermindert.¹³⁹

In jüngster Zeit sind daher Substanzen, die die sGC unabhängig von ihrer Häm-Gruppe aktivieren können, besonders in den Vordergrund getreten, da sie den NO/cGMP-Signalweg potent verstärken.¹⁴⁰ Eine dieser Substanzen ist HMR1766, ein Derivat der Anthranilsäure, das seit neuestem auch als Ataciguat

bezeichnet und vermarktet wird (Abb. 3). HMR1766 ist ein neuer sGC-Aktivator, der vornehmlich die nicht mehr NO-sensitive, oxidierte Form der sGC

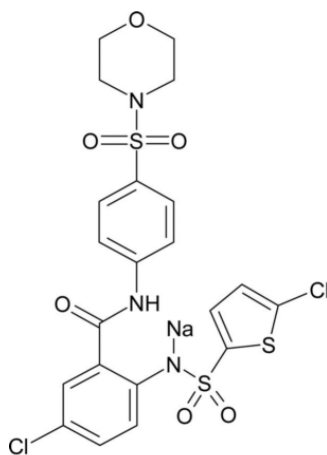


Abbildung 3: Strukturformel des Anthranilsäurederivates HMR1766 (nach Schindler, Mol Pharmacol, 2006)

aktiviert.¹⁴¹ Hieraus ergeben sich viele denkbare therapeutische Einsatzbereiche für diese neue Substanz. Eine Therapie mit HMR1766 könnte eine effektive Therapie darstellen, um bei Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, Herzinsuffizienz oder Diabetes mellitus das endogene NO/cGMP-Signal zu verstärken.¹³⁷

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer chronischen HMR1766-Therapie auf die vaskuläre Dysfunktion in einem diabetischen Tiermodell untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltungsbedingungen

Für die Versuche wurden ausnahmslos männliche Wistar-Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) verwendet. Sie hatten zu Versuchsbeginn ein Körpergewicht (KG) von 250 bis 300 g. Die Tierhaltung erfolgte unter kontrollierten Umgebungsbedingungen. Im Tierstall herrschte eine Raumtemperatur von 20°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 %. Die Raumbeleuchtung unterlag einem festen 12-Stunden-Rhythmus mit Licht ab 7 Uhr und Dunkelheit ab 19 Uhr. Jeweils maximal fünf Tiere wurden in einem Standard-Rattenkäfig mit Hochdeckel und Standard Ratten-Einstreu gehalten. Als Futter standen den Tieren eine Standard-Haltungsdiät (Altromin Spezialfutter GmbH, Lage) und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

2.2 Induktion des Diabetes mellitus

Durch Zerstörung der Pankreasinseln mit einer hochdosierten intravenösen Einzelgabe von Streptozotocin (STZ, 50 mg/kgKG) unter Isoflurannarkose (Forene[®], Abbot GmbH&Co. KG, Wiesbaden; Verdampfer VAPRO 19.3 von Dräger, Lübeck) wurde eine dauerhafte Hyperglykämie induziert. Für die Applikation wurde STZ (10 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) in sterilem Natriumcitratpuffer (25 mM, pH 4,5) angesetzt und innerhalb von 10 Minuten sofort verwendet. Eine gleiche Anzahl von Tieren erhielt als Kontrollgruppe nur eine Injektion von Citratpuffer.

Zum Hyperglykämienachweis wurde der Blutzuckerspiegel zwei und vier Wochen nach der STZ-Injektion mit einem Blutzuckermessgerät (Ascensea Elite, Bayer-Vital GmbH, Leverkusen) aus 2 µl Blut der Schwanzvene bestimmt. Eine ausreichende Hyperglykämie wurde angenommen, wenn bei beiden Messungen dieser Gelegenheitsblutzuckerwert größer als 20 mmol/L (entsprechend etwa 360 mg/dl) war. Wurde dieser Wert bei einer der

Messungen nicht erreicht, wurde das entsprechende Tier aus der Studie ausgeschlossen.

2.3 Behandlung mit HMR1766 und Isoniazid

Zwei Wochen nach der STZ-Injektion wurden die diabetischen Tiere randomisiert, der Behandlungsgruppe oder der Placebogruppe zugeordnet und für 14 Tage zweimal täglich im Abstand von 12 Stunden per Schlundsonde mit HMR1766 (zweimal täglich 10 mg/kgKG, Sanofi-Aventis, Frankfurt/Main) beziehungsweise mit Placebo behandelt. Das als Trockensubstanz vorliegende HMR1766 wurde mit Gummi arabicum und Aqua destillata in Suspension gebracht und körperrgewichtsadaptiert appliziert. Die letzte Dosis wurde jeweils am Vorabend des geplanten Versuchs gegeben, um akute Effekte der Substanz auszuschließen.

Für die Versuche mit Isoniazid wurden nicht-diabetische Tiere ebenfalls randomisiert und der Behandlungs- bzw. Placebogruppe zugeordnet. Sie erhielten unter Isoflurannarkose einmal täglich über fünf Tage eine intraperitoneale, gewichtsadaptierte Injektion von 200 mg/kgKG Isoniazid-Injektionslösung (tebesium[®]-s-250 mg, Riemser Arzneimittel AG, Greifswald) oder steriler NaCl-Lösung.

2.4 Gefäßpräparation und Probengenerierung

Für die vaskulären Messungen wurde die Aorta thoracalis der Wistar-Ratten verwendet. Nach Einleitung einer terminalen Anästhesie mit Isofluran wurden Thorax und Abdomen eröffnet. Nach Entfernung von Herz, Lunge und Ösophagus wurde die Aorta thoracalis bis zum Zwerchfell dargestellt. Der Aortenbogen wurde durchtrennt und die Aorta bis zum Diaphragma unter Vermeidung von Druck oder Zug vorsichtig von der Wirbelsäule abpräpariert. Die Gefäße wurden in 4°C kalte Krebs-Henseleit-Lösung (NaCl 118,4 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂ 1,6 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, Glukose 11,1 mM, Diclofenac 1 µM, pH 7,4) gelegt und intraluminal

durchgespült, um verbliebenes Blut aus dem Lumen zu entfernen. Unter einem Mikroskop wurde die Aorta schonend von umliegendem Fett- und Bindegewebe freipräpariert und in drei Millimeter breite Ringe geschnitten. Für weitere Analysen wurden je Aorta einige Proben zum einen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C eingelagert, zum anderen in TissueTek® (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und für spätere Analysen ebenfalls bei -20°C aufbewahrt. Darüber hinaus wurde von einigen STZ-behandelten Tieren und von einigen Kontrolltieren auch die Aorta thoracalis *in toto* für weitere Versuche in flüssigem Stickstoff konserviert.

2.5 Vaskuläre Reaktivitätsmessungen im Organbad

2.5.1 Versuchsanordnung

Die Aortenringe wurden im Organbad (Föhr-Medical-Instruments, Seeheim) in mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Kammern (5 ml) untersucht (Abb. 4).



Abbildung 4: Organbadapparatur mit acht parallelen Organkammern, zentraler Pufferversorgung und Begasung.

Die Pufferlösung (37°C, pH 7,4) wurde während der Versuchsdurchführung ständig mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast.

In jeder Kammer gab es eine feste und eine bewegliche, mit einem isometrischen Kraftaufnehmer (Scaime SAS, Annemasse, Frankreich) verbundene Aufhängeeinrichtung für die Gefäßringe. Zwischen diesen beiden Drähten wurde das Gefäß fest eingespannt (Abb. 5).



Abbildung 5: Die beiden Drähte zur Aufnahme des Aortenrings mit Detailansicht einer aufgespannten Aorta in einer Organkammer.

Die Tonusänderungen wurden über einen DC-Brückenmessverstärker (MIO-05xx, Föhr-Medical-Instruments, Seeheim) direkt an den PC übertragen und über eine Software (VitrodatWin, Föhr-Medical-Instruments, Seeheim) auf dem PC-Monitor als Kurven dargestellt.

2.5.2 Versuchsprotokolle

Zu Versuchsbeginn wurden die Rattenaorten in den Organkammern unter Erhaltung des Endothels wie oben beschrieben und wie in Abbildung 5 dargestellt aufgehängt. Danach wurde über 30 Minuten eine passive Vorspannung auf 2 g angelegt. Die Versuchsaufzeichnung begann nach Erreichen eines stabilen Äquilibrium durch Zugabe verschiedener Substanzen in die Organkammern, entsprechend des jeweilig angewandten Protokolls.

Bei allen Versuchsprotokollen wurden die Gefäßringe zunächst auf Funktion und Unversehrtheit der Muskelschicht und des Endothels überprüft. Dazu wurden die Ringe mehrfach mit Kaliumchlorid (50 mM und 100 mM) kontrahiert, bis reproduzierbare Kontraktionen erreicht wurden. Anschließend erfolgte eine

Kontraktion mit Phenylephrin (1 μM). Nach Ausbildung einer stabilen Phenylephrin-Kontraktion wurde mit Acetylcholin (1 μM) eine Dilatation eingeleitet. Nach gründlichem Auswaschen und Wiedererreichen der stabilen Ausgangslage wurden die folgenden Versuchsprotokolle angewendet.

2.5.2.1 Kontraktionsprotokolle

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (WK) der Vasokonstriktoren wurden durch Zugabe kumulativer Einzelkonzentrationen ermittelt. Nach jeder Gabe wurde das Erreichen eines stabilen Kontraktionsplateaus abgewartet, bevor die nächste Konzentration eingestellt wurde.

Für die Phenylephrin-WK wurde die Phenylephrin-Konzentration in den Organkammern beginnend mit 0,001 μM bis 10 μM stetig gesteigert. Um die Beeinflussung der Kontraktion durch überschießende endogene NO-Bildung auszuschließen, wurde die Phenylephrin-WK zusätzlich auch in Anwesenheit des NO-Synthase-Inhibitors N^G-Nitro-L-Arginin (L-NNA) durchgeführt. Dazu wurden die Aortenringe vor Beginn der Phenylephringabe für 45 Minuten mit L-NNA (100 μM) inkubiert.

Für die Angiotensin II-WK wurde die Konzentration in den Organkammern von 1 nM bis 1 μM gesteigert, Endothelin-1 wurde in Dosen von 1 nM bis 100 nM verwendet.

Nach Erreichen der jeweiligen Zielkonzentration wurde ein stabiles Plateau abgewartet und die Organkammern anschließend gründlich mit Krebs-Henseleit-Puffer gespült, um die Vasokonstriktoren zu eliminieren. Danach wurde die spontane Relaxation der Ringe bis zum Erreichen der Ruhelage abgewartet, bevor gegebenenfalls weitere Protokolle angewendet wurden.

2.5.2.2 Relaxationsprotokolle

Die Relaxationsstudien wurden im Organbad mit kumulativen Einzeldosen von Acetylcholin und DEA NONOate (2-(N,N-Diethylamino)-diazennitrat-2-oxid diethylammoniumsalz) durchgeführt. Dazu erfolgte – ausgehend von der

Ruhelage der Gefäße – zunächst eine Vorkontraktion der Aortenringe mit Phenylephrin auf vergleichbare Kontraktionslevel (Acetylcholin: Kontrolle: 1,45 g ± 0,06 g, STZ Placebo: 1,45 g ± 0,28 g; STZ HMR1766: 1,47 g ± 0,03 g; DEA NONOate: Kontrolle: 2,02 g ± 0,11 g, STZ Placebo: 2,04 g ± 0,12 g; STZ HMR1766: 2,07 g ± 0,05 g). Nachdem ein stabiles Plateau erreicht war, wurde für die Endothel-abhängige Relaxation Acetylcholin in steigender Konzentration von 0,1 nM bis 10 µM zugegeben, für die Endothel-unabhängige Relaxation wurden ansteigende DEA NONOate-Konzentrationen von 0,1 nM bis 10 µM erzeugt. Die nächsthöhere Konzentration wurde jeweils nach Erreichen eines Relaxationslevels eingestellt.

2.5.2.3 Protokoll zur Messung der Dehnungs-induzierten NO-Bildung

Zur Messung der durch Schubspannung induzierten NO-Freisetzung wurden die Aortenringe nach gründlichem Ausspülen und einer kurzen Ruhephase mit kleinen Dosen von Phenylephrin auf ~20 % ihrer Maximalkontraktion gebracht. Nach Erreichen dieser Vorkontraktion wurde L-NNA (100 µM) zugegeben und für 45 Minuten inkubiert. Die Höhe der dadurch entstehenden Vasokontraktion wurde als Marker der physiologischen, durch Dehnung induzierten, Calcium-unabhängigen NO-Bildung gemessen.¹⁴²

2.6 Superoxidbestimmung in Aortensegmenten

Die vaskuläre Superoxidanionenbildung wurde zum einen mittels Lucigenin-verstärkter Chemolumineszenz gemessen. Die Lichtreaktion zwischen Superoxidanionen und Lucigenin (5 µmol/l) wurde mit einem Luminometer (Wallac, Freiburg) bestimmt, während die Aortenringe in einem HEPES-modifiziertem Krebs-Puffer (pH 7,4) inkubiert waren. Die spezifische Chemolumineszenz wurde als Zählrate pro Minute (counts per minute) pro Milligramm Trockengewicht des Gewebes (cpm/mg) ausgedrückt.

Die Evaluation der *in situ* Produktion von Superoxidanionen erfolgte mit Hilfe des oxidativen Fluoreszenzfarbstoffs Dihydroethidin (DHE). Die unfixierten,

gefrorenen Aortenringe wurden dazu in 10 µm dicke Schnitte geteilt und auf einen Objektträger gelegt. Den Gewebeschnitten wurde topisch DHE (2 µmol/l) zugegeben. Danach wurden sie bedeckt und für 30 Minuten in einer lichtgeschützten, angefeuchteten Kammer bei 37°C inkubiert. Die Bilder wurden mittels eines mit einem Krypton/Argon-Laser ausgestatteten Bio-Rad MRC 1024 konfokalen Laserscan-Mikroskops gewonnen. Die Fluoreszenz wurde unter Nutzung eines 585-nm-long-pass-Filters bestimmt. Die Aortenringe der diabetischen Tiere und das Kontrollgewebe wurden parallel bearbeitet und abgebildet. Die Lasereinstellungen waren dabei für die Bildergewinnung aller miteinander verglichenen Proben identisch.

Des Weiteren wurde die Superoxidproduktion nach dem Verfahren von Fink et al. durch High-performance liquid chromatography (HPLC) bestimmt.¹⁴³ Dazu wurden die gefrorenen Aortenstücke zunächst für 30 Minuten in HEPES-Puffer bei 37°C im Bewegungsbad mit Dihydroethidium inkubiert. Anschließend wurden die Aortenringe in Kaffeesäure homogenisiert und die entstehende Suspension bei 14.000 g für zehn Minuten zentrifugiert. Im Überstand wurde mittels HPLC (Pharmacia LKB HPLC Pump 2248, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) das Oxyethidium gemessen und auf den Peak der als interne Kontrolle verwendeten Kaffeesäure bezogen. Zur Normalisierung auf die jeweilige Proteinmenge wurde das beim Zentrifugieren übrig gebliebene Pellet mit NaOH (1 M) über 24 Stunden denaturiert und die enthaltene Proteinkonzentration anschließend im Photometer (Ultrospec 3100pro, Biochrom Ltd., Cambridge, England) bei 595 nm gemessen.

2.7 Tandem-Massenspektrometrie

Ein LC-MS/MS-System verbindet zwei verschiedene Techniken, die beide schon seit langem als sehr exakte Analyseverfahren eingesetzt werden: eine analytische HPLC wird mit einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) gekoppelt. Durch das Massenspektrometer wird ein weiteres Trennverfahren mit der HPLC kombiniert, so dass eine hochsensitive Analysemethode entsteht.

Zur Bestimmung von 20-HETE (20-Hydroxyeicosatetraensäure) wurde jeweils eine gesamte Aorta homogenisiert und in 100 µl Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,2) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 15 Minuten bei 37°C mit NaOH (10 N) hydrolysiert, dann mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert und schließlich wurde ein deuterierter Vergleichsstandard (20-HETE-d6) hinzugefügt. Im Anschluss wurde zweimal eine Flüssigkeitsextraktion mit 0,5 ml Ethylacetat durchgeführt. Unter Vakuumbedingungen wurde unter einem leichten Stickstoffgaseinstrom das Lösungsmittel abgedampft und die Proben mit 50 µl einer Methanol-Wasser-Lösung (1:1, v/v) rekonstituiert. 20-HETE wurde dann mit einem Sciex API4000 Massenspektrometer (API4000; MDS Sciex, Concord, ON, Kanada) im MRM-(multiple reaction monitoring-) Modus bestimmt. Die chromatographische Auftrennung wurde in einer Gemini-C18-Säule (150 x 2 mm I.D., 5-µm Partikelgröße, Phenomenex, Aschaffenburg) durchgeführt.

2.8 Microarray-Analyse

Zur Analyse wurde die RNA aus dem Aortengewebe mit dem mirVana™ miRNA isolation kit (Ambion, Applied Biosystems, Austin, Texas, USA) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Nach Quantifizierung der RNA mittels UV-

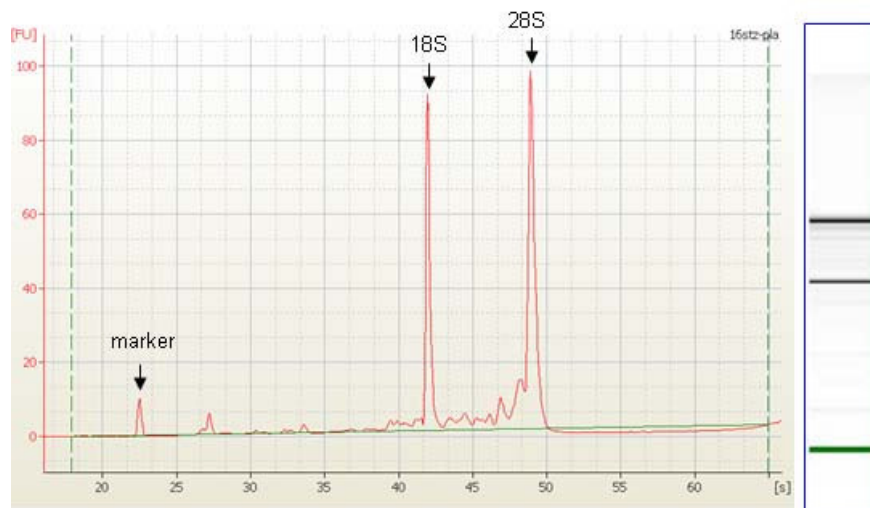


Abbildung 6: Typisches Beispiel der RNA-Analyse mit dem Bioanalyzer 2100

Spektrophotometrie wurde ihre Qualität mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Böblingen) beurteilt (Abb. 6).

Die RNA-Proben wurden in biotinylierte cRNA umgewandelt und mit dem Affymetrix GeneChip[®] Rat Expression Array 230 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, Kanada) gemäß den Herstellerangaben hybridisiert. In der Erststrang-cDNA-Synthese wurde 2 µg Gesamt-RNA zuerst mit Hilfe eines T7-Oligo(dT)-Primers umgeschrieben. Im Anschluss an die Rnase-H-vermittelte Zweitstrang-cDNA-Synthese wurde die doppelsträngige cDNA aufbereitet und diente als Matrize in der nachfolgenden *in vitro* Transkription. Diese Reaktion wiederum wurde in Gegenwart der T7-RNA-Polymerase und eines biotinylierten Ribonukleotid-Gemisches durchgeführt für die komplementäre RNA (cRNA)-Vervielfältigung und Biotin-Markierung. Die biotinylierten cRNAs wurden anschließend gereinigt, fragmentiert und in GeneChip[®] Rat Expression Array 230 2.0 hybridisiert. Diese Untersuchungsreihe wurde mit Streptavidin-Phykoerythrin-Konjugat gefärbt und mit dem GeneArray[®] Scanner gelesen. Die Microarray-Datenanalyse wurde unter Verwendung von R-packages von Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>), einer open-source-software für Bioinformatik, durchgeführt.

2.9 Immunoblotting

Zur Western-Blot-Analyse wurden die Rattenaorten in eiskaltem Trispuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 1% Natriumcholat, 1% Triton-X-100, 0,025% SDS und 250 mM Sucrose) homogenisiert. Bei 4°C und 8000 g wurden die homogenisierten Aorten für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem blauen Muster-Beladungspuffer (#7722, Cell Signaling Technology, Inc., Denver, USA) gemischt und unter Reduktionsbedingungen auf 15 % Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Polyvinylidindifluorid-Membran (Immun-Blot 0.2 µm, Bio-Rad, München) elektrotransferiert. Die entstandenen Banden wurden mit einem Chemilumineszenz-Assay (ECL, Amersham, München) detektiert.

2.10 Statistik

Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind alle Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. „n“ repräsentiert die Anzahl unterschiedlicher Experimente bzw. die Anzahl unterschiedlicher Gefäßringe in den Organbadexperimenten. Die Kontraktionen und Relaxationen der Gefäße wurden in Gramm registriert und die Relaxation prozentual zur Vorkontraktion angegeben. Die Kurvenanpassung der graphischen Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism[®] V4.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Kramer multiple-comparisons-Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

2.11 Substanzen

Alle Chemikalien – soweit im Folgenden nicht anders bezeichnet – wurden im höchsten verfügbaren Reinheitsgrad von Sigma, Deisenhofen, bezogen.

HMR1766: Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main; Isofluran (Forene[®]): Abbot GmbH&Co. KG, Wiesbaden; DEA NONOate (2-(N,N-Diethylamino)-diazonol-2-oxid diethylammoniumsalz): ALEXIS Biochemicals, AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach; TissueTek[®]: Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande; 20-HETE: Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA; Isoniazid (tebesium[®]-s-250 mg): Riemser Arzneimittel AG, Greifswald

3. Ergebnisse

3.1 Schubspannungsvermittelte NO-Bioverfügbarkeit

Da NO ein sehr kurzlebiges Molekül ist, gestaltet sich der direkte und exakte Nachweis der tatsächlichen NO-Bioverfügbarkeit schwierig. Man bedient sich daher indirekter Nachweismethoden, die zum Beispiel über die Analyse des NO/cGMP-Signalweges Aussagen über die NO-Freisetzung ermöglichen.

Eine Möglichkeit zum indirekten NO-Nachweis ist die Ausnutzung des Zusammenhangs zwischen Schubspannung und NO-Produktion: *In vitro* wird die eNOS durch isometrische Kontraktion isolierter Aortenringe aktiviert.¹⁴² Dies geschieht über die gleiche intrazelluläre Signalkaskade, die *in vivo* durch die luminale Schubspannung zur eNOS-Aktivierung führt.¹⁴² Diese Gegebenheit wurde in der vorliegenden Arbeit zur indirekten Quantifizierung der NO-Synthese infolge physikalischer Stimuli im Organbad genutzt: Isolierte Aortenringe wurden mit Phenylephrin auf ~20%¹⁴² ihrer Maximalkontraktion vorkontrahiert und anschließend mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NNA (100 µM) behandelt. Daraufhin kam es – ausgelöst durch die Wegnahme des zuvor freigesetzten Stickstoffmonoxides – zur Vasokonstriktion. Die zusätzliche Kontraktion kann demzufolge als Maß für die durch isometrische Kontraktion mit Phenylephrin erfolgte NO-Freisetzung herangezogen werden.¹⁴² In Abbildung 7

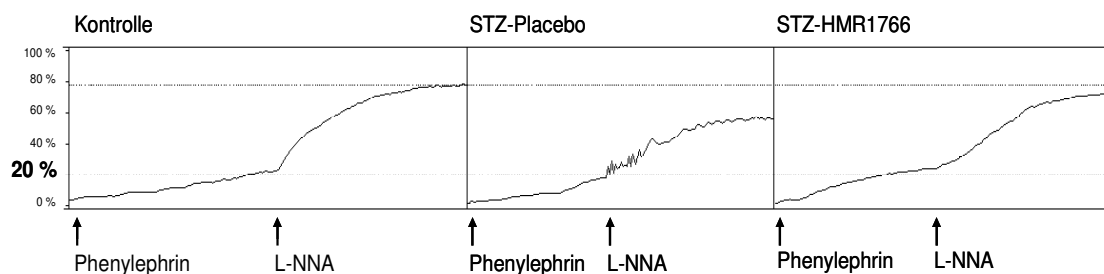


Abbildung 7: Typische Originalregistrierungen der L-NNA-Wirkung auf mit Phenylephrin vorkontrahierte isolierte Rattenaortenringe aller drei Behandlungsgruppen. Durch schrittweise Konzentrationssteigerung von Phenylephrin wurde eine Kontraktion erreicht, die jeweils 20% der zuvor bestimmten Maximalkontraktion entsprach. Nach Erreichen dieser 20% wurde mit L-NNA die NO-Synthase gehemmt, was sich durch die zusätzliche Kontraktion zeigt. Zum Vergleich sind Ausschnitte aller drei Behandlungsgruppen nebeneinander dargestellt.

sind für dieses Experiment typische Originalregistrierungskurven aus dem Organbad dargestellt. Fasst man die Ergebnisse für alle nach diesem Protokoll behandelten Gefäße zusammen (Abb. 8), zeigt sich eine deutlich abgeschwächte Kontraktionsantwort auf N^G-Nitro-L-Arginin in der Gruppe der mit Placebo behandelten diabetischen Tiere. Die Aortenringe der mit HMR1766 behandelten Tiere zeigten dagegen eine vergleichbar starke Vasokonstriktion wie die Gefäßringe gesunder Kontrolltiere.

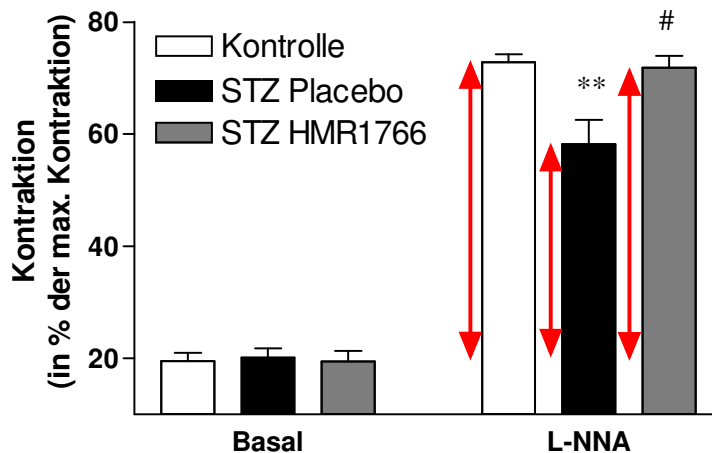


Abbildung 8: NO-Bioverfügbarkeit, indirekt gemessen als zusätzliche Vasokonstriktion nach Zugabe des NOS-Inhibitors L-NNA (100 µM) auf vorkontrahierte Aortenringe (~20% Vorkonstriktion) bei gesunden Kontrolltieren im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten. Die jeweilige zusätzliche Kontraktion ist durch rote Pfeile besonders kenntlich gemacht. ** p<0,001 vs. Kontrolle; # p<0,05 vs. STZ Placebo
n (Kontrolle): 23; n (STZ Placebo): 15; n (STZ HMR1766): 10

Da die Kontraktionshöhe in diesem Modell ein Maß für die NO-Bioverfügbarkeit ist, liegt der Schluss nahe, dass bei den diabetischen Tieren erheblich weniger NO freigesetzt wurde als bei den gesunden Tieren und dass die Therapie mit HMR1766 die NO-Bioverfügbarkeit signifikant erhöht hat.

3.2 Agonisten-vermittelte Relaxationsstudien

3.2.1 Endothel-abhängige Relaxation

Neben der endothelialen NO-Freisetzung durch isometrische Dehnung wurde auch die durch Agonisten vermittelte NO-Produktion und die Sensitivität der

Aorten gegenüber Stickstoffmonoxid untersucht. Hierzu wurden isolierte Aortenringe zunächst mit Phenylephrin auf vergleichbare Vorkontraktionslevel gebracht. Anschließend wurde zur Untersuchung der Endothel-abhängigen Relaxation Acetylcholin in ansteigender Konzentration zugegeben. In Abbildung 9 sind typische Organbadkurven dieses Versuches dargestellt.

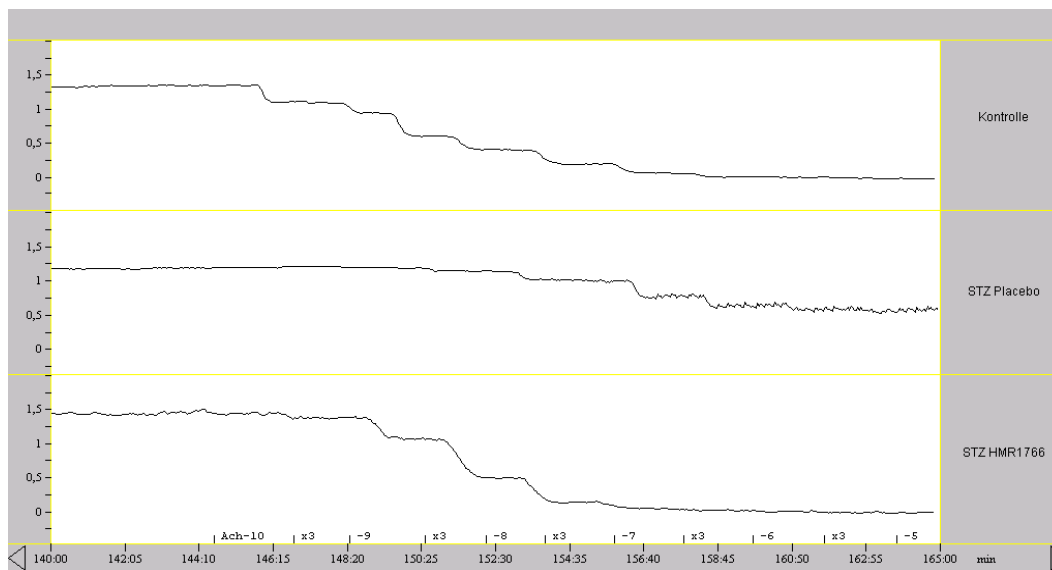


Abbildung 9: Typische Originalregistrierung aus dem Organbad. Dargestellt ist der Effekt ansteigender Acetylcholin-Konzentrationen auf mit Phenylephrin vorkontrahierte Aortenringe. Untereinander sind die Relaxationskurven isolierter Aortenringe von gesunden Kontrolltieren im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten dargestellt.

Aus den gewonnenen Daten wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin erstellt (Abb. 10). Die Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation führte bei den diabetischen Tieren auch bei maximaler Konzentration des Agonisten nicht zur vollständigen Gefäßrelaxation: Es bestand also eine deutliche endotheliale Dysfunktion, denn trotz gleicher Acetylcholin-Konzentration erfolgte eine geringere und spätere Relaxation. Durch die Behandlung mit HMR1766 wurde das NO-Signal wie erwartet verstärkt und das Relaxationsverhalten normalisierte sich sogar fast vollständig. In Tabelle 1 ist die halbmaximale Effektivkonzentration (EC_{50}) für Acetylcholin dargestellt. Die EC_{50} bezeichnet die Acetylcholin-Konzentration, die 50 % des maximalen Relaxationseffektes auslöst.

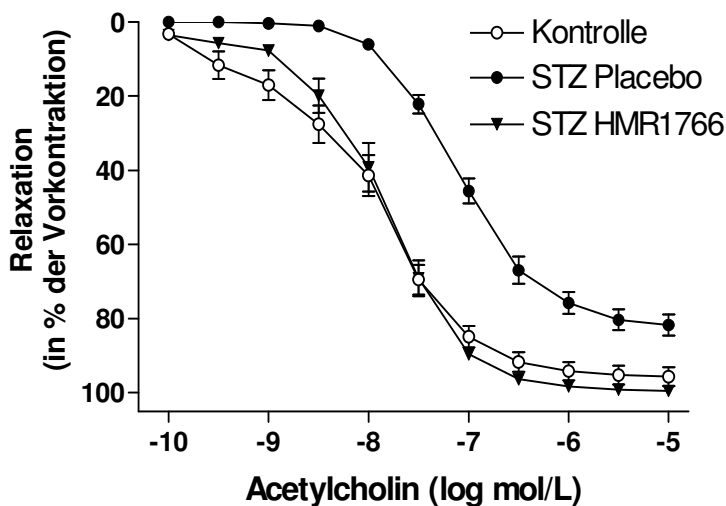


Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Endothel-abhängigen Relaxation mit Acetylcholin. Isolierte Aortenringe gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten. Vor dem Beginn der Relaxation wurden die Gefäße aller Behandlungsgruppen mit Phenylephrin gleich stark vorkontrahiert. n (Kontrolle): 36; n (STZ Placebo): 26; n (STZ HMR1766): 13

Agonist	Vorkontraktion	Behandlung	EC ₅₀ (nmol/L)	R _{max} (%)
Acetylcholin	Phenylephrin	Kontrolle	20,6±3,4	95,7±2,5
Acetylcholin	Phenylephrin	STZ Placebo	158±44,1**	81,7±2,8**
Acetylcholin	Phenylephrin	STZ HMR1766	17,3±1,9##	99,5±0,2##

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Konzentration von Acetylcholin, die nötig ist, um 50 % der maximalen Wirkung auszulösen. Diese Konzentration wird auch als halbmaximale Effektivkonzentration (EC₅₀) bezeichnet. R_{max} entspricht der maximalen Relaxation in % der Vorkontraktion, die mit Acetylcholin erreicht wurde. ** p<0,001 vs. Kontrolle; ## p<0,001 vs. STZ Placebo

3.2.2 Endothel-unabhängige Relaxation

Die Substanz DEA NONOate besitzt eine funktionelle [N(O)NO]⁻-Gruppe und gehört damit chemisch zu den Diazeniumdiolaten. Diese Substanzen finden in der Forschung breite Anwendung, da viele von ihnen in wässrigem Medium spontan zerfallen und dabei NO freisetzen.¹⁴⁴ In der vorliegenden Arbeit wurde DEA NONOate als NO-Donor eingesetzt, um die Endothel-unabhängige

Relaxation im Organbad zu überprüfen. Dazu wurden isolierte Aortenringe mit Phenylephrin auf gleiche Level vorkontrahiert und nach Erreichen eines stabilen Plateaus mit DEA NONOate in ansteigender Konzentration behandelt.

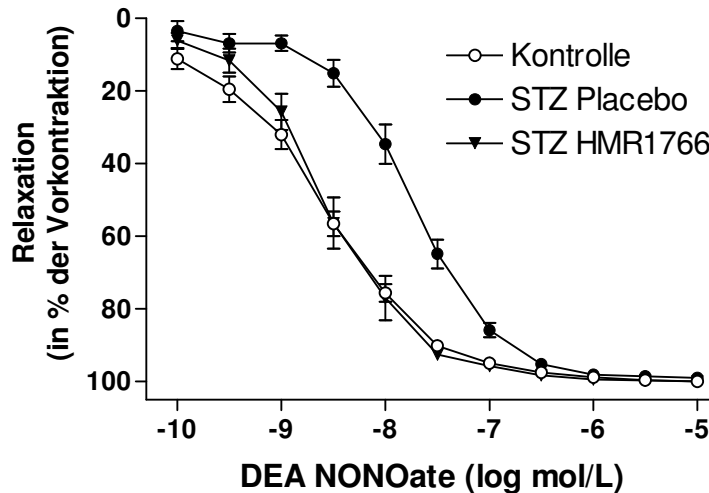


Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Endothel-unabhängigen Relaxation mit dem exogenen NO-Donor DEA NONOate. Isolierte Aortenringe gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten. Vor dem Beginn der Relaxation wurden die Gefäße aller Behandlungsgruppen mit Phenylephrin gleich stark vorkontrahiert. n (Kontrolle): 15; n (STZ Placebo): 24; n (STZ HMR1766): 12

Die Relaxationskurve der Aortenringe der diabetischen, mit Placebo behandelten Tiere zeigt eine deutliche Rechtsverschiebung im Vergleich zur Kurve der Kontrollgruppe (Abb. 11). Dies spricht für eine Desensitivierung der glatten Muskulatur gegenüber NO beziehungsweise für eine vermehrte NO-Inaktivierung in der Gefäßwand. Auch in der Placebogruppe wird eine vollständige Relaxation erreicht, was sich aus dem exogenen NO-Überangebot erklärt. Der Effekt der Behandlung mit HMR1766 ist in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve klar erkennbar: Unter dem GC-Aktivator ist keine Rechtsverschiebung mehr nachweisbar, der Kurvenverlauf hat sich fast vollständig der Kontrollkurve angepasst. Tabelle 2 verdeutlicht anhand der signifikant höheren EC_{50} -Werte nochmals das spätere Ansprechen auf NO unter Placebothherapie sowie den Effekt von HMR1766.

Agonist	Vorkontraktion	Behandlung	EC ₅₀ (nmol/L)	R _{max} (%)
DEA-NONOate	Phenylephrin	Kontrolle	2,8±0,4	100,0±0,0
DEA-NONOate	Phenylephrin	STZ Placebo	20,6±3,2**	99,0±0,7
DEA-NONOate	Phenylephrin	STZ HMR1766	3,8±0,7##	100,0±0,0

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der EC₅₀ und der maximalen Relaxation (R_{max}) für DEA NONOate in vorkontrahierten Rattenaorten aller Behandlungsgruppen.

** p<0,001 vs. Kontrolle; ## p<0,001 vs. STZ Placebo

3.3 Vaskuläre Sauerstoffradikale

Eine der wichtigsten Ursachen für die reduzierte Sensitivität gegenüber NO und für die verstärkte NO-Inaktivierung beim Diabetes mellitus ist der oxidative Stress. Daher wurde weiter untersucht, wie sich die Therapie mit HMR1766 auf die Bildung von Sauerstoffradikale auswirkt.

3.3.1 Luminometrie

Ein schon lange etabliertes Verfahren zur Messung der Superoxidproduktion in der Aorta ist die Lucigenin-verstärkte Chemolumineszenz.^{145;146} Bei dieser Messmethode wird das Lucigenin durch Superoxidanionen zu einem Zwischenprodukt umgewandelt, bei dessen Zerfall Lichtquanten emittiert werden, die als Impulse pro Minute gemessen werden können.

Es wurden Aortenringe gesunder, diabetischer und HMR1766-behandelter Ratten untersucht und verglichen. In den diabetischen Gefäßen fand sich ein signifikant erhöhtes Lumineszenzsignal im Vergleich zu den gesunden Kontrollgefäßen. Die Behandlung mit HMR1766 wiederum führte – verglichen mit der Placebothherapie – zu einer signifikant abgeschwächten Lumineszenz, also zu einer Reduktion von oxidativem Stress (Abb. 12).

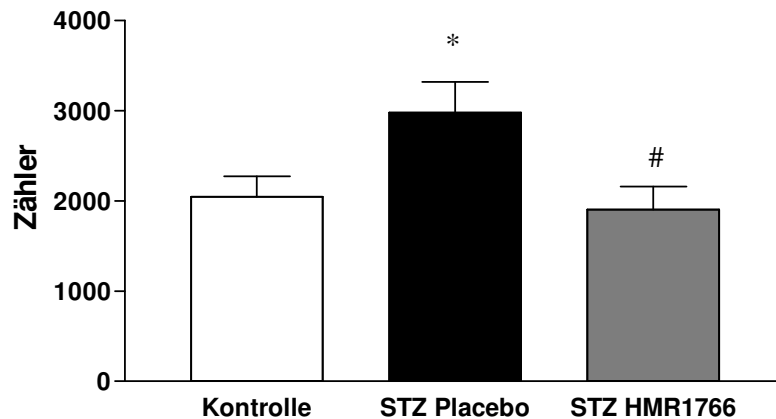


Abbildung 12: Superoxidproduktion in Aortenringen gesunder Ratten und diabetischer (STZ), mit Placebo oder HMR1766 behandelter Tiere, detektiert und quantifiziert durch Lucigenin-verstärkte Chemolumineszenz. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. STZ Placebo
n (Kontrolle): 22; n (STZ Placebo): 26; n (STZ HMR1766): 16

3.3.2 Fluoreszenz-Mikrotopographie

Zur Messung der *in situ* Produktion von Superoxid wurde der oxidative Fluoreszenzfarbstoff Hydroethidium (HE) benutzt.¹⁴⁷ HE durchdringt die Zellmembran und wird im Zytoplasma in Anwesenheit von O_2^- zu Ethidiumbromid oxidiert, welches sich durch Interkalation mit der DNA dort ablagert.¹⁴⁸ Die Stärke der entstehenden Fluoreszenz wurde in Aortenringen mittels konfokaler Lasermikroskopie gemessen und als Maß für die



Abbildung 13: Konfokale Mikroskopie von 10 μ m dicken Aortensegmenten, die zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hydroethidium inkubiert wurden, um die Superoxidbildung in der Gefäßwand sichtbar zu machen.

Superoxidproduktion quantifiziert. Visuell war die Hydroethidiumfluoreszenz in unbehandelten diabetischen Aortenringen stark erhöht (Abb. 13). Nach zweiwöchiger Behandlung mit HMR1766 nahm die Fluoreszenz in den Gefäßwänden wieder deutlich ab.

3.3.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Neben den oben beschriebenen Arten existieren noch einige andere Techniken zur Messung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Viele davon sind jedoch entweder nur mit großem Aufwand durchführbar, erlauben nur eine semiquantitative Auswertung der Ergebnisse oder sind nur bedingt geeignet, um z.B. intrazellulär gebildetes Superoxid zu messen.¹⁴³ Neuerdings etabliert sich jedoch eine weitere Methode: Es wurde entdeckt, dass Dihydroethidium mit O_2^- -Molekülen spezifisch zu Oxyethidium reagiert. Oxyethidium ist eine stabile Verbindung und wird proportional zur Superoxidproduktion aus Dihydroethidium gebildet. Da sich Oxyethidium im Molekulargewicht deutlich von Ethidium und Dihydroethidium unterscheidet, kann es mit HPLC exakt gemessen werden.¹⁴³

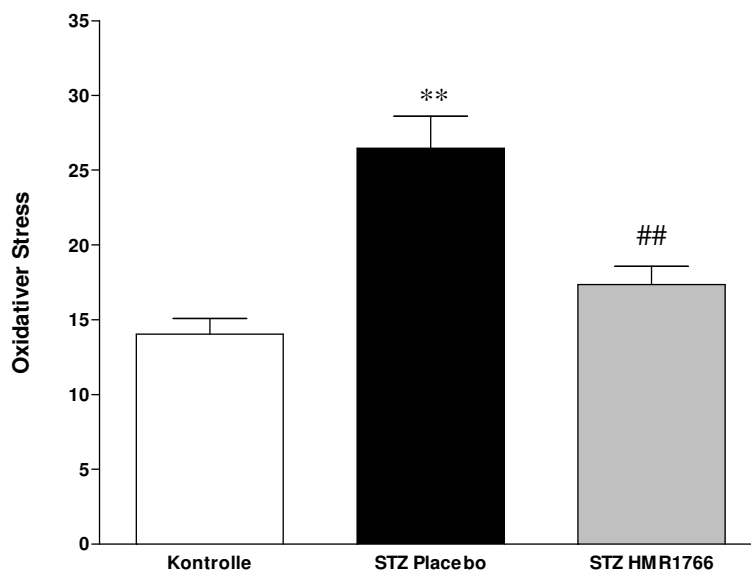


Abbildung 14: Superoxidmessung mittels HPLC. Die Oxyethidiumbildung wurde in homogenisiertem Aortengewebe gesunder Kontrollratten, sowie Placebo- und HMR1766-behandelter diabetischer (STZ-)Ratten gemessen. Dargestellt sind die Peakwerte für Oxyethidium aus der HPLC, normalisiert auf die Proteinmenge.

** p<0,001 vs. Kontrolle; ## p<0,001 vs. STZ Placebo
n (Kontrolle): 7; n (STZ Placebo): 6; n (STZ HMR1766): 9

Da diese Methode eine hohe Exaktheit und Spezifität verspricht, wurde sie in der vorliegenden Arbeit als zusätzliche Nachweismethode für Superoxid angewendet, auch um die mit Luminometrie und oxidativer Fluoreszenz-Mikrotopographie gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren.

Wie Abbildung 14 zeigt, konnte in diabetischen Gefäßen auch mittels HPLC eine deutliche Zunahme der Superoxidproduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch die in der Luminometrie bereits gezeigte signifikante Reduktion der Superoxidbildung durch chronische HMR1766-Therapie konnte mittels HPLC bestätigt werden.

3.3.4 NADPH-Oxidase als Superoxidquelle

Wie oben beschrieben gibt es bei Diabetes mellitus verschiedene Mechanismen, die zur Entstehung und Verstärkung von oxidativem Stress beitragen. In früheren Studien wurde demonstriert, dass im STZ-Diabetes-Modell die Aktivität der NADPH-Oxidase stark erhöht ist.^{14;149} Diese Beobachtung ging mit einem deutlichen Anstieg der mRNA der NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91^{phox} einher.¹⁴

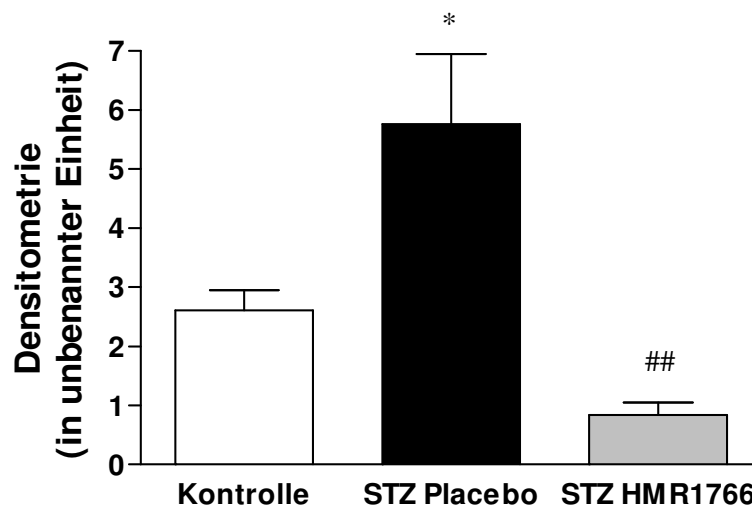


Abbildung 15: Die Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91^{phox} wurde mittels Western Blot ermittelt.

* p<0,05 vs. Kontrolle; ## p<0,001 vs. STZ Placebo

n (Kontrolle): 6; n (STZ Placebo): 6; n (STZ HMR1766): 6

Daher wurde der Zusammenhang zwischen erhöhter Superoxidbildung und der NADPH-Oxidase bei Diabetes mellitus auch hier weiter untersucht. Im Western Blot konnte eine signifikante Zunahme der Untereinheit gp91^{phox} in den diabetischen Gefäßen gefunden werden (Abb. 15). Die deutliche Herunterregulierung dieser Untereinheit bei den mit HMR1766 behandelten Tieren passt gut zum beobachteten Rückgang der Superoxidproduktion in der Gruppe der mit dem GC-Aktivator behandelten Tiere.

3.4 Kontraktionsstudien

3.4.1 Vasokonstriktoren im Organbad

Analog zu den Relaxationsstudien wurden im Organbad auch Versuche mit verschiedenen vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen durchgeführt. Zunächst wurde die Kontraktionsantwort der isolierten Aortenringe auf eine Einzelkonzentration von Kaliumchlorid (Abb. 16) und Phenylephrin (Abb. 17) untersucht.

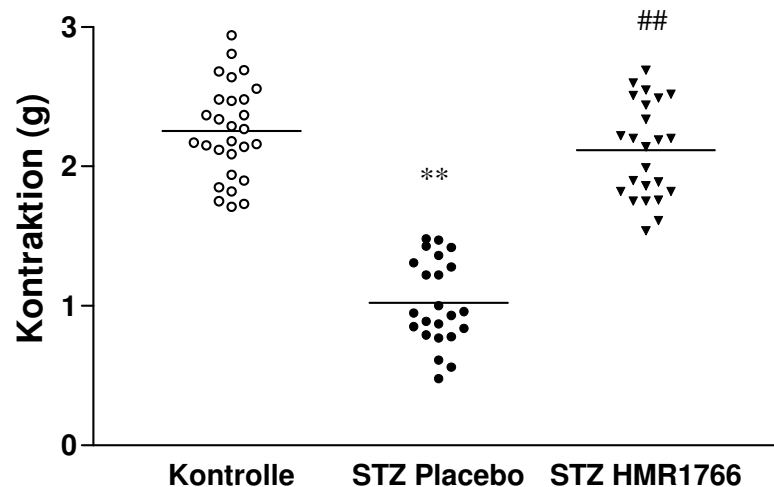
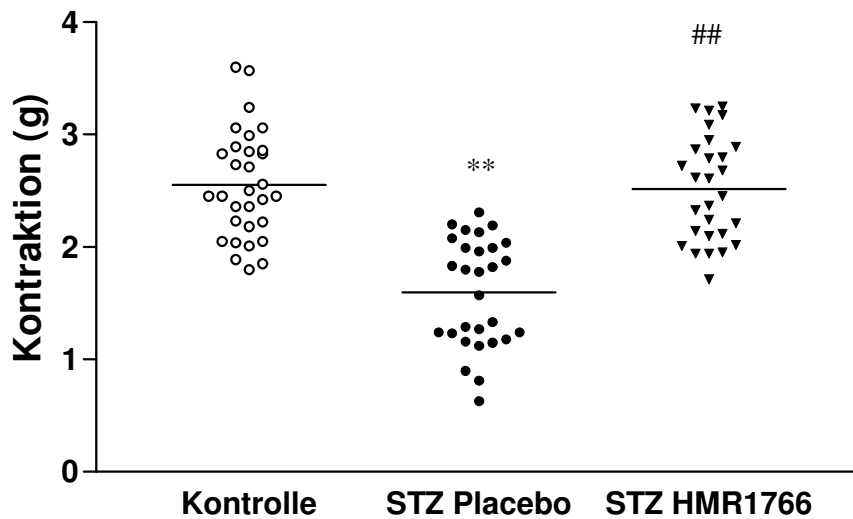


Abbildung 16: Kalium (100 mM)-induzierte Kontraktion isolierter Aortenringe gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten.

** p<0.001 vs. Kontrolle; ## p<0.001 vs. STZ Placebo
n (Kontrolle): 28; n (STZ Placebo): 23; n (STZ HMR1766): 24



**Abbildung 17: Phenylephrin (1 μ M)-induzierte Kontraktion isolierter Aortenringe gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten. ** p<0.001 vs. Kontrolle; ## p<0.001 vs. STZ Placebo
n (Kontrolle): 31; n (STZ Placebo): 29; n (STZ HMR1766): 28**

In beiden Fällen zeigte sich eine signifikant abgeschwächte Kontraktionsantwort der diabetischen Aorten. In der HMR1766-Gruppe dagegen fand sich ein Kontraktionsverhalten wie bei den Kontrolltieren.

Steigende Konzentrationen von Phenylephrin erbrachten ein ähnliches Bild: Eine deutlich reduzierte Maximalkontraktion der diabetischen Gefäße und eine nahezu vollständige Normalisierung nach chronischer Behandlung mit HMR1766. Um die mögliche Beeinflussung dieses Experimentes durch eine massiv gesteigerte NO-Produktion beispielsweise durch die iNOS auszuschließen, wurde der Versuch auch nach 45-minütiger Inkubation der Aortenringe mit L-NNA durchgeführt. Bis auf eine insgesamt gesteigerte Kontraktionshöhe blieb das Ergebnis jedoch weitgehend unverändert. Die Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Abbildung 18 und 19 dargestellt.

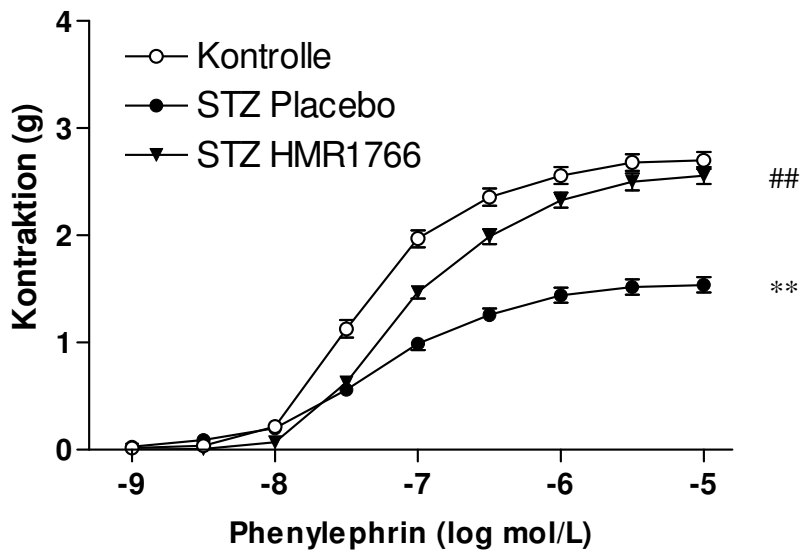


Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Phenylephrin-induzierten Kontraktion isolierter Aortenringe gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten.

** $p < 0.01$ vs. Kontrolle; ## $p < 0.01$ vs. STZ Placebo
 n (Kontrolle): 49; n (STZ Placebo): 50; n (STZ HMR1766): 54

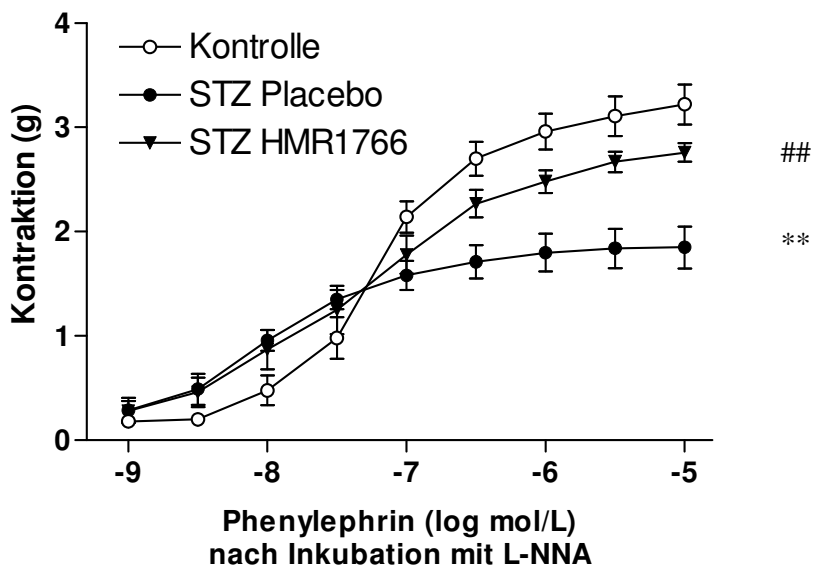


Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Phenylephrin-induzierten Kontraktion isolierter Aortenringe gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten nach Vorinkubation im Organbad mit L-NNA (100 μ M).

** $p < 0.01$ vs. Kontrolle; ## $p < 0.01$ vs. STZ Placebo
 n (Kontrolle): 15; n (STZ Placebo): 9; n (STZ HMR1766): 14

Diese Ergebnisse waren zunächst sehr überraschend. Die extrem eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit in der Diabetes-Gruppe war ebenso wenig erwartet worden wie der hochsignifikante Einfluss des GC-Aktivators auf die Vasokonstriktion.

Daher wurden zusätzlich Versuche mit Angiotensin II und Endothelin-1 durchgeführt (Abb. 20 und 21).

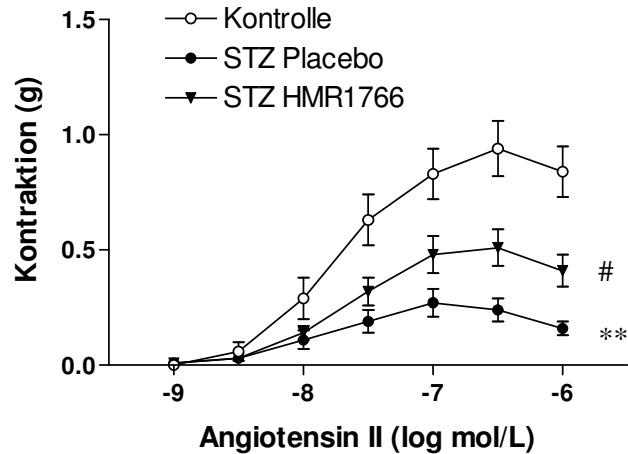


Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Angiotensin II-induzierten Kontraktion isolierter Aortenringe gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten.

** p<0.01 vs. Kontrolle; # p<0.05 vs. STZ Placebo
n (Kontrolle): 16; n (STZ Placebo): 22; n (STZ HMR1766): 19

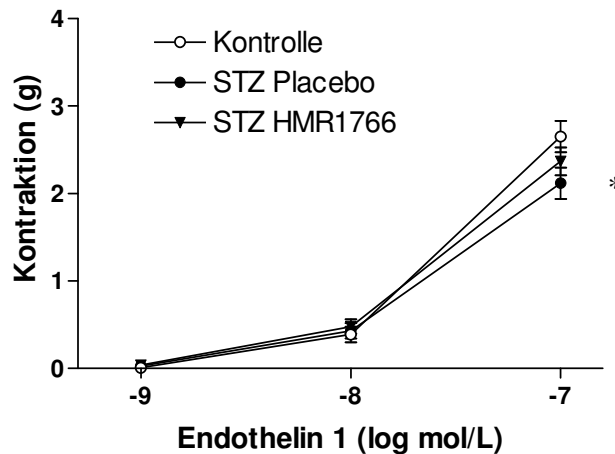


Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Endothelin-1-induzierten Kontraktion isolierter Aortenringe gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten diabetischen (STZ-)Ratten.

* p<0.05 vs. Kontrolle
n (Kontrolle): 8; n (STZ Placebo): 17; n (STZ HMR1766): 16

Auch auf diese beiden Vasokonstriktoren kontrahierten die diabetischen Gefäße jedoch signifikant schlechter als die entsprechenden Kontrollgefäße. HMR1766 führte – wie schon bei der Phenylephrin-induzierten Kontraktion – auch hier zu einer deutlichen Verbesserung, auch wenn dieser Effekt beim Endothelin-1 unterhalb des Signifikanzniveaus blieb.

3.4.2 Microarray und Western Blot

Da für die eingeschränkte Kontraktilität zunächst keine offensichtliche Erklärungsmöglichkeit bestand, wurde mittels Microarray eine breite Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene durchgeführt, um Erklärungshinweise für die eingeschränkte Kontraktilität zu erhalten (Abb. 22).

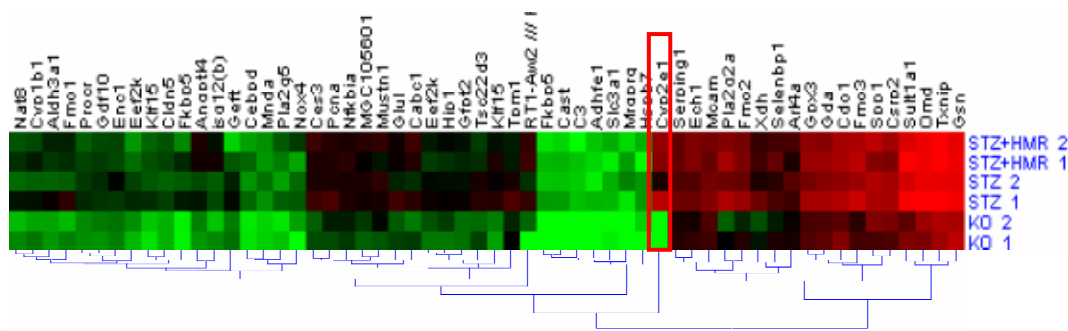


Abbildung 22: Microarray-Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene. Analysiert wurde Gewebe von jeweils zwei Aorten aus jeder Behandlungsgruppe. In der STZ-Gruppe fällt CYP2E1 als das im Vergleich zur Kontrollgruppe am stärksten hochregulierte Gen auf (roter Rahmen).

Es fiel auf, dass der Unterschied in der Genexpression zwischen Kontrollgruppe und STZ-Gruppe unter allen analysierten Genen bei Cytochrom-P450-2E1 (CYP2E1) am stärksten ausgeprägt war. Die Expression von CYP2E1 war in der STZ-Gruppe 42-fach erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daher wurde ein Western Blot durchgeführt, um die Expression auch auf Proteinebene nachzuvollziehen. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.

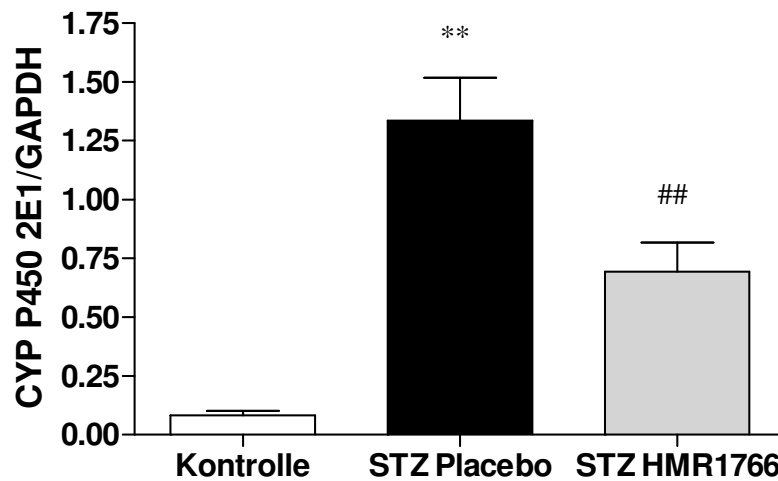


Abbildung 23: Die CYP2E1-Proteinexpression wurde mittels Western Blot ermittelt. Analysiert wurde Aortengewebe gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu Placebo- und HMR1766-behandelten STZ-diabetischen Ratten.

** p<0,001 vs. Kontrolle; ## p<0,01 vs. STZ Placebo
n (Kontrolle): 6; n (STZ Placebo): 6; n (STZ HMR1766): 6

In der Tat ergab sich in der STZ-Gruppe eine hochsignifikante Überexpression von CYP2E1 auf Proteinebene. Dies bestätigte nicht nur die Ergebnisse aus der Microarray-Analyse, sondern ließ auch eine deutliche funktionelle Auswirkung erwarten. Überdies fand sich in der HMR1766-behandelten Gruppe diabetischer Tiere auf Proteinebene eine deutliche Reduktion von CYP2E1.

3.5 Cytochrom-P450-Isoenzyme im Arachidonsäurestoffwechsel

3.5.1 Einführung

Enzyme der Cytochrom-P450-Enzymfamilie haben eine große Bedeutung bei der Metabolisierung unterschiedlichster exogener und endogener Substrate. Sie sind am Abbau verschiedenster Medikamente beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei Arzneimittelwechselwirkungen.

Darüber hinaus synthetisieren CYP450-Enzyme wichtige intermediäre bioaktive Verbindungen, die in viele verschiedene physiologische Prozesse eingebunden sind. CYP450-Enzyme sind unter anderem entscheidend am

Arachidonsäurestoffwechsel beteiligt. Sie katalysieren die Monohydroxylierung von Arachidonsäure zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE), wobei durch ω -1- und ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure vor allem 19- und 20-HETE entstehen. Dabei sind gewebeabhängig spezifische CYP450-Isoenzyme für die Produktion von verschiedenen HETE-Spezies mit jeweils gewebsspezifischen Funktionen verantwortlich.¹⁵⁰

Das in dieser Studie überexprimierte CYP2E1 ist in diesem Zusammenhang vor allem für die Produktion von 19-HETE verantwortlich. 19-HETE ist ein kompetitiver Antagonist des vasokonstriktorisch wirkenden 20-HETE, dessen eigene Produktion darüber hinaus durch Induktion von CYP2E1 signifikant abnimmt.¹⁵⁰⁻¹⁵² Da der Nachweis von 19-HETE technisch schwierig und sehr aufwendig ist und zwischen 19- und 20-HETE der beschriebene direkte Zusammenhang besteht, beschränken sich die hier dargestellten Analysen auf das einfacher zu messende 20-HETE.

20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) ist Bestandteil verschiedener Signaltransduktionskaskaden und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Gefäßtonus in Gehirn, Niere, Herz und im Splanchnicus-Gebiet. Die Substanz ist ein potenter Vasokonstriktor, der in glatten Muskelzellen als Reaktion auf verschiedene Stimuli durch CYP4A-Isoenzyme synthetisiert wird. Die 20-HETE-Synthese wird unter anderem durch Angiotensin II, Endothelin, Phenylephrin und Norepinephrin gesteigert. Durch 20-HETE-Synthese-Inhibitoren kann die myogene Antwort und Autoregulation von renalen und cerebralen Arteriolen vollständig blockiert werden. Bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen wie cerebrovaskulärer Ischämie oder kardialer Reperfusion, bei Nierenerkrankungen, arterieller Hypertonie und bei Diabetes mellitus wurden Veränderungen in der 20-HETE-Produktion beobachtet und es ist zu vermuten, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der veränderten 20-HETE-Produktion und dem Beginn und Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen.

3.5.2 Nachweis von 20-HETE (20-Hydroxyeicosatetraensäure)

Zur weiteren Analyse wurden Aorten aller drei Behandlungsgruppen homogenisiert und mittels HPLC auf 20-HETE hin untersucht. Hierbei zeigte sich ein erniedrigter Spiegel von 20-HETE in Placebo-behandelten diabetischen Tieren. Nach Behandlung mit HMR1766 war der 20-HETE-Spiegel signifikant erhöht, auch gegenüber dem Kontrollniveau (Abb. 24).

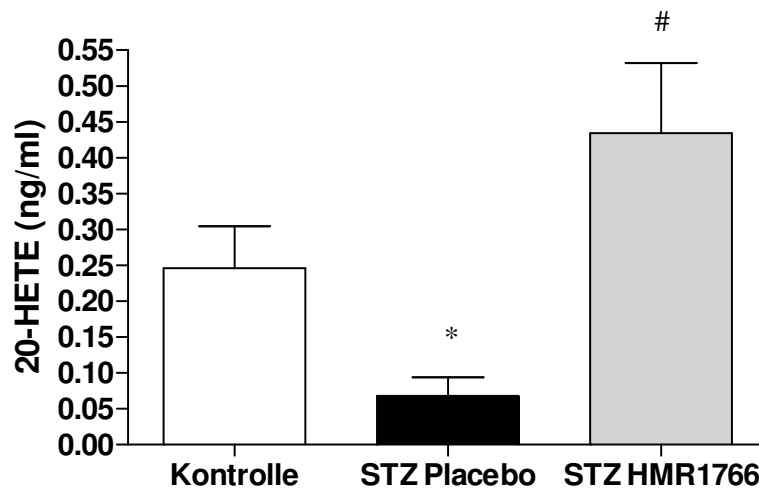


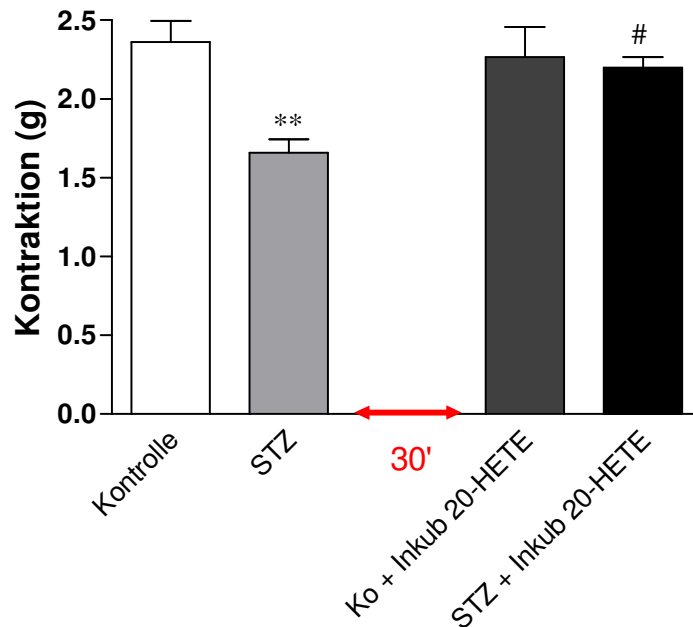
Abbildung 24: 20-HETE-Level in homogenisierten Aortenlysaten gesunder sowie mit Placebo und HMR1766 behandelter STZ-Ratten, analysiert mittels HPLC und Tandemmassenspektroskopie.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle ; # $p < 0,05$ vs. STZ Placebo
n (Kontrolle): 9; n (STZ Placebo): 5; n (STZ HMR1766): 3

3.5.3 Vasokonstriktion unter Substitution von 20-HETE

Unter der Annahme eines verminderten Ansprechens auf 20-HETE bzw. eines relativen 20-HETE-Mangels bei diabetischen Tieren erfolgten im Organbad Kontraktionsversuche unter Substitution von 20-HETE. An Aortenringen gesunder und diabetischer Tiere wurde zunächst das Standardprotokoll zur Ermittlung der Maximalkontraktion auf Kaliumchlorid und Phenylephrin durchgeführt. Anschließend – nach gründlichem Auswaschen von Kalium und Phenylephrin – wurden die Aortenringe für 30 Minuten mit 20-HETE (1 μM)

inkubiert. Danach wurden erneut Kaliumchlorid und Phenylephrin in maximaler Konzentration zugegeben, um die Kontraktionsstärke nach der 20-HETE-Inkubation zu ermitteln.



**Abbildung 25: Kontraktionsantwort isolierter Aortenringe gesunder Kontrolltiere und STZ-diabetischer Ratten auf Phenylephrin vor und nach 30-minütiger Inkubation mit 20-HETE (1 µM). ** p<0,01 vs. Kontrolle; # p<0,05 vs. STZ
n (Kontrolle): 8; n (STZ): 8; n (Ko + Inkub 20-HETE): 8; n (STZ + Inkub 20-HETE): 8**

Die Kontraktion auf Phenylephrin war nach der Inkubation bei den diabetischen Tieren signifikant stärker und erreichte fast das Niveau der gesunden Kontrolltiere (Abb. 25).

In Abbildung 26 ist die Kontraktion nach der 20-HETE-Inkubation für die diabetischen Tiere nochmals in Prozent der Kontraktionshöhe vor der Inkubation im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt. Bei den Aortenringen der Kontrolltiere war kein Unterschied im Kontraktionsverhalten vor und nach der Inkubation zu verzeichnen.

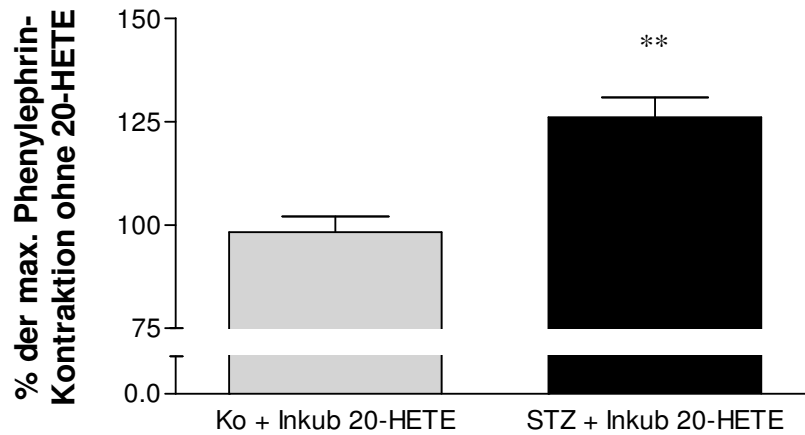


Abbildung 26: Kontraktionszunahme in Prozent nach 30-minütiger Inkubation mit 20-HETE. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Kontraktion, wobei die Kontraktionshöhe ohne 20-HETE 100% entspricht.

**** p<0,001 vs. Kontrolle + Inkubation**

n (Ko + Inkub 20-HETE): 12; n (STZ + Inkub 20-HETE): 12

3.5.4 Vasculäre Studien nach Isoniazidbehandlung

Zur Untermauerung der Hypothese, dass beim STZ-Diabetes-Modell durch CYP2E1-Aktivierung ein Ungleichgewicht zwischen 19- und 20-HETE zu Ungunsten von 20-HETE vorliegt, wurde versucht durch Isoniazidbehandlung CYP2E1 zu induzieren und so einen dem STZ-Modell vergleichbaren nicht-kontraktilen Phänotyp nachzubilden. In Anlehnung an die Versuche von Poloyac et al.¹⁵⁰ wurden gesunde Ratten über fünf Tage intraperitoneal mit Isoniazid (200 mg/kgKG) oder Placebo behandelt. Die Vasokonstriktion wurde anschließend an Aortenringen im Organbad untersucht. Abbildung 27 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Phenylephrin.

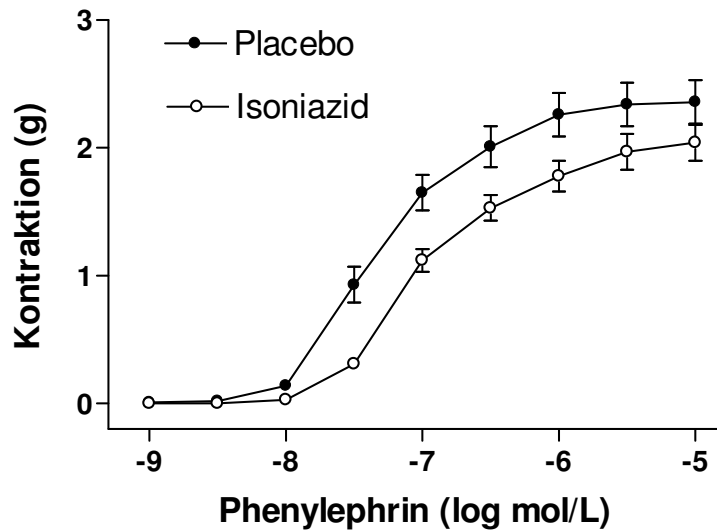


Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Phenylephrin. Isolierte Aortenringe gesunder Placebo-behandelter Kontrolltiere im Vergleich zu Isoniazid-behandelten Ratten. n (Placebo): 16; n (Isoniazid): 16

Agonist	Behandlung	EC ₅₀ (nmol/L)
Phenylephrin	Placebo	53,9±6,1
Phenylephrin	Isoniazid	113±14,7 **

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der EC₅₀ der Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Vergleich gesunder Placebo-behandelter Kontrolltiere mit Isoniazid-behandelten Ratten.

** p<0,001 vs. Placebo

n (Placebo): 16; n (Isoniazid): 16

In der Tat fand sich in der Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve eine signifikant gegenüber den Kontrolltieren abgeschwächte Kontraktionskurve. In der tabellarischen Darstellung der EC₅₀ wird nochmals deutlich, dass die Vasokonstriktion bei den Kontrollringen bereits bei niedrigeren Konzentrationen von Phenylephrin wesentlich stärker ausgeprägt war als bei den Aortenringen der mit Isoniazid behandelten Tiere (Tab. 3).

Für den Nachweis, dass die Isoniazidbehandlung tatsächlich auch CYP2E1 hochreguliert hat, wurde die CYP2E1-Expression in Aorten der

Isoniazidbehandlungsgruppe im Vergleich zur Placebogruppe gemessen. Die Western-Blot-Analyse konnte eine verstärkte Expression von CYP2E1 auf Proteinebene nachweisen (Abb. 28).

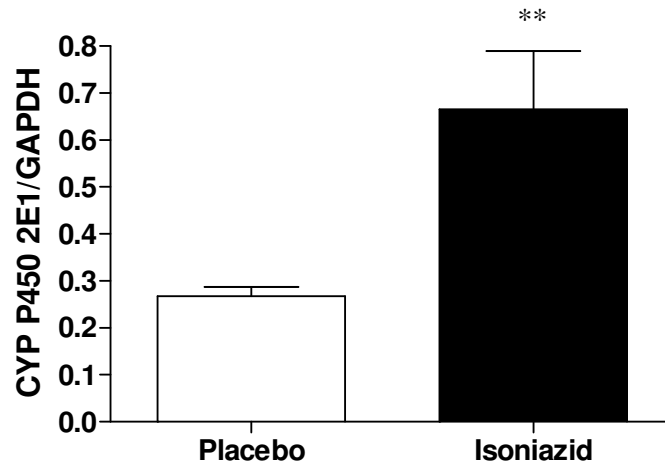


Abbildung 28: CYP2E1-Proteinexpression nach Isoniazidbehandlung gesunder Ratten. Mittels Western Blot wurde Aortengewebe Placebo-behandelter Kontrolltiere im Vergleich zu Isoniazid-behandelten Ratten auf CYP2E1 analysiert.

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

n (Placebo): 4; n (Isoniazid): 4

Somit spricht vieles dafür, dass die erhöhte CYP2E1-Expression und das nachfolgend entstehende Ungleichgewicht zwischen den Arachidonsäuremetaboliten für die eingeschränkte Kontraktionskraft im STZ-Modell verantwortlich sein könnte.

4. Diskussion

4.1 NO-Signalverstärkung und Verbesserung der vaskulären Dysfunktion

In der vorliegenden Arbeit wurde an Rattenaorten gezeigt, dass im STZ-Diabetes-Modell eine deutliche vaskuläre und endotheliale Dysfunktion vorliegt. Mit verschiedenen Methoden konnte eine signifikant erhöhte Superoxidproduktion und damit ein erheblich gesteigerter oxidativer Stress in diabetischen Aorten nachgewiesen werden. Infolgedessen zeigte sich die NO-Bioverfügbarkeit stark eingeschränkt, was sich insbesondere in den Relaxationsstudien im Organbad auch funktionell widerspiegelte: sowohl das Endothel-abhängige als auch das Endothel-unabhängige Relaxationsverhalten war bei diabetischen Aorten signifikant beeinträchtigt.

Bereits früher durchgeführte Studien an diabetischen Gefäßen hatten gezeigt, dass der NO/cGMP-Signalweg einen vielversprechenden pharmakologischen Zielort zur Verbesserung der diabetischen vaskulären Dysfunktion darstellt. So konnte unsere Arbeitsgruppe durch chronische Behandlung mit dem Phosphodiesterase-5-Hemmer Sildenafil bei diabetischen Ratten ebenfalls eine bedeutsame Verminderung der Superoxidproduktion und der endothelialen Dysfunktion erzielen.¹⁴⁹ Diese Ergebnisse, die letztlich auf einen verringerten Abbau des cGMP zurückzuführen sind, legten nahe, dass durch eine Aktivierung der Guanylatzyklase ebenfalls ein positiver Effekt auf das Gefäßsystem zu erwarten ist. Überdies ergibt sich auch aus der bereits anfangs beschriebenen Problematik der Nitrattoleranz die pharmakologische Notwendigkeit, den NO-Signalweg auf der Ebene der Signalweiterleitung zu verstärken, und nicht die zur Verfügung stehende NO-Menge direkt zu beeinflussen. Dies erscheint vor dem Hintergrund der massiv gesteigerten Superoxidproduktion beim Diabetes mellitus umso mehr geboten, da durch eine reine NO-Substitution auch die Gefahr der verstärkten Superoxid- und Peroxinitritbildung besteht.¹⁵³

In Anlehnung an die Sildenafil-Studie wurden diabetische Ratten chronisch mit HMR1766 behandelt, einem neuen Aktivator der Guanylatzyklase. Es konnte

gezeigt werden, dass diese Behandlung zu einer signifikanten Verbesserung sowohl der endothelialen Dysfunktion als auch der eingeschränkten vaskulären Reaktivität bei diabetischen Ratten führt. Diese Ergebnisse sprechen für eine verbesserte Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges durch HMR1766: Von der löslichen Guanylatzyklase wird nach ihrer Aktivierung cGMP produziert, das spannungsabhängige Calciumkanäle hemmt und die Proteinkinase G aktiviert. Dies führt letztlich zu einem intrazellulären Calciumabfall mit verminderter Myosinleichtkettenphosphorylierung und nachfolgender Vasorelaxation.^{37;43;51-57}

Tatsächlich führte die HMR1766-Behandlung zu einer deutlich verbesserten Vasorelaxation bei den diabetischen Tieren. Erstmals konnte also gezeigt werden, dass eine chronische Behandlung mit HMR1766 in isolierten Aortenringen gesunder und diabetischer Ratten eine vergleichbare Vasorelaxation bewirkt. Dieser Effekt konnte sowohl bei der Agonisten-vermittelten, Endothel-abhängigen als auch bei der Endothel-unabhängigen Relaxation beobachtet werden.

Ein entscheidender Punkt für die deutliche Verbesserung der Gefäßfunktion unter dieser Therapie ist sicherlich die Fähigkeit von HMR1766, auch die oxidierte Form der sGC aktivieren zu können.¹⁴¹ In den ersten Untersuchungen mit der neuen Substanz HMR1766 wurde gezeigt, dass der Wirkstoff in der Lage ist, in glatten Gefäßmuskelzellen die mit Hilfe der Inhibitoren ODQ¹⁵⁴ und NS2028¹⁵⁵ gehemmte, oxidierte sGC sogar noch spezifischer zu aktivieren als die nicht oxidierte, noch NO-sensitive Form des Enzyms.¹⁴¹ Dies ist insbesondere in einem Milieu mit erhöhtem oxidativen Stress von großer Bedeutung, da die eisenhaltige Häm-Gruppe des Enzyms für Oxidationsprozesse besonders anfällig ist, aber eine intakte Funktion des Enzyms nur in reduziertem Zustand der Häm-Gruppe gegeben ist: wird das Eisen oxidiert, ist eine Aktivierung der sGC durch NO nicht mehr möglich.¹⁵⁴ Dieser Zusammenhang konnte zunächst *in vitro* nachvollzogen werden, wobei die sGC bei Oxidation mit Peroxynitrit direkt gehemmt wurde.¹⁵⁶ Später gelang der Nachweis, dass durch erhöhten oxidativen Stress *in vivo* die sGC ebenfalls oxidiert wird und dabei ein sGC-Molekül entsteht, das sich von der *in vitro* mit ONOO⁻ künstlich erzeugten Form der sGC nicht unterscheidet.¹³⁹ Erkrankungen

wie Diabetes mellitus, die mit erhöhtem oxidativen Stress einhergehen, führen zu einer deutlichen Zunahme der oxidierten, NO-insensitiven Form der sGC und beeinträchtigen somit die Signaltransduktion auf dem NO/cGMP-Weg deutlich.¹³⁹ Dass gerade unter diesem Aspekt die Behandlung mit HMR1766 in solchen pathophysiologischen Zuständen besonders sinnvoll sein kann, konnte hier eindrucksvoll durch die wesentliche Verbesserung der vaskulären Funktion im STZ-Diabetes-Modell demonstriert werden.

4.2 Beeinflussung oxidativer Prozesse

Der Einsatz von HMR1766 führte zu einer signifikanten Abnahme von oxidativem Stress und erhöhte die vaskuläre NO-Bioverfügbarkeit.

Diabetes mellitus ist verbunden mit einer verstärkten Aktivierung der NADPH-Oxidase, die als eine der Hauptquellen für reaktive Sauerstoffverbindungen angesehen wird.^{14;59;103;157;158} Daher kommt es beim Diabetes mellitus zu einer starken Überproduktion freier Sauerstoffradikale.^{14;103}

Die NADPH-Oxidase besteht aus einem in der Zellmembran gebundenen Cytochrom-b558, das wiederum aus den beiden Untereinheiten gp91^{phox} und p22^{phox} sowie den zytosolischen Komponenten p47^{phox} und p67^{phox} aufgebaut ist.¹⁵⁸ In dieser Arbeit wurde zunächst bestätigt, dass es – wie aus verschiedenen Studien bereits bekannt^{14;149} – im STZ-Diabetes-Modell zu einer deutlichen Zunahme der NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91^{phox} kommt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung mit HMR1766 die Überexpression dieser NADPH-Oxidase-Untereinheit deutlich verringert wird.

In einer Studie von Muzaffar et al. wurde erstmals berichtet, dass durch NO-Donoren die Expression der Untereinheit gp91^{phox} in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen aus Schweine-Pulmonalarterien gehemmt werden kann.¹⁵⁹ Dieser Effekt konnte durch den sGC-Inhibitor ODQ aufgehoben werden.¹⁵⁹ Dies spricht für einen über die lösliche Guanylatzyklase vermittelten und damit cGMP-abhängigen Mechanismus.¹⁵⁹ In Untersuchungen mit dem GC-Aktivator BAY41-2272 konnte diese Hypothese weiter untermauert werden: im corpus

cavernosum von Mäusen führte BAY41-2272 zu einer Hemmung der Aktivität und Expression der NADPH-Oxidase.¹⁶⁰ Nach Inaktivierung der Guanylatzyklase blieb die Expression der NADPH-Oxidase unbeeinflusst.¹⁶⁰ Diese Daten legen nahe, dass die Funktionsfähigkeit der Guanylatzyklase – und damit also das Vorhandensein von cGMP – offenbar für die Hemmung der NADPH-Oxidase verantwortlich ist.

Ein ähnlicher Zusammenhang kann für die hier beschriebenen Effekte des HMR1766 angenommen werden: Unter physiologischen Verhältnissen ist die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase einerseits nicht übermäßig gesteigert und andererseits durch einen funktionierenden NO/sGC/cGMP-Signalweg gut unter Kontrolle. Kommt es jedoch durch pathologische Veränderungen – wie beim Diabetes mellitus – zu einer gesteigerten Expression der NADPH-Oxidase, wird das Gleichgewicht gestört. Die Guanylatzyklase wird zum einen durch die verminderte NO-Bioverfügbarkeit weniger stark aktiviert, zum anderen durch die exzessive Superoxidproduktion auch selbst deaktiviert. Somit steht weniger cGMP zur Verfügung und infolgedessen findet eine ungehemmte Produktion von Sauerstoffradikalen durch die NADPH-Oxidase statt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser *circulus vitiosus* durch die Therapie mit HMR1766 durchbrochen werden kann: die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase reduziert die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Hemmung der NADPH-Oxidase. Dadurch wird gleichzeitig das noch vorhandene NO-Restsignal verstärkt, da es zu einer verminderten NO-Inaktivierung durch reaktive Sauerstoffverbindungen kommt. Zusammengefasst führte HMR1766 bei STZ-induziertem Diabetes mellitus zu einer verbesserten NO-Bioverfügbarkeit, einer Verminderung der oxidativen Belastung der Zellen und in der Konsequenz zu einer Verbesserung der vaskulären Dysfunktion.

4.3 Einfluss von HMR1766 auf die Vasokonstriktion

Bei den Organbadstudien fiel an den Aortenringen der diabetischen Tiere eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abgeschwächte Antwort auf

verschiedene Kontraktion-auslösende Agonisten wie Phenylephrin und Kalium auf. Besonders interessant war dabei die Tatsache, dass diese eingeschränkte Vasomotorik durch die HMR1766-Behandlung fast vollständig normalisiert werden konnte.

4.3.1 Phänotypmodulation und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Eine wichtige Rolle für die Vasokonstriktion spielen naturgemäß die glatten Gefäßmuskelzellen. Sie sind wie bereits oben beschrieben auch an der Entstehung arteriosklerotischer Plaques beteiligt: Diabetes mellitus begünstigt unter anderem durch entzündliche Prozesse, vermehrte Sauerstoffradikalbildung und verminderte NO-Bioverfügbarkeit die Entstehung und Progression der Arteriosklerose. In der entzündlich veränderten Gefäßwand werden im Rahmen der weiteren Arterioskleroseentstehung verschiedene Botenstoffe freigesetzt, die unter anderem glatte Gefäßmuskelzellen zur verstärkten Proliferation und Produktion extrazellulärer Matrix anregen und damit die Plaquentstehung fördern.¹²²

Wie verschiedene Studien zeigen, scheint der Diabetes mellitus schon *per se* das Proliferationsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen zu beeinflussen. Etienne et al. untersuchten die Morphologie und Proteinstruktur glatter Gefäßmuskelzellen (SMC) aus Aorten von STZ-behandelten Wistar-Ratten im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren.¹⁶¹ In der Zellkultur stellten sich dabei die diabetischen SMC mit großem zytoplasmatischem Volumen und reich an rauhem endoplasmatischem Retikulum dar. Vor allem aber waren die Aktinfilamente weniger homogen verteilt und das Gleichgewicht zwischen den Aktin-Isoformen war deutlich verschoben: in den frisch isolierten SMC diabetischer Ratten war das auf Proliferation hinweisende sogenannte nichtmuskuläre-(nonmuscle-) β -Aktin (β -NM) stärker vorhanden und die normalerweise dominierende α -Gefäßmuskel(-smooth muscle) Aktin-Isoform im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert. Die SMC diabetischer Tiere zeigten also insgesamt einen weniger differenzierten und eher proliferativen Zustand im Vergleich zu den Zellen nicht-diabetischer Tiere.

In einer ähnlichen Studie konnten Pandolfi et al. zeigen,¹⁶² dass in aortalen SMC pankreatektomierter Ratten der entstandene Diabetes mellitus zu einer Abnahme der α -Gefäßmuskel Aktin-Isoform und somit zu einer zellulären Dedifferenzierung der Gefäßmuskulatur führt.

Tatsächlich sind verschiedene Phänotypen vaskulärer SMC bekannt:¹⁶³ zum einen der sogenannte kontraktile oder differenzierte Phänotyp und zum anderen der nicht-kontraktile oder dedifferenzierte Phänotyp, der insbesondere in pathologisch veränderten Gefäßabschnitten zu finden ist, zum Beispiel an Orten beginnender arteriosklerotischer Veränderungen.^{162;164} Beim nicht-kontraktilen Phänotyp ist die Expression von Proteinen, die am Kontraktionsprozess beteiligt sind, wie zum Beispiel Aktin, vermindert, während gleichzeitig die Fähigkeit der Zellen, extrazelluläre Matrix zu produzieren, erhöht ist.¹⁶⁵ Die Phänotypänderung vom differenzierten zum dedifferenzierten Typ wird als Phänotyp-Modulation¹⁶⁵ bezeichnet und konnte sowohl in diabetischen Tiermodellen als auch in SMC diabetischer Patienten gezeigt werden.¹⁶⁶ Die Gefäßmuskulatur der diabetischen Patienten war dabei in der Zellkultur durch signifikant erhöhte Raten von Proliferation, Adhäsion und Migration gekennzeichnet.¹⁶⁶

Zusammenfassend scheint der Diabetes mellitus die Modulation glatter Gefäßmuskelzellen zu einem nicht-kontraktilen Phänotyp zu begünstigen und damit durch die eingeschränkte Vasomotorik einerseits, und durch die verstärkte Proliferation andererseits die vaskuläre Dysfunktion und Arterioskleroseentstehung weiter zu fördern. Da dieser Zusammenhang insbesondere auch am STZ-Diabetes-Modell gezeigt werden konnte, liegt der Schluss nahe, dass die funktionellen Ergebnisse der Kontraktionsstudien in der vorliegenden Arbeit zumindest teilweise ebenfalls auf der Phänotypmodulation der glatten Gefäßmuskelzellen beruhen.

Durch HMR1766 konnte die eingeschränkte Vasokonstriktion diabetischer Gefäße deutlich verbessert werden. Dies spricht für einen NO/cGMP-abhängigen Mechanismus. Durch Ergebnisse von Tulis et al. wird diese Vermutung gestützt:¹⁶⁷ durch YC-1, wie HMR1766 ein Aktivator der Guanylatzyklase, konnte die Proliferation kultivierter SMC von Ratten deutlich

gehemmt werden. Dabei korrelierte die Stärke der Proliferationshemmung mit dem gemessenen cGMP-Spiegel. Darüber hinaus konnte in einem Rattenmodell zur Untersuchung von Gefäßwandverletzungen die topische Anwendung von YC-1 auf einem experimentell gesetzten Intimaschaden der Arteria carotis die Entstehung einer Neo-Intima durch Hemmung der glattmuskulären Proliferation und Thrombozytenaggregation wirksam unterdrücken.

In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass NO antiproliferative und antimigrative Eigenschaften besitzt und dass diese Effekte in glatten vaskulären Muskelzellen über einen cGMP-abhängigen Mechanismus gesteuert werden.^{91;168;169} HMR1766 verstärkt durch Aktivierung der Guanylatzyklase das NO/cGMP-Signal und greift somit wohl auch in die Regulation der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen der Gefäßwand ein. Dieser Zusammenhang ist eine mögliche Erklärung für die demonstrierte Verbesserung der Vasokonstriktion und Gefäßregulation STZ-diabetischer Aortenringe.

4.3.2 Regulation des Arachidonsäuremetabolismus

Ein weiterer Erklärungsansatz für die signifikant eingeschränkte Kontraktionskraft der diabetischen Aortenringe ergibt sich aus der Microarray-gestützten Genanalyse von Aortengewebe, die eine deutliche Überexpression von CYP2E1 ergab.

Bei Patienten mit Diabetes mellitus ist eine erhöhte *in vivo* Bioaktivität von CYP2E1 bekannt.¹⁷⁰ Im experimentellen STZ-Diabetes-Modell findet sich ebenfalls eine gesteigerte CYP2E1-Enzymaktivität, die vor allem auf das absolute Insulindefizit im STZ-Modell zurückzuführen ist,¹⁷¹ und die in den Mitochondrien bei STZ-Ratten zu vermehrter Superoxidproduktion führt.¹⁷² Die Vermutung liegt nahe, dass durch erhöhte CYP2E1-Expression nicht nur vermehrt reaktive Sauerstoffradikale produziert werden, sondern auch der Arachidonsäureabbau zu Hydroxyeicosatetraensäuren vermehrt stattfindet und dadurch verschiedene HETE-Spezies verstärkt synthetisiert werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass bei Ratten die Induktion von CYP2E1

mit Isoniazid eine erhöhte Produktion von 19-HETE in der Leber zur Folge hatte.¹⁵⁰ Gleichzeitig kam es dabei zu einer signifikanten Abnahme von 20-HETE.¹⁵⁰ 19-HETE ist darüber hinaus ein kompetitiver Antagonist der vasokonstriktorisches Eigenschaften von 20-HETE.^{151;152} In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein 18-19-HETE-Defizit zu einer vasoregulatorischen Imbalanz und zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber 20-HETE führt beziehungsweise, dass es durch eine vermehrte Produktion von 18- und 19-HETE zu einer geringeren 20-HETE-abhängigen Sensitivität glatter Gefäßmuskelzellen gegenüber Vasokonstriktoren kommt.¹⁷³

Tatsächlich fand sich im Aortengewebe der STZ-diabetischen Tiere ein signifikant erniedrigter Spiegel von 20-HETE. Dadurch kann ein geringeres Ansprechen der Gefäßmuskulatur auf vasokonstriktorisches Substanzen entstehen. Die gezeigte signifikante Verbesserung der Kontraktionshöhe diabetischer Aorten unter Substitution von 20-HETE im Organbad spricht sehr für diesen Zusammenhang. Die Ergebnisse von Poloyac et al.¹⁵⁰ konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt werden: Isoniazid-Behandlung führte bei gesunden Ratten zu einer CYP2E1-Überexpression und zu einer signifikant schwächeren Vasokonstriktion. Da sowohl durch Isoniazid als auch durch STZ eine auffallende CYP2E1-Induktion stattfindet, ist zu vermuten, dass in beiden Modellen die oben beschriebene empfindliche Störung des Gleichgewichts zwischen den HETE-Spezies der eingeschränkten Vasokonstriktionsfähigkeit zugrunde liegt.

Betrachtet man dieses gestörte Gleichgewicht neben der oben diskutierten glattmuskulären Dedifferenzierung und Proliferation als weitere Ursache für die eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit im STZ-Modell, kann man mutmaßen, dass die deutliche Verbesserung der Vasokonstriktion durch HMR1766 auch auf eine Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels zurückgeht. Der Ausgangspunkt für die Veränderungen im beschriebenen Diabetes-Modell war die Überexpression von CYP2E1. Gregel et al. untersuchten bereits vor längerer Zeit den Effekt von NO auf die Enzymaktivität von CYP2E1.¹⁷⁴ Sowohl die Aktivität von induziertem CYP2E1 in Lebermikrosomen von Ratten als auch die Aktivität von stabil exprimiertem CYP2E1 in einer humanen Leberzelllinie

konnte durch Zugabe verschiedener NO-Donoren deutlich reduziert werden. Wie bei der Aktivierung der Guanylatzyklase bindet NO an die Häm-Gruppe von CYP2E1 und führt so zur Inaktivierung des Enzyms. Diese Enzyminhibition konnte in jüngerer Zeit von Gong et al. nochmals bestätigt werden:¹⁷⁵ Bei der Evaluierung eines neuen hepatischen NO-Donors erfolgte in einer humanen Leberzelllinie durch NO eine ausgeprägte cGMP-unabhängige Hemmung der katalytischen Aktivität von CYP2E1.

Insgesamt betrachtet ist für die Verbesserung der vaskulären Kontraktion durch HMR17666 unter Berücksichtigung dieser Daten also folgender Mechanismus denkbar und möglich: Durch die Signalverstärkung des NO/sGC/cGMP-Weges werden einerseits die cGMP-abhängigen NO-Effekte verbessert, beispielsweise die antiproliferativen Wirkungen. Andererseits kann aber durch die Verstärkung des NO-Restsignals durch HMR1766 insgesamt von einer verbesserten NO-Bioverfügbarkeit ausgegangen werden, die für die direkten NO-Effekte verantwortlich ist. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis einer vermehrten NO-Bioverfügbarkeit auch bestätigt werden. Daher kann man folgern, dass durch die Therapie mit HMR1766 und die nachfolgende Verbesserung des NO-Signals ausreichend NO vorhanden ist, um im unbehandelten STZ-Diabetes die erhöhte katalytische Aktivität von CYP2E1 trotz des weiterhin bestehenden absoluten Insulinmangels zu normalisieren. Dadurch kommt der Arachidonsäurestoffwechsel wieder ins Gleichgewicht, es steht ausreichend vasokonstriktorisches 20-HETE zur Verfügung und die Kontraktionsfähigkeit der Gefäße steigt.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht den Effekt des Guanylatzyklase-Aktivators HMR1766 auf die vaskuläre Dysfunktion bei Streptozotozin-(STZ-)induziertem Diabetes mellitus im experimentellen Rattenmodell. Zunächst wird anhand funktioneller Studien die vaskuläre Reaktivität aortaler Gefäßringe gesunder, Placebo- und HMR1766-behandelter Tiere verglichen. Davon ausgehend werden weiterführende experimentelle Daten dargestellt, die mögliche Wirkungsmechanismen von HMR1766 im STZ-Diabetes-Modell beschreiben und einen Erklärungsansatz für die funktionell gewonnenen Daten liefern.

Es wird gezeigt, dass eine chronische Behandlung mit HMR1766 die endotheliale Dysfunktion im STZ-Diabetes signifikant verbessern kann. HMR1766 verstärkt den Stickstoffmonoxid-(NO-)Signalweg über die lösliche Guanylatzyklase zum zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP), normalisiert die eingeschränkte Vasorelaxation, führt zu einer gesteigerten NO-Bioverfügbarkeit und erhöht so die inhibitorische Wirkung von NO auf die Superoxid-produzierende NADPH-Oxidase. Dadurch wird der oxidative Stress signifikant reduziert und die NO-Inaktivierung durch Superoxid verringert.

Die vorgelegten Daten stellen ferner einen Zusammenhang her zwischen dem vaskulären Kontraktionsdefizit bei Diabetes und einem Ungleichgewicht im Arachidonsäuremetabolismus. Durch eine Überexpression von Cytochrom-P450-2E1 (CYP2E1) im STZ-Modell kommt es zu einem Defizit der vasokonstriktorisch wirkenden 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE). Dies führt zu einem verminderten Ansprechen der Gefäße auf Vasokonstriktoren wie Phenylephrin. HMR1766 kann durch die Verbesserung des NO/cGMP-Signals die katalytische Aktivität von CYP2E1 hemmen, dadurch das 20-HETE-Defizit ausgleichen und die vaskuläre Reaktivität wieder normalisieren.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass eine Behandlung mit HMR1766 bei STZ-induziertem Diabetes mellitus zu einer signifikanten Verbesserung der vaskulären Dysfunktion führt. Eine Behandlung mit HMR1766 könnte daher ein sinnvoller Ansatz sein zur Vermeidung vaskulärer Komplikationen bei Diabetes mellitus.

6. Literaturverzeichnis

1. Eknoyan G, Nagy J. A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005;12:223-229.
2. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2004;27:5S-10.
3. Robert Koch Institut. Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 24 Diabetes mellitus 2006. 2006.
4. Deutsche Diabetes Union. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2007. *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2007.* 2007.
5. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA.* 2002;287:2570-2581.
6. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation.* 2003;108:1527-1532.
7. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114:597-605.
8. Luscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation.* 2003;108:1655-1661.
9. Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci.* 2004;76:715-730.
10. Sniderman AD, Scantlebury T, Cianflone K. Hypertriglyceridemic hyperapob: the unappreciated atherogenic dyslipoproteinemia in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2001;135:447-459.
11. Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25:1055-1059.
12. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res.* 2003;93:1159-1169.
13. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van d, V, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000;130:963-974.

14. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001;88:E14-E22.
15. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, Levy D, Meigs JB, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Savage PJ. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA*. 2004;292:2495-2499.
16. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998;339:229-234.
17. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
18. Tschoepe D, Menart-Houtermans B. Diabetes mellitus. In: Platelets. Alan D. Michelson, ed. 2002. Elsevier Science USA.
19. Nathan DM, Meigs J, Singer DE. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is ... or is it? *The Lancet*. 1997;350:S4-S9.
20. Lundberg V, Stegmayr B, Asplund K, Eliasson M, Huhtasaari F. Diabetes as a risk factor for myocardial infarction: population and gender perspectives. *J Intern Med*. 1997;241:485-492.
21. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. 1993;16:434-444.
22. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 1998;21:1414-1431.
23. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047-1053.
24. Hauner H, von Ferber L, Köster I. Schätzung der Diabeteshäufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland anhand von Krankenkassendaten. Sekundärdatenanalyse einer repräsentativen Stichprobe AOK-Versicherter der Stadt Dortmund. *Dtsch Med Wochenschr*. 1992;645-650.
25. Hauner H, Koester I, von Ferber L. Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland 1998 - 2001. *Dtsch Med Wochenschr*. 2003;2632-2638.
26. Rathmann W, Haastert B, Icks A, Lowel H, Meisinger C, Holle R, Giani G. High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern

- Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia*. 2003;46:182-189.
27. Liebl A, Neiß A Spannheimer A et al. Kosten des Typ 2-Diabetes in Deutschland. *Dtsch Med Wochenschr* 126(20), 585-589. 2001.
 28. Massi-Benedetti M. The cost of diabetes Type II in Europe: the CODE-2 Study. *Diabetologia*. 2002;45:S1-S4.
 29. Liebl A, Goertz A, et al. Drug use and costs of medication in patients with diabetes in Germany. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108.
 30. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91:3527-3561.
 31. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
 32. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989;3:2007-2018.
 33. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:9265-9269.
 34. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*. 1988;12:365-372.
 35. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526.
 36. Anderson TJ. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail Rev*. 2003;8:71-86.
 37. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med*. 2005;26:3-31.
 38. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284:R1-12.
 39. Llorens S, Jordan J, Nava E. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. *J Physiol Biochem*. 2002;58:179-188.
 40. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1:S193-S201.

41. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87:315-424.
42. Sessa WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100 Suppl 1:15-18.
43. Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2003;1:2112-2118.
44. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 1999;43:509-520.
45. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153:1251-1256.
46. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:175-195.
47. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601-605.
48. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:677-685.
49. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res.* 2002;55:250-260.
50. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000;190:244-254.
51. Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med.* 1999;189:1255-1264.
52. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 1998;17:3045-3051.
53. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994;368:850-853.

54. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*. 2000;404:197-201.
55. Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res*. 1999;84:210-219.
56. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*. 1996;76:967-1003.
57. Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*. 2006;355:2003-2011.
58. Ceriello A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr Pract*. 2006;12 Suppl 1:60-62.
59. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003;108:1912-1916.
60. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*. 2000;105:1631-1639.
61. Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1997;80:557-564.
62. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:517-554.
63. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995;96:60-68.
64. Pfeiffer S, Schmidt K, Mayer B. Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide in vivo. *J Biol Chem*. 2000;275:6346-6352.
65. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:385-391.
66. Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ES, Rabelink TJ. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. 1998;14:241-249.

67. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5193-5197.
68. Eigenthaler M, Nolte C, Halbrugge M, Walter U. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem*. 1992;205:471-481.
69. Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, Glazova M, Rohde E, Horak I, Walter U, Zimmer M. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8120-8125.
70. Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*. 1994;225:21-27.
71. Bearer EL, Prakash JM, Manchester RD, Allen PG. VASP protects actin filaments from gelsolin: an in vitro study with implications for platelet actin reorganizations. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2000;47:351-364.
72. Schafer A, Burkhardt M, Vollkommer T, Bauersachs J, Munzel T, Walter U, Smolenski A. Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochem Pharmacol*. 2003;65:397-405.
73. Massberg S, Gruner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, Kersting J, Schulz C, Muller I, Besta F, Nieswandt B, Heinzmann U, Walter U, Gawaz M. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood*. 2004;103:136-142.
74. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol*. 2001;62:1153-1161.
75. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002;196:887-896.
76. Schäfer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008;6:52-60.

77. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001;88:756-762.
78. Arndt H, Smith CW, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension*. 1993;21:667-673.
79. Davenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology*. 1994;107:1050-1058.
80. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1652-1659.
81. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation*. 1996;94:1682-1689.
82. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76:980-986.
83. Tsao PS, Wang B, Buitrago R, Shyy JY, Cooke JP. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation*. 1997;96:934-940.
84. Cardona-Sanclemente LE, Born GV. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on the uptake of LDL and fibrinogen by arterial walls and other organs of the rat. *Br J Pharmacol*. 1995;114:1490-1494.
85. Draijer R, Atsma DE, van Der LA, van Hinsbergh VW. cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76:199-208.
86. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett*. 1993;334:170-174.
87. Goss SP, Hogg N, Kalyanaraman B. The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1997;272:21647-21653.
88. Seccia M, Perugini C, Albano E, Bellomo G. Inhibition of Cu²⁺-induced LDL oxidation by nitric oxide: a study using donors with different half-time of NO release. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;220:306-309.
89. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis.

- Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*. 1996;79:748-756.
90. Fukuo K, Hata S, Suhara T, Nakahashi T, Shinto Y, Tsujimoto Y, Morimoto S, Ogihara T. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 1996;27:823-826.
 91. Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin1 receptors. *J Clin Invest*. 1995;96:141-149.
 92. Fukumoto S, Koyama H, Hosoi M, Yamakawa K, Tanaka S, Morii H, Nishizawa Y. Distinct role of cAMP and cGMP in the cell cycle control of vascular smooth muscle cells: cGMP delays cell cycle transition through suppression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 activation. *Circ Res*. 1999;85:985-991.
 93. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113:1708-1714.
 94. Bohlen HG, Lash JM. Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF-mediated vasodilation of normal rat arterioles. *Am J Physiol*. 1993;265:H219-H225.
 95. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;88:2510-2516.
 96. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation*. 2001;103:1618-1623.
 97. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404:787-790.
 98. Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der LB, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli GC, Joch H, Volpe M, Luscher TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 2003;107:1017-1023.
 99. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263:681-684.
 100. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002;109:817-826.

101. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001;103:1282-1288.
102. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*. 2001;276:14533-14536.
103. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105:1656-1662.
104. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43:562-571.
105. Garay-Sevilla ME, Regalado JC, Malacara JM, Nava LE, Wrobel-Zasada K, Castro-Rivas A, Wrobel K. Advanced glycosylation end products in skin, serum, saliva and urine and its association with complications of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest*. 2005;28:223-230.
106. Schmidt AM, Stern D. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Curr Atheroscler Rep*. 2000;2:430-436.
107. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:E685-E694.
108. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest*. 1991;87:1643-1648.
109. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*. 1994;43:1122-1129.
110. Inoguchi T, Xia P, Kunisaki M, Higashi S, Feener EP, King GL. Insulin's effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. *Am J Physiol*. 1994;267:E369-E379.
111. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Creager MA. Inhibition of protein kinase C β prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ Res*. 2002;90:107-111.

112. Kelley DE, Simoneau JA. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1994;94:2349-2356.
113. Boden G. Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999;111:241-248.
114. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 1999;103:253-259.
115. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, 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.* 2000;49:1939-1945.
116. Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I, Ares MP, Banfi C, Calara F, Hamsten A, Eriksson P, Nilsson J. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells. *Circ Res.* 1999;84:1085-1094.
117. Cummings MH, Watts GF, Umpleby AM, Hennessy TR, Naoumova R, Slavin BM, Thompson GR, Sonksen PH. Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in NIDDM. *Diabetologia.* 1995;38:959-967.
118. Sniderman A, Thomas D, Marpole D, Teng B. Low density lipoprotein. A metabolic pathway for return of cholesterol to the splanchnic bed. *J Clin Invest.* 1978;61:867-873.
119. Dimitriadis E, Griffin M, Owens D, Johnson A, Collins P, Tomkin GH. Oxidation of low-density lipoprotein in NIDDM: its relationship to fatty acid composition. *Diabetologia.* 1995;38:1300-1306.
120. de Man FH, Weverling-Rijnsburger AW, van Der LA, Smelt AH, Jukema JW, Blauw GJ. Not acute but chronic hypertriglyceridemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation: reversal after lipid-lowering therapy by atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:744-750.
121. Kuhn FE, Mohler ER, Satler LF, Reagan K, Lu DY, Rackley CE. Effects of high-density lipoprotein on acetylcholine-induced coronary vasoreactivity. *Am J Cardiol.* 1991;68:1425-1430.
122. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.

123. Pradhan AD, Ridker PM. Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur Heart J.* 2002;23:831-834.
124. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 1999;48:1-9.
125. Pennathur S, Heinecke JW. Mechanisms of oxidative stress in diabetes: implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy. *Front Biosci.* 2004;9:565-574.
126. Schwarz UR, Kobsar AL, Kocsch M, Walter U, Eigenthaler M. Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:1399-1407.
127. Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost.* 2001;86:214-221.
128. Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikstrom-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2702-2708.
129. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:3378-3384.
130. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695.
131. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:456S-460S.
132. Libby P, Plutzky J. Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Am J Cardiol.* 2007;99:27B-40B.
133. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest.* 2001;107:255-264.
134. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2:275-281.
135. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schomig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface

expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*. 1998;98:1164-1171.

136. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schomig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2000;148:75-85.
137. Schäfer A, Bauersachs J. Therapeutic targets of ataciguat. *Drugs Future*. 2007;32:369.
138. Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Munzel T. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation*. 2001;103:2188-2194.
139. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, AK HS, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Muller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Muller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*. 2006;116:2552-2561.
140. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:755-768.
141. Schindler U, Strobel H, Schonafinger K, Linz W, Lohn M, Martorana PA, Rutten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Topfer A, Pistorius A, Jannek C, Mulsch A. Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol*. 2006;69:1260-1268.
142. Fleming I, Bauersachs J, Schafer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces the Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1123-1128.
143. Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, 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*. 2004;287:C895-C902.
144. Fitzhugh AL, Keefer LK. Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the "NONOates". *Free Radic Biol Med*. 2000;28:1463-1469.

145. 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;254:319-324.
146. Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods.* 1987;97:209-213.
147. Schafer A, Flierl U, Vogt C, Menninger S, Tas P, Ertl G, Bauersachs J. Telmisartan improves vascular function and reduces platelet activation in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Pharmacol Res.* 2007;56:217-223.
148. Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res.* 1998;82:1298-1305.
149. Schäfer A, Fraccarollo D, Pfortsch S, Flierl U, Vogt C, Pfrang J, Kobsar A, Renne T, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J. Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus. *Br J Pharmacol.* 2008;153:886-893.
150. Poloyac SM, Tortorici MA, Przychodzin DI, Reynolds RB, Xie W, Frye RF, Zemaitis MA. The effect of isoniazid on CY. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:727-733.
151. Alonso-Galicia M, Falck JR, Reddy KM, Roman RJ. 20-HETE agonists and antagonists in the renal circulation. *Am J Physiol.* 1999;277:F790-F796.
152. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* 2002;82:131-185.
153. Warnholtz A, Mollnau H, Heitzer T, Kontush A, Moller-Bertram T, Lavall D, Giaid A, Beisiegel U, Marklund SL, Walter U, Meinertz T, Munzel T. Adverse effects of nitroglycerin treatment on endothelial function, vascular nitrotyrosine levels and cGMP-dependent protein kinase activity in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1356-1363.
154. Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 1996;50:1-5.

155. Olesen SP, Drejer J, Axelsson O, Moldt P, Bang L, Nielsen-Kudsk JE, Busse R, Mulsch A. Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol*. 1998;123:299-309.
156. Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxyntrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:1360-1367.
157. Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*. 2003;108:2034-2040.
158. Ebrahimian TG, Heymes C, You D, Blanc-Brude O, Mees B, Waeckel L, Duriez M, Vilar J, Brandes RP, Levy BI, Shah AM, Silvestre JS. NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol*. 2006;169:719-728.
159. Muzaffar S, Shukla N, Angelini G, Jeremy JY. Nitroaspirins and morpholinonydnimine but not aspirin inhibit the formation of superoxide and the expression of gp91phox induced by endotoxin and cytokines in pig pulmonary artery vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *Circulation*. 2004;110:1140-1147.
160. Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC. Effects of 5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine (BAY 41-2272) on smooth muscle tone, soluble guanylyl cyclase activity, and NADPH oxidase activity/expression in corpus cavernosum from wild-type, neuronal, and endothelial nitric-oxide synthase null mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322:1093-1102.
161. Etienne P, Pares-Herbute N, Mani-Ponset L, Gabrion J, Rabesandratana H, Herbute S, Monnier L. Phenotype modulation in primary cultures of aortic smooth muscle cells from streptozotocin-diabetic rats. *Differentiation*. 1998;63:225-236.
162. Pandolfi A, Grilli A, Cilli C, Patruno A, Giaccari A, Di Silvestre S, De Lutiis MA, Pellegrini G, Capani F, Consoli A, Felaco M. Phenotype modulation in cultures of vascular smooth muscle cells from diabetic rats: association with increased nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation. *J Cell Physiol*. 2003;196:378-385.
163. Ko YS, Yeh HI, Haw M, Dupont E, Kaba R, Plenz G, Robenek H, Severs NJ. Differential expression of connexin43 and desmin defines two subpopulations of medial smooth muscle cells in the human internal mammary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1669-1680.
164. Rocnik E, Saward L, Pickering JG. HSP47 expression by smooth muscle cells is increased during arterial development and lesion formation and is

- inhibited by fibrillar collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:40-46.
165. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995;75:487-517.
166. Faries PL, Rohan DI, Takahara H, Wyers MC, Contreras MA, Quist WC, King GL, LoGerfo FW. Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. *J Vasc Surg.* 2001;33:601-607.
167. Tulis DA, Durante W, Peyton KJ, Chapman GB, Evans AJ, Schafer AI. YC-1, a benzyl indazole derivative, stimulates vascular cGMP and inhibits neointima formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279:646-652.
168. Chiche JD, Schlutsmeyer SM, Bloch DB, de la Monte SM, Roberts JD, Jr., Filippov G, Janssens SP, Rosenzweig A, Bloch KD. Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP. *J Biol Chem.* 1998;273:34263-34271.
169. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res.* 2003;93:280-291.
170. Wang Z, Hall SD, Maya JF, Li L, Asghar A, Gorski JC. Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P450 2E1 in humans. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;55:77-85.
171. Kataoka S, Yasui H, Hiromura M, Sakurai H. Effect of insulin-mimetic vanadyl sulfate on cytochrome P450 2E1-dependent p-nitrophenol hydroxylation in the liver microsomes of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Life Sci.* 2005;77:2814-2829.
172. Raza H, Prabu SK, Robin MA, Avadhani NG. Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes.* 2004;53:185-194.
173. Zhang F, Deng H, Kemp R, Singh H, Gopal VR, Falck JR, Laniado-Schwartzman M, Nasjletti A. Decreased levels of cytochrome P450 2E1-derived eicosanoids sensitize renal arteries to constrictor agonists in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2005;45:103-108.
174. Gergel D, Misik V, Riesz P, Cederbaum AI. Inhibition of rat and human cytochrome P450 2E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1997;337:239-250.

175. Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. The liver-selective nitric oxide donor O²-vinyl 1-(pyrrolidin-1-yl)diazene-1,2-diolate (V-PYRRO/NO) protects HepG2 cells against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity. *Mol Pharmacol.* 2004;65:130-138.

Publikationen und Präsentationen

- Schäfer A, Fraccarollo D, Pförtsch S, Flierl U, **Vogt C**, Pfrang J, Kobsar A, Renne T, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J. *Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus*. Br J Pharmacol. 2008;153:886-893.
- Schäfer A, Flierl U, **Vogt C**, Menninger S, Tas P, Ertl G, Bauersachs J. *Telmisartan improves vascular function and reduces platelet activation in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus*. Pharmacol Res. 2007;56:217-223.
- Schäfer A, Fraccarollo D, **Vogt C**, Flierl U, Hemberger M, Tas P, Ertl G, Bauersachs J. *Improved endothelial function and reduced platelet activation by chronic HMG-CoA-reductase inhibition with rosuvastatin in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus*. Biochem Pharmacol. 2007;73:1367-1375.
- Postervortrag auf der 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 12. bis 14. April 2007, Mannheim
C. Vogt, U. Flierl, A. Schäfer
Verbesserung der vaskulären Dysfunktion bei STZ-induziertem Diabetes mellitus durch den Angiotensin II-Antagonisten Telmisartan (P149)
- Postervortrag auf dem XIV. International Symposium on Atherosclerosis der International Atherosclerosis Society, 18. bis 22. Juni 2006, Rom, Italien
Vogt C, Fraccarollo D, Leutke M, Bauersachs J, Schäfer A
Improvement of Vascular Dysfunction in Diabetes by Chronic Guanylyl Cyclase Activation (218 Tu-P7:153)
- Vortrag auf der 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 20. bis 22. April 2006, Mannheim
Chr. Vogt, U. Flierl, M. Leutke, A. Schäfer
Chronische Stimulation der löslichen Guanylatzyklase in vivo normalisiert die hochgradig eingeschränkte vaskuläre Kontraktionsfähigkeit bei Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus (V1483)
- Postervortrag auf der 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 31. März bis 2. April 2005, Mannheim
Chr. Vogt, M. Hemberger, I. Birschmann, A. Schäfer
Verbesserung der vaskulären Dysfunktion bei Diabetes mellitus durch Guanylatzyklase-Aktivierung. (P993)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Johann Bauersachs für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas und für sein Vertrauen danken.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Schäfer für seine unermüdliche Unterstützung, seine wertvollen Anregungen und seine engagierte Betreuung während der gesamten Zeit der Laborarbeiten und während der Erstellung dieser Dissertation.

Herzlich danken möchte ich Frau Dr. Daniela Fraccarollo und Herrn Dr. Paolo Galuppo, die mir im Labor stets mit gutem Rat zur Seite gestanden haben. Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bauersachs, die mir während der experimentellen Phase stets eine große Unterstützung waren.

Ganz besonders danke ich nicht zuletzt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mich bei meinen Bemühungen stets rückhaltlos mit Rat und Tat unterstützt haben.

Für meine allerliebste Katrin.