

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

Die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion isolierter Arterien
und deren Beeinflussung durch OxLDL

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

vorgelegt von

Maria Görg

aus Kaltennordheim

Würzburg, September 2005

Referent: Prof. Dr. med. Jan Galle

Korreferent: Prof. Dr. Michael Gekle

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2006

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Physiologie und Pathophysiologie der Vasomotorik	1
1.1.1	Vasomotorische Relaxation	2
1.1.2	Vasomotorische Kontraktion	3
1.2	Regulationsmechanismen der Vasomotorik	4
1.3	Endothel und Endotheliale Dysfunktion	6
1.4	Atherosklerose	7
1.5	Lipoproteine	8
1.5.1	Stoffwechsel	8
1.5.2	Oxidiertes LDL	10
1.5.3	Rezeptoren für Oxidiertes LDL	10
1.5.4	Oxidiertes LDL und seine Wirkung	11
1.6	Angiotensin II	12
1.6.1	Angiotensin II Rezeptoren	13
1.6.2	Angiotensin II Rezeptor Typ 1(AT ₁)	13
1.6.3	Angiotensin II Rezeptor Typ 2 (AT ₂)	14
1.6.4	Angiotensin II vermittelte Wirkung	14
1.7	Ziel der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Versuchstiere	16
2.2	Gefäßpräparation	16
2.3.	Präparationspuffer	17

2.4	Versuchsaufbau	18
2.4.1	Querschnittsskizze	19
2.4.2	Detailskizze	20
2.5	Perfusat	21
2.6	Versuchsdurchführung	21
2.6.1	Allgemeine Bemerkungen	21
2.6.1.1	Versuche zum Wirkungsprofil von Angiotensin II und der Festlegung einer Ang II-Schwellenkonzentration	22
2.6.1.2	Versuche zur Wirkung von OxLDL auf die Ang II-DWK	22
2.6.1.3	Versuche zum Einfluss von OxLDL auf den Basaltonus und die durch eine Schwellenkonzentration vorkontrahierten Gefäße	23
2.6.1.4	Versuche zur Wirkung verschiedener Medikamente und Substanzen	23
2.6.1.5	Versuche an deendothelialisierten Gefäßen	24
2.7	Versuchsauswertung	24
2.8.	Präparation und Modifikation von LDL	25
2.8.1	Gewinnung von nativem LDL	25
2.8.2	Konzentrierung des nativen LDL	25
2.9	Modifikation von n-LDL zu OxLDL	26
2.9.1	Eliminierung von EDTA	26
2.9.2	Oxidation des n-LDL	26
2.9.3	Beendigung des Oxidationsvorganges	26
2.9.4	Kontrolle des Oxidationsgrades und des Proteingehaltes	27
2.10	Auswertung und Statistik	27
2.11	Chemikalien und Pharmaka	27
2.12	Geräteverzeichnis	28

3	ERGEBNISSE	30
3.1	Wirkungsprofil des Angiotensin II	30
3.2	Einfluss von OxLDL auf die Ang II-DWK	31
3.3	Einfluss von OxLDL auf den Basaltonus sowie auf gering vorkontrahierte GefäÙe	32
3.4	Einfluss von OxLDL auf den Basaltonus sowie auf gering vorkontrahierte deendothelialisierte GefäÙe	34
3.5	Einfluss von Quinapril auf die Ang II induzierte Kontraktion	35
3.6	Einfluss von Quinapril auf die durch OxLDL hervorgerufene Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion	37
3.7	Effekt des Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion	38
3.8	Einfluss des Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin auf die durch OxLDL induzierte Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion	39
3.9	Einfluss des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan auf das Kontraktionsverhalten isolierte Aortenringe bei Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen von Ang II	41
3.10	Effekt des AT₁- Rezeptorantagonisten Losartan auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL	43
3.11	Einfluss des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 auf das durch Ang II Stimulation in ansteigenden Konzentrationen induzierte Kontraktionsverhalten isolierter Kaninchenaortenringe	44

3.12	Einfluss von Y27632 auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL	46
4	DISKUSSION	49
4.1	Wirkprofil des Angiotensin II und dessen Beeinflussung durch verschiedene Testsubstanzen	49
4.2	Der Einfluss von OxLDL auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion	50
4.3.	Einfluss bekannter Antihypertensiva auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion und deren Potenzierung durch OxLDL	52
4.3.1	Der Calciumkanalantagonist Felodipin schwächt die Ang II induzierte Vasokonstriktion und deren Potenzierung durch OxLDL ab	52
4.3.2	Der ACE-Hemmer Quinapril hat keinen Einfluss auf die Ang II Induzierte Vasokonstriktion und deren Potenzierung durch OxLDL	53
4.3.3	Der AT ₁ -Rezeptorantagonist Losartan hemmt die OxLDL vermittelte Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion	54
4.4	Der Effekt des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion und deren Potenzierung durch OxLDL	55
4.4.1	Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 schwächt die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion ab	55
4.4.2	Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 verhindert die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL	56
5	ZUSAMMENFASSUNG	57
6	LITERATURVERZEICHNIS	59

7 ANHANG	69
7.1 Abbildungsverzeichnis	69
7.2 Abkürzungsverzeichnis	72

1 Einleitung

Bereits 1898 legten Tiegerstedt und Bergmann den Grundstein für die heutige Bluthochdruckforschung, als sie durch die Injektion eines aus frischen Nieren gewonnen Extraktes einen deutlichen Anstieg des Blutdruckes der Versuchstiere feststellten und eine blutdrucksteigernde Substanz als Ursache vermuteten[1]. Eine erste Bestätigung dieser Hypothese gelangen Goldblatt et al. mit dem Nachweis einer Hypertonie durch Nierenarteriendrosselung 1934[2].

Seit der Entdeckung des Angiotensins durch Braun-Mendez et al. sowie Page et al. 1939/40 konnten die Wirkmechanismen des Angiotensins sowohl physiologisch als auch molekularbiologisch nahezu vollständig geklärt werden[3], [4].

Etwa 1913 stießen Anitschkow und Chalutow mit ihrer Feststellung, daß Kaninchen, welche einer cholesterinreichen Diät unterzogen werden, Läsionen entwickeln, die der Atherosklerose des Menschen vergleichbar sind, die wissenschaftlichen Arbeiten auf dem Gebiet der Pathogenese der Atherosklerose und der therapeutischen Möglichkeiten an[5],[6]. Durch die Feststellung von Potter et al., daß sowohl Angiotensin II als auch OxLDL in atherosklerotischen Plaques vorliegen, erhielten beide Forschungsrichtungen wesentliche neue gemeinsame Impulse[7].

1.1 Physiologie und Pathophysiologie der Vasomotorik

Bei der Entstehung des Hypertonus spielt die Variationsbreite der vasomotorischen Reaktion die entscheidende Rolle.

Die optimale Durchblutung der Organe wird durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst. Mechanische Belastung (shear stress, pulsatile Wanddehnung), Änderungen der metabolischen Vorgänge und der Freisetzung von vasoaktiven Substanzen stellen für die Gefäße des Kreislaufs Stresssituationen dar, auf welche sie binnen kurzer Zeit mit Veränderungen des Tonus reagieren müssen.

Diese Veränderungen des Gefäßtonus werden in erster Linie durch das Zusammenspiel zwischen relaxierenden und kontrahierenden Faktoren gesteuert.

Die von Furchtgott und Zawadzki [8]⁸ als Endothelium Derived Relaxing Factor bezeichnete und später als NO identifizierte Substanz[9]⁹ steuert hierbei den relaxierten Zustand in dem die Arterien physiologischerweise vorliegen.

1.1.1 Vasomotorische Relaxation

Nach rezeptorabhängiger oder –unabhängiger Stimulation des Endothels durch Agonisten erfolgt die Bildung des NO durch die Aktivität endothelialer NO-Synthetasen.

Hierbei wird NO durch Abspaltung von L-Arginin gebildet und freigesetzt. NO aktiviert eine Guanylatzyklase und führt über die Bildung von cGMP zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur.

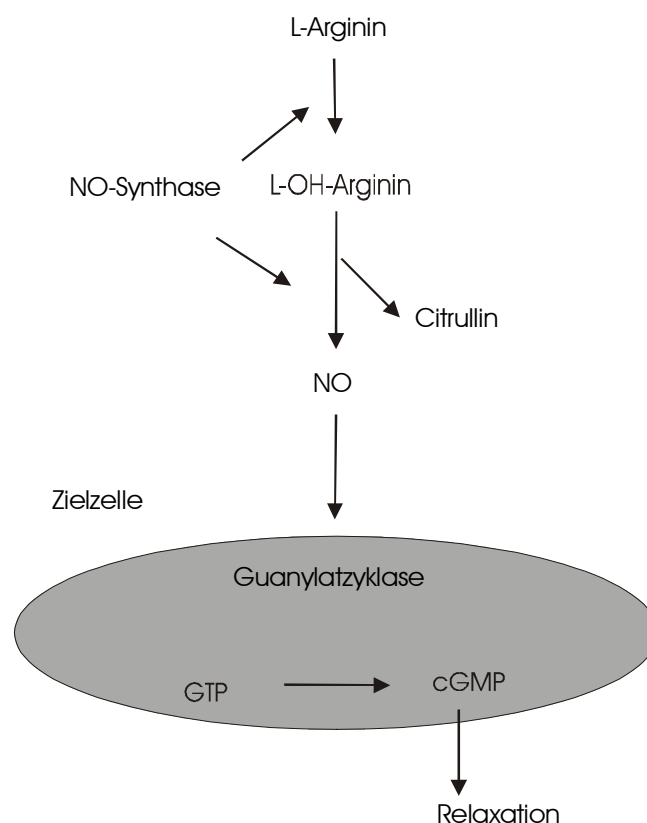


Abb.1: Synthese von NO aus der Aminosäure L-Arginin unter der Einwirkung des Enzyms NO-Synthase. Die über NO aktivierte Guanylatzyklase der Zielzellen bildet zyklisches Guanodin-Monophosphat (cGMP) aus Guanodintriphosphat (GTP), welches die Relaxation der glatten Muskelzellen vermittelt.

1.1.2 Vasomotorische Kontraktion

Neben der Vasodilation durch NO und andere endotheliale Faktoren hat sich die agonistenvermittelte Vasokonstriktion in den letzten Jahren zunehmend als ebenso bedeutend in der Pathogenese des Bluthochdrucks, insbesondere im Zusammenhang mit Atherosklerose, gezeigt.

Durch Rezeptorbindung verschiedener Vasokonstriktoren und Aktivierung eines stimulierenden G-Proteins, öffnen sich Ca^{2+} -Kanäle, durch welche es zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Zelle kommt. Diese freigesetzten Calciumionen bilden mit Calmodulin einen Komplex, der in der Lage ist, die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) zu aktivieren. Im aktivierten Zustand phosphoryliert diese MLCK die Myosin-Leichtketten (MLC), worauf es diesen möglich wird, mit Aktin zu interagieren und eine Kontraktion hervorzurufen. Die Dephosphorylierung der Myosinleichtketten führt zu einer Inaktivierung und Relaxation. Diese wird durch die Myosin-Leichtketten-Phosphatase vermittelt[10].

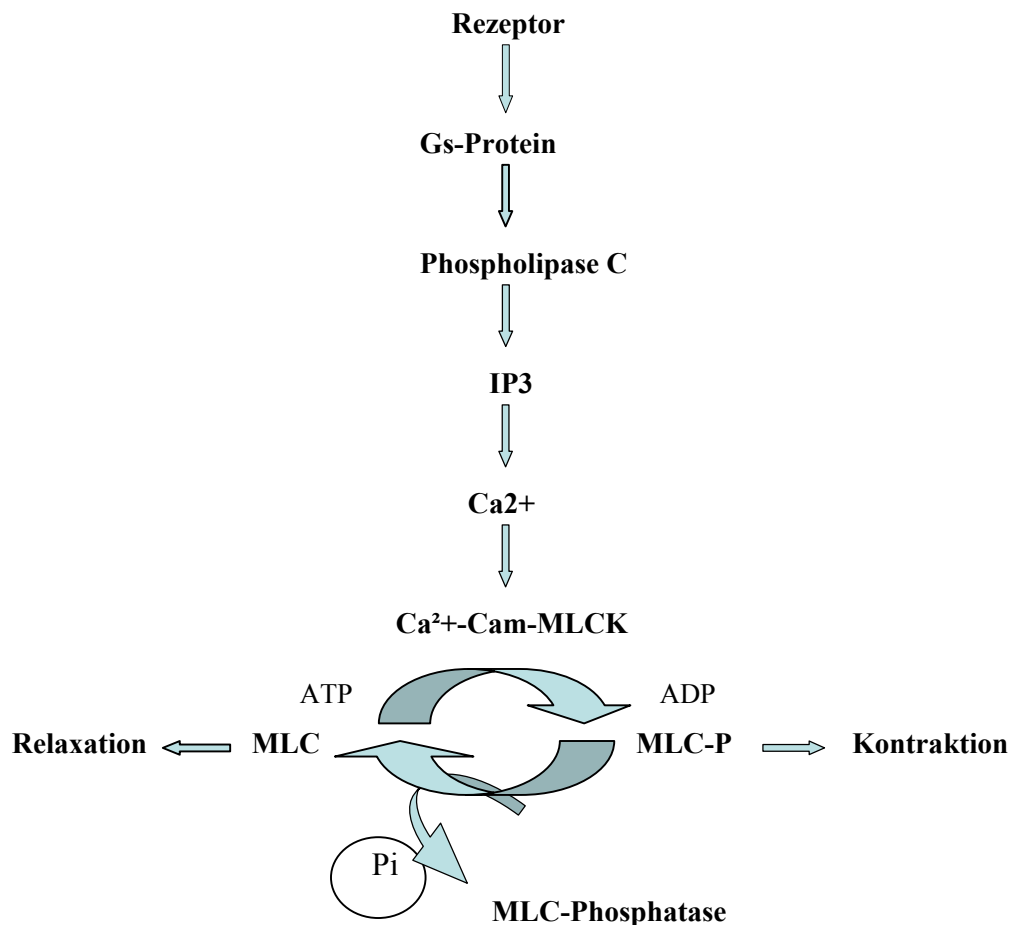


Abb.2: Rezeptorgekoppelte Induktion der glattmuskulären Kontraktion und die Myosin-Leichtketten-Phosphatase vermittelte Relaxation

1.2 Regulationsmechanismen der Vasomotorik

Die Kontraktion ermöglichenden Mechanismen Phosphorylierung und Dephosphorylierung sind prädisponiert, um als regulierende Einheiten der Vasomotorik zu wirken.

Bradley et al.[11], Himpens et al.[12] und Rembold et al.[13] beschrieben als erste eine wesentlich höhere Kraft/Calcium-Ratio durch Agonisten vermittelten als durch einen depolarisationsbedingten Anstieg der Calciumionenkonzentration. In verschiedenen weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es trotz einer stabilen intrazellulären

Calciumionenkonzentration zu einer Abnahme der Kraftentwicklung und ebenso zu einer Zunahme der Kraftentwicklung bei abfallenden Calciumionenkonzentrationen kommen kann. Dieses Phänomen wird als Calcium-Sensibilisierung bezeichnet.

Bereits Anfang der 90er Jahre konnte man parallel zu der veränderten Kraftentwicklung unter konstanten Calciumspiegeln Unterschiede in der Aktivität der phosphorylierenden und dephosphorylierenden Enzyme und, damit verbunden, im Grad der Phosphorylierung der MLC nachweisen. Somlyo postulierte, dass die Aktivität der Myosinleichtkettenphosphatase (MLC-Phosphatase) hierbei der regulierende Schritt sei. Zunächst wurde die Aktivität der MLC-Phosphatase als konstitutiv aktiv angesehen. Im Verlaufe der letzten 15 Jahre wurden jedoch verschiedene Regulationsmechanismen postuliert bzw. aufgedeckt[10].

Gong et al. zeigten eine Arachidonsäure vermittelte Dissoziation der MLC-Phosphatase- Untereinheiten mit einer daraus resultierenden Aktivitätsminderung nach G-Protein Aktivierung[14], während Masuo et al.[15] eine Proteinkinase C vermittelte Calcium-Sensibilisierung aufdeckten. Nishimura et al.[16] und Kitazawa et al.[17] postulierten und zeigten eine G-Protein assoziierte Steigerung der Ca^{2+} Sensibilität. Ausgehend von diesen Beobachtungen entwickelten sich verschiedene Richtungen, die die Regulation der Ca^{2+} -Sensibilisierung zum einen durch eine Phosphorylierung einer MLC-P-Untereinheit bzw. der MLCK vermuteten.

Durch die Arbeiten von Kimura et al., Kureishi et al. und Uehatha et al. konnte das beschriebene G-Protein als Rho und dessen assoziierte Kinase (Rho-Kinase) in Zellkulturen identifiziert werden[18] [19] [20].

Dabei postulierten Kimura et al.[18] einen modifizierenden Einfluss der Rho-Kinase auf die Myosinleichtkettenphosphatase-Aktivität. Ausgehend von diesen Arbeiten kann man die Regulation der glattmuskulären Kontraktion und die Ca^{2+} Sensibilisierung folgendermaßen zusammenfassen.

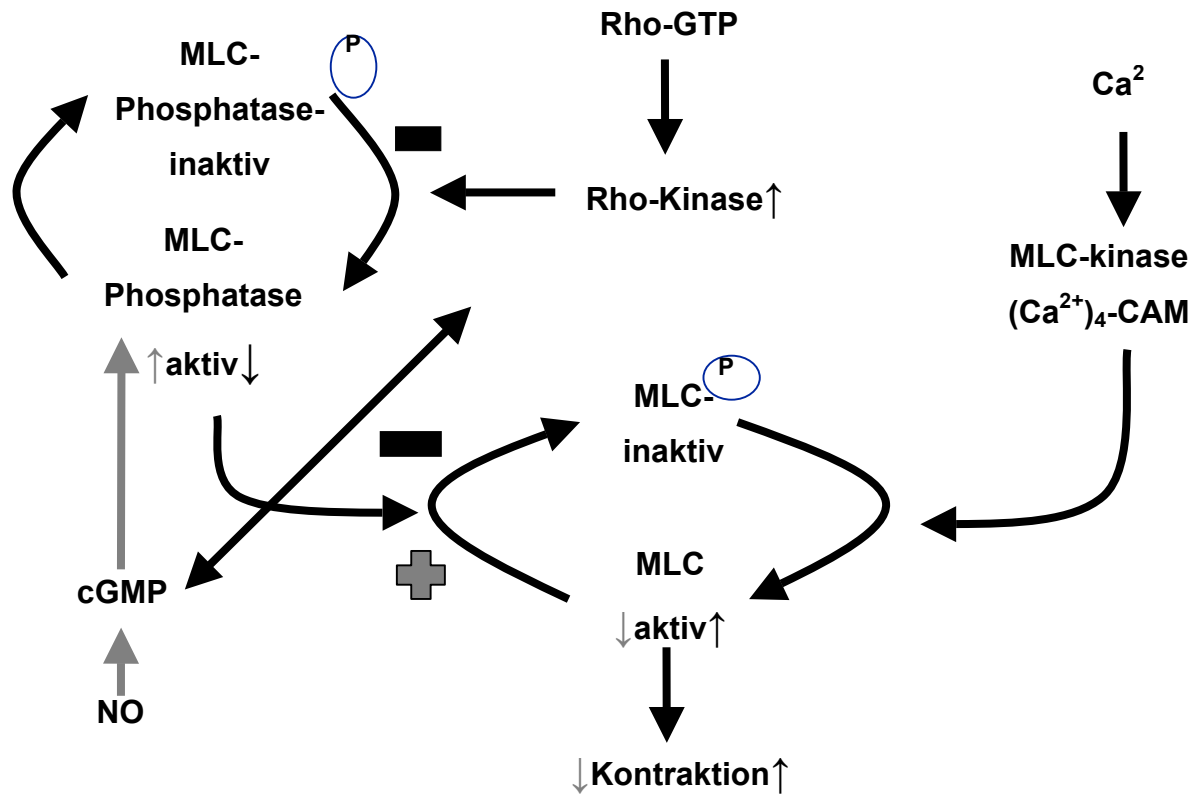


Abb.3: Regulation der glattmuskulären Kontraktion

1.3 Endothel und Endotheliale Dysfunktion

Als luminal auskleidende Schicht der Gefäße ist das Endothel den ständig wechselnden Bedingungen der Blutzusammensetzung, der zirkulierenden Hormone und des systemischen Blutdrucks ausgesetzt.

Neben der Regulation des basalen Gefäßtonus durch Sekretion von NO erfüllt das Endothel weitere kreislaufregulatorische Funktionen. Über die Synthese von Faser- und Proteoglykankomponenten beeinflusst es die Gefäßarchitektur; die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen wird gehemmt, die Migration von Leukozyten im Rahmen von entzündlichen Prozessen durch Expression von Adhäsionsmolekülen gefördert. Die Interaktion von Blutzellen mit der Gefäßwand, sowie die Entstehung von Thromben und atherosklerotischen Läsionen wird durch die Produktion und Sekretion

verschiedenster Faktoren beeinflusst. Exemplarisch seien hier Interleukin-1, Tissue Plasminogen Activator, Prostazyklin und Fibronektin genannt.

Antiatherogen wirkt das Endothel durch Inhibition der Oxidation von Low Density Lipoprotein und der Synthese inflammatorischer Zytokine[21-23].

Durch eine Endothelschädigung kann die Störung der Vasomotorik resultieren. Neben klassischen Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Bluthochdruck und Diabetes mellitus tragen auch chronische Entzündungen, das C-reaktive Protein, Lipoprotein(a) sowie bakterielle und virale Infektionen zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion bei und begünstigen die Atheroskleroseentstehung[24-26]. Im Zuge der endothelialen Dysfunktion entsteht ein Ungleichgewicht zwischen dilatierenden und konstringierenden Faktoren, mit der Folge eines erhöhten Vasotonus.

Als Folge der endothelialen Dysfunktion werden Vasospasmen, Thrombenbildung und Atherosklerose gefördert[22, 27, 28].

1.4 Atherosklerose

Die Pathogenese der Atherosklerose ist bisher nicht vollständig geklärt. Anders als die von Virchow aufgestellte und noch bis in die 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts von vielen Wissenschaftlern vertretene Hypothese des ursprünglichen Endothelzellschadens[29] als Initialschritt bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen, etablierte sich in den letzten Jahren zunehmend die Theorie der endothelialen Dysfunktion als Anfangstadium der Atherosklerose. Im Zuge der gestörten Endothelzellfunktion werden aufgenommene Lipoproteine wie z.B. Very Low Density Lipoprotein (VLDL) und vor allem Low Density Lipoprotein (LDL) vermehrt oxidativ modifiziert und im subendothelialen Raum abgelagert. Diese modifizierten Lipoproteine schädigen die Endothelzellen nicht nur direkt, sondern induzieren auch die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle für Monozyten und T-Lymphozyten auf der Endotheloberfläche. Zu diesen Adhäsionsmolekülen gehören unter anderem E-Selectin und VCAM-1. Zusätzlich werden von Endothel- und glatten Muskelzellen nach Kontakt zu atherogenen Substanzen auch direkte chemotaktische Faktoren wie Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) produziert, die die Anheftung und Migration in den subendothelialen Raum vermitteln.

Nachdem die Monozyten in die Intima eingewandert sind, wandeln sie sich unter der Wirkung von Colony Stimulating Factor (CSF) und Zytokinen in aktivierte Makrophagen um. Die anschließende Phagozytose der abgelagerten Lipoproteine führt zur Schaumzellbildung. Zusammen mit den eingewanderten und aktivierten T-Lymphozyten bilden die Schaumzellen den sogenannten „fatty streak“, die erste sichtbare atherosklerotische Läsion. Die Aufnahme von LDL in Makrophagen erfolgt über den saturierbaren ApoB 100-Rezeptor. Bereits oxidativ modifiziertes LDL kann aufgrund einer Änderung im Apoprotein B nicht an den Apo B 100-Rezeptor binden. Hier erfolgt die Aufnahme über nichtsättigbare Scavenger Rezeptoren, welche die Überladung der Zellen und somit die Schaumzellbildung begünstigen. Neben der Phagozytose abgelagerter Lipoproteine sezernieren die Makrophagen verschiedene Stoffe. Dabei kommt es zum einen zu einer weiteren lokalen Schädigung durch reaktive Sauerstoffradikale oder Enzyme wie Lipasen und Proteasen. Zum anderen wird durch immunmodulatorische Botenstoffe, wie Interferon α , Interleukin-1 oder Tumor – Nekrose Faktor α , eine Entzündungsreaktion induziert. Aufgrund mangelnder Synthese antithrombogener Faktoren durch die Endothelzellen, kommt es von luminal zur Thrombozytenaggregation. Durch die Freisetzung von PDGF tragen diese zur Migration und Transformation glatter Muskelzellen mit hauptsächlich kontraktilen Elementen zu synthetisch aktiven Myozyten bei. Durch die Produktion von Proteoglykanen und Kollagenfasern wird im weiteren Verlauf die Sklerose der Läsion und damit die Atherombildung unterstützt[30].

1.5 Lipoproteine

1.5.1 Stoffwechsel

Triglyzeride und Cholesterin werden sowohl mit der Nahrung aufgenommen als auch von der Leber selbst synthetisiert. Zum einen dienen sie der Synthese von Gallensäuren

und -salzen, zum anderen der Herstellung von Lipoproteinen zur Versorgung der verschiedensten Organe.

Das von der Leber gebildete Very Low Density Lipoprotein (VLDL) enthält 0,7% Cholesterin und 55% Triglyzeride. Als Strukturprotein enthält es das Apolipoprotein B-100 (Apo B-100), zusätzlich zu diesem auch die Apolipoproteine AI, E, und C. Durch das Wirken der Lipoproteinlipase werden die Triglyzeride hydrolysiert. Über das Zwischenprodukt Intermediate Density Lipoprotein (IDL) entsteht bei diesem Vorgang das Low Density Lipoprotein (LDL). Neben dem unveränderten Anteil an Cholesterin und einem stark reduzierten Triglyzeridgehalt verfügt LDL nur noch über das ApoB-100. Über den Blutstrom transportiert LDL das Cholesterin zu den Zellen der Peripherie. Durch die Interaktion des ApoB-100 mit den ApoB-100- und ApoE-Rezeptoren wird das Cholesterin in die Zellen aufgenommen. Diese LDL-Rezeptoren befinden sich in spezialisierten Membranbereichen, den sogenannten coated pits, welche auf der intrazellulären Membranseite ein clathrinhaltiges Proteingerüst aufweisen. Dieses Clathrin vermittelt durch die Ausbildung eines Gitterwerkes die Ablösung der coated pits von der Plasmamembran und die Entstehung von Endocytosevesikeln. Über die Verschmelzung der Endosomen mit Lysosomen wird eine Änderung des pH-Wertes und somit eine Dissoziation der LDL-Rezeptor-Komplexes erreicht. Der nun wieder freie LDL-Rezeptor wird erneut in die Plasmamembran integriert. Die im LDL enthaltenen Cholesterinester werden durch lysosomale Lipasen hydrolysiert. Freies Cholesterin wird hauptsächlich zur Membran- und Hormonsynthese verwendet. Über die Aktivierung des Enzyms Cholesterin-Acyltransferase kann das freie Cholesterin erneut verestert und in der Zelle gespeichert werden. Da das Gen für den LDL-Rezeptor ein sterol regulatory element enthält, trägt der intrazelluläre Cholesterinestergehalt wesentlich zur Regulation der LDL-Rezeptorexpression bei. Ein hoher intrazellulärer Cholesteringehalt hemmt die weitere Aufnahme von LDL-Partikeln durch die Hemmung der Transkription des LDL-Rezeptorgens. Aufgrund der geringen Bindungsaffinität des ApoB-100 zum LDL-Rezeptor verweilt dieses länger als alle anderen Lipoproteine im Blut, wodurch seine Atherogenität begünstigt wird. Überschüssiges Cholesterin, das in der Peripherie z.B. beim Absterben von Zellen und beim Abbau von Zellmembranen entsteht, wird von

High Density Lipoprotein-Partikeln (HDL) aufgenommen und zur Leber zurücktransportiert[31-35].

1.5.2 Oxidiertes LDL

Wie sowohl Steinberg als auch Ylä-Herttuala und Daugherty in ihren Untersuchungen atherosklerotischer Läsionen zeigten, findet sich bei vorbestehender Hypercholesterinämie sowohl natives als auch oxidiertes LDL (OxLDL) in den betroffenen Gefäßabschnitten[36-38]. Für die Entstehung und Weiterentwicklung der Atherosklerose ist jedoch vor allem das oxidativ modifizierte LDL das entscheidende Substrat[36]. In vivo erfolgt die Oxidierung des LDL über verschiedenste Mechanismen, wie z.B. Superoxidanionen, Hydroxylradikale, Coeruloplasmin oder die Lipoxygenase. Auf zellulärer Ebene sind daran neben den Endothel- und glatten Muskelzellen vor allem Makrophagen beteiligt[39, 40]. Für die in vitro Oxygenierung wird das reduzierende Potential der Kupferionen genutzt[41-43]. In Abhängigkeit vom Grad der Oxidierung ergeben sich unterschiedliche Wirkungen des OxLDL auf die Zellen[44].

1.5.3 Rezeptoren für Oxidiertes LDL

Während die rezeptorvermittelte Endozytose des LDLs über den intrazellulären Cholesteringehalt geregelt wird und saturierbar ist, erfolgt die Aufnahme oxidierten LDL über so genannte Scavenger Rezeptoren, die nicht saturierbar sind. Dadurch wird die Ansammlung von OxLDL und damit die Bildung atherosklerotischer Läsionen begünstigt. Makrophagen exprimieren nur diesen Scavenger Rezeptor. Auf den Endothelzellen findet sich jedoch ebenfalls ein Lecitin-Like OxLDL-Rezeptor, der sich in seiner Spezifität gegenüber den Liganden vom Scavenger Rezeptor unterscheidet. Durch OxLDL selbst wie auch durch Ang II, Fluid shear stress und TNF- α kann die Expression dieses Rezeptors gesteigert werden[45-49].

1.5.4 Oxidiertes LDL und seine Wirkung

Die Akkumulation von OxLDL in der Gefäßwand führt auf zellulärer Ebene zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, P-Selectin oder ICAM-1, zu anderen wird die Ausschüttung von Zytokinen, Wachstums- und chemotaktischen Faktoren gesteigert[50-52]. Über den Makrophagen colony stimulating factor und das Monozyten chemotaktische Protein-1 wird eine vermehrte Ansammlung von Makrophagen in der Gefäßintima vermittelt. Dies ist ein wichtiger Schritt in der frühen Phase der Atherosklerose[53]. Des Weiteren kommt es unter der Anwesenheit von OxLDL zur Proliferation von glatten Muskel- und Endothelzellen sowie von Makrophagen.

Neben diesen Mechanismen wirkt OxLDL konzentrationsabhängig zytotoxisch auf alle Zellreihen[54].

Bezüglich der Vasomotorik führt OxLDL zu einem verstärkten Ansprechen auf vasokonstriktive Substanzen, sowie zur Abschwächung der Acetylcholin induzierten Vasodilatation [55]. Das verminderte Ansprechen der glatten Muskelzellen auf die Acetylcholin vermittelte Gefäßdilatation begründet sich zum einen in der verminderten Bildung und Freisetzung von EDRF, wodurch es zu einem Überwiegen der kontraktiven Einflüsse kommt. Zum anderen muss OxLDL direkt auf die glattmuskuläre Gefäßmuskulatur kontraktisch wirken. Wie Galle et al. in ihren Untersuchungen an deendothelialisierten Gefäßen zeigen konnten, reagierten diese nach Inkubation mit OxLDL mit einer vermehrten Vasokonstriktion[56, 57].

Die verminderte Dilatationsfähigkeit hypercholesterinämischer Gefäße wird mit der gesteigerten Sekretion von O_2^- durch die Endothelzellen unter dem Einfluss von OxLDL erklärt. Diesen Nachweis führten Ohara et al., als sie bei deendothelialisierten Gefäßen hypercholesterinämischer Kaninchen eine deutlich geringere O_2^- Freisetzung maßen als bei Gefäße mit intaktem Endothel[59]. Zudem konnte in weiteren Arbeiten gezeigt werden, dass OxLDL sowohl an Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen und glatten Gefäßmuskelzellen als auch in der Zellkultur von humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen eine vermehrte Sekretion von O_2^- bewirkt[58, 59].

Während der Großteil des O_2^- über das NADH/NADPH-Oxidase-System gebildet wird, gibt es auch Hinweise auf die Beteiligung anderer Enzymsysteme wie z.B. der Xanthinoxidase; eine vollständige Klärung liegt derzeit jedoch nicht vor[59, 60]. Die Zugabe von Superoxiddismutase verbesserte die endotheliale Dilatation von Gefäßen hypercholesterinämischer Kaninchen. Dies spricht für eine Beteiligung von O_2^- .

Mittlerweile ist bekannt, daß O_2^- und NO stöchiometrisch zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) reagieren[61, 62]. Peroxynitrit kann zwar unter gewissen Umständen selber als Vasodilatator fungieren[63], diese Reaktion unterliegt aber einer raschen Tachyphylaxie[64], so dass der Haupteffekt von Peroxynitrit in der Auslösung einer Endotheldysfunktion zu sehen ist.

Ein weiterer Mechanismus für die verminderte Dilatationsfähigkeit bzw. gesteigerte Vasokonstriktion hypercholesterinämischer Gefäße ist die Steigerung des intrazellulären Calciumgehaltes[65-67] und somit die vermehrte Kontraktionsfähigkeit. Bolz et al. fanden in ihren Arbeiten Hinweise für eine Interaktion von OxLDL mit dem RhoA-Rho-Kinase System, dessen Aktivierung zu einer Calciumsensibilisierung führt. Kandabashi et al. konnten den Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Rho-Kinase und der Entstehung von Vasospasmen in großen Arterien zeigen[67, 68].

1.6 Angiotensin II

Nach Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) z.B. infolge von arterieller Hypotonie, wird Angiotensin II (Ang II) unter Wirkung von Renin und des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) aus hepatisch gebildetem Angiotensinogen durch Proteolyse gebildet. Neben der sofortigen Vasokonstriktion, bewirkt Ang II über eine gesteigerte Ausschüttung von Aldosteron mit nachfolgender Natrium- und Wasserretention eine Steigerung bzw. Aufrechterhaltung des Blutdruckes.

Während man zunächst von einem zentralen RAAS, gestützt von Niere, Leber und Lunge, ausging, konnte in den vergangenen Jahren ein lokales gewebeständiges RAAS nachgewiesen werden. Neben dem ubiquitär vorkommenden ACE, wirken hier auch gewebeeigene Enzyme wie Tonin und tissue-Plasminogen-Aktivator (t-PA), die Ang II

direkt aus Angiotensinogen abspalten können. Im gewebständigen RAAS übernimmt das Ang II auto- und parakrine Funktionen. Des weiteren stehen die Organe über die Mikrozirkulation mit dem Blutkreislauf in Verbindung, so dass angenommen werden muss, dass ein gewisser Anteil des zirkulierenden Ang II aus dem lokalen RAAS stammt[69].

1.6.1 Angiotensin II Rezeptoren

Wie viele weitere Mediatoren vermittelt Angiotensin II seine Wirkung an der Zielzelle über membranständige Rezeptoren. In mehreren experimentellen Studien wurde schon frühzeitig das Vorhandensein zwei verschiedener Rezeptoren postuliert, dieser Beweis konnte jedoch erst durch die Klonierung der Angiotensin II Rezeptoren vom Typ 1 und 2 (AT₁ und AT₂) erbracht werden[70-72]. Die Frage, welcher Rezeptortyp exprimiert wird, ist bisher noch nicht vollständig geklärt und scheint vom Zelltyp abhängig zu sein. Während beim Fötus eine deutliche Dominanz der AT₂-Rezeptoren besteht, findet sich postpartum eine spezifische Verteilung[73]. AT₁-Rezeptoren überwiegen beispielsweise in Niere, Leber und Darm. In den Organen des Herz-Kreislaufsystemes, sowie in den Nebennieren hingegen findet sich ein Gleichgewicht. Eine Dominanz an AT₂-Rezeptoren wird in den weiblichen Geschlechtsorganen gefunden[70, 74, 75].

1.6.2 Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT₁)

Beide Rezeptortypen bestehen aus einer transmembranen Helixstruktur, an welche ein G-Protein gekoppelt ist. Im Falle des AT₁-Rezeptors führt die Bindung von Ang II über die Aktivierung eines stimulierenden G-Proteins zur Aktivierung der Phospholipase C. Durch deren Wirkung werden aus dem Phospholipid Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat die beiden second messenger Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin freigesetzt. IP₃ ruft durch Bindung an seinen Rezeptor am sarkoplasmatischen Retikulum die Freisetzung von Calciumionen durch Aktivierung spezifischer Kanäle

hervor[10]. Diacylglycerin hingegen bewirkt über die Aktivierung der Proteinkinase C und Phospholipase A₂ die Produktion und Sekretion auto- und parakrin wirkender Wachstumsfaktoren[74]. Ein Großteil der Angiotensin II vermittelten Effekte erfolgt durch Aktivierung des AT₁-Rezeptors. Dies betrifft vor allem die Vasomotorik, Aldosteronsekretion, Hypertrophie und Wachstum von Zellen sowie die Freisetzung von O₂⁻ und NO[73, 75].

1.6.3 Angiotensin II Rezeptor Typ 2 (AT₂)

Im Gegensatz zum AT₁-Rezeptor agiert der AT₂- Rezeptor über ein inhibitorisches G-Protein. Hierbei wird zum einen die Aktivität von Kalium-Kämen moduliert, zum anderen werden verschiedene Phosphatasen mit teilweise gegensätzlicher Wirkung aktiviert. Infolge einer Aktivierung der Protein-Phosphotyrosin-Phosphatase vermittelt Ang II eine Wachstums-inhibition der Zelle. Ebenso erfolgt durch Aktivierung von Serin- und Threoninphosphatasen eine Wachstumsinhibition und Apoptoseinduktion[73, 74]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die intimale Regeneration nach Verletzung von Gefäßen über AT₂-Rezeptoren vermittelt wird[75]. Wie der AT₁-Rezeptor wird auch die Expression des AT₂-Rezeptors durch verschiedene Stoffe, wie zum Beispiel Glukokortikoide, Zytokine und Wachstumsfaktoren, beeinflusst.

1.6.4 Angiotensin II vermittelte Wirkung

Aus den vielseitigen Rezeptorfunktionen der beiden AT-Rezeptortypen ergeben sich für Angiotensin II im Wesentlichen zwei Hauptwirkungen – Induktion einer Vasokonstriktion und Regulation des Zellwachstums.

Durch Bindung an den AT₁-Rezeptor vermittelt Ang II zum einen über Aktivierung eines stimulierenden G-Proteins die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, zum anderen durch Stimulation der Endothelin-1 Freisetzung die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen. Wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt

werden konnte, wird dieser Effekt durch die Gabe von AT₁-Rezeptorantagonisten abgeschwächt[76, 77].

1.7 Ziel der Arbeit

Während in vorangegangenen Untersuchungen mit dem Schwerpunkt der endothelialen Funktion gezeigt werden konnte, dass atherosklerotische Prozesse die Vasomotorik durch Inaktivierung von NO sowie die Freisetzung von O²⁻ beeinflussen, soll in dieser Arbeit gezielt die Funktion und Beeinflussung des kontraktiven Apparates des Gefäßsystems analysiert werden.

Basierend auf den Ergebnissen von Galle und Busse 1989[57], die zeigten, dass oxidiertes LDL die Vasokonstriktion verschiedener Agonisten (Noradrenalin, Serotonin, Phenylephrin) potenziert sowie den Analysen von Potter und Heistad [7]1998, welche die Co-Lokalisation von Ang II und OxLDL in atherosklerotischen Läsionen zeigten, sollen in dieser Arbeit die Auswirkungen dieser beiden Substanzen auf die Vasomotorik untersucht werden.

Entsprechend wird zunächst untersucht, ob OxLDL auch die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion verstärkt.

Im Weiteren soll geklärt werden, welche Mechanismen bei einer solchen Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion involviert sind. Zum Einsatz sollen bereits etablierte antihypertensive Medikamente wie der Calciumkanalantagonist Felodipin, der Angiotensin-Converting-Enzym Inhibitor Quinapril, sowie der AT₁-Rezeptorantagonist Losartan kommen.

Ausgehend von den Beobachtungen Bolz' et al.[67], die eine Beteiligung des Rho- Rho-Kinase-Systemes bei der Interaktion von OxLDL mit der Agonisten induzierten Vasokonstriktion beschrieben, wurde ebenfalls ein Inhibitor des Enzymes Rho-Kinase verwendet, um deren Beteiligung an der glattmuskulären Kontraktion zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit enthaltenen Versuchsdaten wurden experimentell am Tiermodell erhoben.

Hierfür wurden die thorakalen Aorten von Chinchilla Bastarden (Alter: 2-3 Monate, Gewicht: 2,0-2,5kg, keine Geschlechtsspezifität) gewonnen. Die Kaninchen wurden über die Charles River Deutschland GmbH bezogen und bis zur Organentnahme artgerecht im Tierstall gehalten. Es wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Tiere frühestens 24 Stunden nach Transport zur Tötung kamen. Diese wurde den Richtlinien für Tierschutz entsprechend durchgeführt.

2.2 Gefäßpräparation

Bereits im Vorfeld der Präparation wurde darauf geachtet, alle anstehenden Arbeitsschritte so schonend und schnell wie möglich nacheinander durchzuführen, um die Risiken einer etwaigen Endothelschädigung so gering wie möglich zu halten. Die Tötung des Tieres erfolgte mittels Bolzenschuss und Ausblutung durch Eröffnung beider Karotiden. Anschließend wurde der Thorax des Versuchstieres durch einen Medianschnitt eröffnet. Nach Darstellung der Aorta wurde diese, um eine intravasale Koagulation zu verhindern, noch intrathorakal intraluminal mit Tyrode Puffer durchgespült und anschließend vorsichtig exzediert. Der Transport und die Lagerung des entnommenen Segmentes bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte auf Eis gelagert in Tyrode Lösung.

Das entnommene Segment wurde unter einem Lichtmikroskop (Firma Zeiss, Dtl.) vom periadventitiellen Fett- und Bindegewebe gereinigt und in Ringe von 3-4 mm Länge geschnitten. Sowohl der distale als auch der proximale Anteil (ca. 3mm) wurde abgetrennt und nicht für die Experimente eingesetzt. Die für einen Teil der Versuche benötigte Deendothelialisierung der Gefäßabschnitte erfolgte kurz vor dem

Experimentbeginn durch einen mechanischen Arbeitsschritt. Hierbei wurde die Gefäßinnenseite nach außen gedreht und vorsichtig über ein Zellstoffpapier einige Male hin und her bewegt und anschließend mit Tyrode durchgespült, um verbliebene gelöste Endothelzellen restlos zu entfernen. Die erfolgreiche Entfernung des Endothels und die Intaktheit der glatten Gefäßmuskulatur wurden anhand der Reaktion auf Acetylcholin (ACh) überprüft. Wie in Abbildung 1 dargestellt, vermittelt ACh über die Aktivierung der NO-Synthase die Freisetzung von NO aus den Endothelzellen. Während Gefäße mit intaktem Endothel auf ACh-Stimulation mit einer Dilatation reagieren, fehlt dieses bei deendothelialisierten Gefäßen. Durch die Aktivierung myozytärer ACh-Rezeptoren kann bei deendothelialisierten Gefäße auf ACh-Stimulation jedoch eine Kontraktionsantwort beobachtet werden.

2.3 Präparationspuffer

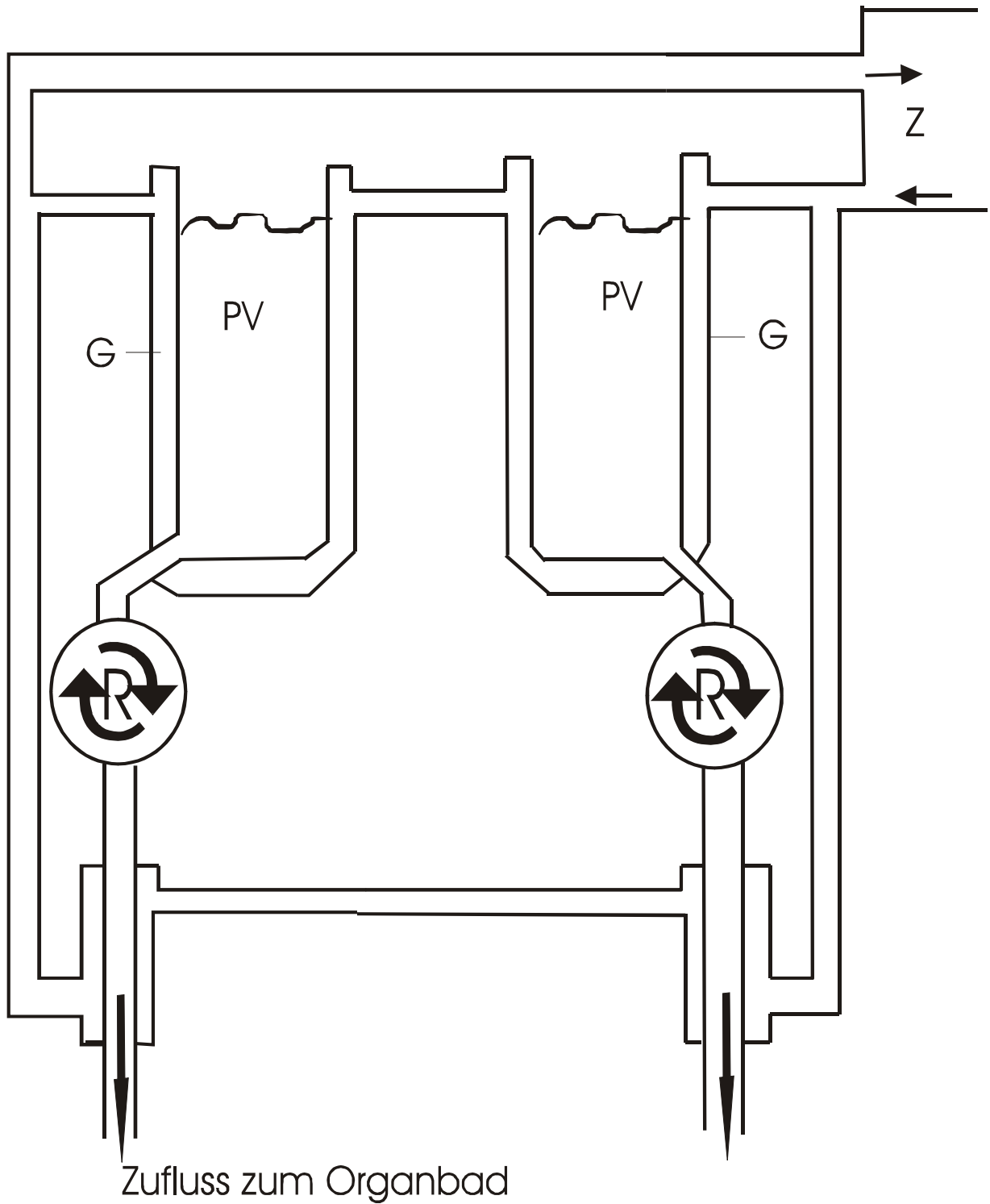
Die Zusammensetzung der zum Transport und während der Präparation eingesetzten Tyrode Lösung lautet wie folgt:

NaCl	132 mmol/l
KCl	4,0 mmol/l
CaCl ₂ -2H ₂ O	1,6 mmol/l
MgCl-6H ₂ O	1,0 mmol/l
NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O	11,9 mmol/l
NaHCO ₃	36,0 mmol/l
Ca-Triplex®	0,05 mmol/l
Glukose	5 mmol/l

2.4 Versuchsaufbau

Die Versuchsanlage bestand aus 3 Organbädern, welche je ein Volumen von 5 ml fassten. Im Organbad selbst befanden sich zwei Stahlhaken, an welchen die Aortenringe befestigt wurden. Einer der Stahlhaken war unbeweglich an der Wand des Organbades befestigt, der andere beweglich und mit einem Force Transducer F30 Typ372 verbunden. Über den Force Transducer wurde das Signal aufgenommen und mit Hilfe eines Messverstärkers und eines Dreikanalschreibers sichtbar gemacht. Das Organbad war über ein Schlauchsystem und zwei Rollenpumpen mit den Perfusativvorratsbehältern verbunden. Durch kontinuierliche Umspülung des Perfusates mit auf ca. 40°C erwärmtem Wasser über ein zweites Schlauchsystem konnte eine stets konstante Temperatur vom 37°C im Organbad gewährleistet werden.

2.4.1 Querschnittsskizze



G Glasgefäße zur Temperierung

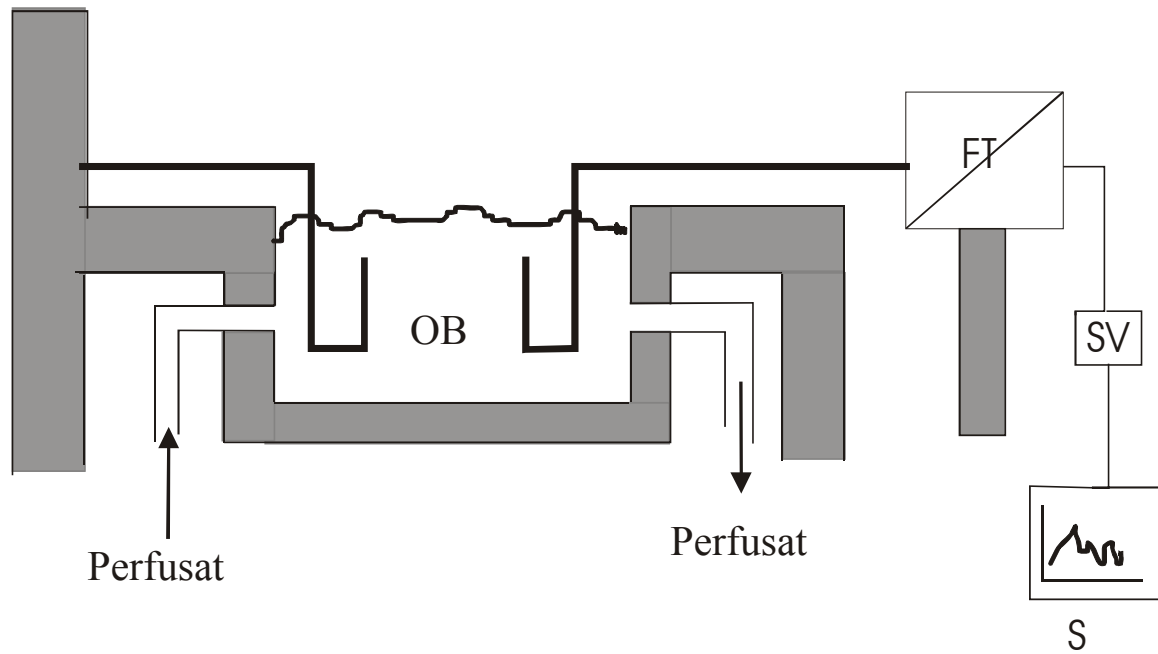
R Rollenpumpe

PV Perfusatvortat

Z Zirkulation zur Temperierung

Abb. 4: Querschnittsskizze der Versuchsanordnung I

2.4.2 Detailskizze Organbad



OB Organbad
FT Force Transducer
SV Signalverstärker
S Dreikanal-Schreiber

Abb.5: Querschnittsskizze der Versuchsanordnung II
Detailskizze des Organbades

2.5 Perfusat

Als Perfusat diente Hepes-Puffer, dessen pH-Wert vor Versuchsbeginn durch einmaliges Begasen mit Carbogen-Gas auf 7,35 eingestellt wurde. Die inhaltliche Zusammensetzung war wie folgt:

CaCl ₂ (2H ₂ O)	1,87 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0,5 mmol/l
NaCl	137 mmol/l
N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid (Hepes)	9,1 mmol/l
Glucose	2,8 mmol/l
NaH ₂ PO ₄	0,35 mmol/l

Über Eppendorf Handpipetten konnten dem Perfusat die weiteren eingesetzten Testsubstanzen und Stoffe direkt ins Organbad zugegeben werden.

2.6 Versuchsdurchführung

2.6.1 Allgemeine Bemerkungen

In jedem Einzelexperiment wurden drei Aortenringe parallel untersucht. Dabei diente einer der drei Aortenringe als Kontrollgefäß, während an den beiden anderen Gefäßen der Effekt der zu untersuchenden Substanzen gezeigt wurde.

Zu Beginn eines Versuches wurden die Kraftaufnehmer mittels Eichgewicht geeicht. Im Anschluss erfolgte die Perfundierung der Organbäder mit Hepes-Puffer und die Aortenringe wurden auf die beiden Stahlhaken gesetzt. Die Pumpförderleistung betrug 30 ml/min. Über die Feinjustierung des Kraftmessers wurden die Ringe zunächst mit einer Kraft von 20 N (~2 g) vorgedehnt, da sich in bereits vorangegangenen Versuchen gezeigt hat, dass bei dieser Vorspannung die isometrische Kraftentwicklung aufgrund einer optimalen Überlappung von Aktin- und Myosinfilamenten am größten ist. Nach einer Ruhephase von 20-30 min wurden die einzelnen Experimente gestartet.

Am Ende eines jeden Einzelversuches wurde die komplette Apparatur mit 500 ml Hepes-Puffer von allen verwendeten Substanzen gereinigt. Ebenso wurde die Versuchsanlage nach jedem Versuchstag mit einem Liter 2 %iger Desinfektionslösung sowie 2 Liter Aqua dest. durchgespült. Des Weiteren erfolgte in regelmäßigen Abständen ein kompletter Wechsel der verwendeten Schlauchsysteme.

2.6.1.1 Versuche zum Wirkungsprofil von Angiotensin II und der Festlegung einer Ang II-Schwellenkonzentration

In dieser Serie von Experimenten wurden die vorgedehnten Aortenringe mit Angiotensin II in ansteigenden Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-12}$ – $3 \cdot 10^{-8}$ M, welches dem Perfusat über Eppendorf Handpipetten zugegeben wurde, kontrahiert. Nachdem bei einer Ang II- Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ M die maximal mögliche kontraktile Antwort erreicht war, wurde der Zirkulationsmodus der Apparatur aufgehoben und die Ringe für die Dauer von 10 min bei einer Pumpförderleistung von 150 ml/min mit Hepes-Puffer superfundiert und so von dem eingesetzten Ang II reingewaschen (wash out). Sobald sich der Ruhetonus wieder eingestellt hatte, wurde in gleiche Vorgehensweise eine weitere Ang II -Dosis-Wirkungskurve erstellt. Im Anschluss erfolgte eine maximale Depolarisation der Gefäße durch Zugabe von 100 mM KCl – Lösung.

2.6.1.2 Versuche zur Wirkung von OxLDL auf die Ang II-DWK

Bei nahe zu gleichem Vorgehen, wurden die Gefäße bei diesen Versuchen nach dem Wash out der ersten Ang II - DWK für 90 Minuten mit OxLDL in einer Konzentration von 100µg/ml inkubiert, bevor die zweite Ang II -DWK durchgeführt wurde.

2.6.1.3 Versuche zum Einfluss von OxLDL auf den Basaltonus und die durch eine Schwellenkonzentration vorkontrahierten Gefäße

Ausgehend von den Ergebnissen der Untersuchungen an den Ang II –DWK's bestand das Ziel des folgenden Arbeitsschrittes darin, eine Ang II –Konzentration zu finden, bei der die Auswirkungen von OxLDL auf die Ang II vermittelte Kontraktion am größten waren. Hierfür wurden die Gefäße zu Beginn für 30 Minuten mit 100 µg/ml OxLDL inkubiert und nach einem anschließenden Auswaschvorgang mit Ang II in Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-11}$ bis $1 \cdot 10^{-9}$ M kontrahiert. Sobald die Kontraktion ein konstantes Niveau erreicht hatte, wurde erneut mit OxLDL in gleicher Konzentration inkubiert.

2.6.1.4 Versuche zur Wirkung verschiedener Medikamente und Substanzen

Bevor eine Testsubstanz in ihrer Wirkung auf mögliche OxLDL induzierte Veränderungen der Vasokonstriktion untersucht wurde, erfolgte zunächst eine Analyse ihrer Wirkung auf das Wirkungsprofil von Angiotensin II. Hierfür wurde der Versuchsablauf von 2.6.1.2 so modifiziert, dass im Anschluss an den Wash out und nach Erreichen des Ruhetonus eine Inkubation mit der Testsubstanz für 30 Minuten durchgeführt wurde, bevor die zweite Stimulation mit Angiotensin II in ansteigenden Konzentrationen erfolgte.

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf mögliche OxLDL induzierte Effekte zu untersuchen, wurden ähnlich dem unter 2.6.1.3 beschriebenen Vorgehen die isolierten Aortenringe zunächst für 30 min mit OxLDL inkubiert. Im Anschluss an den Wash out folgte bei zwei der drei Gefäße die Inkubation mit einer der jeweils untersuchten Substanzen (Felodipin, Quinapril, Losartan und Y27632) für weitere 30 Minuten, während das Kontrollgefäß weiterhin mit HEPES-Puffer superfundiert wurde. Erst nachdem diese Inkubationszeit abgelaufen war, wurde die Ang II vermittelte Kontraktion sowie die nachfolgende Inkubation mit OxLDL durchgeführt. Zusätzlich

wurde für die Substanzen Felodipin und Y27632 ein weiteres Vorgehen ausgearbeitet. Hierbei wurde zunächst bei allen Aortenringen das Protokoll von 2.6.1.3 durchgeführt und im Anschluss an die OxLDL Inkubation zwei Ringe mit der jeweiligen Substanz inkubiert.

2.6.1.5 Versuche an deendothelialisierten Gefäßen

Um zu zeigen, dass der von OxLDL vermittelte Effekt auf die Ang II induzierte Kontraktion nicht Folge einer Endothelschädigung war, wurden exemplarisch Versuche mit deendothelialisierten Gefäßen durchgeführt. Hierfür wurden die Gefäße wie unter 2.2. beschrieben deendothelialisiert. Um die effektive Endothelentfernung zu zeigen, wurden die Gefäße mit Phenylephrin $3 \cdot 10^{-6}$ M vorkontrahiert und dann mit ACh $3 \cdot 10^{-6}$ M, einer Konzentration, die in Vorversuchen sicher eine Dilatationsantwort hervorgerufen hat, stimuliert. Das Ausbleiben der Dilatation sprach für eine vollständige Beseitigung des Endothels. Im Anschluss an eine alleinige Superfusion mit HEPES-Puffer bis zum Erreichen des Ruhetonus wurde das Experiment analog zu 2.6.1.3 gestartet.

2.7 Versuchsauswertung

Die in einer ersten Versuchsreihe ermittelte konzentrationsabhängige Kontraktionsantwort wurde als prozentualer Anteil der maximal möglichen Depolarisation durch 100 mM KCl – Lösung dargestellt. Hierbei ergab sich eine sigmoidal verlaufende Dosiswirkungskurve. Für alle in den weiteren Versuchsserien gewonnenen Daten wurde die Darstellung mittels Säulendiagramm bevorzugt, wodurch ein Vergleich der einzelnen Aortenringe untereinander möglich wurde.

2.8 Präparation und Modifikation von LDL

2.8.1 Gewinnung von nativem LDL

Als Grundlage zur LDL-Präparation diente gepooltes Blutplasma von verschiedenen Spendern. Das frisch gewonnene Plasma wurde bereits bei Raumtemperatur mit einem Antioxidationspuffer bestehend aus:

EDTA 200 mmol/l

NaCl 300 mmol/l

Aprotinin 10 IE/ml

Gentamycin 40 mg/ml

Chloramphenicol 200mg/ml

versetzt. Dabei sollte EDTA als Antioxidans die Autooxidation, Aprotinin als Proteaseninhibitor eine Proteolyse sowie Gentamycin als Antibiotikum ein etwaiges Bakterienwachstum verhindern. (Galle et.al 1992). Im Anschluss wurde das Plasma mit Hilfe von Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,063 g eingestellt und für 8h bei 4°C und 20.000 U/min zentrifugiert. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt fanden sich die LDL-Fraktionen aufgrund ihrer geringeren Dichte (ca.1,055 g/ml) als oberste Bande des dreischichtigen Plasmas über der Pufferschicht und konnten abgetrennt werden. Da die LDL-Fraktion neben LDL auch noch VLDL und Triglyzeride enthielt, wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt durchgeführt, um LDL vollständig zu isolieren. Bei einer erneut mit KBr voreingestellten Dichte von 1,04 g/ml und 20.000 U/min betrug die Zentrifugationszeit diesmal 3 h bei einer Temperatur von 4 °C. In der nun entstandenen zweischichtigen Probe befand sich das LDL in der zweiten Bande und konnte nach Abtrennung des VLDL und der Chylomikronen gewonnen werden.

2.8.2 Konzentrierung des nativen LDL

Bevor das nach diesem Schema isolierte LDL einer weiteren Modifikation unterzogen wurde, erfolgte eine Aufkonzentrierung. Hierfür wurde das LDL auf Millipore-Filter mit einer Porengröße von 10.000 Dalton aufgetragen und zur Beschleunigung des Filtervorgangs bei 4°C mit 1.5000 U/min für eine Stunde zentrifugiert. Das am Ende

des Konzentrierungsvorgangs erhaltene native LDL (n-LDL) stellte die Ausgangssubstanz für die weitere Verarbeitung dar.

2.9 Modifikation von n-LDL zu OxLDL

2.9.1 Eliminierung von EDTA

Über einen Dialyseprozess wurde dem n-LDL zunächst das noch enthaltene antioxidativ wirkende EDTA entzogen. Hierfür wurde das n-LDL in Dialyseschläuche mit einer Porengröße von 50.000 Dalton pipettiert und für 24h gegen sterilen KPP – Puffer dialysiert.

Der Dialysevorgang fand bei einer Temperatur von 4°C mit einer Puffer-Proben-Relation von 1:500 statt.

2.9.2 Oxidation des n-LDL

Nach Elimination des EDTA wurde das noch im Dialyseschlauch befindliche n-LDL in einem weiteren Dialyseschritt bei Raumtemperatur gegen einen mit 10 µmol/l CuSO₄ versetzten KPP – Puffer dialysiert.

2.9.3 Beendigung des Oxidationsvorganges

Nach 30 Stunden wurde der Oxidationsvorgang beendet. Hierfür wurde der Dialyseschlauch in einen KPP – Puffer eingebracht, der EDTA als Antioxidans in einer Konzentration von 200 µmol enthielt. Nach weiteren 48 Stunden Dialyse bei einer Temperatur von 4 °C konnte dem Dialyseschlauch nun oxidiertes LDL (OxLDL) entnommen werden.

2.9.4 Kontrolle des Oxidationsgrades und des Proteingehaltes

Bevor die präparierten Lipoproteine in Versuchen eingesetzt wurden, erfolgte die Bestimmung des Oxidationsgrades sowie des Proteingehaltes.

Der Grad der Oxidation wurde mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese festgestellt. Hierbei wurde die Zunahme der relativen Mobilität auf dem Agarosegel, welche durch die stärkere negative Ladung des OxLDL bewirkt wird, ausgenutzt. Die Mobilität der nativen LDL diente als Standardwert des Messsystems.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach Lowry eingesetzt. Das aufbereitete OxLDL wurde bei Dunkelheit und 4 °C für maximal 3 Wochen aufbewahrt.

2.10 Auswertung und Statistik

Die deskriptive Darstellung der erhobenen Daten erfolgte als arithmetischer Mittelwert \pm SEM (Standardfehler). In den Versuchsdiagrammen ist der Standardfehler jeweils als vertikaler Balken eingezeichnet. Durch die Anwendung des Student-t-Test für gepaarte Stichproben konnte die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgefäßen festgestellt werden. Ebenso kam das ANOVA-Verfahren für wiederholte Messungen zum Einsatz.

Das Erreichen statistischer Signifikanz ($p > 0,05$) ist durch einen Stern über den entsprechenden Säulen in den Abbildungen gekennzeichnet.

2.11 Chemikalien und Pharmaka

Ang II, ACh, L-Phenylephrin, EDTA, Hapes Fa. Sigma München Deutschland.
(D+) Glucose (wasserfrei), Calcium-Triplex®-Dihydrat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid-Dihydrat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Brenztraubensäure-Natriumsalz, Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, Kupfersulfat und Gentamicin (Refobacin®) Fa. Merck, Darmstadt Deutschland.

Natriumhydrogencarbonat, Kaliumdihydrogenphosphat Fa. Riedel-de Häen, Seelze
Deutschland.

Chloramphenicol (Paramyxin®) Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland.

Aprotinin (Trasylol®) Fa. Bayer, Leverkusen, Deutschland.

Y27632 Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd, Osaka, Japan

Felodipin Fa. Astra Chemicals, Wedel, Deutschland..

Losartan Fa. Merck, Sharp & Dome, München, Deutschland..

Quinapril Fa. Gödecke AG, Freiburg, Deutschland..

Ethanol Fa. J.T. Baker BV, Deventer, Holland

Carbogen-Gas Fa. Tyczka-Industriegase, Mannheim, Deutschland.

2.12 Geräteverzeichnis

Lichtmikroskop Fa. Zeiss, Deutschland.

Thermostat Typ F1/D, Fa. Haake, Deutschland.

Rollenpumpe Typ IPC und Schläuche, Fa. Ismatec, Deutschland.

Glasgefäße Fa. Kummer, Freiburg, Deutschland.

Force Transducer F30 Typ 372, Fa. HSE Hugo Sachs Elektronik, Deutschland

Dreikanalschreiber Typ R-63, Fa. Rikadenki

Organbad, Fa. HSE Hugo Sachs Elektronik, Deutschland

pH-Meter CG 825, Fa. Schott, Mainz, Deutschland.

Ultrazentrifuge Beckman 50 Fullerton, CA

Zentrifugenröhrchen Beckman Quick Seal™ 36ml

Dialyseschläuche Spectra/por® 6 membran, Spectrum Laboratori Products, Houston,
USA

Millipore-Filter Centrifugal Ultrafree®-20, Millipore Co., Bedford-USA

Spektralphotometer Lambda 12, Firma Perkin-Elmer GmbH

Agarosegel Lipidophor, Immuno, Wien, Österreich

Eppendorf-Caps 2ml, Fa. Eppendorf, Deutschland.

Einwegspritzen 20ml, Fa. Braun, Deutschland.

19G Einwegkanülen, Fa. Braun, Deutschland.

Zentrifugationsröhrchen 15ml, Fa. Greiner

3 Ergebnisse

3.1 Wirkungsprofil des Angiotensin II

Um einen Überblick über die kontraktile Antwort der Gefäße auf wiederholte Ang II - Stimulation zu erhalten, wurden zunächst Dosis-Wirkungskurven für Ang II erstellt. Hierbei wurden die vorgedehnten Gefäße mit Ang II in ansteigenden Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-12}$ - $3 \cdot 10^{-8}$ M stimuliert.

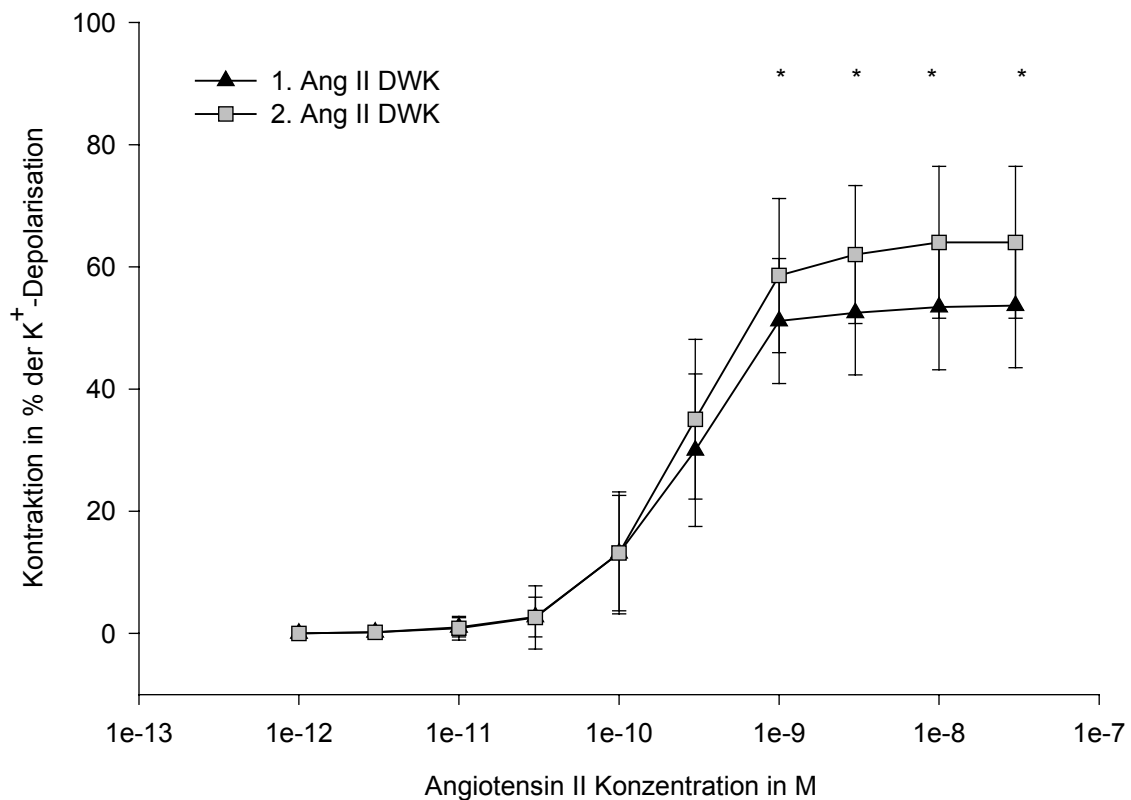


Abb.6: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Angiotensin II ($1 \cdot 10^{-12}$ – $3 \cdot 10^{-8}$ M) und der vor und nach 30 minütiger Inkubation mit Tyrode-Puffer resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Kaninchenaortenringe.

n= 13, * p< 0,05 Ang II DWK I vs. Ang II DWK II

Neben einer signifikanten Zunahme der Kontraktilität während der 2. Stimulation durch Ang II, konnte aus dem sigmoidalen Kurvenverlauf eine Schwellenkonzentration für Ang II, die nur eine minimale kontraktile Antwort hervorrief, ermittelt werden. Diese lag bei 3nM/l.

3.2 Einfluss von OxLDL auf die Ang II –DWK

In vorangegangenen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, das OxLDL die durch Vasokonstriktoren, wie z.B. Phenylephrin induzierten Kontraktionen signifikant verstärkte[57]. Um die Wirkung von oxidiertem LDL auf die Ang II induzierte Vasokonstriktion zu untersuchen, wurden die Aortenringe im Anschluss an die 1. Ang II –DWK für 90 Minuten mit OxLDL (100µg/ml) inkubiert und dann erneut mit Ang II in ansteigenden Konzentrationen stimuliert.

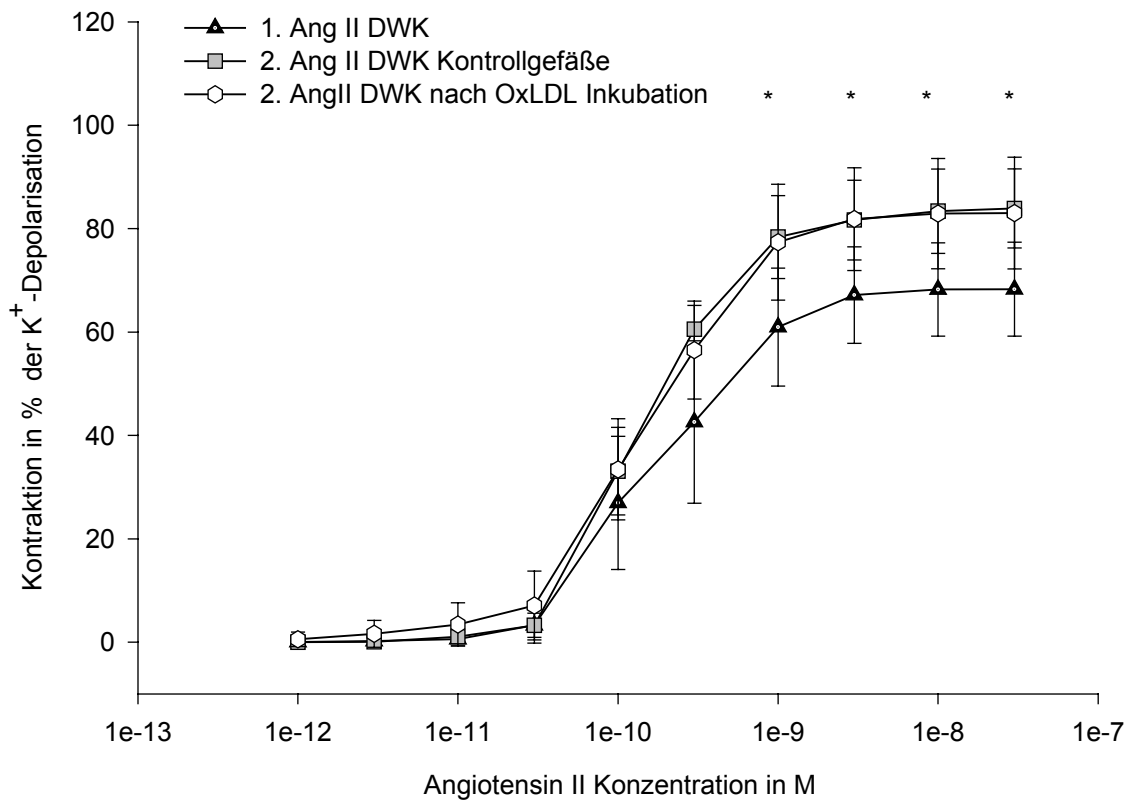


Abb.7: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Angiotensin II ($1 \cdot 10^{-12}$ – $3 \cdot 10^{-8}$ M) und der nach Inkubation mit oxidiertem LDL ($100 \mu\text{g/ml}$) resultierenden Kontraktion vorgedehnter Aortenringe im Vergleich zu Kontrollgefäßen. $n=6$; $*p>0,05$ Ang II-DWK I vs. Ang II- DWK II und Ang II-DWK + OxLDL

Bei diesem Vorgehen konnte kein verstärkender Einfluss des OxLDL auf die Ang II-DWK festgestellt werden.

3.3 Einfluss von OxLDL auf den Basaltonus sowie auf gering vorkontrahierte Gefäße

Durch eine Vorinkubation der isolierten Aortenringe mit OxLDL sollte untersucht werden, wie sich OxLDL auf den Basaltonus nicht kontrahierter Gefäße auswirkt. Die Nachinkubation der gering vorkontrahierten Gefäße mit OxLDL sollte klären, ob OxLDL eine Veränderung der bereits bestehenden Kontraktion bewirkt.

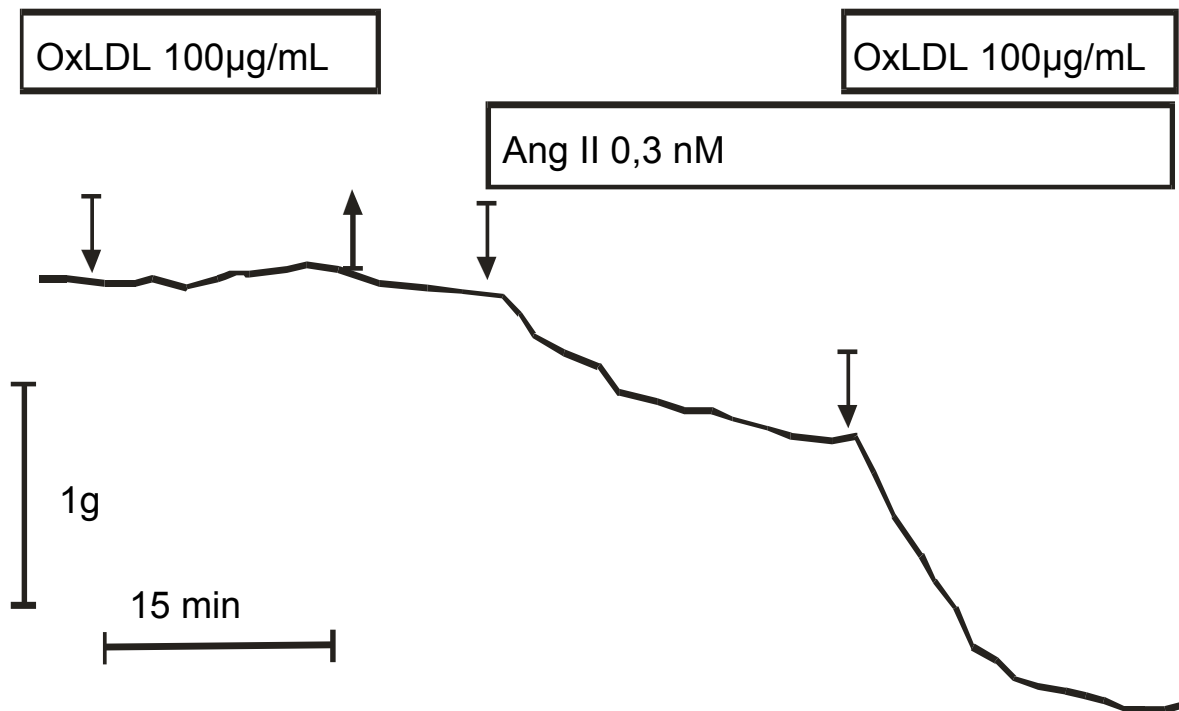


Abb.8: Effekt von OxLDL (100µg/ml) auf den Basaltonus und die Ang II induzierte Vasokonstriktion.

Originalregistrierung

Die alleinige Inkubation der Gefäße mit OxLDL hatte keinen Einfluss auf den Basaltonus.

Bei minimal vorkontrahierten Aortenringen konnte jedoch eine Verstärkung der Kontraktion durch OxLDL festgestellt werden.

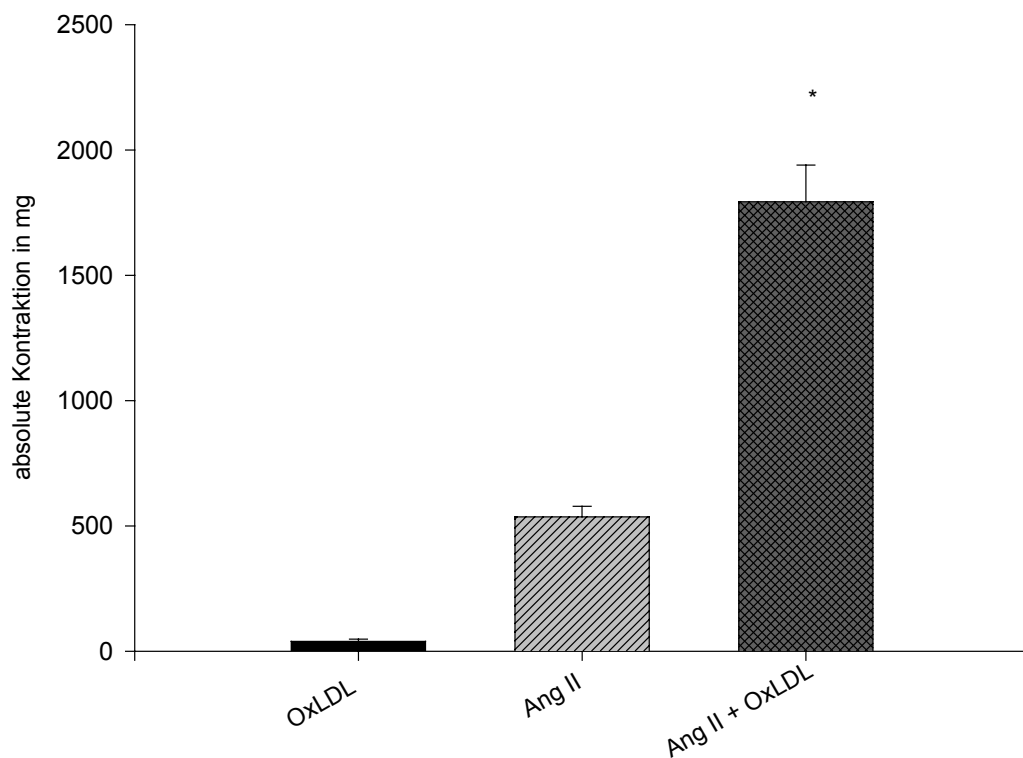


Abb.9: Effekt von OxLDL (100µg/ml) auf den Basaltonus und die Ang II ($1 \cdot 10^{-10}$ – $3 \cdot 10^{-10}$ M) induzierte Vasokonstriktion.

n=14, * $p < 0,05$ Ang II vs. Ang II und OxLDL (100µg/ml)

Der in diesem Diagramm dargestellte kontraktionsverstärkende Effekt des OxLDL wurde bei verschiedenen Ang II-Konzentrationen ($1 \cdot 10^{-11}$ - $1 \cdot 10^{-9}$ M) untersucht (Daten nicht aufgeführt). Hierbei ergab sich die größte mögliche Potenzierung bei Ang II-Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-10}$ bzw. $3 \cdot 10^{-10}$ M, die auch bei allen folgenden Versuchen beibehalten wurde.

3.4 Einfluss von OxLDL auf den Basaltonus sowie auf gering vorkontrahierte deendothelialisierte Gefäße

Um zu klären, ob OxLDL in Abhängigkeit von der Endothelfunktion unterschiedliche Effekte auf den Basaltonus von nicht kontrahierten Aortenringen hat, erfolgte eine Inkubation von deendothelialisierten Gefäßen. Im Anschluss sollte durch eine Schwellenkontraktion dieser deendothelialisierten Aortenringe untersucht werden, ob OxLDL bei nicht vorhandener Endothelfunktion andere Effekte vermittelt.

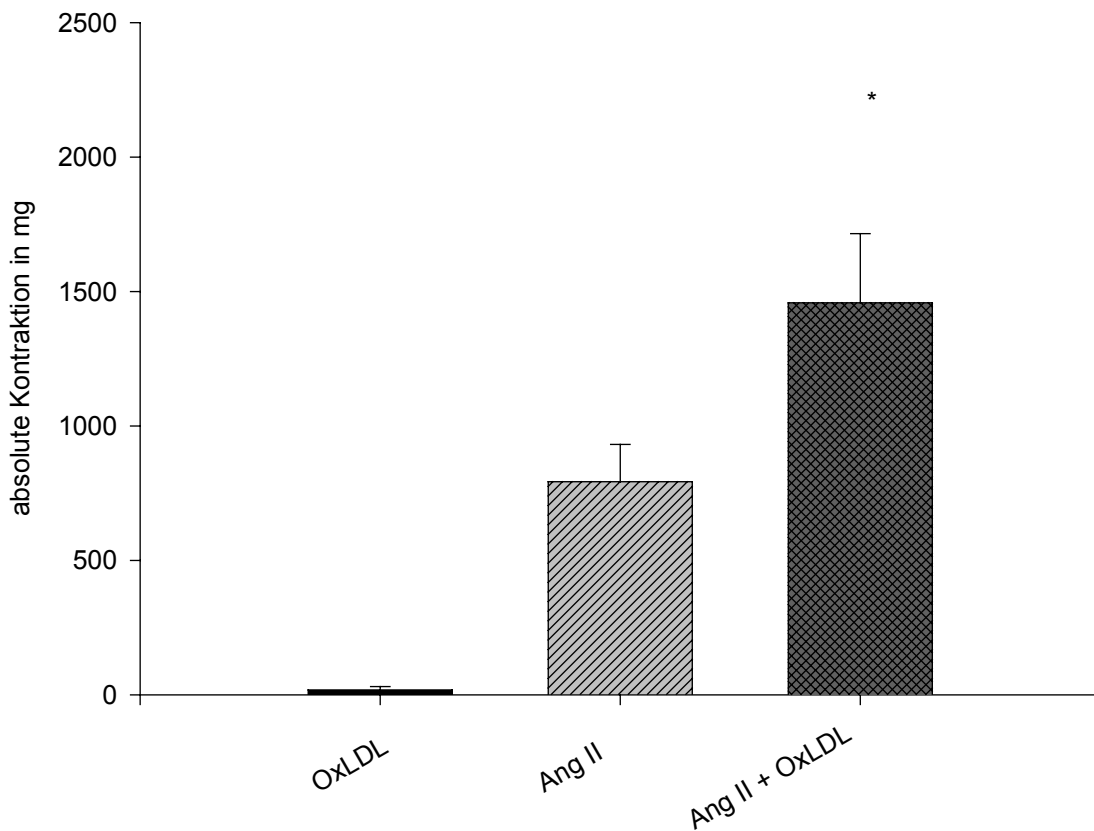


Abb.10: Effekt von OxLDL (100µg/ml) auf den Basaltonus und die Ang II ($1 \cdot 10^{-10}$ – $3 \cdot 10^{-10}$ M) induzierte Vasokonstriktion deendothelialisierter Aortenringe.

n=14, * $p < 0,05$ Ang II vs. Ang II und OxLDL (100µg/ml)

Auch an deendothelialisierten Aortenringen führte eine Inkubation mit OxLDL zu keiner Beeinflussung des Basaltonus. Die durch eine Schwellenkonzentration von Ang II hervorgerufene Vasokonstriktion wurde wie auch bei Aortenringen mit intaktem Endothel durch OxLDL potenziert.

3.5 Einfluss von Quinapril auf die Ang II induzierte Kontraktion

Bei der Synthese von Ang II im Organismus spielt das Angiotensin-Converting-Enzym eine wesentliche Rolle. In den folgenden Experimenten wurde analysiert inwieweit eine Beeinflussung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch den ACE-Inhibitor Quinapril möglich ist.

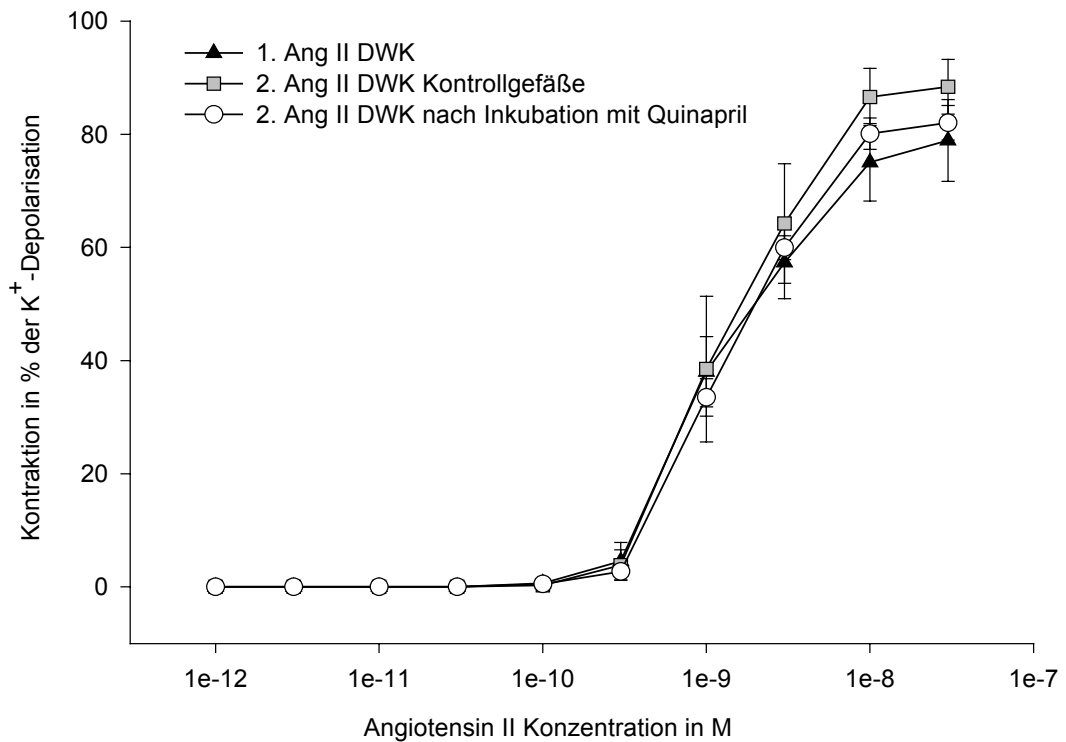


Abb.10: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II und der nach Inkubation mit dem Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitor Quinapril ($1 \cdot 10^{-6}$ M) resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe im Vergleich zu Kontrollgefäßen.

n=3

Eine Präinkubation der Aortenringe mit Quinapril hatte keinen Einfluss auf die Ang II induzierte Vasokonstriktion.

3.6 Einfluss von Quinapril auf die durch OxLDL hervorgerufene Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion

Ähnlich den vorangegangenen Experimenten wurde in den anschließenden Versuchen untersucht, ob durch die Inkubation der Aortenringe mit Quinapril ein Effekt auf die OxLDL induzierte Steigerung der Ang II vermittelten Kontraktion zu erzielen ist.

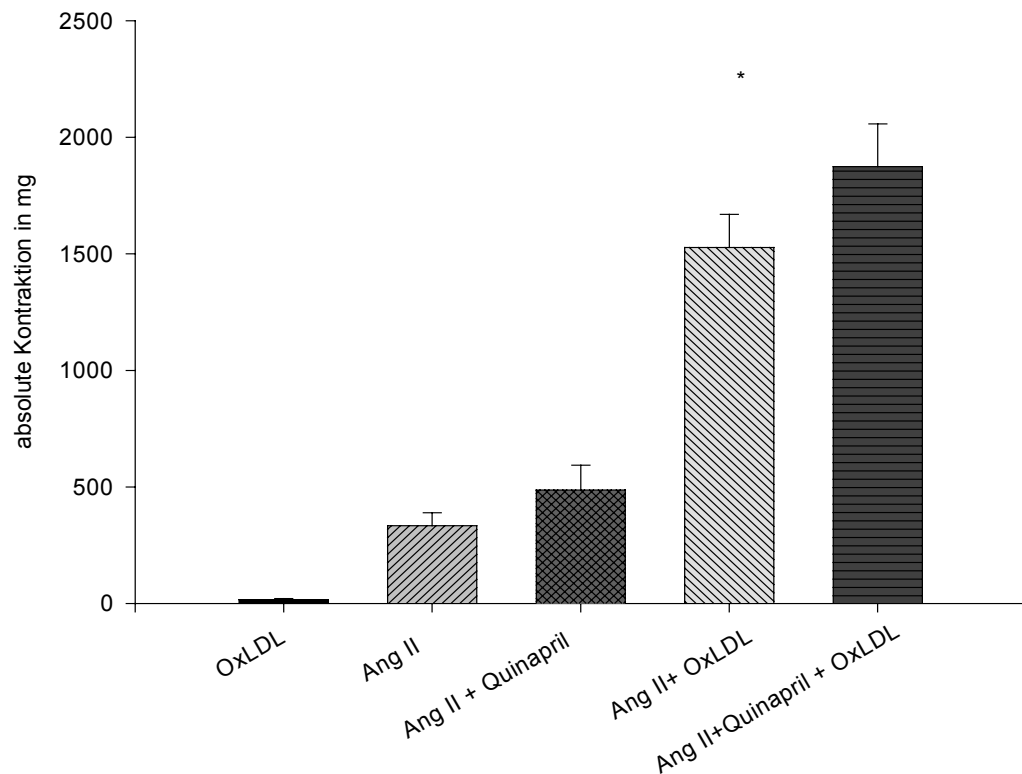


Abb.11: Einfluss des Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitors Quinapril ($1 \cdot 10^{-6}$ M) auf die durch OxLDL vermittelte Potenzierung der Ang II induzierten Kontraktion.

n=6

Wie aus den Experimenten zur Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Ang II und Quinapril bereits zu erwarten war, konnte auch in diesem Versuchsablauf keine

hemmende oder vermindernde Wirkung auf die Ang II induzierte Vasokonstriktion sowie deren Potenzierung festgestellt werden.

3.7 Effekt des Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion

Da Calcium für die muskuläre Kontraktion von entscheidender Bedeutung ist, wurde untersucht, in wieweit die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion durch die Vorinkubation mit einem Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten vom Hydropyridintyp verändert werden kann.

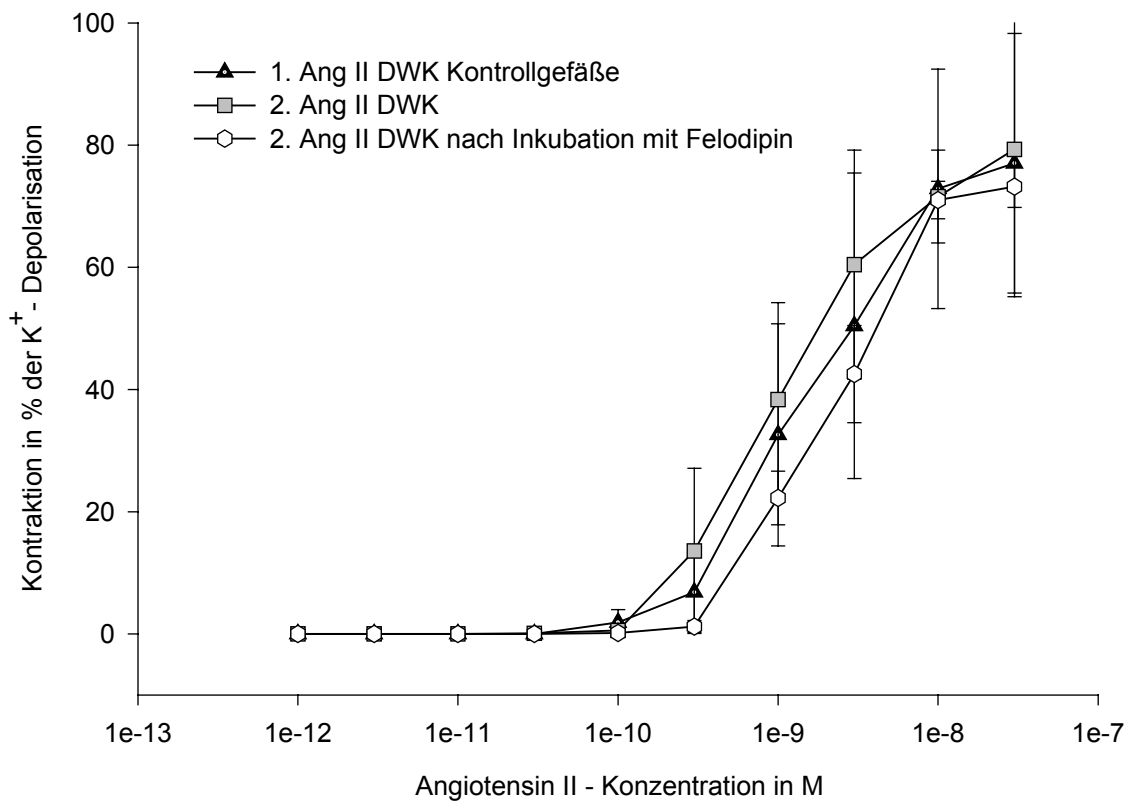


Abb.12: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II und der nach Inkubation mit dem Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin ($1 \cdot 10^{-7} \text{M}$)

resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe im Vergleich zu Kontrollgefäßen.

n= 4

Eine Vorinkubation der isolierten Aortenringe mit dem Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion.

3.8 Einfluss des Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin auf die durch OxLDL induzierte Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion

Ähnlich den vorangegangenen Experimenten wurde in den anschließenden Versuchen untersucht, ob durch die Inkubation der Aortenringe mit Felodipin ein Effekt auf die OxLDL induzierte Steigerung der Ang II vermittelten Kontraktion zu erzielen ist.

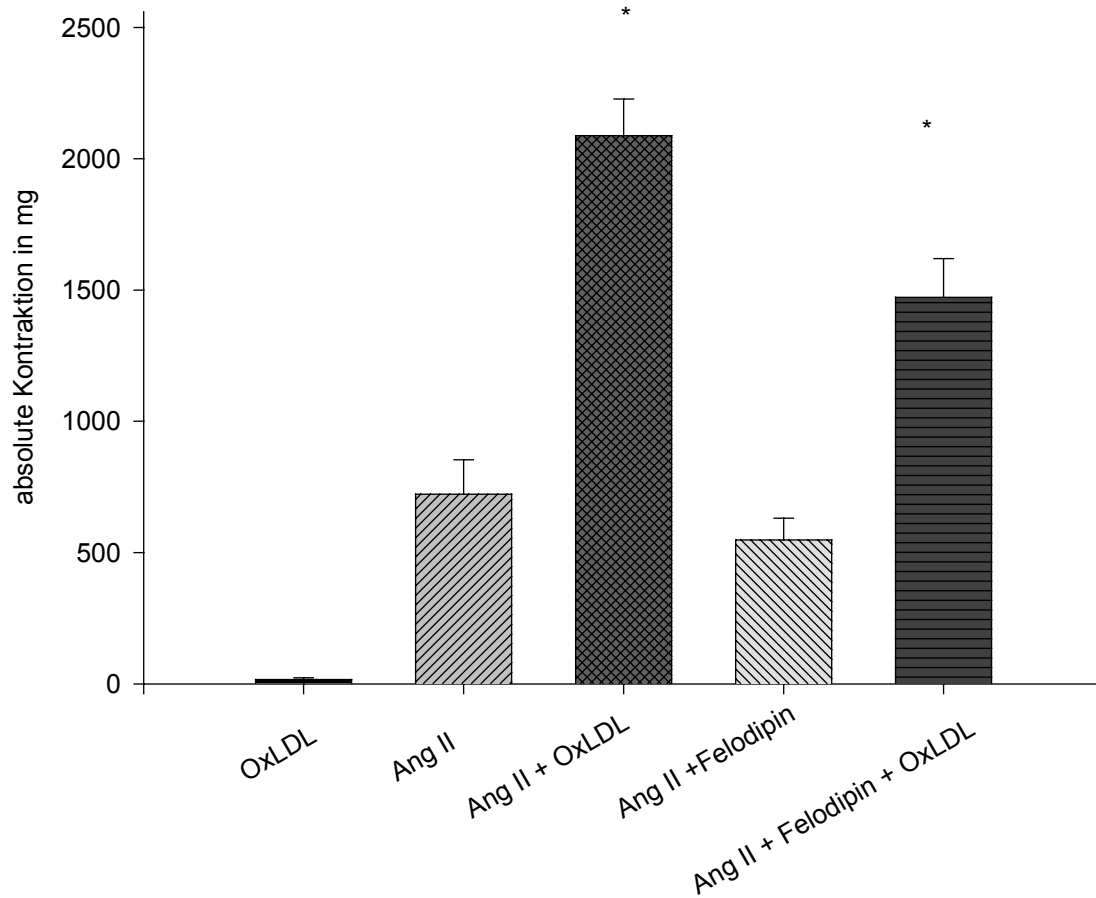


Abb.13: Einfluss des Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin ($1 \cdot 10^{-7}$ M) auf die durch OxLDL (100 μ g/ml) vermittelte Potenzierung der Ang II induzierten Kontraktion. n= 5, * $p < 0,05$ Ang II vs. Ang II und OxLDL sowie Ang II und OxLDL vs. Ang II und Felodipin und OxLDL

Eine Vorinkubation der isolierten Aortenringe mit dem Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin verhinderte die Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL teilweise.

3.9 Einfluss des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan auf das Kontraktionsverhalten isolierter Aortenringe bei Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen von Ang II

Bei der Auslösung einer Kontraktion durch Ang II spielt der AT₁-Rezeptor eine wesentliche Rolle. In den folgend dargestellten Experimenten wurde untersucht, wie sich eine Präinkubation mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan auf das Kontraktionsverhalten der Aortenringe auswirken.

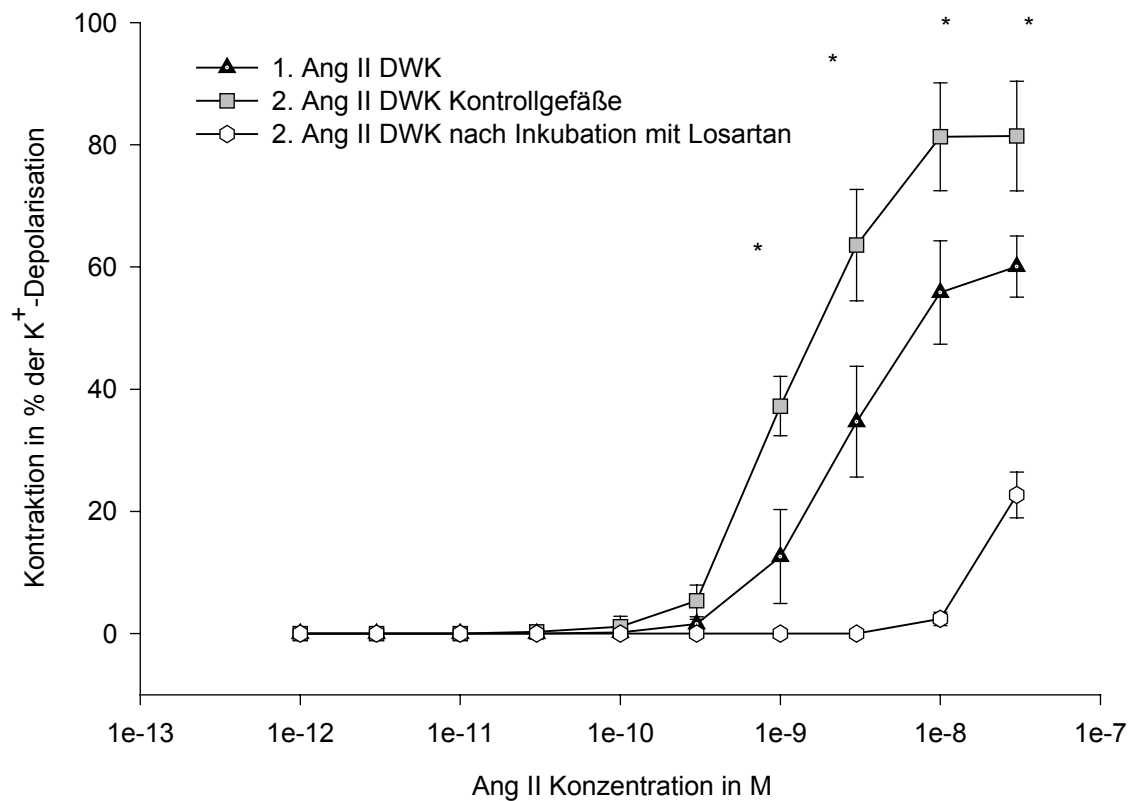


Abb.14: Dosiswirkungsbeziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II und der nach 30 minütiger Inkubation mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan (0,1µM) resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe.

n=3, *p<0,05 Ang II DWK I vs. Ang II DWK II vs. Ang II DWK II + Losartan

Eine Präinkubation mit Losartan ($0,1\mu\text{M}$) verhinderte eine Kontraktion im Konzentrations-bereich von $1\cdot 10^{-12}$ - $1\cdot 10^{-9}$ M und schwächte sie für hohe Ang II Konzentrationen ($3\cdot 10^{-9}$ - $3\cdot 10^{-8}$ M) stark ab.

Durch eine Präinkubation mit Losartan in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ konnte die kontraktile Antwort der Gefäße für alle eingesetzten Ang II Konzentrationen unterbunden werden.

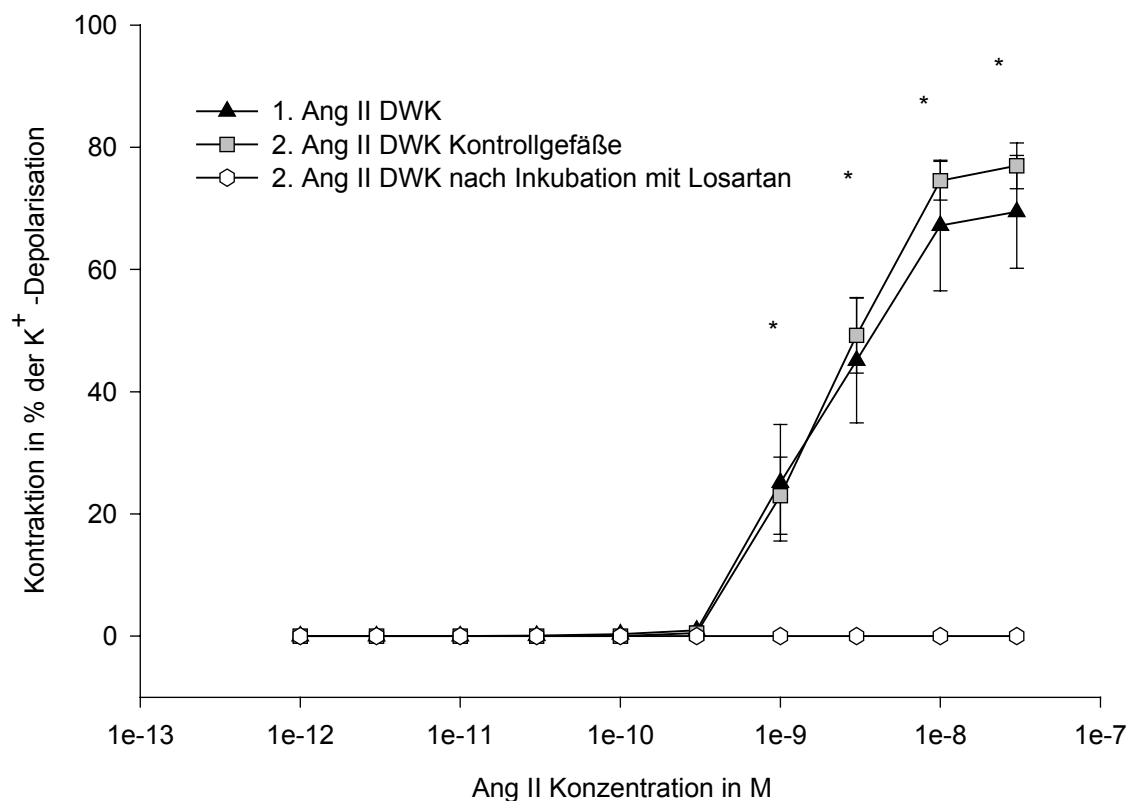


Abb.15: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II ($1\cdot 10^{-12}$ - $3\cdot 10^{-8}$ M) und der vor und nach 30minütiger Inkubation mit dem AT_1 -Rezeptorantagonisten Losartan $1\mu\text{M}$ resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe.

n=3, *p<0,05 Ang II DWKI vs. Ang II DWK II vs. Ang II DWK II +Losartan ($1\mu\text{M}$)

3.10 Effekt des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL

Durch Inkubation mit Losartan konnte die kontraktile Antwort der Gefäße auf Stimulation mit Ang II verhindert werden. Um die Auswirkungen von Losartan auf die durch OxLDL induzierte Potenzierung der Ang II vermittelten Vasokonstriktion festzustellen, wurden die Aortenringe im Anschluss an die OxLDL-Perfusion für 30 Minuten mit Losartan 1 μ M inkubiert, bevor die Stimulation mit Ang II und OxLDL erfolgte.

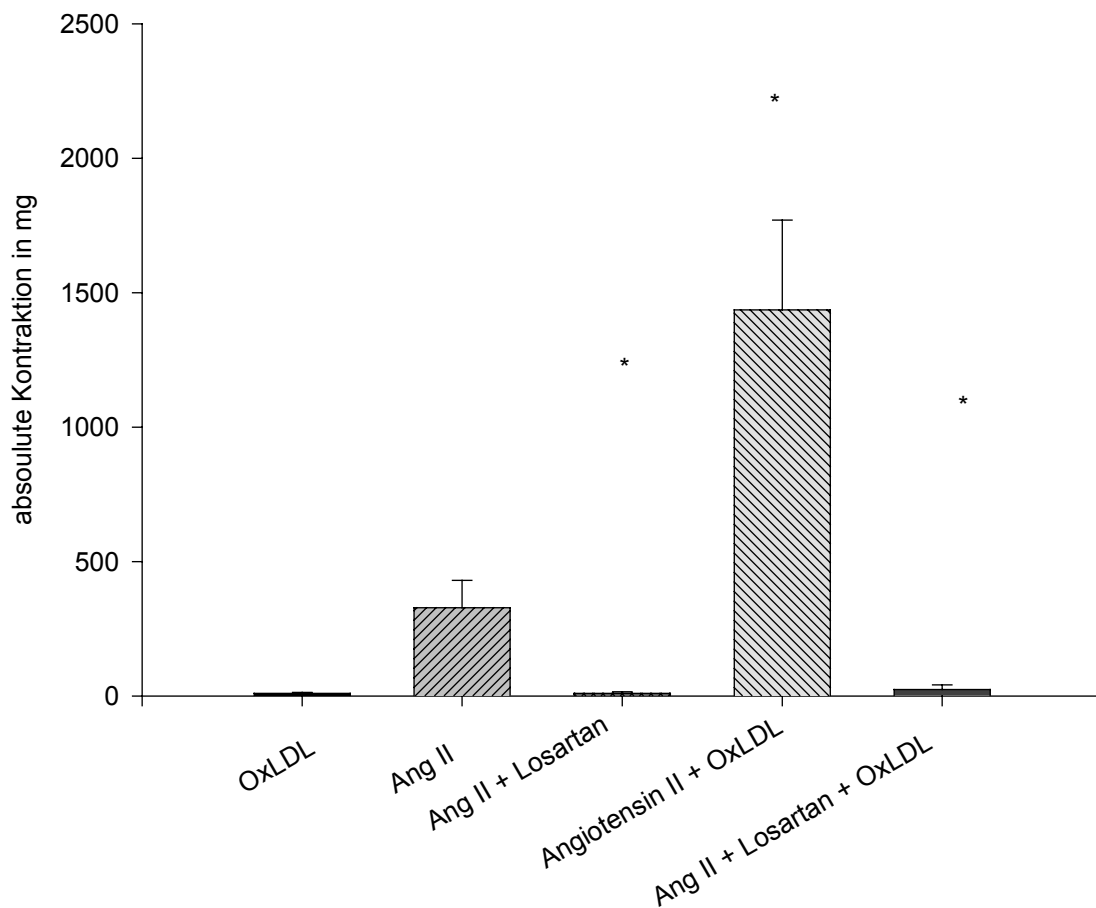


Abb.16: Effekt des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan (1 μ M) auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL (100 μ g/ml).

n=5, * p < 0,05 Ang II versus Ang II + Losartan sowie Ang II + OxLDL versus Ang II + OxLDL + Losartan.

Durch die Vorinkubation der Gefäße mit Losartan konnte sowohl die Ang II vermittelte Vasokonstriktion als auch deren Potenzierung durch OxLDL verhindert werden.

3.11 Einfluss des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 auf das durch Ang II Stimulation in ansteigenden Konzentrationen induzierte Kontraktionsverhalten isolierter Kanichenaortenringen

Neben der Freisetzung von Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum, führt die Bindung von Angiotensin II an den AT₁-Rezeptor auch zu einer Aktivierung der Rho-Kinase.

Um den Effekt eines Rho-Kinase-Inhibitors auf das Wirkungsspektrum der Angiotensin II vermittelten Vasokonstriktion zu beurteilen, erfolgte im Anschluss an eine erste Angiotensin II –Dosis-Wirkungskurve eine Inkubation mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632.

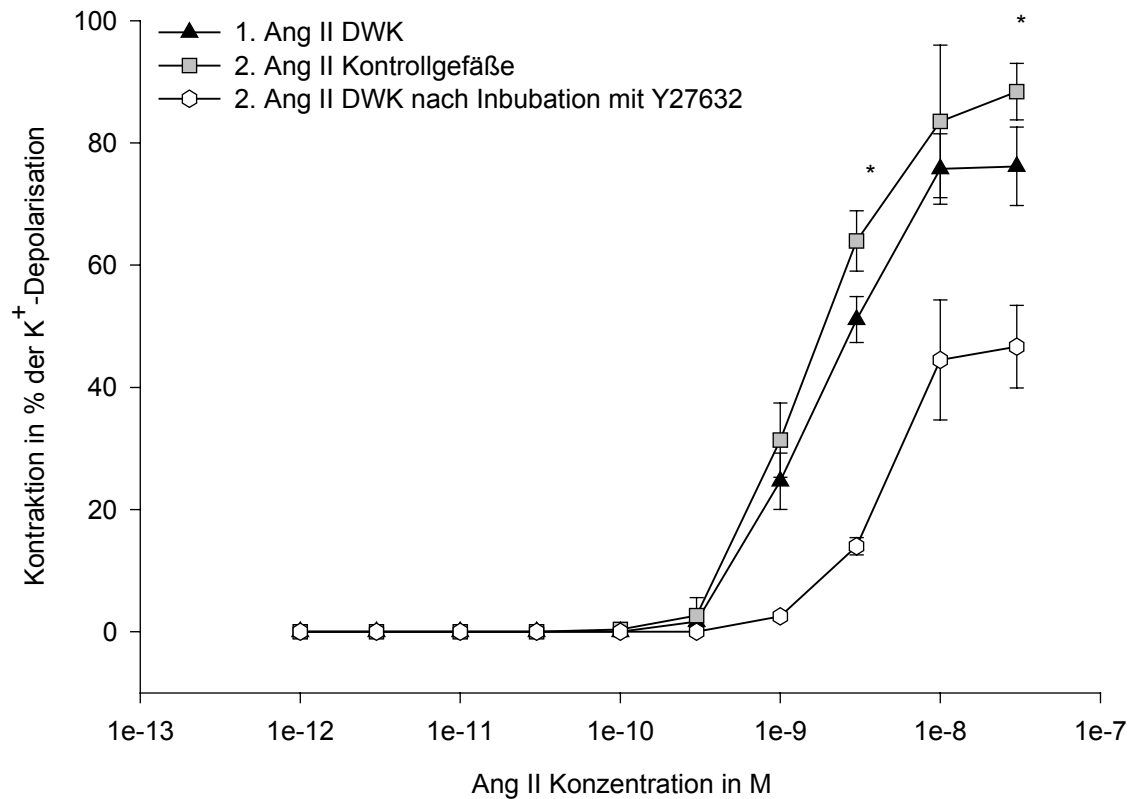


Abb.17: Dosiswirkungsbeziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II und der nach 30 minütiger Inkubation mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y23762 (0,1µM) resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe.

n=3, * p<0,05 Ang II DWK I versus Ang II DWK II (1*10⁻¹² – 3*10⁻⁸M) und Y27362 (0,1µM)

Eine Vorinkubation der isolierten Aortenringe mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 (0,1µM) verhinderte die Angiotensin II induzierte Kontraktion im Bereich der Schwellendosis und führte zu einer signifikanten Abschwächung der konstriktorischen Antwort im höheren Dosisbereich.

3.12 Einfluss von Y27632 auf Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL

Die OxLDL induzierte Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion konnte durch die Blockade von Calciumkanälen nur teilweise unterbunden werden. Um zu untersuchen, ob OxLDL über eine Aktivierung der Rho-Kinase zu einer Steigerung der Kontraktilität führt, wurden die isolierten Aortenringe mit Angiotensin II und dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 kokubiert, bevor eine Stimulation mit OxLDL erfolgte.

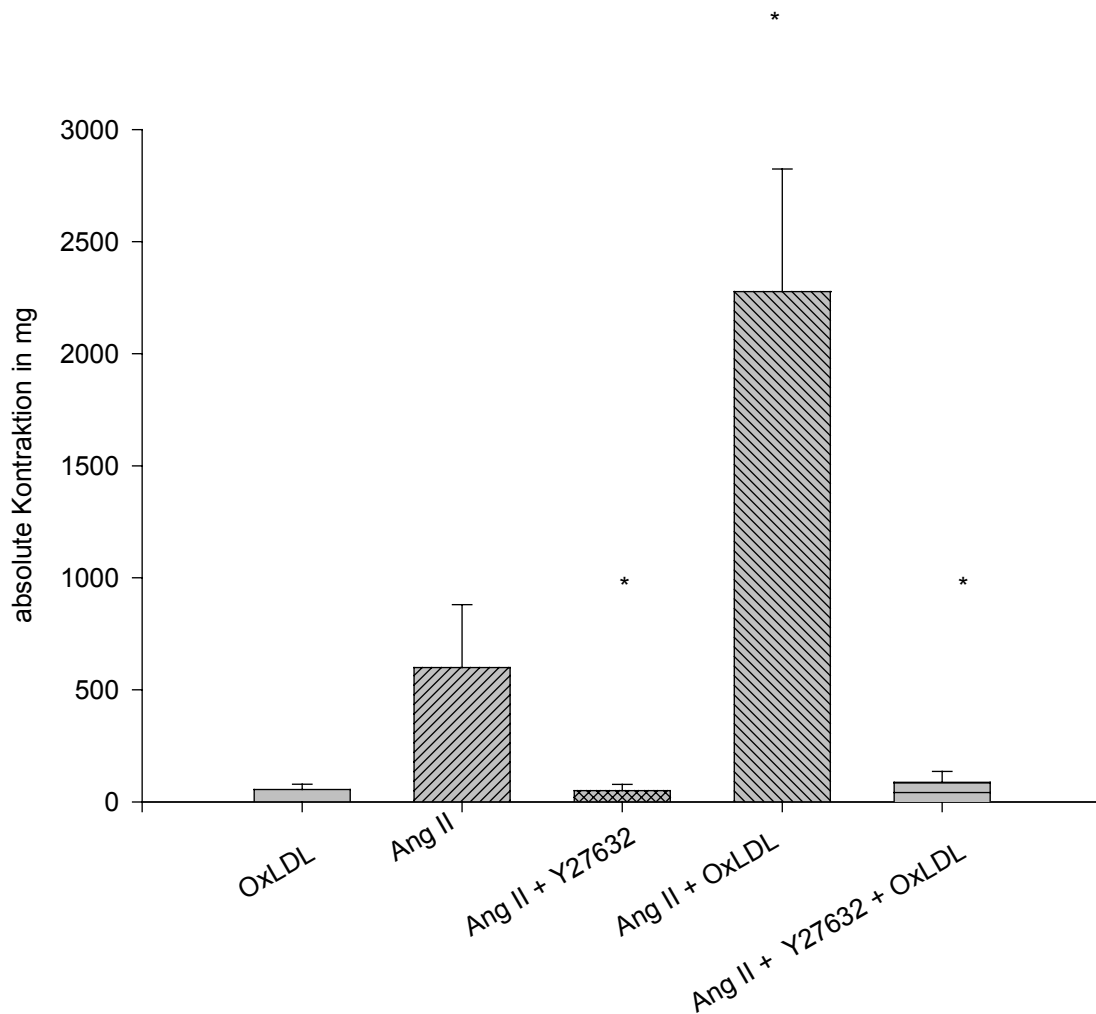


Abb.18: Effekt des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 (1 μ M) auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL

n=5, * p<0,05 Ang II vs. Ang II + Y27632, sowie Ang II + OxLDL vs. Ang II + Y27632 + OxLDL

Durch die Inkubation isolierter Kaninchenaortenringe mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 konnte die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL verhindert werden.

In einem weiteren Versuchsablauf wurde untersucht, wie stark sich die Anwesenheit des Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 auf die Vasomotorik isolierter Aortenringe auswirkt. Da von Angiotensin II bereits bekannt ist, dass es eine Aktivierung der Rho-Kinase hervorruft, sollte nun untersucht werden wie spezifisch die Blockade der Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion durch den Rho-Kinase-Inhibitor war. Hierfür wurden die mit Angiotensin II kontrahierten Aortenringe mit OxLDL inkubiert, so dass eine Potenzierung hervorgerufen wurde. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Y27632.

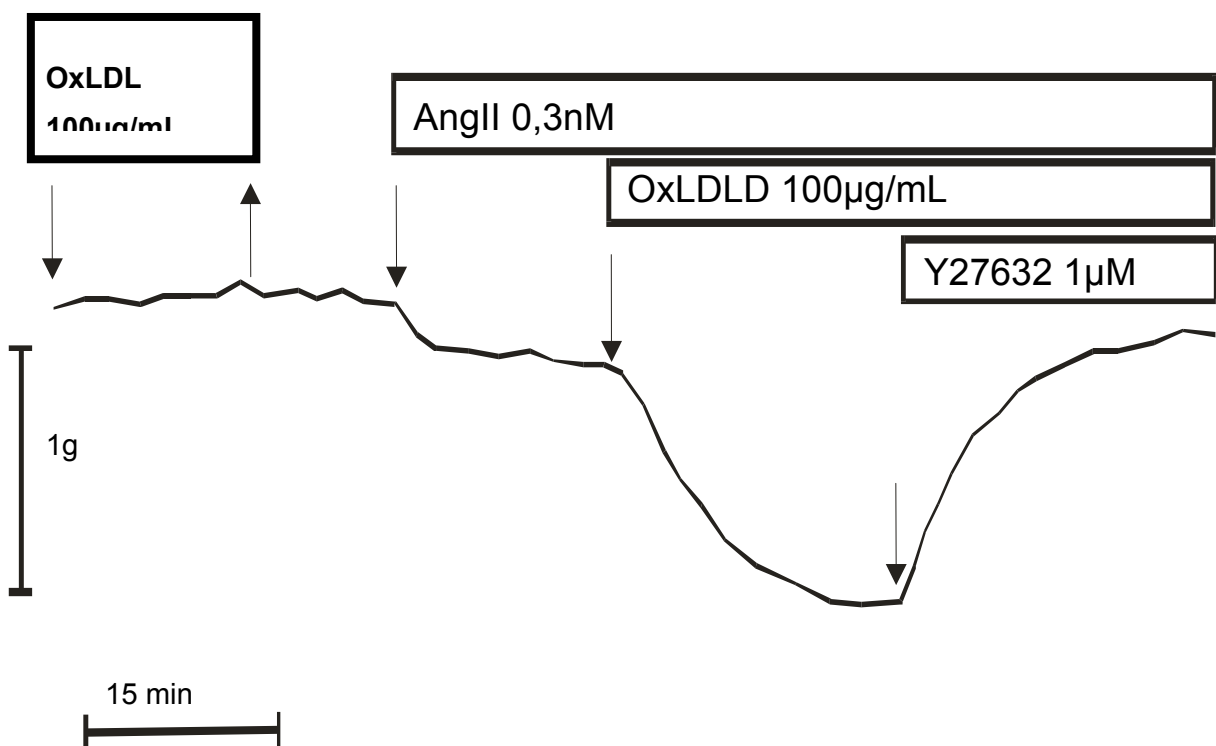


Abb.19: Effekt des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 (1µM) auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL.

Originalregistrierung

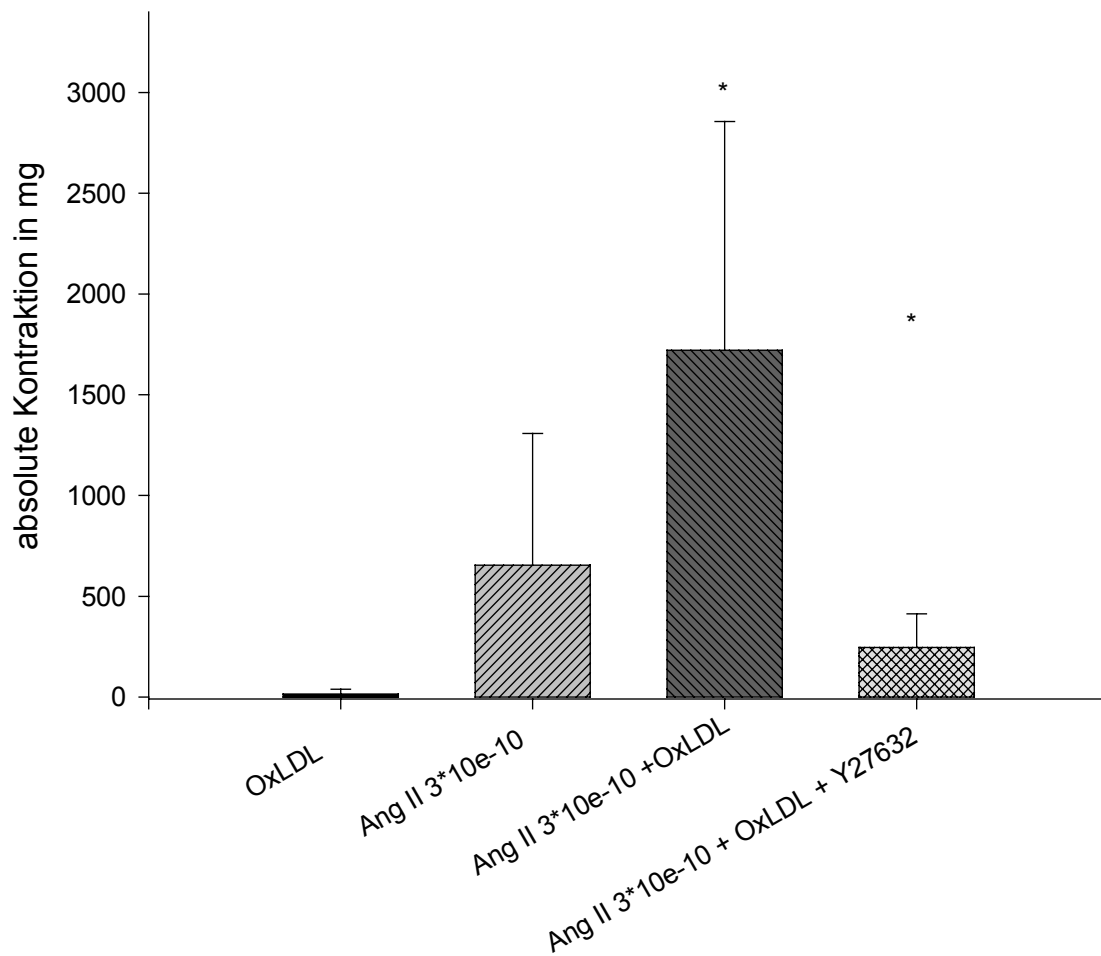


Abb. 20: Effekt des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 (1 μ M) auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL

n=6, * p<0,05 Ang II vs. Ang II + OxLDL sowie Ang II +OxLDL vs.

Ang II + OxLDL + Y27632

Der Rho-Kinase Inhibitor Y27632 hob die Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion auf und führte im Weiteren zu einer geringen Reduktion der Ang II induzierten Vasokonstriktion im Vergleich zu den Vorwerten.

4 Diskussion

Sowohl OxLDL, als auch Angiotensin II konnten in den vergangenen Jahren als wichtige Faktoren in der Pathogenese der Entstehung artherosklerotischer Läsionen identifiziert werden. Vor dem Hintergrund, dass OxLDL die vasokonstriktorisches Eigenschaften verschiedener Substanzen potenziert, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie sich OxLDL auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion auswirkt und über welchen Mechanismus diese Reaktion vermittelt wird.

4.1 Wirkungsprofil des Angiotensin II und dessen Beeinflussung durch verschiedene Testsubstanzen.

Die repetitive Stimulation der isolierten Kaninchenaortenringe mit Ang II in ansteigenden Konzentrationen führte zu einer signifikanten Zunahme der Kontraktilität in der 2. Stimulation im hohen Konzentrationsbereich.

Für die Agonisten induzierte Vasokonstriktion sind verschiedene Regulationsmechanismen bekannt. Neben der Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-Kaskade ist für viele Agonisten das Phänomen der Ca^{2+} -Sensibilisierung beschrieben worden. Hierbei kommt es auch bei konstanten oder abfallenden intrazellulären Ca^{2+} -Spiegeln zu einer Interaktion des kontraktilen Apparates und damit zur Kraftentwicklung. Da die Experimente der vorliegenden Arbeit unter konstanten Calciumkonzentrationen durchgeführt wurden, ist die hier gezeigte Zunahme der Kontraktilität durch wiederholte Angiotensin II Stimulationen als eine Calcium-Sensibilisierung zu interpretieren.

Hierfür spricht auch die nur teilweise Beeinflussung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion durch einen Calciumkanalantagonisten.

Kimura et al.[18] haben das Phänomen der Calcium-Sensibilisierung mit einer Aktivitäts-regulierung der Myosinleichtketten-Phosphatase durch das Wirken der Rho-Kinase erklärt. Durch ihre Beobachtungen, dass der Rho-Kinase Inhibitor Y27632 die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion mesenterialer Rattenarterien inhibiert,

zeigten Matrougui et al.[78] 2001 erstmalig eine Beteiligung der Rho-Kinase an der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion. Im Einklang mit diesen Berichten steht auch die in dieser Arbeit gezeigte Abnahme der Kontraktilität in der 2.Stimulation nach Inkubation mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632.

Die Abnahme bzw. vollständige Hemmung der Vasokonstriktion auf Stimulation mit Angiotensin II nach Inkubation mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten war zu erwarten. Der in dieser Arbeit eingesetzte AT₁-Rezeptorblocker Losartan leitet sich von der Grundstruktur der Imidazole ab und bindet kompetitiv und selektiv an den AT₁-Rezeptor. In hohen Konzentrationen kann Angiotensin II diesen aus der Bindung verdrängen. Dies zeigte sich bei einer Konzentration von Losartan von 0,1 μM in einem Angiotensin II Dosisbereich von 3*10⁻⁹-3*10⁻⁸ M, während bei einer Konzentration von Losartan von 1 μM jegliche Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion gehemmt wurde. Auch der ausbleibende Effekt des ACE-Inhibitors Quinapril auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion war zu erwarten. Da bei allen Versuchen das Angiotensin II von außen zugegeben wurde, konnte sich eine Inhibition des Enzymes nicht auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion auswirken.

4.2 Der Einfluss von OxLDL auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion

OxLDL potenziert die durch eine Schwellenkonzentration von Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion um das 2,9-fache. Dabei wurde die Angiotensin II Dosis, die eine Schwellenkontraktion hervorrief, empirisch ermittelt. Höhere Dosen führten zu keiner weiteren Zunahme der Kontraktionssteigerung. Im niedrigeren Dosisbereich war der Potenzierungseffekt zu gering ausgeprägt. Die maximal induzierbare Kontraktion durch Angiotensin II blieb durch eine Inkubation mit OxLDL unbeeinflusst.

Die Reaktion des Gefäßtonus auf kontraktorische und dilatierende Einflüsse beruht auf einem engen Zusammenspiel zwischen den dilatierenden Mechanismen der Endothelzelle und der kontraktorischen Stimulation der glatten Gefäßmuskulatur. Bereits in den Arbeiten von Flavahan et al [79], Jessup et al.[80] und Warnholtz et al.[81] wurde eine Abschwächung der endothelialen Funktion durch OxLDL und Angiotensin II beschrieben.

Sowohl OxLDL als auch Angiotensin II führen zu einer vermehrten Bildung von freiem O_2^- aus Endothelzellen[82].

In Folge der chemischen Reaktion mit NO zu Peroxynitrit, führt die vermehrte O_2^- Sekretion zu einer endothelialen Dysfunktion mit verminderter Dilatationsfähigkeit. Galle et al. zeigten 1993, dass eine abgeschwächte endotheliale Funktion die kontraktile Antwort auf Agonisten erhöht[83]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch durch eine Vergleichsanalyse an deendothelialisierten Gefäßen gezeigt werden, dass diese Potenzierung der kontraktilen Antwort auf Angiotensin II durch Inkubation mit OxLDL unabhängig von der endothelialen Funktion ist. Die hier dargestellte Steigerung der Kontraktilität durch OxLDL muss also durch eine direkte Interaktion mit den glatten Muskelzellen hervorgerufen werden.

Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen von Galle et al. 1990, die einen potenzierenden Effekt des OxLDL auf die Vasokonstriktion verschiedener Agonisten zeigten[84]. Auch in dieser Arbeit war eine Beeinträchtigung der endothelialen Funktion durch Versuche an deendothelialisierten Gefäßen ausgeschlossen worden. Ausgehend von diesen Ergebnissen, ist die in dieser Arbeit beschriebene Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL nicht als einzig spezifisch für Angiotensin II anzusehen.

4.3 Einfluss bekannter Antihypertensiva auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion und deren Potenzierung durch OxLDL

4.3.1 Der Calciumkanalantagonist Felodipin schwächt die Ang II induzierte Vasokonstriktion und deren Potenzierung durch OxLDL ab

Bei der Induktion der glattmuskulären Konstriktion spielen die Calciumionen eine entscheidende Rolle. Die Agonisten induzierte Rezeptorstimulation führt zu einer Zunahme der intrazellulären Calciumionenkonzentration, durch Komplexbildung mit Calmodulin und im weiteren Verlauf mit der Myosinleichtketten-Kinase wodurch die Phosphorylierung der Myosinleichtketten ermöglicht wird. Erst im phosphorylierten Zustand kann eine Interaktion zwischen Myosin- und Aktinfilamenten und damit eine Kontraktion erfolgen[10].

Sachindis et al. konnten nachweisen, dass OxLDL zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration führt[66]. Bolz et al. wiesen zusätzlich eine deutliche Zunahme der Kontraktilität in der Mikrozirkulation nach[67].

Mit Calciumkanalantagonisten, deren Wirksamkeit bei arterieller Hypertension und coronarer Herzkrankheit bereits in verschiedenen klinischen Studien gezeigt werden konnte, besteht eine Möglichkeit, direkt in die Signalkaskade der Vasokonstriktion – induziert durch Rezeptoragonisten, wie auch durch OxLDL -einzugreifen[85] [86].

Durch die Blockade verschiedener spannungs- und auch rezeptorabhängiger Calciumkanäle wird der intrazelluläre Calciumionengehalt niedrig gehalten, so dass eine Ca^{2+} abhängige Aktivierung der Myosinleichtkettenkinase unterbleibt.

Der Einsatz des Calciumkanalblockers Felodipin in dieser Arbeit führte zu einer Verminderung der Gesamtwirksamkeit von Angiotensin II, sowie zu einer Abschwächung der OxLDL induzierten Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion um etwa 40%.

Dieser Effekt wurde ebenfalls von Galle et al. 1990, sowie Bolz et al. 2000 für verschiedene Agonisten der Vasokonstriktion und OxLDL an großen Widerstandsgefäßen und in der Mikrozirkularisation gezeigt[67, 84].

Da sich die Potenzierung einer Agonisten induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL durch einen Calciumkanalantagonist nur partiell beeinflussen ließ, muss vermutet werden, dass sich die Inkubation mit OxLDL nicht einzig über den bekannten Anstieg der Ca^{2+} -Ionenkonzentration auswirkt. Vielmehr spiegelt diese Beobachtung die so genannte Ca^{2+} -Sensibilisierung wieder.

4.3.2 Der ACE-Hemmer Quinapril hat keinen Einfluss auf die Ang II induzierte Vasokonstriktion und deren Potenzierung durch OxLDL

Die Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzymes durch Prilatabkömmlinge ist eine effektive und häufig angewandte Möglichkeit zur medikamentösen Behandlung einer arteriellen Hypertonie. ACE-Inhibitoren binden kompetitiv an das aktive Zentrum des Angiotensin Converting Enzymes und verhindern dadurch die Synthese von Angiotensin II aus Angiotensin I. Im Weiteren wird die Inaktivierung des vasodilatativ wirkenden Bradykinins durch das ACE behindert.

Das Wirken der Prilate auf das Angiotensin-Converting-Enzym ist unselektiv, d.h. sowohl das zentrale RAAS als auch das gewebsständige RAAS wird gehemmt. Dadurch gehen die Effekte der ACE-Inhibitoren über eine reine Senkung des arteriellen Blutdruckes durch Reduktion des im Blutstrom zirkulierenden Angiotensin II hinaus[87].

Im Rahmen mehrerer klinischer Studien wurde die Wirksamkeit der ACE-Inhibitoren gezeigt[88-90].

Der in dieser Arbeit eingesetzte Angiotensin Converting Enzym Inhibitor Quinapril hatte keinen Einfluss auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion und deren Potenzierung durch OxLDL.

Der Wirkschwerpunkt der ACE-Inhibitoren liegt im Bereich der Bildung von Angiotensin II aus Angiotensin I. Erwartungsgemäß konnte im hier gewählten Versuchsablauf mit externer Zugabe von Angiotensin II, die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion, sowie nachfolgende deren Potenzierung durch OxLDL nicht verhindert werden.

4.3.3 Der AT₁-Rezeptorantagonist Losartan hemmt die OxLDL vermittelte Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion

Eine weitere Interaktionsebene zur Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systemes stellen die AT₁-Rezeptorantagonisten dar. Durch verschiedene Studien konnte die Wirksamkeit und Verträglichkeit sowie die Senkung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität erwiesen werden. AT₁-Rezeptorblocker sind bereits als Medikamente der ersten Wahl in der medikamentösen Therapie der arteriellen Hypertonie etabliert[91, 92].

Angiotensin 1-Rezeptorantagonisten, die so genannten Sartane, leiten sich von der Grundstruktur der Imidazole ab. Durch kompetitive und nicht kompetitive Bindung an den Rezeptor, blockieren sie diesen selektiv[93, 94].

Der in dieser Arbeit verwandte AT₁-Rezeptorblocker Losartan bindet kompetitiv und kann somit durch hohe Agonistenkonzentrationen verdrängt oder aber seine Bindung bei gleichzeitiger Gabe von Angiotensin II verhindert werden. Bei einer Losartankonzentration von 0,1µM zeigte sich diese Verdrängung partiell bei hohen Konzentrationen an Angiotensin II. Bei einer Konzentration von Losartan von 1µM war die Rezeptorblockade jedoch effektiv und eine Verdrängung durch Angiotensin II nicht möglich, so dass eine Vasokonstriktion nach Ang II Stimulation ausblieb. Unter diesen Bedingungen kam es nicht zu einer Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den ebenfalls in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen, dass OxLDL keine Veränderungen des Basaltonus unkontrahierter Gefäße hervorruft.

4.4 Der Effekt des Rho-Kinase-Inhibitors Y27362 auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion und deren Potenzierung durch OxLDL.

4.4.1 Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 schwächt die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion ab

Bisher wurde die Agonisten induzierte Vasokonstriktion durch die rezeptorgekoppelte Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin- und second messenger Kaskade erklärt. Daneben wurde in den vergangenen Jahren die zunehmende Bedeutung alternativer Regulations- und Induktionsmechanismen nachgewiesen. Vor allem über das Phänomen der Ca^{2+} -Sensibilität geriet das Enzym Rho-Kinase zunehmend ins Blickfeld der aktuellen Forschung im Zusammenhang mit Agonisten induzierten Vasokonstriktion. Matrougui et al beschrieben 2001 erstmals konkrete Hinweise auf eine Beteiligung der Rho-Kinase an der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion. In ihren damaligen Experimenten konnten sie durch den Einsatz des Rho-Kinase Inhibitors Y27632 ein Ausbleiben der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion nachweisen[78].

In den ersten Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte eine Zunahme der Kontraktilität

(Ca^{2+} -Sensibilität) isolierter Kaninchenarterienringe durch wiederholte Stimulation mit Angiotensin II gezeigt werden. Da sich dieser Effekt nur teilweise durch die Blockade von Ca^{2+} -Kanälen beeinflussen ließ, muss angenommen werden, dass ein weiterer Mechanismus involviert ist. Unter dem Einsatz des Rho-Kinase Inhibitors Y27632 wurde die Kontraktilitätszunahme deutlich reduziert. Im Bereich der Schwellenkonzentration führte Y27632 zu einem Ausbleiben der kontraktiven Antwort. Dies ist in Einklang mit den bereits erwähnten Untersuchungen von Matrougui et al. und den Analysen von Uehata et al., die ähnliche Ergebnisse für die Phenylephrin induzierte Vasokonstriktion berichteten[20, 78]. Daneben zeigten Batchelor et al. die Prävention von Agonisten induzierten Spasmen der A. mammaria durch die Gabe von Rho-Kinase Inhibitoren[95]. Während Kandabashi et al. zeigten, dass eine Ca^{2+} Sensibilisierung durch die Aktivierung der Rho-Kinase eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung von Vasospasmen großer Arterien hat[96]. Somit spielen bei der

Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion sowohl die Rezeptor gekoppelte Aktivierung des Ca^{2+} -Calmodulin Systems als auch von einem Rho-Kinase vermittelten Mechanismus eine wesentliche Rolle.

4.4.2 Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 verhindert die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL

Die Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL konnte durch die Inkubation mit einem Calciumkanalantagonisten nur teilweise aufgehoben werden. Daher ist neben einer Steigerung der Calciumionenkonzentration ein weiterer kontraktionsverstärkender Mechanismus zu vermuten. Bolz et al. fanden in ihren Versuchen an Gefäßen der Mikrozirkulation, durch den Einsatz des Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 bereits erste Hinweise, dass die Rho-Kinase bei der OxLDL vermittelten Ca^{2+} -Sensibilisierung eine Rolle zu spielen scheint[67]. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit führte eine Inkubation mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 zu einem Ausbleiben der OxLDL vermittelten Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion.

Im Rahmen dieser Arbeit haben sich deutliche Hinweise für eine Interaktion von Angiotensin II mit der Rho-Kinase ergeben, jedoch konnte durch eine weitere Analyse gezeigt werden, dass die Zunahme der Kontraktilität nach Stimulation mit OxLDL durch die anschließende Inkubation mit Y27632 voll reversibel war. Die Angiotensin II induzierte Kontraktion wurde kaum beeinträchtigt. Daher ist davon auszugehen, dass OxLDL die Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion über die Aktivierung der Rho-Kinase vermittelt.

Gestützt wird diese These von den Arbeiten von Essler et al., die eine OxLDL induzierte Aktivierung der Rho A/Rho-Kinase sowie eine Hemmung der MCL-P in Endothelzellen nachwiesen[97]. Auch die neueren Arbeiten von Galle et al., die eine OxLDL vermittelte Translokation von Rho A aus dem Zytosol an die Zellmembran zeigten sprechen hierfür[98].

Wobei es bei sich Rho A um ein kleines GTP bindendes Protein handelt, welches die Aktivität der Rho-Kinase reguliert.

5 Zusammenfassung

Atherosklerose und Hypercholesterinämie führen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der vaskulären Funktion. Neben der bereits vielfältig beschriebenen Hemmung der endothelvermittelten Vasodilatation durch oxidierte Lipoproteine, fanden sich in den vergangenen Jahren auch zunehmend Hinweise für ein verändertes Kontraktionsverhalten von Arterien unter dem Einfluss von oxidiertem LDL. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob oxidiertes Lipoprotein die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion verändert, durch welche Mechanismen dies geschieht und ob sich durch den Einsatz bereits bekannter und etablierter antihypertensiver Medikamente und neuerer Substanzen ein Einfluss hierauf nehmen lässt. Hierfür wurden Kontraktionsexperimente an isolierten Kaninchenaorten durchgeführt. Zu Beginn der Arbeit wurde zunächst die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion studiert, hierbei zeigte sich, dass Angiotensin II selbst bei repetitiver Stimulation zu einer Zunahme der Kontraktilität isolierter Kaninchenaorten führt. Wie weiterführende Untersuchungen zeigten, konnte dieser Effekt durch die Blockade von Calciumkanälen nur teilweise beeinflusst werden. Hiervon ausgehend kann festgestellt werden, dass Angiotensin II zu einer Zunahme der Kontraktilität durch eine Sensibilisierung des kontraktilen Apparates gegenüber Calcium führt. Der Mechanismus der Ca^{2+} -Sensibilisierung ist noch nicht vollständig geklärt, in vorangehenden Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen fanden sich jedoch viele Hinweise auf eine Rho-Kinase vermittelte Aktivitätsmodulierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase. Die Beteiligung der Rho-Kinase an der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion konnte durch den Einsatz des Rho-Kinase Hemmers Y27632 gezeigt werden. Nach Inkubation kam es zu einer signifikant verringerten Ausprägung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion.

Auch durch die Blockade des AT_1 -Rezeptors konnte die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion verhindert werden, während der Einsatz eines Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitors ohne Einfluss auf die Vasomotorik blieb.

Im Anschluss wurde der Effekt des oxidierten Low Density Lipoproteins auf die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion untersucht. OxLDL steigerte die durch eine

Schwellenkonzentration von Angiotensin II hervorgerufene Kontraktion isolierter Kaninchenaortenringe um das 2,9 fache, während es den Basaltonus unkontrahierter Gefäße nicht beeinflusste. Dabei war zunächst unklar, über welchen Mechanismus diese Potenzierung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion vermittelt wird. Durch den Einsatz eines Calciumkanalantagonisten konnte gezeigt werden, dass die OxLDL induzierte Zunahme der Kontraktilität nicht einzig durch eine Steigerung der intrazellulären Calciumionenkonzentration vermittelt ist, da dieser nur einen partiellen Effekt von etwa 40% hatte.

Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 führte jedoch zu einem Ausbleiben bzw. Rückgang der Potenzierung.

Daher bleibt festzustellen, dass sowohl bei Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion als auch deren Potenzierung durch OxLDL die Rho-Kinase beteiligt ist.

Auch eine Hemmung der Angiotensin II induzierten Vasokonstriktion durch einen AT₁-Rezeptorblocker verhinderte den potenzierenden Einfluss von OxLDL.

In der Hypertonus Therapie bei hypercholesterinämischen Patienten könnte der Einsatz von AT₁-Rezeptorblockern und Rho-Kinase-Hemmern erfolgsversprechend sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Tiegerstedt R, B.P., *Niere und Kreislauf*. Skandinavisches Archiv für Physiologie, 1898. **8**: p. 223-271.
2. Goldblatt H, L.J., Hanzal R.F., Summerville W.W, *The renal origin of hypertension*. Journal of experimental Medicine 1934, 1934(59): p. 347.
3. Braun-Menendez E., F.J.C., Leloir L.F, Muñoz J.M, *The substance causing renal Hypertension*. Journal of Physiology, 1940(98): p. 283-298.
4. Page IH, H.O., *A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator*. Journal of experimental Medicine, 1940(71): p. 29-42.
5. Anitschkow N., *Über die Veränderung der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose*. Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol, 1913. **56**: p. 379-404.
6. Anitschkow N., C.S., *Über experimentelle Cholestrinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse*. Zentralbl Allg Path Path Anat, 1913. **24**: p. 1-9.
7. Potter D., C.B.S., Sobey G., Tompkins P.K., Rossen J.D., Heistad D.D., *Evidence that Macrophages in atherosclerotic lesions contain Angiotensin II*. Circulation, 1998. **98**: p. 800-807.
8. Furchtgott R.F., Z.J.V., *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**: p. 373-376.
9. Moncada S., P.R.M., Higgs E.A., *The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator*. Hypertension. **12**: p. 365-372.
10. Somlyo, A.P., Somlyo Avril V., *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. Nature, 1994. **372**: p. 231-236.
11. Bradley A. B., M.K.G., *Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin*. J Physiol, 1987. **385**: p. 437-448.
12. Himpens B, K.T., Somlyo AP, *Agonist-dependent modulation of Ca²⁺ sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle*. Pflugers Arch, 1990. **417**: p. 21-28.

13. Rembold CM, M.R., *Myoplasmic [Ca²⁺] determines myosin phosphorylation in agonist-stimulated swine arterial smooth muscle*. *Circ Res*, 1988. **63**: p. 593-603.
14. Gong M.C., F.A., Alessi D., Kobayashi S., Cohen P., Somlyo A.P., *Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium*. *J Biological Chemistry*, 1992. **267**: p. 21492-21498.
15. Masuo, M., et al., *A novel mechanism for the Ca(2+)-sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: inhibition of myosin light chain phosphatase*. *J. Gen. Physiol.*, 1994. **104**(2): p. 265-286.
16. Nishimura J., K.M.v.B.C., *Norepinephrine and GTP-gamma-S increase myofilament Ca²⁺ Sensitivity in alpha-toxin permeabilized arterial smooth muscle*. *Biochem Res Comm*, 1988. **157**(2): p. 677-83.
17. Kitazawa T., K.S., Horiuti K., Somlyo A.P., *Receptor-coupled permeabilized smooth muscle: Role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins, and modulation of the contractile response to Ca²⁺*. *J Biological Chemistry*, 1989. **264**(10): p. 5339-42.
18. Kimura K., I.M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K., *Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase(Rho-Kinase)*. *Science*, 1996. **273**: p. 245-248.
19. Kureishi Y., K.S., Amano M., Kimura K., Kanide H., Nakano T., Kaibuchi K., Masaaki I., *Rho-associated Kinase Directly Induces Smooth Muscles Contraction through Myosin Light Chain Phosphorylation*. *J Biological Chemistry*, 1997. **272**(19): p. 12257-12260.
20. Uehata Masayoshi, I.T., Satoh Hiroyuki, Ono Takashi, Kawahara Toshi, Morshita Tamami, Tamakawa Hiroki, Yamagami Keiji, Inui Jun, Maekawa Midori, Narumiya Shuh, *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension*. *Nature*, 1997. **389**: p. 990-994.
21. Vanhoutte P.M., *Endothelial Dysfunction and atherosclerosis*. *Eur Heart J.*, 1997(Suppl E): p. E19-29.
22. Shimokawa H., *Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **1**: p. 23-37.

23. Davies P.F., *Flow mediated endothelial mechanotransduction*. *Physiol. Rev.*, 1995. **75**(3): p. 519-560.
24. Oparil S., O.A., *Nontraditional cardiovascular risk factor*. *Am J Med Sci*, 1999. **371**(3): p. 23-37.
25. Simon B.C., N.B., Maisch B., *Endotheliale Dysfunktion eine Bestandsaufnahme und Ansätze zur Therapie*. *Herz*, 1999. **24**(1): p. 62-71.
26. Ross R., *Atherosclerosis- an inflammatory disease*. *New England Journal of Medicine*, 1999. **340**(2): p. 115-26.
27. Vogel R.A., *Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis: a review*. *Clinical Cardiology*. **20**: p. 426-432.
28. Boulanger C.M., V.P.M., *G proteins and endothelium relaxations*. *J Vas Res*, 1997. **34**(3): p. 175-82.
29. Virchow R. Phlogose und., *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin*. 1856: p. 458-463.
30. Ross R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature*, 1993. **362**: p. 801-809.
31. Goldstein J.L., B.M.S., *The Low density lipoprotein pathwas and its relation to atherosclerosis*. *Ann Rev Biochem*, 1977. **46**: p. 897-930.
32. Brown M.S., G.J.L., *Receptor-mediated pathway for cholesterol Homeostasis*. *Science*, 1986. **232**: p. 34-47.
33. Breslow J.L., *Apolipoprotein Genes and Atherosclerosis*. *J Clin Invest*, 1992. **70**: p. 377-384.
34. Brown M.S., G.J.L., *Arteriosklerose und Cholesterin: die Rolle der LDL-Rezeptoren*. *Spektrum der Wissenschaft*, 1985: p. 96-109.
35. Sudhof T.C., G.J.L., Brown M.S., Russel D.W., *The LDL-Receptor Gene: A Mosaic of Exons Shared with Different Proteins*. *Science*, 1985. **228**: p. 815-822.
36. Steinberg D., *Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis*. *Circulation*. **76**: p. 508-514.
37. Ylä-Herttuala S., P.W., Rosenfeld M.E, Carew T.E, Butler S., Witztum J.L., Steinberg D., *Evidence for the presence of oxidatively modified low density*

- lipoprotein in atherosclerotic lesion of rabbit and man.* J Clin Invest. **84**: p. 1086-1095.
38. Daugherty A., Z.B.S., Sobel B.E., Schonfeld G., *Isolation of low density lipoprotein from atherosclerotic vascular tissue of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. **8**: p. 768-777.
 39. Mueller K., C.K.L., Mitchinson M.J., *Cell-mediated oxidation of LDL: comparison of different cell types of atherosclerotic lesion.* Free Radical Research. **29**: p. 207-220.
 40. Aviram M., *LDL-platelet interaction and oxidative stress induces macrophage foam cell formation.* Thromb Haemost. **74**: p. 560-564.
 41. Ehrwald E., F.P.L., *Role of endogenous ceruloplasmin in low density lipoprotein oxidation by human U937 monocytic cells.* J Clin Invest. **97**: p. 884-890.
 42. Parathasarathy S., S.N., Ramachandran S., Meilhac O., *Oxidants and antioxidants in atherogenesis: An appraisal.* J Lipid Research, 1999. **40**(12): p. 2143-57.
 43. Esterbauer H., R.P., *Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL.* Res Physiol Biochem Pharmacol: p. 12731-64.
 44. Janabi M., Y.S., Hiranop K., Sakai N., Hiraoka H., Matsumoto K., Zhang Z., Nozaki S., Matsuzawa Y., *Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte derived macrophages from CD 36-deficient patients.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. **20**: p. 1953-1960.
 45. Adachi H., T.M., Arai H., Inoue K., *Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells.* J Biological Chemistry. **272**: p. 31217-31220.
 46. Metha J.L., L.D.Y., *Identification of an autoregulation of receptor for OxLDL in cultured human coronary endothelial cells.* Biochem Res Comm. **84**: p. 322-327.
 47. Moriwaki H., K.N., Sawamura T., Aoyama T., Hoshikawa H., Ochi H., Nishi E., Masaki T., Kita T., *Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. **18**: p. 1541-1547.

48. Li D.Y., Z.Y.C., Philips M.I. Sawamura T., Metha J.L., *Upregulation of endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein (LOX-") in cultured human coronary artery cells by angiotensin II type receptor activation.* Biochem Biophys Res Comm. **248**: p. 511-514.
49. Kume N., M.T., Moriwaki H., Aoyama T., Sawamura T., Masaki T., Kita T., *Identification of soluble forms of lecithin-like oxidized LDL receptor-1.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. **20**: p. 715-720.
50. Amberger A., M.C., Jurgens G., Michaelis D., Schet G., Eberl T., Jindal S., Xu Q., Wick G., *Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low density lipoproteins.* Cell Stress Chaperones, 1997. **2**: p. 94-103.
51. Cushing S.D., B.J.A., Valente A.J., Territo M.C., Navab M., Parhami F., Gerrity R., Schwartz C.J., Fogelman A.M., *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells.* Proc Natl Acad Sci USA. **87**: p. 5143.
52. Kume N., C.M.L., Gimbrone M.A., *Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial cells.* J Clin Invest. **90**: p. 1138-1144.
53. Rajavashisth T.B., A.A., Territo M.C, Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Lusis A.J., *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins.* Nature. **344**: p. 254-257.
54. Morel D.W., D.C.P.E., Chisolm G.M., *Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation.* Arteriosclerosis. **4**: p. 357-364.
55. Galle J., B.R., Bassenge E., *Hypercholesterolemia and Atherosclerosis change vascular reactivity in Rabbits by Different Mechanism.* Arteriosclerosis and Thrombosis, 1991. **11**.
56. Galle J., B.J., Busse R., Bassenge E., *Inhibition of cyclic AMP- and cyclic GMP-mediated dilations in isolated arteries by oxidized low density lipoproteins.* Arteriosclerosis and Thrombosis, 1992. **2**: p. 180-186.

57. Galle J., B.E., Busse R., *Oxidized Low density lipoproteins potentiate Vasoconstrictions to various Agonist by Direct Interaction with vascular smooth muscle*. Circulation Res, 1989. **66**: p. 1287-1292.
58. Galle J., S.R., Heinloth A., Wanner C., Galle R.P., Conzelmann E., Dimmeler S., Heermeier K., *Lp(a) and LDL induced apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress*. Kidney Int. **55**: p. 1450-1461.
59. Ohara Y., P.T.E., Harrison D.G., *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxid anion production*. J Clin Invest. **91**: p. 2546-2551.
60. Rueckschloss U., D.N., Morawietz H., *NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis*. JAntioxid Redox Signal, 2003. **2**: p. 171-180.
61. Pohl U, H.N., Galle J, *Effects of LDL on intracellular free calcium and nitric oxide-dependent cGMP formation in porcine endothelial cells*. Atherosclerosis, 1995. **117**: p. 169-178.
62. Dimmeler S, H.J., Galle J, Zeiher AM, *Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases: a mechanistic clue to the "response to injury" hypothesis*. Circulation, 1997. **95**: p. 1760-1763.
63. Galle J, H.A., Schwedler S, Wanner C, *Effect of HDL and atherogenic lipoproteins on formation of O₂⁻ and renin release in juxtaglomerular cells*. Kidney Int, 1997. **51**: p. 253-260.
64. Greiber S, W.U., Galle J, Brämer P, Schollmeyer P, *Activated clotting time is not a sensitive parameter to monitor anticoagulation with low molecular weight heparin in hemodialysis*. Nephron, 1977. **76**: p. 15-19.
65. Sachinidis A., L.R., Mengden T., Steiner A., Vetter W., *Vasoconstriction: A novel activity for low density lipoprotein*. Biochem Biophys Res Comm, 1989. **163**: p. 315-320.
66. Sachinidis A., L.R., Mengden T., Vetter W., *Low-density lipoprotein elevates intracellular free Calcium and pH in vascular smooth muscle cells and fibroblasts without mediation of LDL receptor*. Biochem Biophys Res Comm, 1990. **167**: p. 1287-1293.
67. Bolz, S., Galle J., Derwand R., De Wit C., Pohl U., *Oxidized LDL increase the sensitivity of contractile apparatus in isolated resistance arteries for Ca²⁺ via*

- Rho- and Rho-kinase dependent mechanism.* Circulation, 2000. **102**: p. 2402-2410.
68. Kandabaschi T., S.H., Miyata K., Kunihiro I., Kawano Y., Fukata Y., Higo T., Egashira K., Takahashi S., Kaibuchi K., Takeshita A., *Inhibition of Myosin Phosphatase by Upregulated Rho-Kinase Plays a Key Role for Coronary Artery Spasm in a Porcine Model With Interleukin-1 β .* Circulation, 2000. **101**: p. 1319-1323.
 69. Gallinat S., E.O., Unger T., *Das Renin-Angiotensin-System.*
 70. Whitebread S., M.M., Kamber B., de Gasparo M., *Preliminary biochemical Characterization of two angiotensin II receptor subtypes.* Biochem Biophys Res Comm, 1989. **163**: p. 284-91.
 71. Murphy Thomas J., Alexander R. Wayne, Griendling Kathy K., Runge Marschall S., Bernstein Kenneth E., *Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor.* Nature, 1991. **351**: p. 233-236.
 72. Inagami T, I.N., Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Chaki S, Guo DF, Furuta H, and K.Y. Ohyama K, et al., *Cloning, expression and regulation of angiotensin II receptors.* Eur Heart J., 1994: p. Suppl D 104-7.
 73. Siragy, H.M., *AT₁ and AT₂ Receptor in the Kidney: Role in Health and Disease.* Seminars in Nephrology, 2004. **24**(2): p. 93-100.
 74. Kaschina E., U.T., *Angiotensin AT₁/ AT₂ Receptors: Regulation, Signaling and Function.* Blood press, 2003. **24**(2): p. 93-100.
 75. AbdAlla Said, L.H., Adel-Tawab Ahmed M., Quitterer Ursula, *The Angiotensin II AT₂ Receptor Is An AT₁ Receptor Antagonist.* The Journal of Biological Chemistry, 2001. **273**(43): p. 39721-39726.
 76. Luscher T.F., T.F.C., *Endothelial regulation of vascular tone and growth.* Am J Hypertension, 1993. **6**: p. 283S-293S.
 77. Sorokin A., K.D.E., *Physiology and pathophysiology of Endothelin-1 in renal mesangium.* Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(4): p. F579-589.
 78. Matrougui K., T.L.B., Loufrani L., Gorny D., Levy B.I., Tedgui A., Henrion D., *Involvement of Rho-Kinase and the Actin Filament Network in Angiotensin II-Induced Contraction and Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity in*

- Intact Rat Mesenteric Resistance Arteries*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**: p. 1288-1293.
79. Flavahan, N.A., *Atherosclerosis or Lipoprotein-Induced Endothelial Dysfunction*. *Circulation*, 1992. **85**(5): p. 1927-1938.
80. Jessup W., *Oxidized lipoproteins and nitric oxide*. *Curr OpinLipidol*, 1996. **7**: p. 274-280.
81. Warnholtz A, N.G., Schulz E, Macharzina R, Brañsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, HarrisonDG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T., *Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis - Evidence for involvement of the renin-angiotensin system*. *Circulation*, 1999. **99**: p. 2027-2033.
82. Hae Young Sohn, U.R., Anke Hoffmann, Torsten Gloe, Kathrin Heermeier, Jan Galle & and U. Pohl, *Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation*. *British Journal of Pharmacology*, 2000. **131**: p. 667 - 672.
83. Galle J, B.J., Bassenge E, Busse R, *Arterial size determines the enhancement of contractile responses after suppression of endothelium-derived relaxing factor formation*. *Pflugers Arch*, 1993. **422**: p. 564-569.
84. Galle J, B.E., Busse R, *Oxidized low density lipoproteins potentiate vasoconstrictions to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle*. *Circulation*, 1990. **66**: p. 1287-1293.
85. Staessen JA et al., *Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators*. *Lancet*. **350**: p. 757-64.
86. Gong L et al., *Shanghai trial of nifedipine in the elderly (STONE)*. *J Hypertens*, 1996. **14**: p. 1237-1245.
87. Weishaar Ronald E., P.R.L., Major Terry C., Simmermann John C, Rapundalo Stephen T., Taylor JR. David G., *Evidence for a Functional Tissue Renin-Angiotensin System in the Rat Mesenteric Vasculature and Its Involvement in Regulating Blood Pressure*. *J Pharm Exper Ther*, 1990. **256**(2): p. 568-574.
88. Curla et al., *Quinapril: a further update of its pharmacology and therapeutic use in cardiovascular disorders*. *Drugs*, 2002. **62**(2): p. 339-85.

89. Lees RS, P.B., Chan RC, Holmvang G, Dinsmore RE, Campbell LW, Haber HE, Klibaner MI, Cashin Hemphill L, *Baseline clinical and angiographic data in the Quinapril Ischemic Event (QUIET) Trial. Am.J Cardiol*, 1996. **78**: p. 1011-1016.
90. Mancini GBJ, H.G., Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Upprichard ACG, Pepine CJ, Pitt B, *Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease - The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) study. Circulation*, 1996. **94**: p. 258-265.
91. Dahlöf B, D.R., Kjeldsen S, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm L, Nieminen M, Omvik P, Oparil S, Wedel H, *Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. Lancet*, 2002. **359**: p. 995-1003.
92. Lithell H, H.L., Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A, *The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. J Hypertension*, 2003. **21**: p. 875-886.
93. Timmermans PB, C.D., Chiu AT, Duncia JV, Price WA Jr, Wells GJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL., *Angiotensin II receptor antagonists. From discovery to antihypertensive drugs. Hypertension*, 1990. **III 5 Suppl**: p. 136-42.
94. Timmermans PB, W.P., Chiu AT, Herblin WF, Benefield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD, *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. Pharmacol Rev.* **45**: p. 205-251.
95. Batchelor TJP, S.J., Ishola A., Pacaud P., Munsch CM, Beech DJ, *Rho-kinase inhibitors prevent agonist-induced vasospasm in human internal mammary artery. British Journal of Pharmacology*, 2001. **132**: p. 302-308.
96. Kandabashi T., S.H., Mukai Y., Matoba T., Morikawa K., Ito M., Takahashi S., Kaibuchi K., Takeshita A., *A Involvement of Rho-kinase in agonist-induced contractions of arteriosclerotic human arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**: p. 243-248.

97. Essler M., R.M., Bauer M., Heemskerk J.W., Aepfelbacher M., Siess W., *Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase.* J Biological Chemistry, 1999. **274**: p. 30361-30364.
98. Galle, J., et al., *Oxidized LDL and its Compound Lysophosphatidylcholine Potentiate AngII-Induced Vasoconstriction by Stimulation of RhoA.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(6): p. 1471-1479.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Synthese von NO aus der Aminosäure L-Arginin unter der Einwirkung des Enzyms NO-Synthase. Die über NO aktivierte Guanylatcyclase der Zielzellen bildet zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP), welches die Relaxation der glatten Muskelzellen vermittelt.

Abb.2: Rezeptorgekoppelte Induktion der glattmuskulären Kontraktion und die Myosin-Leichtketten-Phosphatase vermittelte Relaxation

Abb.3: Regulation der glattmuskulären Kontraktion

Abb. 4: Querschnittsskizze der Versuchsanordnung I

Abb.5: Querschnittsskizze der Versuchsanordnung II
Detailskizze des Organbades

Abb.6: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Angiotensin II ($1 \cdot 10^{-12}$ – $3 \cdot 10^{-8}$ M) und der vor und nach 30 minütiger Inkubation mit Tyrode-Puffer resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Kaninchenaortenringe.
n= 13, * p< 0,05 Ang II DWK I versus Ang II DWK II

Abb.7: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Angiotensin II ($1 \cdot 10^{-12}$ – $3 \cdot 10^{-8}$ M) und der nach Inkubation mit oxidiertem LDL (100µg/ml) resultierenden Kontraktion vorgedehnter Aortenringe im Vergleich zu Kontrollgefäßen.
n= 6; *p>0,05 Ang II-DWK I vs. Ang II DWK II + OxLDL

Abb.8: Effekt von OxLDL (100µg/ml) auf den Basaltonus und die Ang II induzierte Vasokonstriktion. Originalregistrierung

Abb.9: Effekt von OxLDL (100µg/ml) auf den Basaltonus und die Ang II ($1 \cdot 10^{-10}$ – $3 \cdot 10^{-10}$ M) induzierte Vasokonstriktion.

n=14, * p< 0,05 Ang II vs. Ang II und OxLDL (100µg/ml)

Abb.10: Effekt von OxLDL (100µg/ml) auf den Basaltonus und die Ang II ($1 \cdot 10^{-10}$ – $3 \cdot 10^{-10}$ M) induzierte Vasokonstriktion deendothelialisierter Aortenringe.

n=14, * p< 0,05 Ang II vs. Ang II und OxLDL (100µg/ml)

Abb.11: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II und der nach Inkubation mit dem Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitor Quinalapril ($1 \cdot 10^{-6}$ M) resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe im Vergleich zu Kontrollgefäßen.

n=3,

Abb.12: Einfluß des Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitors Quinapril ($1 \cdot 10^{-6}$ M) auf die durch OxLDL vermittelte Potenzierung der Ang II induzierten Kontraktion.

n=6

Abb.13: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II und der nach Inkubation mit dem Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin ($1 \cdot 10^{-7}$ M) resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe im Vergleich zu Kontrollgefäßen.

Abb.14: Einfluß des Calcium-Kanal-Antagonisten Felodipin ($1 \cdot 10^{-7}$ M) auf die durch OxLDL (100µg/ml) vermittelte Potenzierung der Ang II induzierten Kontraktion.

n= 5, * p<0,05 Ang II vs. Ang II und OxLDL sowie Ang II und OxLDL vs. Ang II und Felodipin und OxLDL

Abb.15: Dosiswirkungsbeziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II und der nach 30 minütiger Inkubation mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan (0,1µM) resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe.

n=3, *p<0,05 Ang II DWK I vs. Ang II DWK II vs. Ang II DWK II + Losartan

Abb.16: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II ($1 \cdot 10^{-12}$ - $3 \cdot 10^{-8}$ M) und der vor und nach 30minütiger Inkubation mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan 1 μ M resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe.

n=3, *p<0,05 Ang II DWKI vs. Ang II DWK II vs. Ang II DWK II +Losartan (1 μ M)

Abb.17: Effekt des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan (1 μ M) auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL (100 μ g/ml).

n=5, * p< 0,05 Ang II versus Ang II + Losartan sowie Ang II + OxLDL versus Ang II + OxLDL + Losartan.

Abb.18: Dosiswirkungsbeziehung zwischen dem Vasokonstriktor Ang II und der nach 30 minütiger Inkubation mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y23762 (0,1 μ M) resultierenden Vasokonstriktion vorgedehnter Aortenringe.

n=3, * p<0,05 Ang II DWK I versus Ang II DWK II ($1 \cdot 10^{-12}$ - $3 \cdot 10^{-8}$ M) und Y23762 (0,1 μ M)

Abb.19: Effekt des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 (1 μ M) auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL

n=5, * p<0,05 Ang II vs. Ang II + Y27632, sowie Ang II + OxLDL vs. Ang II + Y27632 + OxLDL

Abb.20: Effekt des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 (1 μ M) auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL. Originalregistrierung

Abb. 21: Effekt des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 (1 μ M) auf die Potenzierung der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch OxLDL

n=6, * p<0,05 Ang II vs. Ang II + OxLDL sowie Ang II +OxLDL vs. Ang II + OxLDL + Y27632

7.2 Abkürzungsverzeichnis

<i>Ang II</i>	Angiotensin II
<i>AT₁ und AT₂</i>	Angiotensin II Rezeptoren vom Typ 1 und 2
<i>Ach</i>	Acetylcholin
<i>Ang II –DWK</i>	Angiotensin II Dosis-Wirkungskurve
<i>ATP</i>	Adenosintriphosphat
<i>ADP</i>	Adenosindiphosphat
<i>ApoB</i>	Apolipoprotein B100
<i>ACE</i>	Angiotensin Converting Enzyme
<i>cAMP</i>	Zyklisches Adenosinmonophosphat
<i>Ca²⁺-Cam-MLCK</i>	Ca ²⁺ -Calmodulin- Myosin-Leichtketten-Kinase-Komplex
<i>CSF</i>	Colony Stimulating Factor
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EDRF</i>	Endothelium Derived Relaxing Factor
<i>GTP</i>	Guanosintriphosphat
<i>cGMP</i>	zyklisches Guanodin-Monophosphat
<i>HDL</i>	High Density Lipoproteins
<i>IP3</i>	Inositoltriphosphat
<i>ICAM-1,</i>	Intercellular adhesion molecule 1
<i>LDL</i>	Low Density Lipoproteins
<i>Lp(a)</i>	Lipoprotein (a)
<i>MLCK</i>	Myosin-Leichtketten-Kinase
<i>MLC</i>	Myosin-Leichtketten
<i>MLC-P</i>	phosphorylierte Myosinleichtketten
<i>MCP-1</i>	Monocyte Chemotactic Protein-1
<i>n-LDL</i>	native LDL
<i>NADH</i>	Nicotinamid-Adenindinucleotid-Hydroeen
<i>NADPH</i>	Nicotinamid-Adenindinucleotidphosphat
<i>NO</i>	Stickstoffmonoxid

<i>oxLDL</i>	Oxidativ modifizierte Low Density Lipoproteins
<i>ONOO⁻</i>	Peroxynitrit
<i>O₂⁻</i>	freie Sauerstoffradikale
<i>PBS</i>	Phosphat Buffered Saline
<i>PKA</i>	Proteinkinase A
<i>RAAS</i>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
<i>t-PA</i>	tissue-Plasminogen-Aktivator
<i>TGF-β</i>	Transforming Growth Factor- beta
<i>TNF-α</i>	Tumornekrosefaktor alpha
<i>VCAM-1</i>	Vascular cell adhesion molecule 1
<i>VLDL</i>	Very Low Density Lipoproteins

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben herzlich Danken.

Herrn Professor Dr. Jan Galle danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung sowie alle weitere fachliche und konstruktive Unterstützung rund um mein Studium und das weitere klinische Fortkommen.

Frau Margarethe Röther, Frau Traudel Baier und Frau Elke Baumeister danke ich für ihren engagierten Einsatz bei der Gewinnung und Bereitstellung von OxLDL und die herzliche Aufnahme in das Laborleben.

Frau Dr. Kathrin Heermeier danke ich für ihr offenes Ohr in unterschiedlichsten Fragen rund um die Arbeit.

Herrn Link aus dem Pharmakologischen Tierstall sei für die Betreuung und Pflege der Versuchstiere gedankt.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir dieses Studium ermöglichen haben und gemeinsam mit meinem Geschwistern alle Hochs und Tiefs meines Weges geduldig mitgetragen haben.

Hella, Anja, Alexander, Ulrike, Dido, Maria, Aracelli und Miriam danke ich für die treue freundschaftliche Unterstützung und den Wiederaufbau nach mancher verzweifelter Labor- oder Schreibtischnacht und in allen anderen Lebensphasen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtstag: 20.01.1977
Geburtsort: Ilmenau
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch

Schulbildung

1983-1991 Polytechnische Oberschule Friedrich Engels Kaltennordheim
1991-1995 Staatliches Thüringisches Rhöngymnasium Kaltensundheim,
Abschluss mit dem Abitur

Berufsausbildung

09/1995 – 03/1996 Krankenpflegeschule Semmelweis Bad Liebenstein
05/1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/1998 Ärztliche Vorprüfung
03/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2000 Amerikanisches Staatsexamen USMLE Step1
03/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztliche Prüfung
08/2001-06/2001 Praktisches Jahr
Chirurgie:
Kreisspital Männedorf, Schweiz
Tumaini University Moshi, Tanzania
Pädiatrie:
Universitätskinderklinik Würzburg
Innere Medizin:
Medizinische Universitätsklinik Würzburg
10/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

12/2002 – 05/2004

Ärztin im Praktikum, Universitätskinderklinik Hamburg-Eppendorf

Seit 06/2004

Assistenzärztin, Universitätskinderklinik Hamburg Eppendorf, wissenschaftliche Mitarbeiterin Im Deutschen Leukodystrophie-Netzwerk, Schwerpunkt Klinik und Genetik unklassifizierte Leukodystrophien

Auszeichnungen

10/1999

2. Posterpreis der 1. Bad Brückenauer Herbsttagung der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Jugendpreis der 1. Bad Brückenauer Herbsttagung der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Hamburg, 29.09.2005

A handwritten signature in black ink, reading "Maria Gösg". The signature is written in a cursive style with a large, looping 'G' at the end.