

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

Einfluss des Vasopeptidaseinhibitors AVE7688 auf Blutdrucksenkung
und Endothelfunktion bei renovaskulärer Hypertonie im Vergleich zu
dem ACE-Hemmer Ramipril

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Sabine Rühl
aus Marburg

Würzburg, Mai 2006

Referent: Prof. Dr. Wanner

Koreferent: Prof. Dr. Gekle

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2006

Die Promovendin ist Ärztin

2K1C	2 Kidney, 1 Clamp
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Ach	Acetylcholin
ANP	Atrial-natriuretic-peptide
AT-II	Angiotensin II
BNP	Brain-natriuretic-peptide
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
CNP	C-type-natriuretic-peptide
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
EDHF	Endothelial Derived Hyperpolarizing Factor
EDTA	Tetranatrium
ET-1	Endothelin-1
H ₂ O	Wasser
i.E.	internationale Einheiten
IL-8	Interleukin-8
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Dense-Lipoprotein
L-NAME	L-Nitroargininmethylester
-log	negativer Logarithmus
MCP-1	Monozyten-Chemoattractive Proteine-1
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol/l	Millimol/Liter
Mol/l	Mol/Liter
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NE	Norepinephrin
NEP	Neutrale Endopeptidase
NO	Stickstoffmonoxid
p	Signifikanz
p.o.	per os
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
pD ₂	Sensitivität
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reactive-Oxygen-Species
SEM	Standardabweichung
SHR	Spontan Hypertensive Ratten
SNP	Natrium-Nitroprussid
t-PA	tissue-type Plasminogen Aktivator
U/min	Umdrehungen/Minute

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bluthochdruck, Endothelfunktion und Atherosklerose	1
1.1.1 Endothelfunktion	2
1.1.2 Vasoaktive Substanzen	3
1.1.3 Endotheldysfunktion und Atherosklerose	7
1.2 ACE-Hemmer	14
1.2.1 Wirkmechanismus	14
1.2.2 Einfluss auf Hypertonie und Endothelfunktion	15
1.3 Vasopeptidase-Inhibitoren	18
1.3.1 Wirkmechanismus	18
1.3.2 Kombinierte NEP- und ACE-Hemmung im Vergleich zur einfachen ACE-Hemmung	19
1.4 Organkammerversuch und Tiermodell	21
1.5 Fragestellung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Versuchsprotokoll	23
2.2 Aufbau der Organkammer	24
2.3 Herstellung der Pufferlösung	25
2.4 Stenosierung der Nierenarterie / Scheinoperation	25
2.5 Ermittlung von Herzfrequenz, systolischem Blutdruck und Gewicht	26
2.6 Gefäßpräparation	27
2.7 Versuchsablauf	28
2.8 Material	30
2.9 Statistik	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Vitaldaten	34
3.2 Endothel-abhängige Relaxation auf Acetylcholin	37
3.3 Endothel-unabhängige Relaxation auf SNP	40
3.4 Kontraktionsreaktionen	42

4. Diskussion	45
4.1 Einfluss der Therapie auf die Herzfrequenz	45
4.2 Einfluss der Therapie auf die Blutdrucksenkung	46
4.3 Einfluss der Therapie auf die Endothel-abhängige Relaxation	46
4.4 Einfluss der Therapie auf die Endothel-unabhängige Relaxation	48
4.5 Einfluss der Therapie auf das Kontraktionsverhalten der unterschiedlichen Versuchsgruppen	48
5. Zusammenfassung	50
6. Anhang	52
6.1 Abbildungsverzeichnis	52
6.2 Literaturverzeichnis	56

1. Einleitung

1.1. Bluthochdruck, Endothelfunktion und Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen, wie koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall, zählen in den Industrieländern mit fast 50% zu den Haupttodesursachen [1]. Internationale Studien zeigen, dass das Auftreten dieser Erkrankungen sehr stark mit chronisch erhöhtem Blutdruck korreliert [2;3]. Den aktuellen Richtlinien zufolge spricht man ab einem systolischen Blutdruck ≥ 140 mmHg und einem diastolischen ≥ 90 mmHg von einem behandlungsbedürftigem Bluthochdruck, dessen Prävalenz in der deutschen Gesamtbevölkerung bei 39% liegt, bei den über 60-jährigen sogar bei 67% [4;5]. Für Risikopatienten, wie Typ2-Diabetiker, gelten noch engere Richtlinien. Bei ihnen korreliert die Inzidenz von mikro- und makrovaskulären Komplikationen bereits mit Blutdruckwerten ≥ 120 mmHg [6]. Durch eine medikamentöse antihypertensive Therapie können Komorbiditäten und die Gesamtsterblichkeit deutlich vermindert werden [7;8].

Eine der Hauptkomplikationen langjährig erhöhten Blutdrucks ist die koronare Herzkrankheit (KHK) [9]. Sie beginnt mit dem entzündlichen Prozess der Atherosklerose. Ursachen der Atherosklerose können verschiedenste Faktoren sein, die man unter dem Begriff der kardiovaskulären Risikofaktoren zusammenfasst. Sie beinhalten unter anderem arterielle Hypertonie, erhöhtes und modifiziertes Low-Dense-Lipoprotein (LDL), Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Adipositas, erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) und chronische systemische Infektionen [10-16]. Diese Risikofaktoren führen zu einer Schädigung des Endothels, setzen Entzündungsprozesse in Gang und Endotheldysfunktion als frühestes Stadium der Atherosklerose ist die Folge [17;18]. Liegen mehrere Risikofaktoren gleichzeitig vor, potenziert sich ihre schädigende Wirkung [19]. Der unmittelbare Zusammenhang zwischen Endotheldysfunktion, Atherosklerose und KHK ist mehrfach demonstriert worden. Es wurde gezeigt, dass endotheliale Dysfunktion als erste Stufe der Atherosklerose in direktem Zusammenhang mit Ausmaß und Schwere von KHK steht [20-22]. Aufgrund dieser Zusammenhänge ist eine medikamentöse Therapie wünschenswert, die sowohl den Blutdruck senkt als auch die Endotheliale Dysfunktion verbessert um so Folgeerkrankungen zu vermeiden.

Zunächst werden die Zusammenhänge zwischen Endothel, der Substanzen die es produziert und sezerniert und der pathophysiologischen Vorgänge bei der Atherosklerose beschrieben. Im Kapitel 1.2 werden ACE-Inhibitoren mit ihrer Wirkung auf Endothel und Bluthochdruck vorgestellt. Kapitel 1.3 befasst sich mit der Funktion der Neutralen Endopeptidase und den Auswirkungen der kombinierten Hemmung von Neutraler Endopeptidase und Angiotensin-converting-Enzym durch Vasopeptidase-Inhibitoren. Abschließend erläutern die Kapitel 1.4 und 1.5 die Simulation der physiologischen Vorgänge im Tierexperiment und die Fragestellung dieses Versuchs.

1.1.1. Endothelfunktion

Arterielle Blutgefäße bestehen aus drei verschiedenen Schichten. Die innen liegende Intima setzt sich aus Basalmembran, Membrana elastica interna und Endothel zusammen. Das Endothel besteht aus einer einschichtigen Zellschicht, mit der die Gefäßwand von innen vollständig ausgekleidet ist. Über der Intima kommt die Media zu liegen, ein Verband aus glatten Muskelzellen, Elastin, Kollagen und Proteoglykanen. Nach außen wird das Gefäß von der Adventitia ummantelt, einer Schicht aus Bindegewebsfasern, die vor allem für die Verankerung der Blutgefäße im umliegenden Gewebe verantwortlich ist. In ihr kommen die Vasa vasorum zur nutritiven Versorgung der Gefäße zu liegen.

Endothelzellen besitzen sekretorische Eigenschaften, die aktiv der funktionellen Integrität der Gefäßwand dienen. Sie produzieren vasoaktive Substanzen und setzen diese frei, wirken somit dilatierend oder kontrahierend auf die glatte Gefäßmuskulatur und den lokalen Gefäßtonus. Außerdem beeinflussen sie durch diese Substanzen die Adhäsivität für Leukozyten und Thrombozyten [23-25]. Somit ist das Endothel ein wichtiger Regulator für Blutdruck, Anpassung an Blutviskosität, Entzündungsprozesse und Thrombose.

Die am besten dokumentierte und daher am häufigsten gemessene Komponente der Endothelfunktion ist die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation [26;27]. Diese entsteht durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel in die darunter liegende glatte Gefäßmuskulatur.

1.1.2. Vasoaktive Substanzen

Unter den vasodilatierenden Substanzen, die vom Endothel gebildet und sezerniert werden, steht an erster Stelle als wichtigstes Molekül Stickstoffmonoxid (NO). Aber auch Prostacyclin und Endothelial Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) wirken direkt vasodilatierend auf die Gefäßmuskulatur [28;29]. Daneben bildet der Körper Moleküle, die rezeptorvermittelt vasodilatierend wirken.

Stickstoffmonoxid (NO)

NO wird im Endothel mittels einer endothelialen NO-Synthase aus L-Arginin gebildet [23;30]. Es wird sowohl basal, als auch rezeptorvermittelt freigesetzt. Zu den Agonisten für die rezeptorvermittelte Freisetzung zählen außer Acetylcholin Bradykinin, Substanz P, Adenosindiphosphat und Serotonin [31;32]. Durch Bindung an einen endothelialen Rezeptor erhöhen sie die intrazelluläre Ca-Konzentration und aktivieren so die endotheliale NO-Synthase [33]. Eine Steigerung der NO-Synthase kann auch durch Scherkräfte induziert werden, die durch das zirkulierende Blut zustande kommen [34]. NO wird luminal und abluminal abgegeben. Abluminal diffundiert es zu den glatten Gefäßmuskelzellen, induziert Gefäßrelaxation und wirkt somit blutdrucksenkend [33]. Luminal wirkt es als antithrombotischer Faktor hemmend auf die Plättchenaggregation [35].

Will man experimentell die Ursächlichkeit von NO an verschiedenen physiologischen Vorgängen testen, kann man seine Bildung pharmakologisch durch L-Nitroargininmethylester (L-NAME) hemmen. Es handelt sich hierbei um eine falsche, dem Arginin ähnliche Aminosäure, die die NO-Synthase hemmt [36].

Einleitung

Acetylcholin (Ach)

Acetylcholin ist ein physiologischer Neurotransmitter, der als Überträgerstoff an den Synapsen des Parasympathikus und des Sympathikus sowie an den motorischen Endplatten in der Muskulatur vorkommt. Er liegt an den Übertragungsstellen in Vesikeln gespeichert vor und wird bei Nervenerregung freigesetzt. Durch Bindung an nikotinerge oder muskarinerge Rezeptoren des Erfolgsorgans öffnet oder moduliert es Ionenkanäle in der Membran. Die Wirkungsdauer des Acetylcholins ist wegen des schnellen hydrolytischen Abbaus durch die Acetylcholinesterase in Cholin und Acetat sehr kurz. Pharmakologisch wirkt es durch Vasodilatation blutdrucksenkend, bronchokonstriktiv sowie auf den Darm tonussteigernd. Weiterhin steigert es die Drüsensekretion und wirkt negativ chronotrop und inotrop am Herzen.

Bradykinin

Bradykinin wird von verschiedenen Körperzellen produziert, unter anderem in Herzmuskel- und Endothelzellen [37-39]. Der genaue Mechanismus zur Regulation des Bradykinin-Haushaltes ist noch unklar. Man weiß, dass es z.B. bei vermehrtem Blutfluss gebildet wird und für die Fluss-vermittelte Vasodilatation verantwortlich ist. Dabei erhöht es über die Stimulation von B₂-Rezeptoren an den Endothelzellen die intrazelluläre Ca-Konzentration, aktiviert die NO-Synthase und NO, Prostacyclin und EDHF werden freigesetzt [40;41]. Ebenfalls fördert es über die Stimulation der endothelialen NO-Synthase Diurese und Natriurese in der Niere [42] und senkt den Sauerstoffverbrauch im Herzmuskel [43]. Zusätzlich wirkt Bradykinin Blutgerinnung und Thrombogenese entgegen, indem es Endothelzellen zur Produktion und Sekretion des Plasminogenaktivators tissue-type Plasminogen-Activator (t-PA) stimuliert, der eine Fibrinolyse und Thrombolyse bewirkt [44-46].

Natrium-Nitroprussid (SNP)

Bei SNP handelt es sich um einen pharmakologischen Stickstoff-Donator, der dosisabhängig NO-Moleküle freisetzt. Klinisch wird er zur akuten Blutdrucksenkung angewandt. Experimentell dient SNP als Vergleichsmedium zum Ermitteln des Relaxationsausmaßes durch die rezeptorvermittelte NO-Freisetzung. Seine Wirkdauer ist sehr kurz.

Einleitung

Ebenso wie vasodilatierende Substanzen produziert und sezerniert das Endothel auch vasokonstriktive. Zu ihnen zählen Angiotensin-II (At-II), Endothelin-1 (ET-1), Prostaglandine und freie Sauerstoffradikale (Reactive-Oxygen-Species, ROS). Sie wirken direkt oder über Mediatoren konstriktiv auf die glatte Gefäßmuskulatur [47-50].

Angiotensin-II (AT-II)

AT-II zählt zu den Peptidhormonen und entsteht als Hauptprodukt des aktivierten Renin-Angiotensin-Systems. Seine Konzentration ist bei Patienten mit Bluthochdruck häufig erhöht. Es bindet an spezifische Rezeptoren der glatten Muskelzellen und führt über eine Aktivierung der Phospholipase C zur Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration. So stimuliert es glatte Muskelzellen zu Kontraktion, erhöhter Proteinsynthese und Hypertrophie [51]. Es fördert die Sekretion des antidiuretischen Hormons aus dem Hypophysenhinterlappen und die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde [52-54]. Neben der direkten rezeptorvermittelten Aktivierung von Gefäßmuskelzellen induziert AT-II die Freisetzung des als hochpotent bekannten Vasokonstriktors Endothelin-1 aus Endothel- und Gefäßmuskelzellen und wirkt damit auch indirekt vasokonstriktiv [55;56]. Es kommt zu Gefäßwandproliferation, Anstieg des Körperwasservolumens, des Natriumgehaltes und folglich zu einem Anstieg des Blutdrucks.

Endothelin-1 (ET-1)

Bei Endothelin handelt es sich um den stärksten bisher bekannten Vasokonstriktor in vivo [57]. Es kommt in vier Isoformen vor, von denen nur ET-1 in Gefäßendothelzellen produziert wird [58]. Stimulierend auf seine Synthese wirken physikalisch chemische Faktoren wie Hypoxie, Vasokonstriktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Adhäsionsmoleküle [59-62]. Hemmend auf die ET-1 Synthese wirken NO, Prostacycline, ANP und Östrogene [62-64].

Auf die abluminale Seite des Endothels sezerniert, bindet es an spezifische Rezeptoren der Muskelzellen und induziert G-Protein-gekoppelt über Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration eine Vasokonstriktion [65;66]. Der Abbau erfolgt intrazellulär durch Hydrolisierung mittels der Neutralen Endopeptidase [67]. Trotz rascher Metabolisierung des Peptids hält seine Wirkung noch lange an. Das erklärt man sich über die gleich

Einleitung

bleibend erhöhte Ca-Konzentration [68]. Durch Beschleunigung des Konzentrationsabfalls von intrazellulärem Calcium auf dessen Ausgangswert verkürzt NO die Kontraktionsdauer von ET-1 [69].

Norepinephrin (NE)

Norepinephrin stellt ein pharmakologisches Analogon zu Noradrenalin dar, ein zu den Katecholaminen zählender Neurotransmitter des Sympathikus. Noradrenalin wird sowohl in den Ganglienzellen des sympathischen Nervensystems, als auch in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks neben Adrenalin aus L-Tyrosin gebildet. Noradrenalin vermittelt seine vasokonstriktive Wirkung rezeptorgekoppelt über eine Konzentrationserhöhung von intrazellulärem Calcium. Klinisch bewirkt es eine Steigerung des systolischen und diastolischen Blutdrucks unter anderem durch die Verengung der Widerstandsgefäße.

1.1.3. Endotheldysfunktion und Atherosklerose

Gesundes Endothel ist in der Lage, die Produktion vasodilatierender und -konstriktiver Substanzen im Gleichgewicht zu halten [70]. Sezerniertes NO hemmt z.B. cGMP-abhängig die Produktion von ET-1, wird aber von Superoxidanionen inaktiviert [13;63;71]. So kann unter physiologischen Umständen Blutdruck und Blutfluss gleichmäßig gehalten werden und es lässt sich so gut wie keine Entzündungsaktivität in der Gefäßwand nachweisen [72].

Atherosklerose entsteht als Folge einer Endothelverletzung und repräsentiert eine chronische lokale Entzündungsreaktion. Sie geht mit Wandveränderungen und Wandverhärtungen, Elastizitätsverlust, Atherombildung und Lumeneinengung des Gefäßes einher. Das am frühesten sichtbare morphologische Zeichen ist der Fettstreifen, der bereits bei Kindern zu finden ist [73]. Es ist eine Läsion, die nur aus einer Ansammlung von Makrophagen und T-Zellen besteht [74].

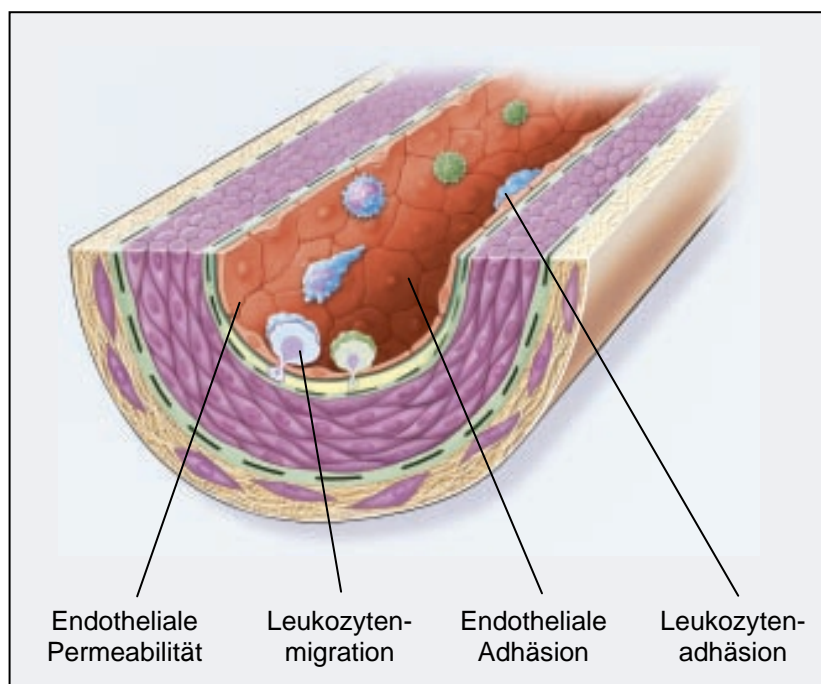


Abb. 1.1: Die frühesten Veränderungen, die bei der Formation atherosklerotischer Läsionen stattfinden, spielen sich im Endothel ab. Diese Veränderungen beinhalten vermehrte endotheliale Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile. Die Permeabilitätsveränderung wird über NO, Prostacyclin, AT-II und Endothelin vermittelt. Vermittelt über oxidiertes LDL werden Adhäsionsmoleküle in Leukozyten und Endothelzellen hochreguliert und Leukozyten wandern in die Arterienwand ein (Abb. modifiziert nach [18]).

Einleitung

Funktionell lässt sich als frühestes Zeichen eine endotheliale Dysfunktion feststellen [75;76]. Durch die Entzündungsreaktion werden die homöostatischen Eigenschaften des Endothels verändert. Es zeigt sich ein Ungleichgewicht vasoaktiver Substanzen mit Überwiegen der vasokonstriktiven. Zwar ist die endotheliale NO-Synthase in atherosklerotischen Läsionen hochreguliert, sie produziert hier aber vermehrt freie Sauerstoffradikale und vermindert NO [77-79]. Zudem inaktivieren die freien Sauerstoffradikale NO und verstärken so den Mangel des Vasodilatators [71]. Risikofaktoren wie oxidiertes LDL, Thrombin und Angiotensin-II stimulieren die Bildung von endothelialen Vasokonstriktoren, wie Endothelin-1 und Prostaglandine und unterstützen damit das Ungleichgewicht [63;80].

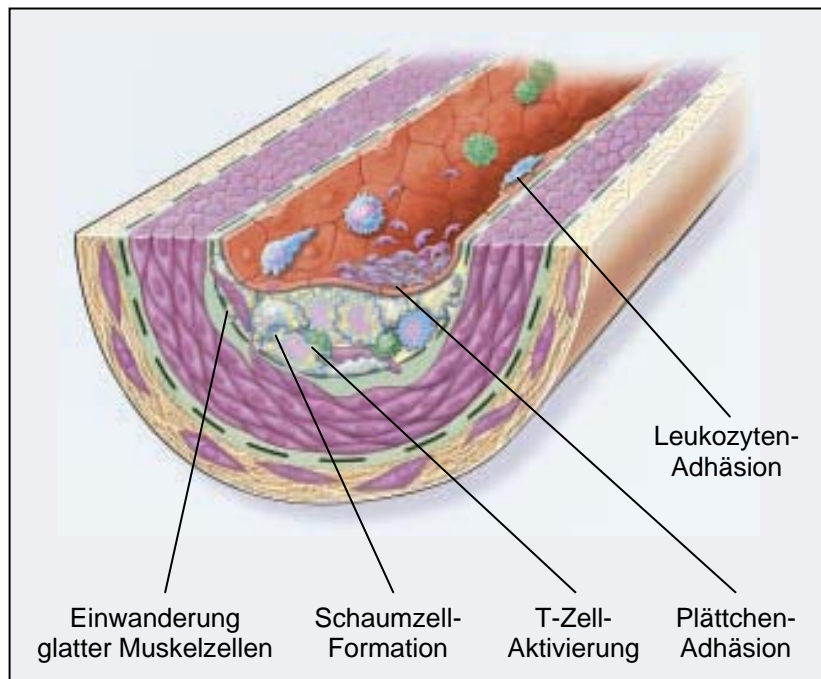


Abb. 1.2: Fettstreifen bestehen zu Beginn aus Lipid-beladenen Monozyten und Makrophagen, sogenannte Schaumzellen, sowie T-Lymphozyten. Später kommen glatte Muskelzellen hinzu. Die Schritte, die in diesen Prozess involviert sind, beinhalten Wachstum der glatten Muskulatur, T-Zell-Aktivierung, Schaumzellformation, Plättchen-Adhäsion und -Aggregation sowie Leukozyten-Adhäsion und Migration (Abb. modifiziert nach [18]).

Einleitung

Das Endothel wirkt nun stärker adhäsiv auf Leukozyten und Thrombozyten und verändert seine Durchlässigkeit. Die antikoagulatorischen Eigenschaften gehen zugunsten prokoagulatorischer verloren [81]. Vasoaktive Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren werden gebildet. Schafft die Entzündungsreaktion es nicht, die Verletzung sowie ihre Ursache zu neutralisieren oder zu beseitigen, schreitet sie weiter fort und stimuliert Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen, die in die Entzündungsregion eingestreut werden. Die Arterienwand verdickt sich, was zunächst noch durch graduelle Dilatation kompensiert werden kann. Dieses Phänomen wird Remodeling genannt [18;82].

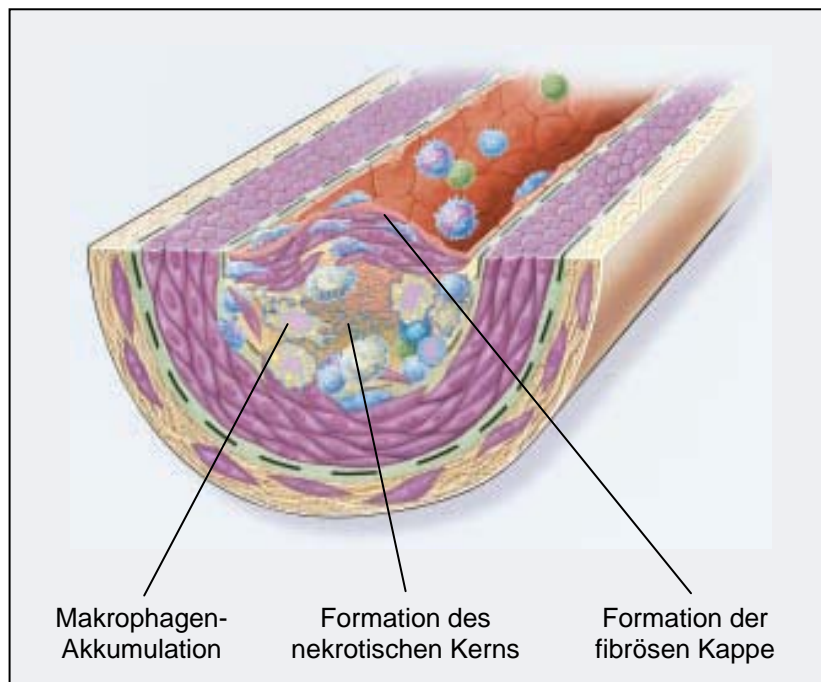


Abb. 1.3: Wenn Fettstreifen zu komplizierten Läsionen fortschreiten, tendieren sie dazu, Fibrinkappen zu bilden. Als Zeichen des Abheilens der Verletzung grenzen sie damit die Läsion zum Lumen ab. Die Fibrinkappe kommt auf einer Mischung aus Leukozyten, Lipiden und Debris zu liegen, aus der sich ein nekrotischer Kern bilden kann. Die komplizierten Läsionen wachsen trotz Fibrinkappe aufgrund der anhaltenden Entzündungsreaktionen an ihren Rändern weiter (Abb. modifiziert nach [18]).

Die Entzündungsantwort wird vornehmlich von Makrophagen und speziellen Unterformen der T-Zellen unterhalten [83;84]. Durch die Chronifizierung findet man

Einleitung

eine hohe Anzahl dieser Entzündungszellen. Sie wandern aus dem Blut zur Läsion und vermehren sich dort. Bei ihrer Aktivierung schütten sie Enzyme, Chemokine und Wachstumsfaktoren aus, die weiteren Schaden induzieren [85;86] und zu lokaler Nekrose führen können. Zyklen von Monozyten-Akkumulation, Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen sowie die Bildung fibrösen Gewebes führen zu einer weiteren Vergrößerung und Restrukturierung der Läsion. Auf einer Schicht von Lipiden und nekrotischem Gewebe bildet sich eine fibröse Kappe. Die Läsion wird jetzt komplizierte oder fortgeschrittene Läsion genannt.

An einem bestimmten Punkt angekommen kann die Arterie die Proliferation der Wand nicht länger durch Dilatation kompensieren. Die Läsion wächst dann in das Lumen hinein und es kann zu Störungen des Blutflusses kommen [18].

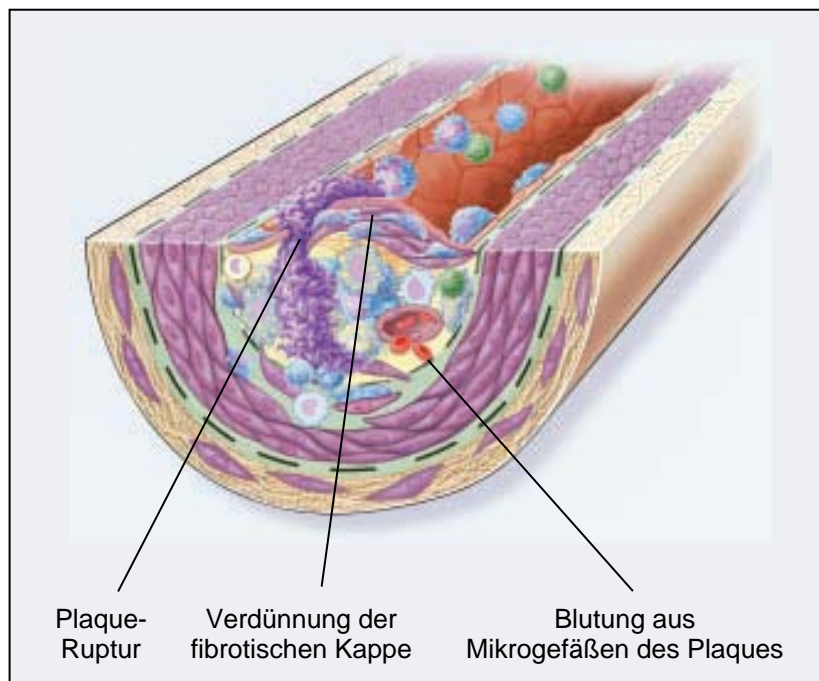


Abb. 1.4: Zerreißen der Fibrinkappen oder Ulzeration der Fibrinplaques kann schnell zu Thrombose führen und kommt üblicherweise dort vor, wo die Fibrinkappe dünner ist. Das Ausdünnen der Fibrinkappe (meist am Rand der Läsion) entsteht am ehesten durch das ständige Heranschwemmen und Aktivieren von Makrophagen, die Metalloproteinasen und andere proteolytische Enzyme ausschütten. Diese Enzyme verursachen einen Abbau der Matrix, was zu Blutungen aus den Vasa vasorum oder aus dem Lumen der Arterie führt. Es kommt zur Formation von Thromben und zum Arterienverschluss (Abb. modifiziert nach [18]).

Einleitung

Von den Risikofaktoren für Atherogenese wird im Folgenden die Rolle der Lipide, des AT-II und des chronischen Bluthochdrucks näher beleuchtet.

LDL, das durch Oxidation, Glykierung, Aggregation, Verbindung mit Proteoglykanen und Aufnahme in Immunkomplexe verändert wird [87-90], ist eine Hauptursache von Endothelschädigung und Verletzung der darunter liegenden glatten Muskulatur [90-92]. Über Oberflächenrezeptoren wird modifiziertes LDL von Makrophagen aufgenommen und es kommt zur Bildung von Schaumzellen [87;91;93]. Aufnahme und Aufspaltung von modifiziertem LDL sind wichtige Schritte der initial protektiven Rolle der Makrophagen im Entzündungsprozess und können die Effekte von modifiziertem LDL an Endothel- und glatten Muskelzellen zunächst minimieren [93-95]. Schafft es die Entzündungsreaktion jedoch nicht, die Entzündung zu beenden, kann es durch die Anwesenheit der Lipide in den Arterien zu einem Teufelskreis aus Inflammation, Modifikation von Lipoproteinen und weiterer Inflammation kommen [96-99].

Internalisiertes LDL aktiviert Schaumzellen und es kommt zur vermehrten Replikation von Makrophagen. „Freies“ modifiziertes LDL reguliert im Endothel die Expression von chemotaktischen Proteinen hoch und wirkt damit chemotaktisch auf andere Monozyten [100]. So trägt es dazu bei, die Entzündungsantwort zum einen durch vermehrte Replikation der Makrophagen, zum anderen durch den Einstrom neuer Monozyten in die Läsion zu unterhalten. Die Entzündungsreaktion selbst wirkt über die Ausschüttung von Mediatoren chemotaktisch auf LDL und es werden vermehrt LDL-Rezeptorgene transkribiert [101;102]. Es kommt also zur vermehrten Bindung von LDL an Endothel und glatter Muskulatur.

AT-II hält bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques die oben beschriebenen Entzündungsreaktionen in Gang. Bestehen bereits atherosklerotische Plaques, findet man die höchsten Konzentrationen von AT-II nicht im Endothel, sondern in neointimalen Makrophagen [103]. In Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen aktiviert es verschiedene Oxidasen. Es werden Hydrogenperoxid und freie Radikale wie Superoxid-Anionen und Hydroxyl-Peroxid gebildet, LDL wird oxidiert. Diese freien Sauerstoffradikale reduzieren die Bildung von NO im Endothel, vermehren Leukozytenadhäsion und peripheren Widerstand [104-109].

Einleitung

Die Konzentrationen von AT-II sind aufgrund eines hochregulierten RAAS häufig bei Patienten mit **chronischem Bluthochdruck** erhöht, insbesondere bei Patienten mit renovaskulärem Bluthochdruck [123]. AT-II ist ein potenter Vasokonstriktor [124]. Es hat somit ursächliche Funktionen bei der Entstehung von Bluthochdruck, kann aber über oben beschriebene Mechanismen auch Entzündungsreaktionen fördern und damit an den Prozessen der Atherosklerose teilhaben. Auch Bluthochdruck hat proinflammatorische Eigenschaften indem es die Formation von Hydrogenperoxid und freien Radikalen im Plasma fördert [91;125;126]. Diese Substanzen reduzieren die Bildung von NO im Endothel [127], vermehren Leukozyten-Adhäsion [126] und den peripheren Widerstand. Somit werden über die Produktion freier Radikale einige Effekte von Bluthochdruck auf die Endothelfunktion vermittelt.

1.2. ACE-Hemmer

1.2.1. Wirkmechanismus

ACE

Das Angiotension-converting-Enzym (ACE) ist das Schlüssel-Enzym bei der Generierung von Angiotensin-II (AT-II) und damit ein wichtiger Bestandteil des neurohormonalen Blutdruckregulationssystems [128;129]. Unter physiologischen Bedingungen findet sich nur ein geringer Teil im Plasma (10%). Der größte Teil liegt lokal an Herzmuskelzellen und Gefäßwand gebunden vor (90%) [130;131]. In der Gefäßwand findet man es an der luminalen Seite des Endothels sowie in den vasa vasorum in der Adventitia und zu einem kleinen Teil in der Media [132]. Bestehen atherosklerotische Veränderungen, findet man es außerdem auf Monozyten in den atherosklerotischen Plaques und in der Neointima neu gebildeter Gefäße [120;133;134]. ACE war ursprünglich als Kininase-II bekannt geworden, da es nicht nur AT-I zu AT-II spaltet, sondern auch Bradykinin abbaut [135-138].

Um die negativen Auswirkungen einer pathologisch erhöhten AT-II-Konzentration zu minimieren wurden Substanzen entwickelt, die ACE kompetitiv hemmen und somit zu niedrigen AT-II und hohen Bradykinin-Konzentrationen führen. ACE-Inhibitoren bewirken damit eine effektive Blutdrucksenkung, verhindern die Aggregation von Thrombozyten, hemmen Transkriptionsfaktoren, vermindern die Oxidation von LDL und reduzieren das Einwandern von Makrophagen.

Ramipril

Unter den bekannten ACE-Inhibitoren findet man Unterschiede in ihrer Lipophilie und damit ihrer Fähigkeit, gewebsgebundenes ACE zu hemmen [139;140]. Ramipril zeigt dabei eine sehr starke Lipidlöslichkeit, ebenso wie eine sehr hohe Affinität zu gewebsgebundenem ACE [140]. Da bekannt ist, dass ACE vor allem im Gewebe vorliegt [130;131], verspricht man sich eine verbesserte Wirksamkeit durch lipophile ACE-Inhibitoren. Experimentell wurde diese These am Tiermodell mit Knockout-Mäusen bestätigt [130]. Auch die nachgewiesene nephroprotektive Wirkung der ACE-Inhibitoren bei Diabetikern erklärt sich über die Hemmung von gewebsgebundenem

ACE, da bei diesen Patienten die zirkulierenden Plasma-Renin und -Angiotensin-Konzentrationen eher niedrig sind [141]. Im direkten Vergleich mit lipophoberen ACE-Hemmern bezüglich Steigerung der NO-Produktion und Verminderung des Sauerstoffverbrauchs im Herzmuskel zeigte sich Ramipril hochpotent [43].

1.2.2. Einfluss auf Hypertonie und Endothelfunktion

Arterielle Hypertonie geht häufig einher mit einer Sympathikus-vermittelten Aktivierung des RAAS [142]. Bei renovaskulärer Hypertonie ist dieser Sachverhalt gesichert [143], bei der essentiellen Hypertonie sind die genauen Interaktionen zwischen Sympathikus und Niere noch offen [144;145]. Ist das RAAS erst einmal hochreguliert, stimuliert AT-II weiterhin sowohl zentral als auch peripher Sympathikus und RAAS [146]. Das führt zu hohen AT-II- und niedrigen Bradykinin-Konzentrationen.

Unter Therapie mit ACE-Inhibitoren normalisieren sich AT-II- und Bradykinin-Konzentrationen in Plasma und Gewebe [147;148] und es kommt sowohl zu einer effektiven Blutdrucksenkung, als auch zur Verbesserung der endothelialen Dysfunktion [149]. Die blutdrucksenkende Wirkung der ACE-Hemmer wird vor allem den erhöhten Bradykinin-Konzentrationen zugeschrieben [138]. An der Atherogenese hingegen ist vor allem AT-II beteiligt. An Blutgerinnung und damit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse sind beide Substanzen beteiligt.

Um den Mechanismus der positiven Auswirkungen der ACE-Inhibitoren zu untersuchen, haben viele experimentelle und klinische Untersuchungen stattgefunden. Am Tiermodell wurde gezeigt, dass die beeinträchtigte Endothel-abhängige Vasodilatation infolge arterieller Hypertonie verbessert wird [150;151]. Im Stadium der frühen Atherosklerose reduziert die Behandlung mit einem ACE-Hemmer die Expression der Chemokine MCP-1 und IL-8, die vornehmlich an der Leukozyteninfiltration beteiligt sind. Des Weiteren wird die verminderte Infiltration der Gefäßwand mit Makrophagen beobachtet [119;152]. Ursächlich hierfür macht man die Blockierung des Transkriptionsfaktors, der für die Expression von Adhäsionsmolekülen

Einleitung

und chemotaktischen Proteinen in den geschädigten Blutgefäßen verantwortlich ist [119;153].

Diese Erkenntnisse stützen die Beobachtungen von ACE-Inhibitoren bei Menschen. Aufgrund der Hemmung von AT-II, Aldosteron und ET-1, die neben proliferativen und inflammatorischen Effekten verschiedene am Umbau beteiligte Oxidasen aktivieren und damit oxidativen Stress produzieren [154], wird dem Umbau kardialen Gewebes nach ischämischen Ereignissen entgegen gewirkt und vaskuläres und kardiales Remodeling beim hypertensiven Patienten effektiv reduziert [155;156]. Messbar wird dies z.B. anhand der Massenverminderung des linken Ventrikels bei bestehender chronischer Herzinsuffizienz [157].

Die im Jahr 2000 veröffentlichte HOPE-Studie untersuchte die bis dahin bekannte protektive Wirkung von ACE-Inhibitoren bei Patienten mit stattgehabtem kardiovaskulären Ereignis nun bei Patienten mit einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, aber noch nicht vorhandener Linksherzinsuffizienz oder eingeschränkter linksventrikulärer Auswurfraction. Durch die Therapie mit einem ACE-Inhibitor zeigte sich ein deutlich selteneres Auftreten von Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod im Vergleich zu unbehandelten Patienten [158]. Einige Jahre zuvor hatte man die Wirkung der ACE-Hemmer nach akutem Myokardinfarkt untersucht und die Konzentrationen von PAI-1 sowie t-PA gemessen. Man sah, dass ACE-Inhibitoren einen starken Einfluss auf die fibrinolytische Balance nahmen. Sie bewirkten eine Reduktion der Plasma PAI-1-Level um 44% und der PAI-1-Aktivität um 22% [159]. Diese Verlagerung des Gleichgewichtes zwischen fibrinolytischen und fibrinogenen Substanzen hin zu den fibrinolytischen nach Myokardinfarkt wurde auch an anderen Stellen gezeigt [158;160]. Bei Patienten mit bestehender Linksherzinsuffizienz ohne bereits abgelaufenen Myokardinfarkt sah man eine Hemmung der morgendlichen PAI-1-Spitzen und ein damit vermindertes Auftreten thrombotischer vaskulärer Ereignisse [161].

Eine weitere Erklärung der positiven Wirkung der ACE-Hemmer wird in der gesteigerten NO-Produktion gesehen, die den Sauerstoffverbrauch im Herzmuskel vermindert [43].

Einleitung

Die organoprotektive Wirkung der ACE-Inhibitoren wird nicht nur für das Herz und sein Gefäßsystem sondern auch für die vorgeschädigte Niere beschrieben. Bei Diabetikern beobachtet man unter Therapie mit einem ACE-Inhibitor eine Verlangsamung der Glomerulosklerose. Dies erklärt man sich über eine Senkung des intraglomerulären Druckes durch sowohl die allgemein blutdrucksenkende Wirkung der ACE-Hemmer als auch eine Hemmung der direkten AT-II-Wirkung am Glomerulum [6;141]. Darüber hinaus wird das Fortschreiten der Atherosklerose bei Diabetikern verlangsamt [162], was dem verminderten Anfallen von ROS und oxidiertem LDL zugeschrieben wird [163;164].

1.3. Vasopeptidase-Inhibitoren (VPI)

Vasopeptidase-Inhibitoren hemmen zusätzlich zum ACE die Neutrale Endopeptidase (NEP), eine Membran-gebundene Zink-Metallopeptidase. Diese spaltet sowohl endogene vasodilatative Peptide, wie die natriuretischen Peptide, Adrenomedullin, Substanz P und Bradykinin [165], als auch vasokonstriktive Peptide, wie ET-1 und AT-II [166]. NEP kommt in Endothelzellen vor, in glatten Gefäßmuskelzellen, Herzmuskelzellen, renalen Epithelzellen, sowie in Fibroblasten [167-169].

Es existieren drei Isoformen der natriuretischen Peptide: Atrial-natriuretic-peptide (ANP), Brain-natriuretic-peptide (BNP) und C-type-natriuretic-peptide (CNP). Natriuretische Peptide werden vermehrt bei hypertensiven Patienten, bei Patienten mit Linksherzhypertrophie und früher Herzinsuffizienz und bei Erkrankungen, die das Körperwasservolumen vermehren, wie z.B. die chronische Niereninsuffizienz, sezerniert [170-172].

1.3.1. Wirkmechanismus der natriuretischen Peptide

ANP

Der Haupt-Stimulus für die Produktion und Sekretion von ANP ist die Wanddehnung der Vorhöfe [173]. BNP wird im Gehirn produziert und sezerniert. Veränderungen der Plasma-Konzentration zeigen sich nicht als sofortige Reaktion auf Veränderungen des Körperwasservolumens sondern als Reaktion auf chronische Veränderungen [174]. ANP und BNP werden beide systemisch nachgewiesen und haben eine vergleichbare Wirkung. Sie senken den Blutdruck durch vor allem eine Vorlastsenkung. Dazu verschieben sie intravasuläres Volumen in den Extravasalraum [175], reduzieren die Sympathikusaktivität und folglich den Tonus in peripheren Gefäßen [176;177], fördern Urin- und Salzausscheidung in der Niere [178;179] und hemmen die Renin- und Aldosteron-Produktion [175;180]. Zusätzlich potenzieren sie die hypotensiven Effekte von Adrenomedullin [181]. ANP hemmt ebenso wie NO die Endothelin-Produktion über die Bildung von cGMP [62] und vermindert die durch AT-I induzierte Kollagensynthese bei Herzinsuffizienz [182].

Einleitung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ANP eine wichtige Rolle bei der Therapie der Hypertonie mit erhöhtem Salzhaushalt, bzw. mit hochreguliertem RAAS spielt und dem Vorgang des kardialen Remodeling entgegenwirkt.

CNP

Während ANP und BNP systemische Antagonisten des RAAS darstellen, agiert CNP als lokaler endogener Regulator der vaskulären ACE-Aktivität [183;184]. Es wird von Endothelzellen infolge Scher-Stress produziert [185;186]. CNP ist in den meisten seiner Funktionen weniger potent als ANP und BNP [187] und liegt nur in sehr geringen Plasma-Konzentrationen vor. Daher wird angenommen, dass es hauptsächlich autokrine Funktionen besitzt [188]. Eine gute Wirksamkeit zeigt es auf die Relaxation von Venen [188] und damit auf Senkung der Vorlast. Auch wirkt es zuverlässig auf die Erweiterung der Koronararterien [189]. Darüberhinaus werden ähnliche antiproliferative Eigenschaften wie durch ANP beobachtet. CNP hemmt Fibroblasten in geschädigten Gefäßen, z.B. infolge Atherosklerose, Hypertonie und Restenosis nach Angioplastik und wirkt damit vaskulärem Remodeling entgegen [190]. Es wirkt antithrombotisch und fördert die Regeneration von Endothelzellen [191].

1.3.2. Kombinierte NEP- und ACE-Hemmung im Vergleich zur einfachen ACE-Hemmung

ACE-Inhibitoren wirken vasodilatierend und damit blutdrucksenkend über zum einen die Vermehrung von NO und Bradykinin und zum anderen die Verminderung von AT-II [192]. AT-II und Bradykinin-vermittelt wirken sie regulierend auf Fibrinolyse und Fibrinogenese und verringern das Auftreten thrombotischer Ereignisse. Durch die Hemmung von AT-II, ET-1 und Aldosteron wirken sie antiproliferativ und antiinflammatorisch und reduzieren damit kardiovaskuläres Remodeling. Auch an vorgeschädigten Nieren, bzw. bei Patienten mit einem hohen Risiko für Nierenschädigung, z.B. infolge von Diabetes, zeigen Studienergebnisse eine organoprotektive Wirkung der ACE-Inhibitoren.

Einleitung

Die Hemmung der Neutralen Endopeptidase bewirkt eine Vasodilatation durch den Anstieg von Bradykinin. Des Weiteren wirkt sie über die höheren Konzentrationen von Bradykinin und Natriuretischen Peptiden auf Natriurese und Diurese in der Niere. Beide Mechanismen dienen theoretisch einer effektiven Blutdrucksenkung. In der Praxis wird jedoch keine Blutdrucksenkung durch die alleinige NEP-Hemmung beobachtet [193]. Erklären lässt sich dies durch die verminderte Metabolisierung der Vasokonstriktoren AT-II und ET-1 durch die NEP [192].

Über eine Erhöhung der Adrenomedullin-Konzentrationen fördert die Hemmung der NEP Proliferation und Migration von Endothelzellen und damit die Regeneration des Endothels [194;195]. Auch positiv auf Reparatur und Regeneration des Endothels wirkt sich die erhöhte CNP-Konzentration aus [191;196]. Bei bestehender chronischer Herzinsuffizienz beobachtet man über die NEP-Inhibition eine Verminderung der Masse des rechten Ventrikels [157].

Vergleicht man die kombinierte Hemmung von NEP und ACE mit der jeweils alleinigen, so beobachtet man im Bezug auf die Blutdrucksenkung eine Potenzierung der Wirkungen. Es lässt sich eine gesteigerte Natriurese und Diurese feststellen [192], sowie deutlich höhere Konzentrationen von Bradykinin messen, als dies durch die jeweilige Hemmung nur eines Enzyms möglich ist [166;192;197].

Im Hinblick auf den strukturellen Umbau von Gefäßen und Organewebe wurde in Experimenten mit Spontan Hypertensiven Ratten und an Ratten mit einer induzierten Herzinsuffizienz durch die kombinierte Hemmung eine effektivere Verbesserung des mikrovaskulären und kardialen Remodeling beobachtet als durch die jeweilige Hemmung nur eines der beiden Enzyme [198;199]. Am Tiermodell mit Salz-induziertem Hypertonus wurde bei vergleichbarer Blutdrucksenkung durch ACE-Inhibitoren und Vasopeptidase-Inhibitoren die Überlegenheit der VPI auf die Endothelfunktion nachgewiesen [200-202]. Betrachtet man die Masse der Herzmuskulatur bei der chronischen Herzinsuffizienz ergänzen sich hier die Wirkungen. Die ACE-Hemmung verringert die linksventrikuläre Masse, die NEP-Hemmung die rechtsventrikuläre. Außerdem beobachtet man durch die kombinierte Hemmung eine Massenreduktion beider Vorhöfe [157].

Die durch ACE-Hemmer beobachtete nephroprotektive Wirkung bei Menschen wurde im Tierexperiment auch für VPI nachgewiesen. Bei Ratten mit Typ-2-Diabetes bewirkte die kombinierte ACE- und NEP-Hemmung eine Reduktion von Albuminurie, Glomerulosklerose und tubulointerstitiellen Nierenschäden [203-205].

1.4. Organkammerversuch und Tiermodell

Die Organkammer dient der experimentellen Prüfung der Endothelfunktion. Das Prinzip der Experimente besteht in der Messung der durch externe Stimuli induzierten, reaktiven isometrischen Spannungsänderung von muskelzellhaltigem Gewebe. Die Versuchsanordnung besteht aus einem Organbad, in dem sich das zu analysierende Gewebe befindet, einem Kraftumwandler, der die resultierenden isometrischen Gewebereaktionen in elektrische Signale umwandelt und einem Computer an den die Daten weitergeleitet und graphisch aufgezeichnet werden.

Um den untersuchten Geweben ein möglichst physiologisches und konstantes Milieu zu gewährleisten, werden sie in Krebs-Ringer-Henseleit-Lösung gegeben, mit einem Gasgemisch von 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast, und mittels des, die Organkammer umspülenden, Wärmebades auf einer Temperatur von 37 C gehalten. Die Versuche können so unter isoosmotischen, isohydrischen und isothermen Bedingungen durchgeführt werden [23].

Es gibt verschiedene Ursachen von Hypertonie, wobei eine in der verminderten Nierendurchblutung liegt. Als Ursache von verminderter Nierendurchblutung kann eine Nierenarterienstenose vorliegen, ebenso wie eine Linksherzinsuffizienz mit verminderter Ejektionsfraktion. Als gemeinsame Folge der Minderdurchblutung wird das RAAS aktiviert. Zur Simulation dieser pathophysiologischen Vorgänge bedient man sich des Prinzips der Goldblatt-Hypertonie. Dabei induziert man z.B. bei Ratten durch Klammerung einer Nierenarterie eine Stenose [206;207]. Es kommt zur Aktivierung des RAAS [208] und zu einer erhöhten ACE-Aktivität in verschiedenen Geweben [209]. Natrium wird vermehrt zurückbehalten und das intravasale Volumen vergrößert sich. So versucht der Organismus eine ausreichende Durchblutung der Niere herzustellen.

1.5. Fragestellung

Bei Bluthochdruck ist das sympathische Nervensystem aktiviert und stimuliert das RAAS. Ein hochreguliertes Renin-Angiotensin-System wirkt mit seinem Produkt AT-II direkt vasokonstriktiv, also blutdrucksteigernd, vermindert die Bildung von NO, unterhält die Entzündungsreaktion in atherosklerotischen Plaques und fördert dort die Thrombogenese. Über Aldosteron wirkt AT-II hemmend auf die Salzausscheidung in den Nieren und das Körperwasservolumen nimmt zu. Da ACE direkt mit Endothelzellen verbunden ist, stellt es einen wichtigen Faktor für den Erhalt der normalen Endothelfunktion durch das Balancieren der AT-II- und Bradykinin-Konzentrationen dar.

Vasopeptidase-Inhibitoren hemmen zum einen das RAAS und damit die AT-II und Aldosteron-Wirkung. Zum anderen verstärken sie über die Hemmung der NEP die blutdrucksenkende und Endothel-regenerierende Wirkung der natriuretischen Peptide. Über beide Mechanismen erhöhen sie die Bradykinin-Konzentrationen.

Unser Ziel war es, die Wirkung des Vasopeptidaseinhibitors AVE7688 im Vergleich zu Ramipril auf Blutdrucksenkung und Endothelfunktion am Modell des renovaskulären Bluthochdruckes, einem Hoch-Renin-Modell, zu zeigen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsprotokoll

In dem vorliegenden Versuch wurden 30 männliche Wistar-Kyoto-Ratten im Alter von 8 Wochen verwendet. Die Tiere stammten von Charles River Deutschland in Kißlegg und wurden im Zeitraum der Behandlung im Tierstall der Medizinischen Klinik Würzburg gehalten. Sämtliche Tiere wurden in Käfigen mit 1-2 Tieren, einer Raumtemperatur von 20-21°C, konstanter Luftfeuchtigkeit von 65% und einem geregelten Tag-Nacht-Rhythmus (12 Stunden Hell-/Dunkelrhythmus) gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Unterbringung im Tierstall sowie die experimentellen Versuche an ihnen wurden von der Tierschutzkommission genehmigt.

Die Ratten wurden nach dem Zufallsprinzip in 2 Gruppen mit 12 bzw. 18 Tieren eingeteilt. Bei der Gruppe mit 18 Tieren wurde nach der Goldblatt Technik (2Kidney, 1Clamp) eine renovaskuläre Hypertonie induziert. Dabei wurde ihnen die rechte Arteria renalis mittels eines Clips stenosierte. Die restlichen 12 Tiere wurden scheinoperiert.

Alle 18 nach dem Goldblatt-Prinzip operierten Tiere entwickelten innerhalb der nächsten 14 Tage einen systolischen Blutdruck von 170-220mmHg. Sie wurden erneut nach dem Zufallsprinzip in drei Untergruppen aufgeteilt und für die folgenden drei Wochen mit entweder dem ACE-Hemmer Ramipril 1mg/kg/d, dem Vasopeptidase-Inhibitor AVE7688 30mg/kg/d oder Placebo behandelt. Die 12 scheinoperierten Tiere wurden ebenfalls nach dem Zufallsprinzip in zwei Untergruppen unterteilt und mit AVE7688 30mg/kg/d oder Placebo behandelt:

	Placebo	Ramipril 1mg/kg/d	AVE7688 30 mg/kg/d
WKY 2K1C	N=6	N=6	N=6
WKY scheinoperiert	N=6		N=6

Abb. 2.1: Aufteilung und Behandlung der Versuchstiere (N=Anzahl der Versuchstiere pro Arm der Studie)

Die Erfassung der Herzfrequenz und des systolischen Blutdrucks erfolgte an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28 und 35 der Studie mittels Tail-cuff-Methode an der erwärmten Schwanzwurzel. Ebenfalls an diesen Tagen wurde jeweils das Gewicht ermittelt. Nach dreiwöchiger Behandlung verstarben die Tiere intraoperativ bei der Entnahme von Blut, Herz, Nieren und Aorta. Blut, Herz und Nieren wurden für eventuelle Anschlussuntersuchungen kryokonserviert, die Aorta wie unten beschrieben für den Organkammerversuch vorbereitet.

2.2. Aufbau der Organkammer

Die Organkammer besteht aus einer Apparatur von 6 Organbädern mit 10ml Volumen pro Bad. In der Wand der Glasbäder zirkuliert eine vorgewärmte Lösung, die die Krebslösung während des Versuchs anwärmt. Jedes Bad besitzt eine eigene Zu- und Ablaufvorrichtung. Ein Austausch der Badlösung ist durch zeitgleiches Zuführen der in einem Wärmezyylinder vorgewärmten Krebslösung und Absaugen der verbrauchten Lösung möglich. Zu- und Ablauf können für jedes Bad einzeln geschaltet werden. Zur Imitation der physiologischen Umgebung werden während des Versuchs sowohl Organbäder, als auch Vorwärmzyylinder konstant mit Carbogen (O₂ 95%, CO₂ 5%) oxygeniert und die Krebslösung auf 37°C gewärmt [210].

Die Aortenringe werden über einen festen und einen mobilen, manuell mit Mikromanipulator verstellbaren Drahtarm aufgehängt. Der mobile Arm ist mit einem Kraftaufnehmer und nachfolgend einem Messverstärker an einen handelsüblichen PC gekoppelt, der mit Hilfe des Datenerfassungs-Programms VitroDat (PC-kompatibles Messdaten Akquisitions-, Speicherungs- und Auswertungssystem für Analogspannungskanäle) kontinuierlich Veränderungen der isometrischen Spannung der Gefäßsegmente aufzeichnet.

Material und Methoden

Herstellung der Pufferlösung

Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Nährlösung (in mmol/l) [211;212]:

Natriumchlorid (NaCl) 118,6; Kaliumchlorid (KCl) 4,7; Calciumchlorid (CaCl₂) 2,5; Magnesiumsulfat (MgSO₄) 1,2; Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) 1,2; Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) 25,1; Tetranatrium EDTA 0,026; Glucose 10,1.

NaCl 9%, KCl 1,15%, CaCl₂ 1,2%, MgSO₄ 1,9%, KH₂PO₄ 2,11% und NaHCO₃ 6,5% wurden in den angegebenen Konzentrationen einzeln mit aqua bidest als Stammlösungen angesetzt und bei 4°C gelagert.

Einmal wöchentlich wurden daraus 25l der Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Nährlösung wie folgt hergestellt:

NaCl 9%	1925ml
KCl 1.15%	775ml
CaCl ₂ 1.2%	575ml
KH ₂ PO ₄ 2.11%	192ml
MgSO ₄ 1.9%	192ml
NaHCO ₃ 6.5%	807ml
Glucose	50g
Tetranatrium EDTA	250mg
H ₂ O	ad 25l

Die Substanzen wurden vermischt und 30 min. mit Carbogen begast.

2.3. Stenosierung der Nierenarterie / Scheinoperation

Zur Induktion eines renalen Hypertonus wurde die Goldblatt-Technik (2K1C) verwendet [206;213]. Durch intraperitoneale Applikation eines Gemisches aus Xylacin Hydrochlorid (10mg/kg Körpergewicht) und Ketamin (100mg/kg Körpergewicht) wurden die Ratten anästhesiert. Alle operativen Maßnahmen wurden auf einer Heizplatte durchgeführt, die die Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur

von 37°C gewährleistet. Nach Inzision der rechten Flankenregion und vorsichtiger Freipräparation der rechten Niere wurde auf der Nierenarterie unter Schonung des umliegenden Gewebes ein Silber-Clip (0,2mm Innendurchmesser) platziert. In der scheinoperierten Kontrollgruppe wurde ebenfalls die rechte Niere freipräpariert, jedoch wurde die Nierenarterie ohne Platzierung eines Clips replaziert und das Abdomen durch Muskel- und Hautnähte wieder verschlossen. Zur Schmerzprophylaxe erhielten die Tiere post-operativ einmalig Tramadol 2,0mg/kg Körpergewicht [214]. Anschließend wurde der Schwanz zur späteren Identifizierung markiert. Einzeln gesetzt erlaubte man ihnen, sich von der Operation zu erholen.

2.4. Ermittlung von Herzfrequenz, systolischem Blutdruck und Gewicht

Zur nicht-invasiven Blutdruckmessung an der nicht sedierten Ratte wurde die Tail-Cuff-Methode angewandt [215]. Dabei wird die Wärmeregulation der Ratten genutzt, deren Schwanzarterie bei Überwärmung vermehrt durchblutet wird. Ratten unterliegen einem sehr ausgeprägten Biorhythmus, weshalb die Blutdruckmessungen immer zur gleichen Tageszeit stattfinden müssen [1].

In einem speziell für Ratten angefertigten Käfig wurden die Tiere in einer Wärmekammer mit 40°C etwa zehn Minuten aufgewärmt. Die Pulswellen der Schwanzarterie wurden durch einen Transducer detektiert und oszilloskopisch aufgezeichnet. Sobald die Herzfrequenz einen konstanten Wert angenommen hatte, wurde dieser dokumentiert. Die hinter dem Transducer angebrachte, ebenfalls speziell für Rattenschwänze konzipierte Staumanschette wurde manuell bis ca. 15-20mmHg über den Wert aufgepumpt, bei dem die Oszillometersignale verschwanden. Mit ca. 5mmHg/sec wurde die Staumanschette anschließend entlastet. Als systolischer Blutdruckwert nach Riva Rocci wurde der Wert genommen, bei dem die Pulswellen wieder einen regelmäßigen und definierten Ausschlag am Oszillometer zeigten. Aus 5 nacheinander ermittelten Werten wurden der höchste und der niedrigste Wert verworfen und aus den restlichen 3 Werten der Mittelwert gebildet.

Anschließend wurde mit einer Digitalwaage das Gewicht der Tiere ermittelt. Dabei wurden die Tiere mit Käfig gewogen und das Käfiggewicht anschließend vom Gesamtgewicht abgezogen.

2.5. Gefäßpräparation

Die Ratten wurden mit Pentobarbital 50mg/kg intraperitoneal anästhesiert [216]. Um Blut für evtl. anschließende Untersuchungen bereitstellen zu können und um eine intravitale Blutgerinnung zu verhindern, erhielten sie zuvor 25000i.E./kg Heparin-Natrium intraperitoneal. Die anästhesierten Tiere wurden auf einer Operationsunterlage fixiert. Thorax und Abdomen wurden mit einer Schere geöffnet. Danach wurde die Seitenaufhängung des Diaphragmas durchtrennt und bis zum Hiatus aorticus inzidiert. Darmschlingen und Magen wurden vorsichtig zur Seite geschoben und die Vena cava inferior aufgesucht.

Über diese wurde die Exsanguination in eine mit Heparin gespülte Spritze vorgenommen. Das Blut wurde zur weiteren Verarbeitung unverzüglich bei 4°C mit 4000U/min zehn Minuten zentrifugiert. Das Herz wurde aus dem es umgebenden Bindegewebe herausgelöst, Vena cava und Pulmonalgefäße abgetrennt und mitsamt der Aorta aus dem Situs mit Schere und Pinzette präpariert.

Alle weiteren Präparationen wurden in einer Petrischale, die mit 4°C gekühlter Krebs-Lösung gefüllt war und auf Eis gelagert wurde, vorgenommen. Zuerst wurde der Arcus aortae vorsichtig an seinem Ursprung mit einem Skalpell abgetrennt. Zur intraluminalen Säuberung und Vermeidung von Koagelbildung wurde die Aorta über eine Kanüle mit Heparin gespült [211]. Nieren und Lungen wurden aus dem Situs entnommen und zusammen mit Herz und dem durch Zentrifugation gewonnenen Blutplasma kryokonserviert. Anschließend wurde die Säuberung und Zerteilung der Aorta vorgenommen. Dazu entfernte man vorsichtig Bindegewebe und Adventitia mit Mikroschere und Pinzette. Mit einem Skalpell wurde sie in 3-4mm lange Stücke zerteilt. Stücke der Aorta abdominalis, die für die Untersuchung der isometrischen Kontraktion nicht benötigt wurden, wurden unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zusammen mit Niere, Lunge und Herz bei -80°C aufbewahrt [216;217].

Sämtliche Gefäßpräparationen fanden unter strikter Vermeidung von Längszug oder Kompression des Gefäßes statt. Anschließend wurden die Gefäßsegmente vorsichtig mit mobilen Haken aufgenommen und in die Organbäder eingespannt. Es konnte mit den unten beschriebenen Versuchen zur Messung der isometrischen Kontraktionskraft begonnen werden.

2.6. Versuchsablauf

Die Aortenringe wurden in der Organkammer zwischen einem fixen und einem mobilen Drahtaufhänger in das mit 10ml Krebslösung gefüllte Organbad gehängt und in mehreren Schritten auf 2g vorgespannt. Zwischen den darauf folgenden Applikationen der vasoaktiven Substanzen wurde den Gefäßen jeweils eine Erholungsphase von ca. 30 Minuten gewährt, in der die Krebslösung dreimal durch Spülen der Organbäder erneuert wurde und so die Testsubstanzen ausgewaschen werden konnten. Auch wurde ggf. die Vorspannung von 2g wiederhergestellt [216;217].

Nachdem die Gefäßsegmente sukzessive auf 2g vorgespannt worden waren, erfolgte eine 15-minütige Phase der Äquilibration. Danach wurde mit dem Stretching der Gefäße begonnen, indem die Ringe wiederholt mit KCl 100mmol/l kontrahiert wurden. Dies wurde wiederholt, bis reproduzierbare Ergebnisse erzielt wurden [211;216;217]. Die maximale KCl-Kontraktion diente als Bezugswert für die nachfolgend beschriebenen Gefäßreaktionen.

Die Endothel-abhängige Gefäßrelaxation wurde mit Acetylcholin kumulativ von 10^{-10} bis 10^{-4} mol/l nach Vorkontraktion mit Norepinephrin (NE~70% von KCl 100mmol/l) geprüft. Die Evaluation der Endothel-unabhängigen Relaxation erfolgte nach vergleichbarer Vasokonstriktion durch die Zugabe von Natriumnitroprussid (SNP) kumulativ von 10^{-10} bis 10^{-5} mol/l. Einige Gefäßringe wurden 30min. mit Indomethacin (10^{-7} mol/l) inkubiert, um die Prostaglandinsynthese während des Versuchs zu unterbinden [210]. Zur Hemmung der NO-Synthase wurden einige Ringe für 30min. mit L-NAME 10^{-5} mol/l inkubiert [216].

Material und Methoden

Das Kontraktionsvermögen wurde auf die einmalige Gabe von Angiotensin-II 10^{-7} mol/l und auf die kumulative Gabe von Endothelin-1 in steigender Dosierung von 3×10^{-10} bis 10^{-7} mol/l mit und ohne Inkubation mit L-NAME gemessen. Alle Untersuchungen finden sich zur Veranschaulichung in nachfolgender Abbildung wieder. Konzentrationen werden in mol/l angegeben:

	Ach-Relaxation 10^{-10} - 10^{-4}	SNP-Relaxation 10^{-10} - 10^{-5}
Ohne Inkubation	X	X
Inkubation mit L-NAME 10^{-5}	X	
Inkubation mit Indomethacin 10^{-7}	X	X

Abb. 2.2: Relaxationsreaktionen nach Kontraktion mit NE 10^{-7}

	AT II-Kontraktion 10^{-7}	ET-1-Kontraktion 3×10^{-10} - 10^{-7}
Ohne Inkubation	X	X
Inkubation mit L-NAME 10^{-5}		X

Abb. 2.3: Kontraktionsreaktionen

Material und Methoden

2.7. Material

Futter und zugesetzte Medikamente

AVE7688, Ramipril und Kontrollfutter wurden von Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden, Deutschland zur Verfügung gestellt

Anästhesie

Heparin-Natrium, 5000I.E./ml	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Thiopental 2,5g/100ml	Abbott AG, 6340 Baar, Schweiz
Xylacin Hydrochlorid 20mg/ml	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Ketamin, 100mg/ml	Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland
Tramadol 50mg/ml	Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland

Substanzen für Krebs-Henseleit-Puffer

Die Substanzen wurden von folgenden Herstellern bezogen:

NaCl, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄, EDTA und Glucose von Merck Eurolab GmbH, Nürnberg.
MgSO₄ und NaHCO₃ von Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Taufkirchen

Organkammersubstanzen

KCL wurde von Merck Eurolab GmbH, Nürnberg bezogen. NE, Ach, SNP, AT-II, Ca₂CO₃, Indomethacin und L-NAME lieferte Sigma-Aldrich Chemie GmbH in Taufkirchen und ET-1 wurde von Calbiochem-Novabiochem GmbH in Schwalbach im Taunus bezogen.

Indomethacin wurde einmal wöchentlich mit Ca₂CO₃ angesetzt und unter Vermeidung von Lichteinfluss bei 4°C aufbewahrt. L-NAME und SNP wurden täglich frisch angesetzt. NE, Ach, AT-II und ET-1 wurden vor der Versuchsreihe einmalig angesetzt, aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren. Zu Beginn eines jeden Versuchstages wurde eine Verdünnungsreihe jeder Substanz angelegt und während des Versuchstages bei 4°C gekühlt. Alle Substanzen wurden in aqua bidest gelöst.

Material und Methoden

Geräte

Organkammer	FMI, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Wärmebad	HAAKE B3, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Blutdruckmessgerät	FMI, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
4-Kanal Oszilloskop	ZUA-82, FMI, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Waagen	Sauter Feinwaage Typ 404/13, Kern & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland Chyo MP-3000, Kern & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland
Sonifikator	Bandelin Sonoplus GM70, Bandelin GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Zentrifugenröhrchen	100/16; Rundboden, Polystyrol glasklar RE 04, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland
Pipettenspitzen	PSG 1000 Pipettenspitzen gelb, Typ Eppendorf 1-100µl, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland PSB 1000 Pipettenspitzen blau, Typ Eppendorf 100 - 1000 µl, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland
Petrischalen	PP90, 94x16mm, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland
Eppendorfcups	RSL1 Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5ml, save lock, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	KT20, Laborversand A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Blutentnahme	Perfusionsbesteck mit Flügeln; 0,6x20mm, 30cm; BD Infusion Therapy, Helsingborg, Schweden

Material und Methoden

Skalpellklingen	SJ21 100 Skalpellklingen steril, Megro GmbH Wesel, Deutschland
Spritzen	Omicam U-40 Insulin, 1ml, B Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland Omnifix-F Plus, 1ml, B Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland Injekt 2ml, luer, solo, B Braun AG, Melsungen, Melsungen, Deutschland
aqua bidest	Ampuwa für Spülzwecke 10l, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H, Deutschland

2.8. Statistik

Die Auswertung der Versuche erfolgte durch eine computergestützte Ermittlung der erzielten Gefäßantworten bei den entsprechenden Substratkonzentrationen. Gefäßreaktionen auf Vasokonstriktoren wurden in Prozent der jeweiligen individuellen Referenzkonzentration auf Kaliumchlorid (100mmol/l) angegeben, die zu Beginn eines jeden Versuchstages für jede Organkammer ermittelt wurde. Gefäßreaktionen auf Vasodilatoren wurden in Prozent der Vorkontraktion auf Norepinephrin (10^{-7} mol/l) angegeben. Es wurden nur Gefäßsegmente in die Auswertung einbezogen, deren Endothel-abhängige Relaxation auf Acetylcholin mehr als 50% der Vorkontraktion auf Norepinephrin betrug.

Die Datenerfassung erfolgte mittels VitroDatWin (FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland). Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) angegeben. Zur statistischen Analyse wurde die Sensitivität (pD_2) der Gefäße auf die vasoaktiven Substanzen als negativer Logarithmus der Konzentration, die eine halbmaximale Kontraktion bzw. Relaxation ausgelöst hat, ausgedrückt. Die maximale Relaxation (ausgedrückt in Prozent der NE-Kontraktion) bzw. die maximale Kontraktion wurden unter Zuhilfenahme von MatLab Software (MatWorks, Natick, MA, USA) für jede Dosis-Wirkungskurve durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelt. Für den Vergleich zwischen zwei Werten kam der ungepaarte Student's t-Test zur Anwendung.

Die graphische Darstellung der Gefäßreaktion und der Vitaldaten der Ratten erfolgte in Form von Linien-Diagrammen mit zusätzlich dargestellter Standardabweichung unter Verwendung von SigmaPlot (Jandel Scientific Software 2001, San Rafael, CA, USA). Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet [218].

3. Ergebnisse

3.1. Vitaldaten

Am Tag 0 wurden von den insgesamt 30 Versuchstieren jeweils 12 Tiere einer Scheinoperation und 18 Tiere einer Stenosierung der rechten Nierenarterie (2K1C) unterzogen. Alle 30 Ratten überlebten die Operation.

Das Gewicht entwickelte sich in allen 5 Versuchsgruppen (siehe 2.1) gleichmäßig. Es zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 3.1).

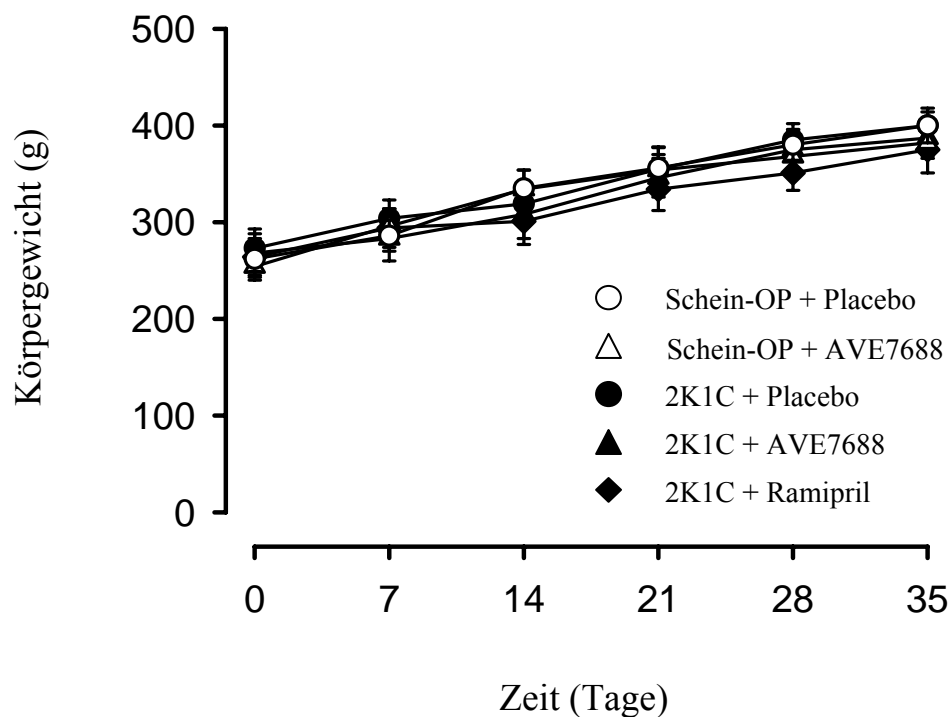


Abb. 3.1: Körpergewicht von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

Ergebnisse

Auch die Herzfrequenz blieb unbeeinflusst von Hypertonie oder Behandlung der Tiere. Eine signifikante Abweichung der verschiedenen Gruppen voneinander konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Abb. 3.2).

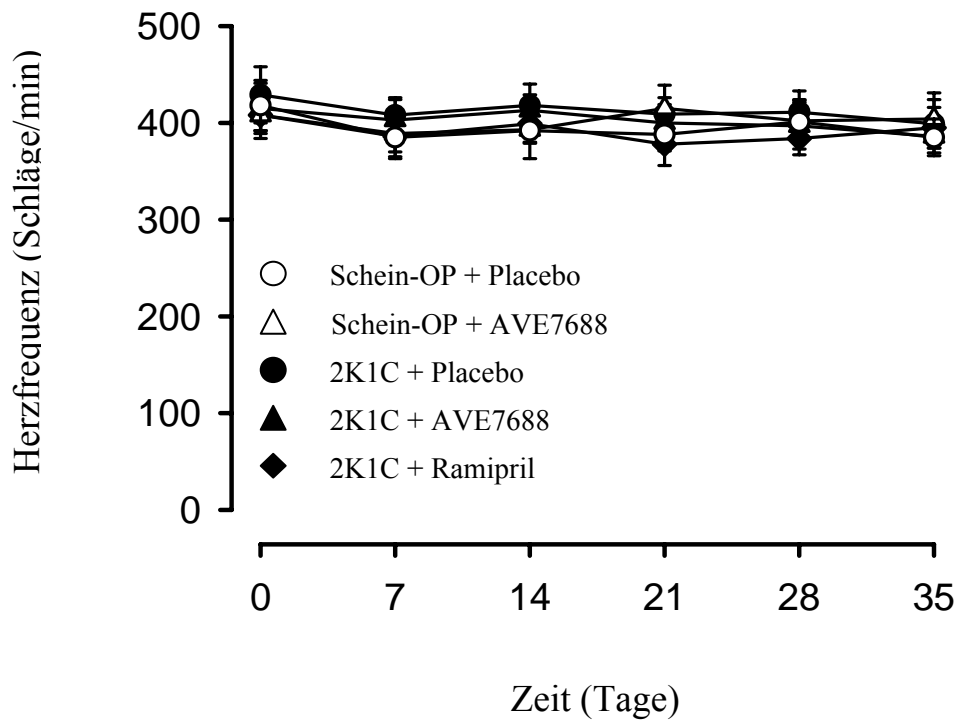


Abb. 3.2: Herzfrequenz von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

Ergebnisse

Bei den 2K1C-Tieren entwickelte sich innerhalb der ersten 14 Tage ein deutlicher Bluthochdruck. Der Blutdruck stieg bei allen Tieren um etwa 30mmHg auf 196 ± 16 mmHg an. Der Blutdruck bei den scheinoperierten Tieren blieb in dieser Zeit konstant. In den 3 darauffolgenden Wochen der Behandlung wurde der Blutdruck sowohl durch Ramipril als auch durch AVE7688 im Vergleich zu Placebo deutlich gesenkt (124 ± 10 mmHg vs. 119 ± 8 mmHg vs. 208 ± 19 mmHg für die Kontrolltiere). Auch in der scheinoperierten Tiergruppe sank der Blutdruck durch die Behandlung mit AVE7688 im Vergleich zu Placebo deutlich (110 ± 9 vs. 139 ± 11 mmHg) (Abb. 3.3).

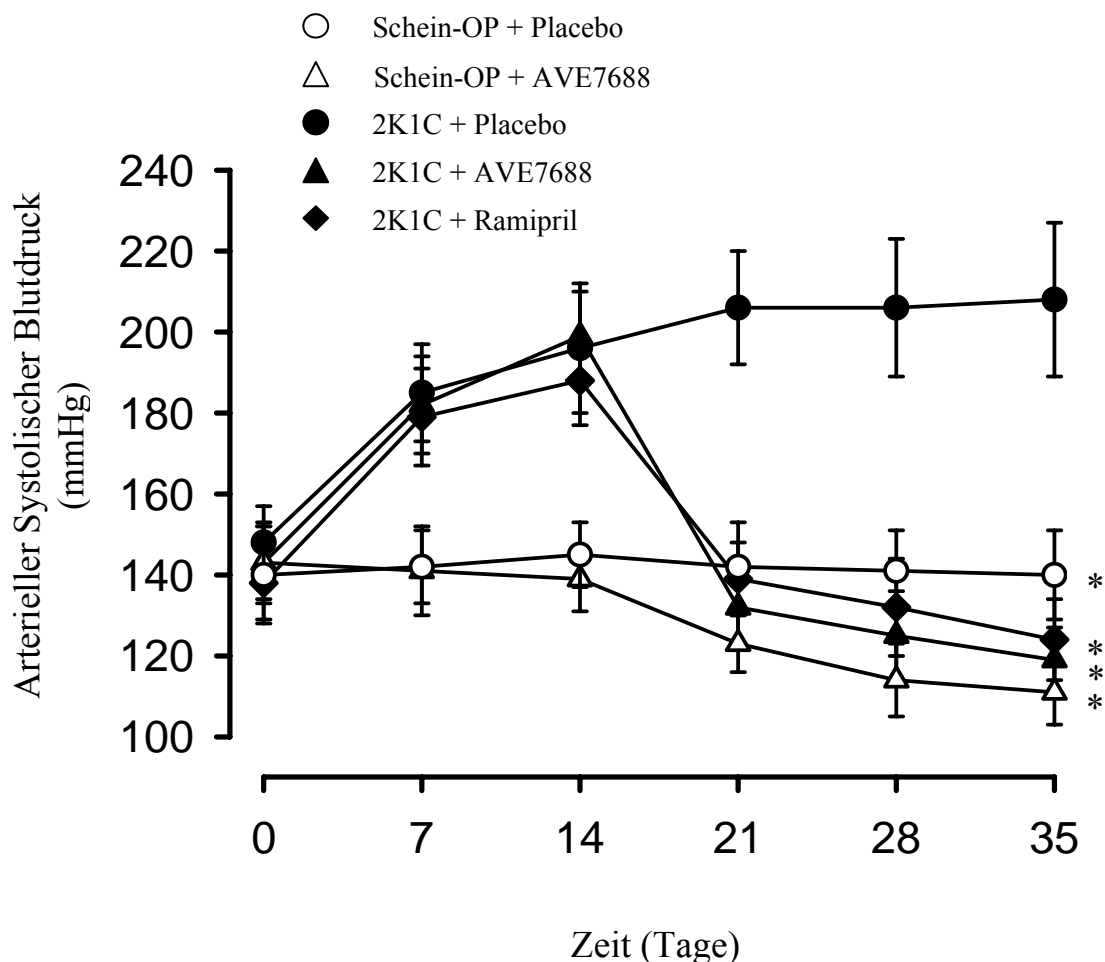


Abb. 3.3: Systolischer Blutdruck (tail-cuff Methode) von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben, * $p \leq 0,05$ vs. 2K1C + Placebo.

3.2. Endothel-abhängige Relaxation auf Acetylcholin

Nach Vorkontraktion mit Norepinephrin war die durch kumulative Ach-Gabe ausgelöste, Endothel-abhängige Relaxation in Aortensegmenten von hypertonen, unbehandelten Tieren signifikant schlechter ($72 \pm 6\%$) als die von normotonen ($99 \pm 7\%$) oder behandelten hypertonen Tieren. Behandlung mit Ramipril induzierte eine Verbesserung der Endothel-abhängigen Relaxation auf $94 \pm 8\%$ der Vorkontraktion; der Effekt von AVE7688 war vergleichbar ($101 \pm 6\%$, Abb. 3.4).

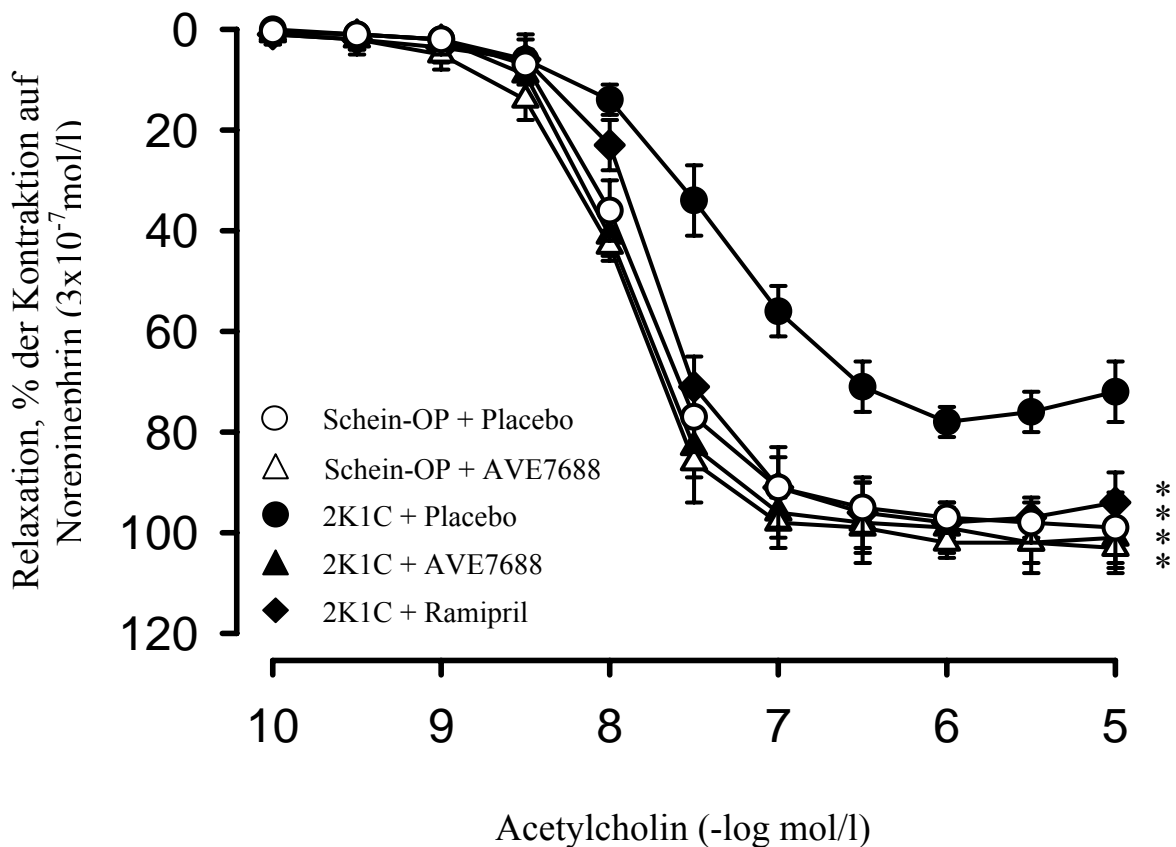


Abb. 3.4: Endothel-abhängige Ach-induzierte Relaxation in Norepinephrin-vorkontrahierten Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben, * $p \leq 0,05$ vs. 2K1C + Placebo.

Ergebnisse

Durch 30-minütige Inkubation mit Indomethacin wurde die Prostaglandinsynthese unterbunden. Die danach durchgeführte Prüfung der Ach-induzierten Endothel-abhängigen Relaxation zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Relaxation ohne Präinkubation mit Indomethacin (siehe Abb. 3.4 und 3.5).

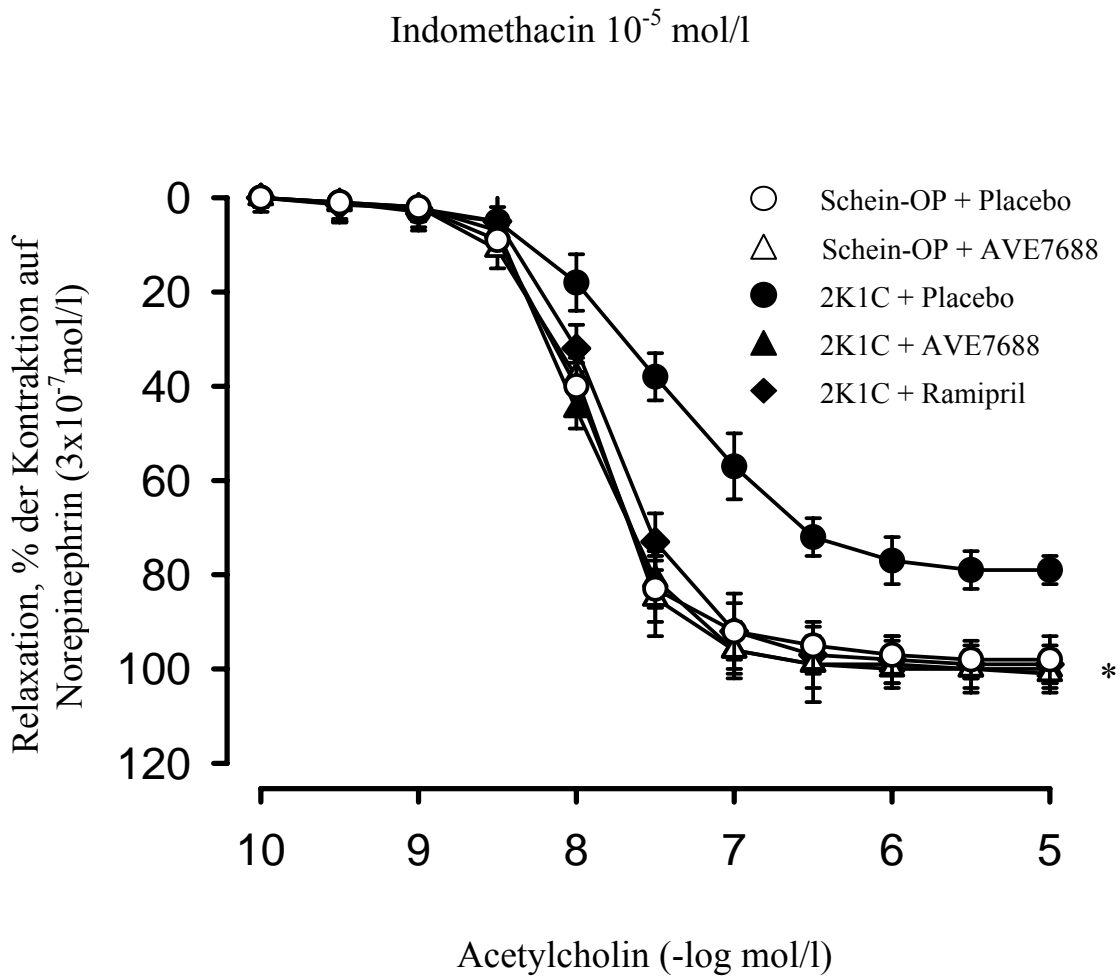


Abb. 3.5: Endothel-abhängige Ach-induzierte Relaxation in Norepinephrin-vorkontrahierten Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben, * $p \leq 0,05$ vs. 2K1C + Placebo. Die Aortensegmente wurden mit Indomethacin 10^{-5} mol/l für 30 min. vorinkubiert.

Ergebnisse

Durch 30-minütige Inkubation mit L-NAME 10^{-5} mol/l wurde die endotheliale NO-Synthese inhibiert. Es fand keine nennenswerte Endothel-abhängige Relaxation auf die kumulative Ach-Gabe statt. Alle Versuchsgruppen zeigten vergleichbare Reaktionen (Abb. 3.6).

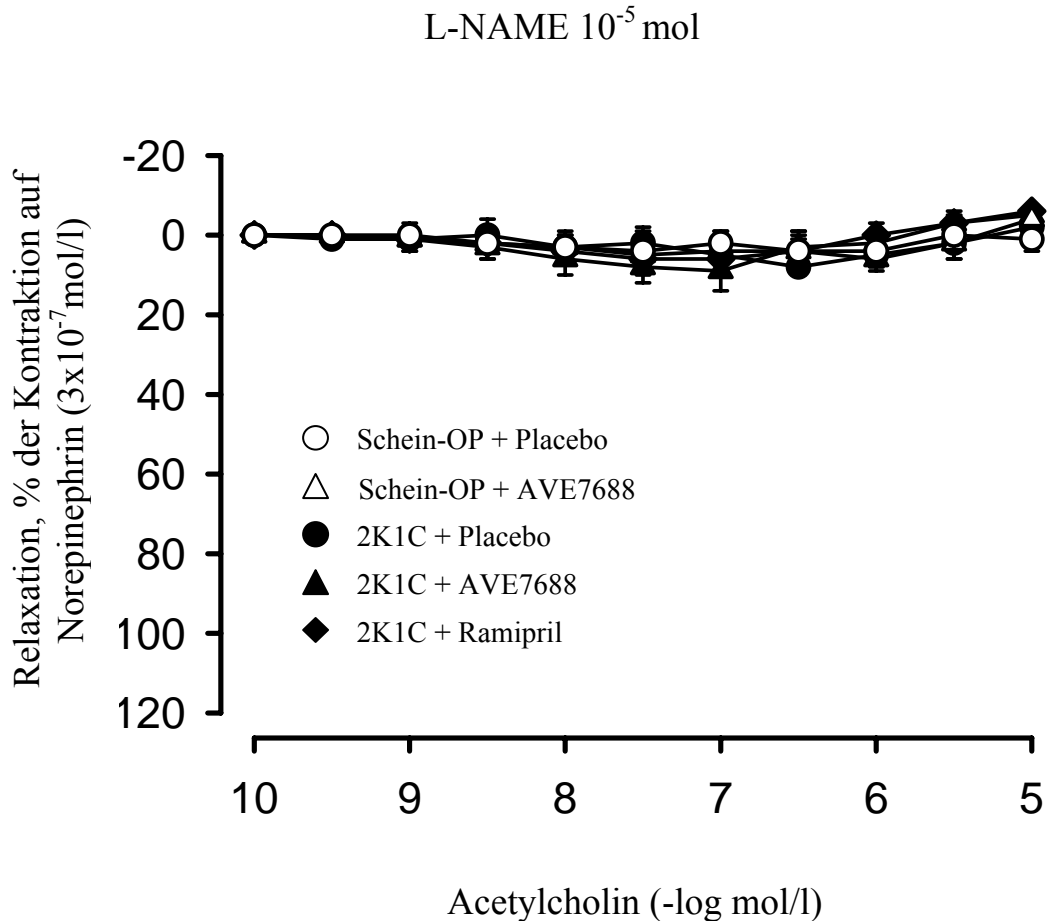


Abb. 3.6: Endothel-abhängige Ach-induzierte Relaxation in Norepinephrin-vorkontrahierten Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben. Die Aortensegmente wurden mit L-NAME 10^{-5} mol/l für 30 min. vorinkubiert.

3.3. Endothel-unabhängige Relaxation auf SNP

Zur Prüfung der Endothel-unabhängigen Gefäßrelaxation wurde nach Vorkontraktion mit Norepinephrin kumulativ der NO-Donator Natrium-Nitroprussid zugegeben. Sowohl in den Gefäßsegmenten der hypertonen Ratten, als auch in denen der Scheinoperierten, sowie in denen der behandelten Ratten wurde eine 100%ige Gefäßrelaxation erreicht (Abb. 3.7).

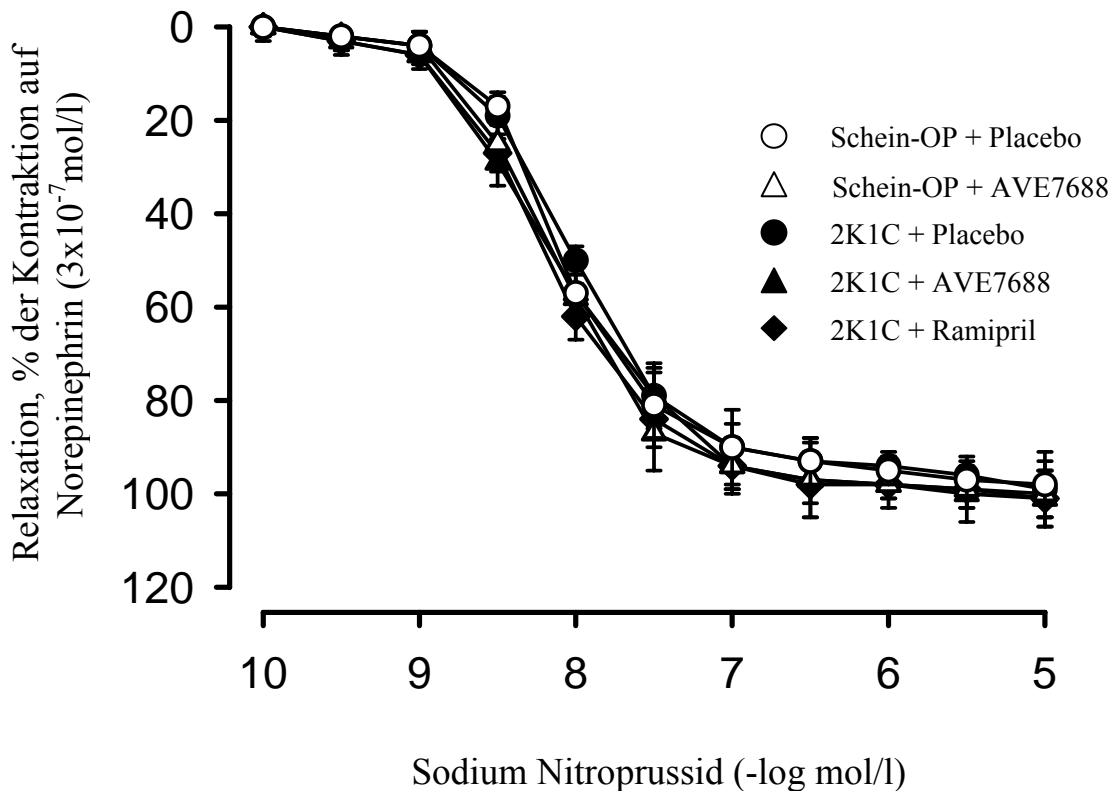


Abb. 3.7: Endothel-unabhängige Relaxation auf Natrium Nitroprussid in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

Ergebnisse

Durch 30-minütige Inkubation mit Indomethacin und damit Hemmung der Prostaglandinsynthese wurden keine signifikanten Unterschiede bei der durch kumulative SNP-Gabe induzierten Endothel-unabhängigen Relaxation im Vergleich zur Relaxation ohne vorherige Prostaglandinsynthesehemmung gemessen (Abb. 3.8).

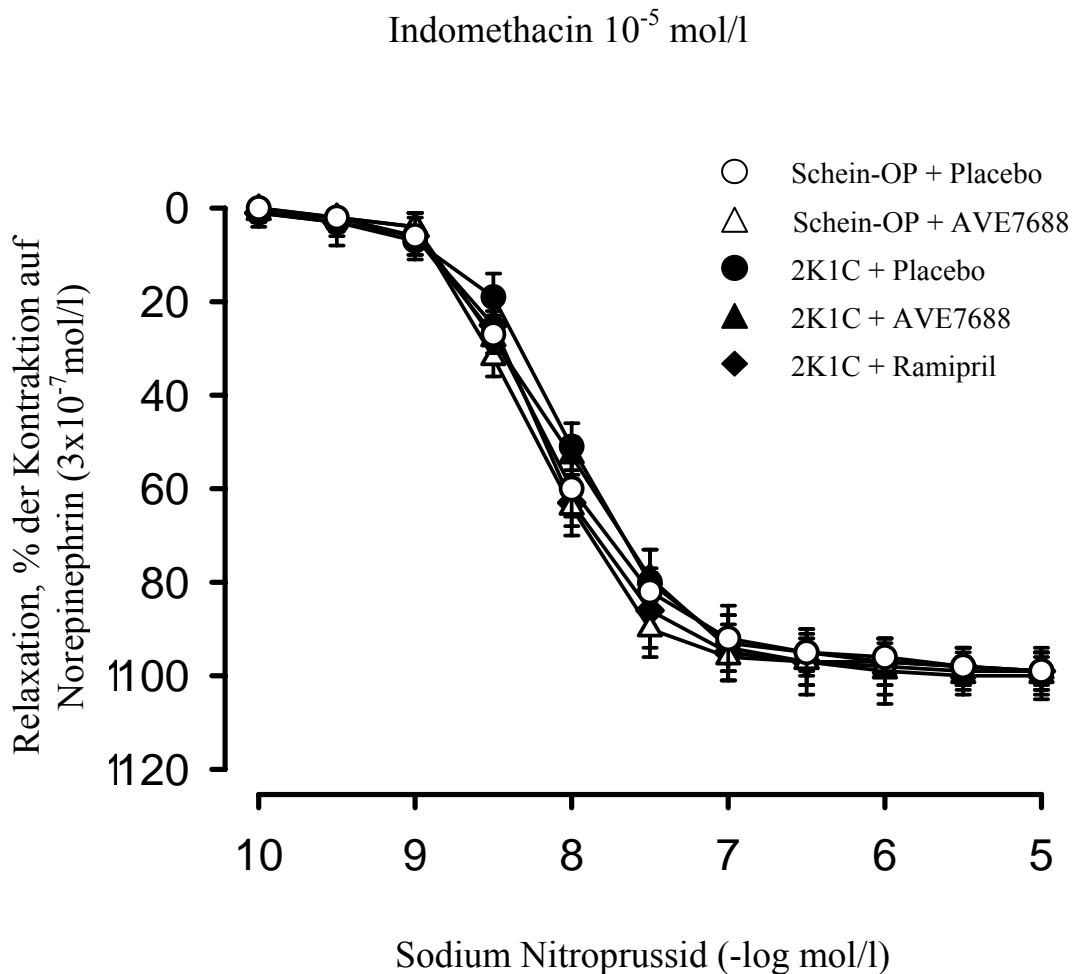


Abb. 3.8: Endothel-unabhängige Relaxation auf Sodium Nitroprussid in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben. Die Aortensegmente wurden vorinkubiert mit Indomethacin 10^{-5} mol/l.

3.4. Kontraktionsreaktionen

Die Kontraktionsfähigkeit der Aortensegmente auf Endothelin-1 blieb unbeeinflusst von Hypertonie, ACE- oder NEP-Hemmung. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Reaktion auf die kumulative Endothelin-1-Gabe (Abb. 3.9).

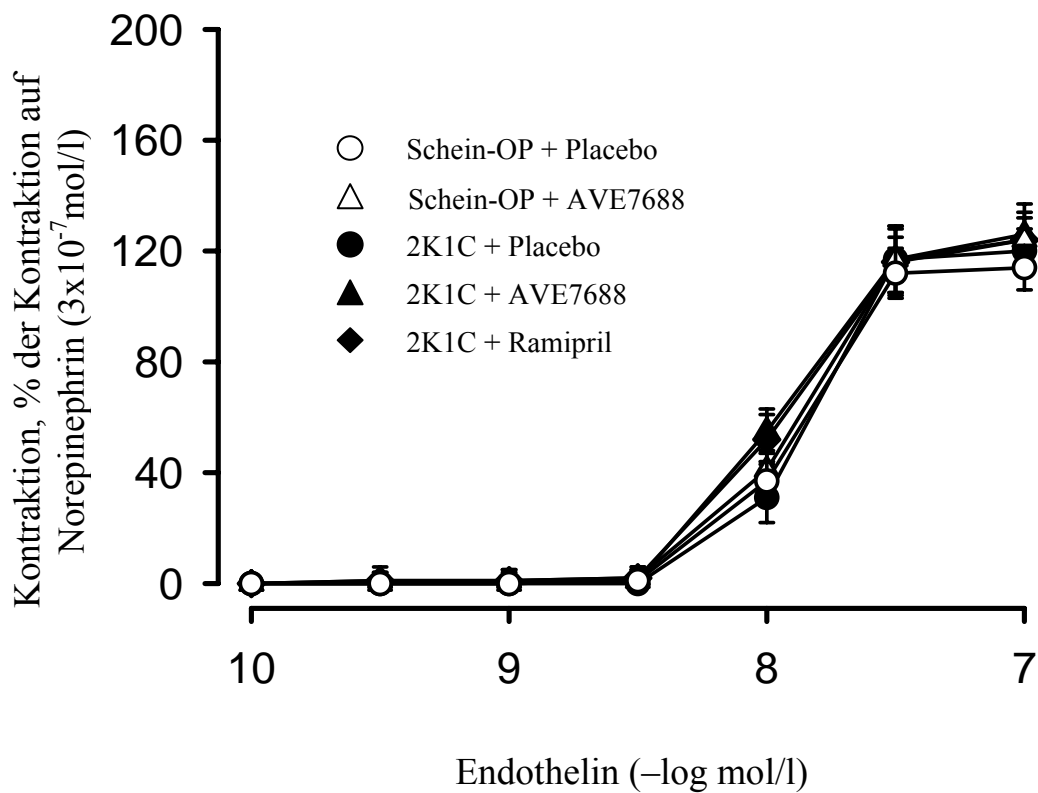


Abb. 3.9: Dosisabhängige Endothelin-induzierte Kontraktionen in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

Ergebnisse

Durch die Hemmung der endothelialen NO-Synthase mittels 30 minütiger Inkubation mit L-NAME 10^{-5} mol/l erhöhte sich die Kontraktionsfähigkeit der Aortensegmente. Kontraktile Antworten unterschieden sich dabei nicht signifikant zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen (Abb. 3.10).

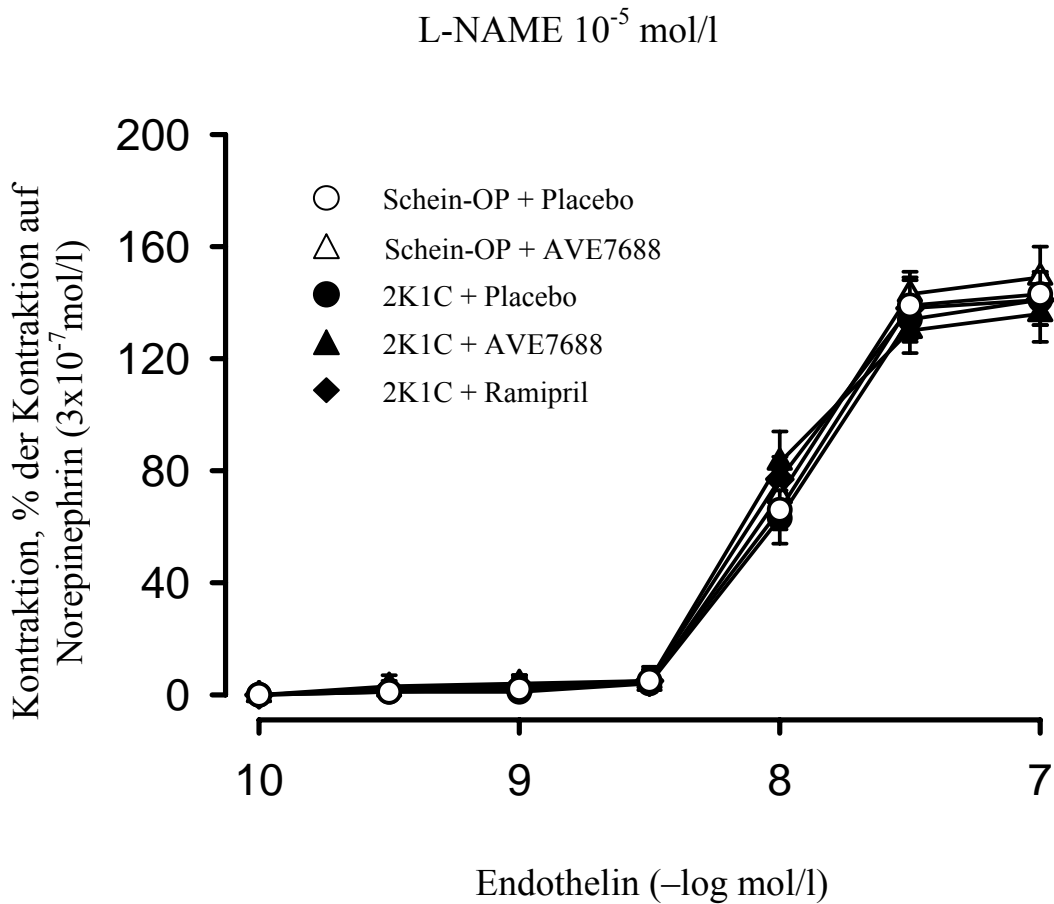


Abb. 3.10: Dosisabhängige Endothelin-induzierte Kontraktionen in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben. Die Aortensegmente wurden mit L-NAME 10^{-5} mol/l 30 min. vorinkubiert.

Ergebnisse

Bei der Kontraktionsfähigkeit auf Angiotensin II zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Abb. 3.11).

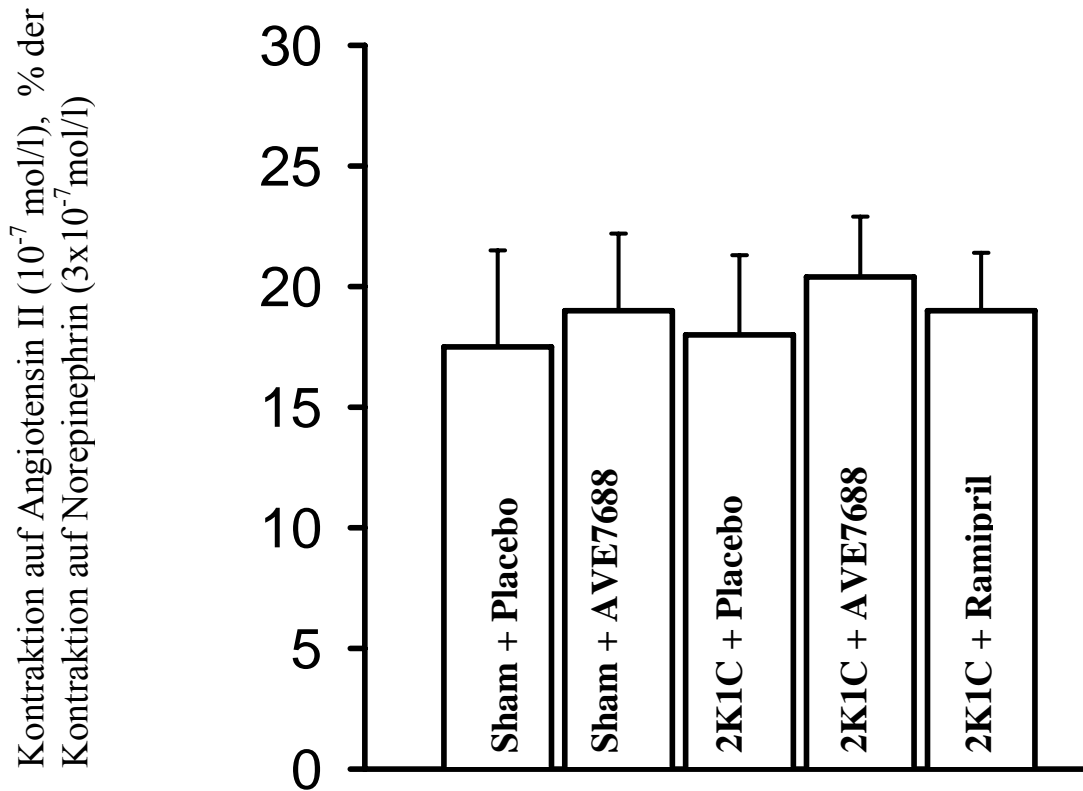


Abb. 3.11: Angiotensin-II-induzierte Kontraktionen in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Langzeitbehandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril und dem Vasopeptidaseinhibitor AVE7688 auf die endotheliale Dysfunktion bei renovaskulärem Bluthochdruck untersucht.

Es ist bekannt, dass renovaskulärer Bluthochdruck mit Endothelialer Dysfunktion einhergeht [9;143]. Zur Erzeugung des renovaskulären Bluthochdrucks wurde eine Nierenarterienstenose simuliert, indem bei intakter Durchblutung zweier Nieren den Versuchstieren eine Nierenarterie abklemmt wurde [206]. Hierbei handelt es sich um ein Hoch-Renin-Modell. Es wurde die Entwicklung von Blutdruck und Herzfrequenz sowohl vor als während der Behandlung dokumentiert. Die vasoaktiven Versuche fanden an der thorakalen Aorta im Organbad statt. Es wurde die verminderte Ach-abhängige Gefäßrelaxation dokumentiert und die Effekte von Ramipril mit denen von AVE7688 auf die Endothel-abhängige Relaxation verglichen. Sowohl Ramipril als auch AVE7688 verbesserten die Endothelfunktion und senkten den Blutdruck signifikant. Untersucht wurde auch der Einfluss einer Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Indomethacin auf die Endothel-abhängige Vasodilatation. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Zum Vergleich wurde die Endothel-unabhängige Vasodilatation mit dem NO-Donator SNP demonstriert.

Zur Beurteilung der kontraktile Fähigkeiten der Gefäße von hypertensiven behandelten und unbehandelten sowie normotonen Tieren wurde eine Vasokonstriktion mit ET-1 und AT-II durchgeführt. Auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.1. Einfluss der Therapie auf die Herzfrequenz

Im Niedrig-Renin-Modell wurde gezeigt, dass weder eine Behandlung mit einem ACE-Hemmer noch mit einem Vasopeptidaseinhibitor zu einer Veränderung der Herzfrequenz führten [219]. Dieser Studie wurde ein Hoch-Renin-Modell zugrunde gelegt, in dem die AT-II-Konzentrationen in Plasma und Gewebe und damit das Substrat des ACE deutlich erhöht sind. Es wurde gezeigt, dass sich die Herzfrequenz durch den renovaskulären Bluthochdruck nicht veränderte und auch die medikamentöse Behandlung mit alleiniger ACE- oder kombinierter ACE-/NEP-Inhibition keine Auswirkungen hatte.

4.2. Einfluss der Therapie auf die Blutdrucksenkung

Es wurde gezeigt, dass eine Dauerbehandlung mit sowohl Ramipril als auch AVE7688 den Blutdruck bei renovaskulärem Bluthochdruck signifikant senkte. Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der Blutdrucksenkung nachweisen.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen für andere Vasopeptidase-Inhibitoren [202;216]. Bei renovaskulärem Bluthochdruck sind die AT-II Konzentrationen in Plasma und Gewebe deutlich erhöht [123]. Da AT-II die Bildung von ET-1 induziert, liegen hochpotente Vasokonstriktoren vor, die zum Bluthochdruck führen. ACE hemmt die Bildung von AT-II und wirkt somit antihypertensiv. Die signifikante Blutdrucksenkung durch ACE-Hemmer wurde sowohl tierexperimentell als auch am Menschen vielfach nachgewiesen [149]. NEP spaltet sowohl vasokonstriktive als auch – dilatierende Peptide. Bezüglich der Blutdrucksenkung scheinen sich diese Wirkungen auszugleichen, sodass sich kein zusätzlicher Profit aus der Inhibition der NEP ergibt.

4.3. Einfluss der Therapie auf die Endothel-abhängige Gefäßrelaxation

Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Ramipril die Endothel-abhängige Vasodilatation signifikant verbesserte. Damit wurde demonstriert, was für Ramipril an anderen Hochdruckmodellen bereits wohlbekannt ist [151]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass durch die Therapie mit dem kombinierten ACE-/NEP-Inhibitor AVE7688 die Endothel-abhängige Vasodilatation noch deutlicher verbessert wurde. Diese Ergebnisse sind wiederum konsistent mit denen anderer VPI und an anderen Hochdruckmodellen [200;216]. Während sich die positiven und negativen Eigenschaften der zusätzlichen Hemmung der NEP in Bezug auf Blutdrucksenkung auszugleichen scheinen, profitiert die pathologische Endothelfunktion von dem zusätzlichen Eingriff. Sogar die Endothel-abhängige Vasodilatation von Gefäßen gesunder Tiere konnte im Vergleich zu unbehandelten gesunden Tieren durch die Behandlung mit AVE7688 gesteigert werden. In einer klinischen Studie wurde bereits für Ramipril gezeigt, dass Patienten mit hohem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, aber noch ohne klinische Symptome, durch die Behandlung ein deutlich selteneres Auftreten von Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Tod hatten [158]. Dass Ausmaß und Schwere von kardiovaskulären Erkrankungen in direktem Zusammenhang mit

Diskussion

endothelialer Dysfunktion stehen, wurde ebenfalls bereits demonstriert [20-22]. Da die endotheliale Dysfunktion im Experiment noch deutlicher von dem VPI als von Ramipril profitiert, ist auch hier ein zusätzlicher Profit aus der Therapie mit dem VPI im Vergleich zum einfachen ACE-Inhibitor zu erwarten.

Die größte Rolle bei der Endothel-abhängigen Vasodilatation spielen die Substanzen NO und Prostacyclin. Um zu erfassen, ob in dem vorliegenden Versuch die Endothel-abhängige Vasodilatation über Prostacyclin oder NO vermittelt wird, wurden die Gefäßringe im Organbad vor Durchführung vasoaktiver Versuche sowohl mit Indomethacin als auch mit L-NAME inkubiert.

Indomethacin unterbindet als pharmakologischer Hemmstoff der Cyclooxygenase die Bildung des Prostacyclins. Prostacyclin führt cAMP-vermittelt zur Vasodilatation. In dieser Versuchsreihe hatte die Hemmung der Prostacyclin-Synthese keinen signifikanten Einfluss auf die Vasodilatation im Vergleich zu den Versuchen ohne Hemmung der Prostacyclin-Synthese. Damit wurde gezeigt, dass die Endothel-abhängige Vasodilatation unabhängig von den Prostacyclin-Konzentrationen erfolgte.

L-NAME ist ein pharmakologischer Hemmstoff der NO-Synthase und verhindert die Bildung von NO aus L-Arginin. Durch 30-minütige Inkubation der Gefäßringe mit L-NAME wurde in diesen Versuchen die NO-Synthase unterdrückt. Die darauffolgenden vasoaktiven Versuche mit Acetylcholin zeigten eine nahezu vollständig aufgehobene Vasodilatation unabhängig von Versuchsgruppe und medikamentöser Behandlung.

Es wurde somit nachgewiesen, dass die Endothel-abhängige Vasodilatation auf Ach bei allen Versuchstieren in erster Linie durch die NO-Synthase-induzierte Bildung und Sekretion von NO erfolgt.

4.4. Einfluss der Therapie auf die Endothel-unabhängige Relaxation

Zur Prüfung der Endothel-unabhängigen Vasodilatation wurden vasoaktive Versuche mit dem NO-Donator SNP durchgeführt. SNP wirkt ohne Verzögerung an glatter Muskulatur durch Erhöhung der intrazellulären cGMP-Spiegel. Es bedarf keiner Umwandlung und wirkt somit wie zugegebenes NO sofort vasodilatierend. In den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied in der absoluten Dilatation oder dem konzentrationsabhängigen Ansprechen auf NO zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen gezeigt werden. Auch die zusätzliche Hemmung der Prostacyclin-Synthese durch Indomethacin ergab keinen Unterschied. Daraus lässt sich folgern, dass die Vasodilatation bei renovaskulärem Bluthochdruck Endothel-abhängig durch Verminderung der NO-Konzentrationen eingeschränkt ist. Prostacyclin spielt eine untergeordnete Rolle bei der Vasodilatation. Die eingeschränkte Endothel-abhängige Vasodilatation kann bei renovaskulärem Bluthochdruck durch ACE-Hemmung und noch effektiver durch die kombinierte ACE-/NEP-Hemmung durch Vasopeptidase-Inhibitoren wiederhergestellt werden.

4.5. Einfluss der Therapie auf das Kontraktionsverhalten der unterschiedlichen Versuchsgruppen

Bei dem Modell des renovaskulären Bluthochdrucks ist bekannt, dass das RAAS hochreguliert ist und AT-II-Konzentrationen erhöht sind. Da AT-II die Sekretion von ET-I induziert, liegt bei renovaskulärem Bluthochdruck auch ET-1 in erhöhten Konzentrationen vor.

In Tierexperimenten mit Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) wurde gezeigt, dass die Ansprechbarkeit auf ET-1 in Gefäßen mit eingeschränkter Endothelfunktion vermindert ist [66]. Für den Salz-induzierten Hypertonus sowie den 1Kidney/1Clamp induzierten Hypertonus weiß man, dass die ET-1-Konzentrationen in Plasma und Gewebe erhöht sind [220]. Beim Renin-abhängigen Hypertonus findet man ET-1-Konzentrationen erst im fortgeschrittenen Stadium erhöht. Im Anfangsstadium entsprechen sie denen normotensiver Tiere [221]. Diese Daten sind konkordant mit denen der vorliegenden Studie. Bei den vasoaktiven Versuchen mit ET-1 lässt sich kein Unterschied im Kontraktionsausmaß der verschiedenen Versuchsgruppen feststellen. Es zeigt sich

Diskussion

jedoch eine deutliche Zunahme der Kontraktionsfähigkeit aller Versuchsgruppen nach Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME. Damit wird demonstriert, wie NO den kontraktilen Fähigkeiten von ET-1 entgegenwirkt [70].

Des weiteren wurde die Kontraktionsfähigkeit auf AT-II untersucht. Auch hier ließen sich keine Differenzen in der Kontraktionsfähigkeit der einzelnen Versuchsgruppen feststellen.

Im Modell des renovaskulären Bluthochdrucks bleibt das Kontraktionsvermögen auf die potenten Vasokonstriktoren ET-1 und AT-II unbeeinflusst. Eine Behandlung mit einem ACE-Hemmer oder einem kombinierten Hemmstoff von ACE und NEP hat keine Auswirkungen. Hingegen wird durch Hemmung der NO-Synthase eine deutliche Kontraktionszunahme im gleichen Ausmaß bei normotensiven, unbehandelten und behandelten hypertensiven Tieren beobachtet.

5. Zusammenfassung

Die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen korreliert mit chronisch erhöhtem Blutdruck. Untersucht man die Vasomotorik von chronisch hypertensiven Patienten, beobachtet man eine Funktionsverschlechterung des Endothels, die in direktem Zusammenhang mit Ausmaß und Schwere kardiovaskulärer Erkrankungen steht. Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) sind potente Antihypertensiva, die zusätzlich zur Blutdrucksenkung einen günstigen Einfluss auf die Endothelfunktion besitzen. Das Enzym Neutrale Endopeptidase (NEP) bewirkt neben dem Abbau von Bradykinin eine Metabolisierung natriuretischer Peptide. Diese wirken dem bei chronischem Bluthochdruck aktivierten Renin-Angiotensin-Aldosteron-System entgegen. Vasopeptidase-Inhibitoren (VPI) sind Substanzen, die sowohl ACE als auch NEP inhibieren und durch diese kombinierte neurohumorale Blockade die günstigen Eigenschaften von ACE- bzw. NEP-Hemmung in sich vereinigen.

Die vorliegende Versuchsreihe untersuchte die Wirkung des VPI AVE7688 im Vergleich zum ACE-Inhibitor Ramipril auf Blutdrucksenkung und Endothelfunktion an einem Tiermodell für renovaskuläre Hypertonie.

Männliche Wistar-Kyoto Ratten wurden randomisiert und einer Stenosierung der rechten A. renalis bzw. einer Scheinoperation unterzogen. 14 Tage später beginnend wurden sie für 21 Tage mit AVE7688 (30mg/kg/d), Ramipril (1mg/kg/d) oder Placebo behandelt. Es wurde die Entwicklung des Blutdrucks dokumentiert und am 35. Tag die Endothelfunktion im Organbad evaluiert. Die Messung der Endothel-abhängigen und unabhängigen Relaxation von isolierten Aortenringen fand hierzu in einer Apparatur zur Dokumentation der isometrischen Spannungsänderung von Gefäßringen statt.

Die Stenosierung der rechten A. renalis führte bei den entsprechenden Tieren zu einem ausgeprägten Blutdruckanstieg. Die Behandlung mit Ramipril bzw. AVE7688 ab dem 14. postoperativen Tag führte zu einer vergleichbaren Blutdrucksenkung in den jeweiligen Versuchsgruppen. Die Endothel-abhängige Relaxation von isolierten Aortenringen auf Acetylcholin war im Vergleich zur Endothel-unabhängigen Relaxation auf SNP bei Tieren mit Nierenarterienstenose ohne medikamentöse Therapie signifikant vermindert. Durch die Behandlung mit Ramipril bzw. AVE7688 ließ sich die Endothel-abhängige Relaxation deutlich verbessern, ohne dass signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassung

Dass die Endothel-abhängige Vasodilatation über die Freisetzung von NO erfolgte, wurde mit Hilfe des Hemmstoffes der NO-Synthase L-NAME demonstriert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Endothel-abhängige Vasodilatation unabhängig von den Prostacyclin-Konzentrationen erfolgte.

Bei der Endothel-unabhängigen Relaxation auf SNP sowie bei der Kontraktion auf AT-II und ET-1 ließen sich weder zwischen hypertonen und normotonen, noch innerhalb der Gruppe der hypertonen Tiere nach unterschiedlicher medikamentöser Therapie signifikante Unterschiede feststellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Effekt von AVE7688 auf die Endothelfunktion in einem Modell für renovaskuläre Hypertonie dem Effekt von Ramipril vergleichbar ist. Beide Substanzen konnten die Endothel-abhängige Relaxation von Gefäßringen verbessern. Eine verbesserte Gefäßrelaxation mag einer der Faktoren sein, die zu einer Verminderung von Endorgan-Schäden durch ACE-Hemmer und Vasopetidase-Inhibitoren beitragen.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Die frühesten Veränderungen, die bei der Formation atherosklerotischer Läsionen stattfinden, spielen sich im Endothel ab. Diese Veränderungen beinhalten vermehrte endotheliale Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile. Die Permeabilitätsveränderung wird über NO, Prostacyclin, AT-II und Endothelin vermittelt. Vermittelt über oxidiertes LDL werden Adhäsionsmoleküle in Leukozyten und Endothelzellen hochreguliert und Leukozyten wandern in die Arterienwand ein (Abb. modifiziert nach [18]).

Abb. 1.2: Fettstreifen bestehen zu Beginn aus Lipid-beladenen Monozyten und Makrophagen, sogenannte Schaumzellen, sowie T-Lymphozyten. Später kommen glatte Muskelzellen hinzu. Die Schritte, die in diesen Prozess involviert sind, beinhalten Wachstum der glatten Muskulatur, T-Zell-Aktivierung, Schaumzellformation, Plättchen-Adhäsion und –Aggregation sowie Leukozyten-Adhäsion und Migration (Abb. modifiziert nach [18]).

Abb. 1.3: Wenn Fettstreifen zu komplizierten Läsionen fortschreiten, tendieren sie dazu, Fibrinkappen zu bilden. Als Zeichen des Abheilens der Verletzung grenzen sie damit die Läsion zum Lumen ab. Die Fibrinkappe kommt auf einer Mischung aus Leukozyten, Lipiden und Debris zu liegen, aus der sich ein nekrotischer Kern bilden kann. Die komplizierten Läsionen wachsen trotz Fibrinkappe aufgrund der anhaltenden Entzündungsreaktionen an ihren Rändern weiter (Abb. modifiziert nach [18]).

Abb. 1.4: Zerreißen der Fibrinkappen oder Ulzeration der Fibrinplaques kann schnell zu Thrombose führen und kommt üblicherweise dort vor, wo die Fibrinkappe dünner ist. Das Ausdünnen der Fibrinkappe (meist am Rand der Läsion) entsteht am ehesten durch das ständige Heranschwemmen und Aktivieren von Makrophagen, die Metalloproteinasen und andere proteolytische Enzyme ausschütten. Diese Enzyme verursachen einen Abbau der Matrix, was zu Blutungen aus den Vasa vasorum oder aus

dem Lumen der Arterie führt. Es kommt zur Formation von Thromben und zum Arterienverschluss (Abb. modifiziert nach [18]).

Abb. 1.5: Wirkung von Angiotensin (Abb. modifiziert nach [75]).

Abb. 2.1: Aufteilung und Behandlung der Versuchstiere (N=Anzahl der Versuchstiere pro Arm der Studie)

Abb. 2.2: Relaxationsreaktionen nach Kontraktion mit NE 10^{-7}

Abb. 2.3: Kontraktionsreaktionen

Abb. 3.1: Körpergewicht von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

Abb. 3.2: Herzfrequenz von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

Abb. 3.3: Systolischer Blutdruck (tail-cuff Methode) von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben, * $p \leq 0,05$ vs. 2K1C + Placebo.

Abb. 3.4: Endothel-abhängige Ach-induzierte Relaxation in Norepinephrin-vorkontrahierten Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach

Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben, * $p \leq 0,05$ vs. 2K1C + Placebo.

Abb. 3.5: Endothel-abhängige Ach-induzierte Relaxation in Norepinephrin-vorkontrahierten Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben, * $p \leq 0,05$ vs. 2K1C + Placebo. Die Aortensegmente wurden mit Indomethacin 10^{-5} mol/l für 30 min. vorinkubiert.

Abb. 3.6: Endothel-abhängige Ach-induzierte Relaxation in Norepinephrin-vorkontrahierten Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben. Die Aortensegmente wurden mit L-NAME 10^{-5} mol/l für 30 min. vorinkubiert.

Abb. 3.7: Endothel-unabhängige Relaxation auf Natrium Nitroprussid in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

Abb. 3.8: Endothel-unabhängige Relaxation auf Natrium Nitroprussid in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die

Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben. Die Aortensegmente wurden vorinkubiert mit Indomethacin 10^{-5} mol/l.

Abb. 3.9: Dosisabhängige Endothelin-induzierte Kontraktionen in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

Abb. 3.10: Dosisabhängige Endothelin-induzierte Kontraktionen in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben. Die Aortensegmente wurden mit L-NAME 10^{-5} mol/l 30 min. vorinkubiert.

Abb. 3.11: Angiotensin-II-induzierte Kontraktionen in Segmenten der Aorta descendens von Wistar Kyoto Ratten nach Stenosierung der rechten Nierenarterie bzw. Scheinoperation jeweils am Tag 0. Die Ratten wurden von Tag 14-35 entweder mit AVE7688 (30mg/kg/d p.o.), Ramipril (1mg/kg/d p.o.) oder Placebo behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM bei 6 Ratten/Gruppe angegeben.

6.2. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt: Datenreport 2004. Datenreport 2004 1:352-353, 2005
2. Willmot M, Leonardi-Bee J, Bath PM: High blood pressure in acute stroke and subsequent outcome: a systematic review. *Hypertension* 43:18-24, 2004
3. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, Kastarinen M, Poulter N, Primatesta P, Rodriguez-Artalejo F, Stegmayr B, Thamm M, Tuomilehto J, Vanuzzo D, Vescio F: Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA* 289:2363-2369, 2003
4. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ: Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42:1206-1252, 2003
5. Sharma AM, Wittchen HU, Kirch W, Pittrow D, Ritz E, Goke B, Lehnert H, Tschöpe D, Krause P, Hofler M, Pfister H, Bramlage P, Unger T: High prevalence and poor control of hypertension in primary care: cross-sectional study. *J.Hypertens.* 22:479-486, 2004
6. Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, Wright AD, Turner RC, Holman RR: Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 321:412-419, 2000
7. Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebich NH, Eberlein KA, Godwin J, Qizilbash N, Taylor JO, Hennekens CH: Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 335:827-838, 1990
8. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J.Hypertens.* 21:1011-1053, 2003
9. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T: Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104:2673-2678, 2001
10. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD: Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J.Clin.Invest* 97:2601-2610, 1996
11. Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, Yue DK, Betteridge DJ, Deanfield JE: Impaired vascular reactivity in insulin-

- dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J.Am.Coll.Cardiol.* 28:573-579, 1996
12. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 88:2149-2155, 1993
 13. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320:454-456, 1986
 14. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM: Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 102:1000-1006, 2000
 15. Prasad A, Zhu J, Halcox JP, Waclawiw MA, Epstein SE, Quyyumi AA: Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. *Circulation* 106:184-190, 2002
 16. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC, Jr., Sowers JR: Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 100:1134-1146, 1999
 17. Ross R: Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis* 131 Suppl:S3-S4, 1997
 18. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N.Engl.J.Med.* 340:115-126, 1999
 19. Raj L: Hypertension, endothelium, and cardiovascular risk factors. *Am.J.Med.* 90:13S-18S, 1991
 20. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F: Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 129:111-118, 1997
 21. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE: Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br.Heart J.* 74:247-253, 1995
 22. Anderson TJ, Elstein E, Haber H, Charbonneau F: Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF study). *J Am Coll Cardiol* 35:60-66, 2000
 23. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980

24. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N.Engl.J.Med.* 329:2002-2012, 1993
25. Vane JR, Botting RM: Secretory functions of the vascular endothelium. *J.Physiol Pharmacol.* 43:195-207, 1992
26. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P: Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N.Engl.J.Med.* 315:1046-1051, 1986
27. Bertrand ME: Provision of cardiovascular protection by ACE inhibitors: a review of recent trials. *Curr.Med.Res.Opin.* 20:1559-1569, 2004
28. Feletou M, Vanhoutte PM: Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 23:1082-1090, 1996
29. Feletou M, Vanhoutte PM: Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 93:515-524, 1988
30. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666, 1988
31. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43:109-142, 1991
32. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526, 1987
33. Lüscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM: Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 3:55-58, 1990
34. Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R: Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ.Res.* 82:686-695, 1998
35. Tschudi MR, Lüscher TF: [Nitric oxide: the endogenous nitrate in the cardiovascular system]. [Review] [104 refs] [German]. *Herz.* 21 Suppl 1:50-60, 1996
36. Moreau P, Takase H, Kung CF, Lüscher TF: [Effect of chronic inhibition of nitric oxide synthesis on vascular structure: remodeling or growth?]. [French]. *Arch Mal.Coeur.Vaiss.* 88:1141-1143, 1995
37. Oza NB, Schwartz JH, Goud HD, Levinsky NG: Rat aortic smooth muscle cells in culture express kallikrein, kininogen, and bradykininase activity. *J.Clin.Invest* 85:597-600, 1990

38. Schmaier AH, Kuo A, Lundberg D, Murray S, Cines DB: The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 263:16327-16333, 1988
39. Nolly H, Carbini LA, Scicli G, Carretero OA, Scicli AG: A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts. *Hypertension* 23:919-923, 1994
40. Groves P, Kurz S, Just H, Drexler H: Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. *Circulation* 92:3424-3430, 1995
41. Busse R, Lamontagne D: Endothelium-derived bradykinin is responsible for the increase in calcium produced by angiotensin-converting enzyme inhibitors in human endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 344:126-129, 1991
42. Pham I, Gonzalez W, Doucet J, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Michel JB: Effects of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase inhibitors: influence of bradykinin. *Eur.J.Pharmacol.* 296:267-276, 1996
43. Zhang X, Xie YW, Nasjletti A, Xu X, Wolin MS, Hintze TH: ACE inhibitors promote nitric oxide accumulation to modulate myocardial oxygen consumption [see comments]. *Circulation* 95:176-182, 1997
44. Brown NJ, Gainer JV, Stein CM, Vaughan DE: Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature. *Hypertension* 33:1431-1435, 1999
45. Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE: Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. *Thromb.Haemost.* 77:522-525, 1997
46. Minai K, Matsumoto T, Horie H, Ohira N, Takashima H, Yokohama H, Kinoshita M: Bradykinin stimulates the release of tissue plasminogen activator in human coronary circulation: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J.Am.Coll.Cardiol.* 37:1565-1570, 2001
47. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415, 1988
48. Pagano PJ, Lin L, Sessa WC, Nasjletti A: Arachidonic acid elicits endothelium-dependent release from the rabbit aorta of a constrictor prostanoid resembling prostaglandin endoperoxides. *Circ.Res.* 69:396-405, 1991
49. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J.Clin.Invest* 91:2546-2551, 1993
50. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S: Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br.J.Pharmacol.*, 2005

51. Dzau VJ: Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. *Basic Res.Cardiol.* 88 Suppl 1:1-14, 1993
52. Black MJ, Dilley RJ, Bobik A: Renin-dependent hypertension induces smooth muscle polyploidy in large and small vessels. *J.Hypertens.Suppl* 11 Suppl 5:S118-S119, 1993
53. Agrest A: [The renin saga]. *Medicina (B Aires)* 60:37-45, 2000
54. Hall JE, Coleman TG, Guyton AC: The renin-angiotensin system. Normal physiology and changes in older hypertensives. *J.Am.Geriatr.Soc.* 37:801-813, 1989
55. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW: Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 29:366-373, 1997
56. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F: Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 19:753-757, 1992
57. Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, Thone-Reineke C, El Hag K, Kusserow H, Elitok S, Bauer C, Neumayer HH, Rodman DM, Theuring F: Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 23:19-26, 2000
58. Masaki T: The discovery of endothelins. [Review] [14 refs]. *Cardiovasc.Res* 39:530-533, 1998
59. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Lüscher TF: Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 238:861-865, 1997
60. Matsuura A, Kawashima S, Yamochi W, Hirata K, Yamaguchi T, Emoto N, Yokoyama M: Vascular endothelial growth factor increases endothelin-converting enzyme expression in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 235:713-716, 1997
61. Corder R, Khan N, Barker S: Studies of endothelin-converting enzyme in bovine endothelial cells and vascular smooth-muscle cells: further characterization of the biosynthetic process. *J Cardiovasc.Pharmacol* 31 Suppl 1:S46-8, 1998
62. Noll G, Wenzel RR, Lüscher TF: Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. [Review] [105 refs]. *Mol.Cell Biochem* 157:259-267, 1996
63. Boulanger C, Luscher TF: Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J.Clin.Invest* 85:587-590, 1990

64. Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Sawaki M, Fukai D, Maeda Y, Kinoshita, M.: Effects of a specific endothelin-converting enzyme inhibitor on cardiac, renal, and neurohumoral functions in congestive heart failure: comparison of effects with those of endothelin A receptor antagonism. *Circulation* 99:570-577, 1999
65. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Lüscher TF: Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels [see comments]. *Circulation* 89:1203-1208, 1994
66. Taddei S, Vanhoutte PM: Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension* 21:9-15, 1993
67. Quaschnig T, Galle J, Wanner C: Vasopeptidase inhibition: a new treatment approach for endothelial dysfunction. *Kidney Int.Suppl*S54-S57, 2003
68. Clarke JG, Benjamin N, Larkin SW, Webb DJ, Davies GJ, Maseri A: Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men. *Am J Physiol* 257:H2033-5, 1989
69. Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF: Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J.Cell Physiol* 158:485-494, 1994
70. Quaschnig T, Kocak S, Bauer C, Neumayer HH, Galle J, Hocher B: Increase in nitric oxide bioavailability improves endothelial function in endothelin-1 transgenic mice. *Nephrol.Dial.Transplant.* 18:479-483, 2003
71. Ohara Y, Peterson TE, Sayegh HS, Subramanian RR, Wilcox JN, Harrison DG: Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. *Circulation* 92:898-903, 1995
72. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA: The clinical implications of endothelial dysfunction. *J.Am.Coll.Cardiol.* 42:1149-1160, 2003
73. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W: Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J.Clin.Invest* 100:2680-2690, 1997
74. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89:2462-2478, 1994
75. Weiss D, Sorescu D, Taylor WR: Angiotensin II and atherosclerosis. *Am.J.Cardiol.* 87:25C-32C, 2001

76. Dzau VJ: Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 37:1047-1052, 2001
77. Kawashima S: Malfunction of Vascular Control in Lifestyle-Related Diseases: Endothelial Nitric Oxide (NO) Synthase/NO System in Atherosclerosis. *J.Pharmacol.Sci.* 96:411-419, 2004
78. Kawashima S, Yokoyama M: Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:998-1005, 2004
79. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, Hirata K, Yasui H, Sakurai H, Yoshida Y, Masada M, Yokoyama M: Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J.Clin.Invest* 110:331-340, 2002
80. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Lüscher TF: Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ.Res.* 70:1191-1197, 1992
81. Hekman CM, Loskutoff DJ: Fibrinolytic pathways and the endothelium. *Semin.Thromb.Hemost.* 13:514-527, 1987
82. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ: Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N.Engl.J.Med.* 316:1371-1375, 1987
83. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK: Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6:131-138, 1986
84. van der Wal AC, Das PK, Bentz vdB, van der Loos CM, Becker AE: Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 61:166-170, 1989
85. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT: Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr.Opin.Lipidol.* 7:330-335, 1996
86. De Caterina R, Libby P: Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids* 31 Suppl:S57-S63, 1996
87. Steinberg D: Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J.Biol.Chem.* 272:20963-20966, 1997
88. Khoo JC, Miller E, McLoughlin P, Steinberg D: Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* 8:348-358, 1988

89. Khoo JC, Miller E, Pio F, Steinberg D, Witztum JL: Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. *Arterioscler.Thromb.* 12:1258-1266, 1992
90. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM: The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 16:831-842, 1996
91. Griendling KK, Alexander RW: Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 96:3264-3265, 1997
92. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM: Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J.Lipid Res.* 24:1070-1076, 1983
93. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC: Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J.Biol.Chem.* 272:21654-21659, 1997
94. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr.: Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N.Engl.J.Med.* 337:408-416, 1997
95. Falcone DJ, McCaffrey TA, Vergilio JA: Stimulation of macrophage urokinase expression by polyanions is protein kinase C-dependent and requires protein and RNA synthesis. *J.Biol.Chem.* 266:22726-22732, 1991
96. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D: Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:2995-2998, 1987
97. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ: Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344:254-257, 1990
98. Leonard EJ, Yoshimura T: Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol.Today* 11:97-101, 1990
99. Geng YJ, Libby P: Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am.J.Pathol.* 147:251-266, 1995
100. Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL: The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu.Rev.Med.* 43:219-225, 1992

101. Stopeck AT, Nicholson AC, Mancini FP, Hajjar DP: Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J.Biol.Chem.* 268:17489-17494, 1993
102. Hajjar DP, Haberland ME: Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J.Biol.Chem.* 272:22975-22978, 1997
103. Potter DD, Sobey CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD: Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation* 98:800-807, 1998
104. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148, 1994
105. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 271:23317-23321, 1996
106. Zhang H, Schmeisser A, Garlichs CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, Daniel WG: Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc.Res.* 44:215-222, 1999
107. Yanagitani Y, Rakugi H, Okamura A, Moriguchi K, Takiuchi S, Ohishi M, Suzuki K, Higaki J, Ogihara T: Angiotensin II type 1 receptor-mediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension* 33:335-339, 1999
108. Keidar S, Kaplan M, Hoffman A, Aviram M: Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 115:201-215, 1995
109. Scheidegger KJ, Butler S, Witztum JL: Angiotensin II increases macrophage-mediated modification of low density lipoprotein via a lipoxygenase-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* 272:21609-21615, 1997
110. Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W: Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 257:826-828, 1999
111. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J: Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ.Res.* 86:1266-1272, 2000
112. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB: Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20:645-651, 2000

113. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM: Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J.Clin.Invest* 92:1866-1874, 1993
114. Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE: Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* 87:1969-1973, 1993
115. Vaughan DE, Lazos SA, Tong K: Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *J.Clin.Invest* 95:995-1001, 1995
116. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D: Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:5252-5256, 1991
117. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN: Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J.Clin.Invest* 88:1121-1127, 1991
118. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM: Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 83:952-959, 1998
119. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J: Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 95:1532-1541, 1997
120. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H: Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 101:1372-1378, 2000
121. Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y, Kano S: Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am.J.Physiol* 260:H1713-H1717, 1991
122. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T: Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243-1254, 1995
123. Fyhrquist F, Kuitunen P, Kojo N: Renin-angiotensin system in an infant with malignant renovascular hypertension. *Helv.Paediatr.Acta* 31:61-65, 1976

124. Chobanian AV, Lichtenstein AH, Nilakhe V, Haudenschild CC, Drago R, Nickerson C: Influence of hypertension on aortic atherosclerosis in the Watanabe rabbit. *Hypertension* 14:203-209, 1989
125. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW: Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J.Hypertens.* 16:291-303, 1998
126. Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW: Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 30:1628-1633, 1997
127. Vanhoutte PM, Boulanger CM: Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens.Res.* 18:87-98, 1995
128. Barger AC: Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the regulation of blood pressure. *Adv.Nephrol.Necker Hosp.* 9:271-293, 1980
129. Schmidt-Ott KM, Kagiya S, Phillips MI: The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul.Pept.* 93:65-77, 2000
130. Esther CR, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, Capecchi MR, Bernstein KE: The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J.Clin.Invest* 99:2375-2385, 1997
131. Johnston CI: Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair, and remodeling. *Hypertension* 23:258-268, 1994
132. Zhuo J, Casley D, Murone C, Mendelsohn FA: Acute and chronic in vivo inhibition of angiotensin-converting enzyme by perindopril in the endothelium and adventitia of large arteries and organs of the rabbit. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 29:297-310, 1997
133. Fukuhara M, Geary RL, Diz DI, Gallagher PE, Wilson JA, Glazier SS, Dean RH, Ferrario CM: Angiotensin-converting enzyme expression in human carotid artery atherosclerosis. *Hypertension* 35:353-359, 2000
134. Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ: Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94:2756-2767, 1996
135. Yang HY, Erdos EG, Levin Y: A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim.Biophys.Acta* 214:374-376, 1970
136. Erdos EG, Yang HY: An enzyme in microsomal fraction of kidney that inactivates bradykinin. *Life Sci.* 6:569-574, 1967
137. Dell'Italia LJ, Oparil S: Bradykinin in the heart: friend or foe? *Circulation* 100:2305-2307, 1999

138. Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ: Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N.Engl.J.Med.* 339:1285-1292, 1998
139. Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM, Husain A: Measurement of angiotensin I converting enzyme inhibition in the heart. *Circ.Res.* 73:51-60, 1993
140. Dell'Italia LJ, Rocic P, Lucchesi PA: Use of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with diabetes and coronary artery disease. *Curr.Probl.Cardiol.* 27:6-36, 2002
141. Hsueh WA, Anderson PW: Systemic hypertension and the renin-angiotensin system in diabetic vascular complications. *Am.J.Cardiol.* 72:14H-21H, 1993
142. Grisk O, Rose HJ, Lorenz G, Rettig R: Sympathetic-renal interaction in chronic arterial pressure control. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 283:R441-R450, 2002
143. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K: Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N.Engl.J.Med.* 346:1954-1962, 2002
144. Grisk O, Rettig R: Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovasc.Res.* 61:238-246, 2004
145. Johansson M, Friberg P: Role of the sympathetic nervous system in human renovascular hypertension. *Curr.Hypertens.Rep.* 2:319-326, 2000
146. Palatini P: Sympathetic overactivity in hypertension: a risk factor for cardiovascular disease. *Curr.Hypertens.Rep.* 3 Suppl 1:S3-S9, 2001
147. Shimamoto K, Matsuki T, Iimura O: Angiotensin-converting enzyme inhibitors and the kallikrein-kinin system. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 15 Suppl 6:S83-S90, 1990
148. Baumgarten CR, Linz W, Kunkel G, Scholkens BA, Wiemer G: Ramiprilat increases bradykinin outflow from isolated hearts of rat. *Br.J.Pharmacol.* 108:293-295, 1993
149. Arzilli F, Magagna A, Giovannetti R, Nuccorini A, Salvetti A: Acute dose-response curve of enalapril in renovascular hypertensives. *Am.J.Hypertens.* 1:75S-78S, 1988
150. Dohi Y, Criscione L, Pfeiffer K, Lüscher TF: Angiotensin blockade or calcium antagonists improve endothelial dysfunction in hypertension: studies in perfused mesenteric resistance arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 24:372-379, 1994
151. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Mattei P, Salvetti A: Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on endothelium- dependent vasodilatation in essential hypertensive patients. *J Hypertens* 16:447-456, 1998

152. Hernandez-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Ortega L, Egido J: ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF-kappaB-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am.J.Pathol.* 153:1825-1837, 1998
153. Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Lusis AJ: Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J.Clin.Invest* 91:2572-2579, 1993
154. Schiffrin EL, Touyz RM: From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 287:H435-H446, 2004
155. Weber KT: Cardioreparation in hypertensive heart disease. *Hypertension* 38:588-591, 2001
156. Safar ME, London GM, Plante GE: Arterial stiffness and kidney function. *Hypertension* 43:163-168, 2004
157. Burrell LM, Farina NK, Balding LC, Johnston CI: Beneficial renal and cardiac effects of vasopeptidase inhibition with S21402 in heart failure. *Hypertension* 36:1105-1111, 2000
158. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators [see comments] [published errata appear in *N Engl J Med* 2000 Mar 9;342(10):748 and 2000 May 4;342(18):1376]. *N.Engl.J Med.* 342:145-153, 2000
159. Vaughan DE, Rouleau JL, Ridker PM, Arnold JM, Menapace FJ, Pfeffer MA: Effects of ramipril on plasma fibrinolytic balance in patients with acute anterior myocardial infarction. HEART Study Investigators. *Circulation* 96:442-447, 1997
160. Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Montague TJ, Teo KK, Benedict CR, Pitt B: Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation* 90:2056-2069, 1994
161. Brown NJ, Agirbasli MA, Williams GH, Litchfield WR, Vaughan DE: Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1. *Hypertension* 32:965-971, 1998
162. Raj L: Workshop: hypertension and cardiovascular risk factors: role of the angiotensin II-nitric oxide interaction. *Hypertension* 37:767-773, 2001
163. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B: Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery

- disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 94:258-265, 1996
164. Rachmani R, Lidar M, Brosh D, Levi Z, Ravid M: Oxidation of low-density lipoprotein in normotensive type 2 diabetic patients. Comparative effects of enalapril versus nifedipine: a randomized cross-over over study. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 48:139-145, 2000
165. Burnett JC: Vasopeptidase inhibition: a new concept in blood pressure management. *J Hypertens Suppl* 17:S37-S43, 1999
166. Campbell DJ: Vasopeptidase inhibition: a double-edged sword? *Hypertension* 41:383-389, 2003
167. Graf K, Koehne P, Grafe M, Zhang M, Auch-Schwelk W, Fleck E: Regulation and differential expression of neutral endopeptidase 24.11 in human endothelial cells. *Hypertension* 26:230-235, 1995
168. Erdos EG, Skidgel RA: Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. [Review] [42 refs]. *FASEB Journal* 3:145-151, 1989
169. Dussaule JC, Stefanski A, Bea ML, Ronco P, Ardaillou R: Characterization of neutral endopeptidase in vascular smooth muscle cells of rabbit renal cortex. *Am J Physiol* 264:F45-52, 1993
170. Zuber M, Kiowski W, Huser B, Erne P, Buhler FR, Thiel G: Atrial natriuretic peptide release and volume regulation following kidney transplantation. *Clin.Nephrol* 40:91-95, 1993
171. An MR, Chung YJ, Kang DG, Nam SC, Lee J: Augmented expression of cardiac atrial natriuretic peptide system in hypertensive rats. *J.Korean Med.Sci.* 14:497-501, 1999
172. Burnett JC, Kao PC, Hu DC, Hesser DW, Heublein D, Granger JP, Opgenorth TJ, Reeder GS: Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science* 231:1145-1147, 1986
173. Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC, Jr.: Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 62:191-195, 1988
174. Kim SW, Lee JU, Kim NH, Choi KC: Effects of altered body fluid balance and high blood pressure on the plasma brain natriuretic peptide in rats. *J.Korean Med.Sci.* 12:117-122, 1997
175. Wijeyaratne CN, Moulton PJ: The effect of alpha human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 76:343-346, 1993

176. Yang RH, Jin HK, Wyss JM, Chen YF, Oparil S: Pressor effect of blocking atrial natriuretic peptide in nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 19:198-205, 1992
177. Schultz HD, Gardner DG, Deschepper CF, Coleridge HM, Coleridge JC: Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *Am.J.Physiol* 255:R6-13, 1988
178. Harris PJ, Thomas D, Morgan TO: Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 326:697-698, 1987
179. Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M: Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 324:473-476, 1986
180. Janssen WM, de Zeeuw D, van der Hem GK, de Jong PE: Antihypertensive effect of a 5-day infusion of atrial natriuretic factor in humans. *Hypertension* 13:640-646, 1989
181. Nawarskas J, Rajan V, Frishman WH: Vasopeptidase inhibitors, neutral endopeptidase inhibitors, and dual inhibitors of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase. *Heart Dis.* 3:378-385, 2001
182. Maki T, Nasa Y, Tanonaka K, Takahashi M, Takeo S: Direct inhibition of neutral endopeptidase in vasopeptidase inhibitor-mediated amelioration of cardiac remodeling in rats with chronic heart failure. *Molecular and Cellular Biochemistry* 254:265-273, 2003
183. Davidson NC, Barr CS, Struthers AD: C-type natriuretic peptide. An endogenous inhibitor of vascular angiotensin-converting enzyme activity. *Circulation* 93:1155-1159, 1996
184. Johnston CI, Phillips PA, Arnolda L, Mooser V: Modulation of the renin-angiotensin system by atrial natriuretic peptide. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 16 Suppl 7:S43-S46, 1990
185. Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Imura H: Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J Clin Invest* 90:1145-1149, 1992
186. Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM, Wei CM, Pittelkow MR, Burnett JC, Jr.: Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. *Am J Physiol* 263:H1318-21, 1992
187. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H: C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 168:863-870, 1990

188. Levin ER, Gardner DG, Samson WK: Natriuretic peptides. *N.Engl.J.Med.* 339:321-328, 1998
189. Chen HH, Burnett JC, Jr.: C-type natriuretic peptide: The endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc.Pharmacol* 32:(pp S22-S28), 1998
190. Ueno H, Haruno A, Morisaki N, Furuya M, Kangawa K, Takeshita A, Saito, Y.: Local expression of C-type natriuretic peptide markedly suppresses neointimal formation in rat injured arteries through an autocrine/paracrine loop. *Circulation* 96:2272-2279, 1997
191. Ohno N, Itoh H, Ikeda T, Ueyama K, Yamahara K, Doi K, Yamashita J, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yurugi T, Kook H, Komeda M, Nakao K: Accelerated reendothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit jugular vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide. *Circulation* 105:1623-1626, 2002
192. Campbell DJ, Anastasopoulos F, Duncan AM, James GM, Kladis A, Briscoe, TA.: Effects of neutral endopeptidase inhibition and combined angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase inhibition on angiotensin and bradykinin peptides in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 287:567-577, 1998
193. French JF, Anderson BA, Downs TR, Dage RC: Dual inhibition of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase in rats with hypertension. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 26:107-113, 1995
194. Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, Nakao K: Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. *Hypertens.Res.* 26 Suppl:S93-S98, 2003
195. Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi-Kobayashi T, Park K, Nakao K: Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 544:86-92, 2003
196. Doi K, Ikeda T, Itoh H, Ueyama K, Hosoda K, Ogawa Y, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Fukunaga Y, Saito T, Sone M, Yamahara K, Kook H, Komeda M, Ueda M, Nakao K: C-type natriuretic peptide induces redifferentiation of vascular smooth muscle cells with accelerated reendothelialization. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:930-936, 2001
197. Dumoulin MJ, Adam A, Rouleau JL, Lamontagne D: Comparison of a vasopeptidase inhibitor with neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme inhibitors on bradykinin metabolism in the rat coronary bed. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 37:359-366, 2001

198. Pu Q, Larouche I, Schiffrin EL: Effect of dual angiotensin converting enzyme/neutral endopeptidase inhibition, angiotensin converting enzyme inhibition, or AT1 antagonism on coronary microvasculature in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Hypertens.* 16:931-937, 2003
199. Abassi ZA, Zeid S, Yahia A, Winaver J, Hoffman A: Cardiac and renal effects of omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor, in rats with heart failure: Comparison with enalapril. *Am J Hypertens* 16:84A, 2003
200. Weckler N, Leitzbach D, Kalinowski L, Malinski T, Busch AE, Linz W: Effect of chronic treatment with the vasopeptidase inhibitor AVE 7688 and ramipril on endothelial function in atherogenic diet rabbits. *J.Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 4:191-196, 2003
201. d'Uscio LV, Quaschnig T, Burnett JC, Jr., Luscher TF: Vasopeptidase Inhibition Prevents Endothelial Dysfunction of Resistance Arteries in Salt-Sensitive Hypertension in Comparison With Single ACE Inhibition. *Hypertension* 37:28-33, 2001
202. Trippodo NC, Robl JA, Asaad MM, Fox M, Panchal BC, Schaeffer TR: Effects of omapatrilat in low, normal, and high renin experimental hypertension. *Am.J.Hypertens.* 11:363-372, 1998
203. Schafer S, Linz W, Rutten H, Bleich M, Busch AE: The vasopeptidase inhibitor AVE7688 reduces nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetologia* 46:A345, 2003
204. Schafer S, Linz W, Vollert H, Biemer-Daub G, Rutten H, Bleich M, Busch AE: The vasopeptidase inhibitor AVE7688 ameliorates Type 2 diabetic nephropathy. *Diabetologia* 47:98-103, 2004
205. Schafer S, Schmidts HL, Bleich M, Busch AE, Linz W: Nephroprotection in Zucker diabetic fatty rats by vasopeptidase inhibition is partly bradykinin B2 receptor dependent. *Br.J.Pharmacol.* 143:27-32, 2004
206. Goldblatt, H. L. J. and Hanzal, R. F. Studies on experimental hypertension: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp.Med.* 59, 347-379. 1934.

Ref Type: Generic

207. Weber KT, Janicki JS, Pick R, Capasso J, Anversa P: Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. *Am.J.Cardiol.* 65:1G-7G, 1990
208. Nystrom HC, Jia J, Johansson M, Lambert G, Bergstrom G: Neurohormonal influences on maintenance and reversal of two-kidney one-clip renal hypertension. *Acta Physiol Scand.* 175:245-251, 2002

209. Sharifi AM, Akbarloo N, Heshmatian B, Ziai A: Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension. *Pharmacol.Res.* 47:201-209, 2003
210. Lüscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von Segesser L, Yang ZH, Turina M, Gradel E, Weber E: Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 319:462-467, 1988
211. Barton M, d'Uscio LV, Shaw S, Meyer P, Moreau P, Lüscher TF: ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 31:499-504, 1998
212. Quaschnig T, Ruschitzka F, Stallmach T, Shaw S, Morawietz H, Goettsch W, Hermann M, Slowinski T, Theuring F, Hoher B, Luscher TF, Gassmann M: Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice. *FASEB J.*, 2002
213. Sampaio RC, Tanus-Santos JE, Melo SE, Hyslop S, Franchini KG, Luca IM, Moreno H, Jr.: Hypertension plus diabetes mimics the cardiomyopathy induced by nitric oxide inhibition in rats. *Chest* 122:1412-1420, 2002
214. Schneider R, Raff U, Vornberger N, Schmidt M, Freund R, Reber M, Schramm L, Gambaryan S, Wanner C, Schmidt HH, Galle J: L-Arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int.* 64:216-225, 2003
215. Widdop RE, Li XC: A simple versatile method for measuring tail cuff systolic blood pressure in conscious rats. *Clin.Sci.(Lond)* 93:191-194, 1997
216. Quaschnig T, d'Uscio LV, Shaw S, Luscher TF: Vasopeptidase inhibition exhibits endothelial protection in salt-induced hypertension. *Hypertension* 37:1108-1113, 2001
217. Bauersachs J, Fleming I, Fraccarollo D, Busse R, Ertl G: Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc.Res.* 51:344-350, 2001
218. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ.Res.* 47:1-9, 1980
219. Trippodo NC, Robl JA, Asaad MM, Bird JE, Panchal BC, Schaeffer TR, Fox, M, Giancarli MR, Cheung HS: Cardiovascular effects of the novel dual inhibitor of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme BMS-182657 in experimental hypertension and heart failure. *J Pharmacol Exp Ther.* 275:745-752, 1995

220. Cardillo C, Campia U, Iantorno M, Panza JA: Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension* 43:36-40, 2004
221. Sventek P, Turgeon A, Garcia R, Schiffrin EL: Vascular and cardiac overexpression of endothelin-1 gene in one-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats but only in the late phase of two-kidney one clip Goldblatt hypertension. *J.Hypertens.* 14:57-64, 1996

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. C. Wanner danke ich für die Ermöglichung der Promotion in der nephrologischen Abteilung des Instituts für Innere Medizin der Universität Würzburg.

Herrn PD Dr. med. J. Galle danke ich für die Betreuung im nephrologischen Forschungslabor des Instituts für Innere Medizin der Universität Würzburg.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. T. Quaschnig für die Überlassung des Promotionsthemas, seine Hilfsbereitschaft und Geduld, die er mir trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung bei der Betreuung der Arbeit entgegenbrachte.

Auch danke ich ihm sehr für die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts.

Den Mitarbeiterinnen des nephrologischen Forschungslabors und insbesondere Frau Carmen Bauer danke ich herzlich für das Einarbeiten in die Methodik zur Erstellung der Versuche.

Meinen Eltern danke ich für das Ermöglichen des Medizinstudiums und die kontinuierliche Unterstützung und Motivation zur Durchführung desselben.

Darüber hinaus danke ich allen, die direkt und indirekt zum Gelingen der Arbeit beitrugen, indem sie mir durch ihren Rat und ihre Unterstützung behilflich waren.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Rühl
Vorname: Sabine
Geburtsdatum: 20.01.1978
Geburtsort: Marburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

07/84–06/90 Grundschule Dautphetal
07/90–06/95 Gymnasium Lahntalschule Biedenkopf
07/95–06/97 Gymnasium Martin-Luther-Schule Marburg
08-11/94 4-monatiger High-School-Aufenthalt an der Forest High School in Ocala, Florida / USA

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

04/98–11/04 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/00 Physikum
03/01 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
09/03 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
11/04 3. Teil der Ärztlichen Prüfung

FAMULATUREN UND PRAKTISCHE ERFAHRUNGEN

08-09/97 2-monatiges Krankenpflegepraktikum in der chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Marburg
09/00 4-wöchige Famulatur in der Pathologie der Universitätsklinik Würzburg
08-09/01 6-wöchige Famulatur in der Chirurgie des Kantonsspitals Herisau / Schweiz
09/02 4-wöchige Famulatur in der Praxis für Neurochirurgie Dr. E. Ferran Rico, Barcelona / Spanien
02/03 3-wöchige Famulatur in der Inneren Medizin der Universitätsklinik Würzburg

01-04/98	Ausbildung zur Rettungssanitäterin an der Schule des Marburger Krankenpflegeteams in Marburg
99 – 01	Rettungssanitäterin beim DRK Mittelhessen
09/01 – 03/02	Studentische Hilfskraft im nephrologischen Forschungslabor bei Prof. Dr. J. Galle, Medizinische Klinik, Uniklinik Würzburg

DISSERTATION

Einfluss des Vasopeptidaseinhibitors AVE7688 auf Blutdrucksenkung und Endothelfunktion bei renovaskulärer Hypertonie im Vergleich zu dem ACE-Hemmer Ramipril

Tierexperimentelle Arbeit an der Organkammer in der Abteilung für Innere Medizin der Universität Würzburg bei Prof. Dr. Wanner

PRAKTISCHES JAHR

10/03-11/03	1. Hälfte des chirurgischen PJ-Tertials in der Kinderchirurgie der Clinica San Juan de Dios, Universidad de San Augustin, Arequipa / Peru
12/03-01/04	2. Hälfte des chirurgischen PJ-Tertials in der Allgemein Chirurgie des Hospital Goyeneche, Universidad de San Augustin, Arequipa / Peru
02/04-05/04	Internistisches PJ-Tertial an der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg, Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg
06/04-09/04	Pädiatrisches PJ-Tertial am Inselspital, Universität Bern

BERUFLICHE AUSBILDUNG

05/05-04/06	Assistenzärztin in der Neurochirurgischen Rehabilitationsklinik Holthausen in Hattingen
Seit 05/06	Assistenzärztin der Pädiatrie, Bethanienkrankenhaus, Moers