

INSTITUT für PHARMAKOLOGIE
der HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Direktor: Prof. K. Schrör

Wirkungen von NO bei Atherosklerose
Einfluss von Geschlecht, Blutgefäßbett und NO-Bildungsort

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
BJÖRN HÜSGEN

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Labisch M.A.

Dekan

Referent:

Priv. Doz. Dr. rer. nat. G. Kojda

Korreferent:

Prof. Dr. med. M. Kelm

Inhaltsverzeichnis

A	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
1.0	Einleitung	3
1.1	Organische Nitrate	3
1.2	Endothelfunktion und Atherosklerose	8
1.2.1	Endothel	8
1.2.2	Endothelläsion und Atherosklerose	11
1.3	Fragestellung	18
2.0	Material und Methoden	21
2.1	Untersuchungssubstanzen und Lösungen	21
2.1.1	Organische Nitrovasodilatoren	21
2.1.2	Sonstige verwendete Substanzen	22
2.1.3	Präparation von Oxyhämoglobin	22
2.1.4	Präparation der Stammlösungen	23
2.2	Physiologische Nähr- und Pufferlösung	24
2.3	Versuchstiere	25
2.3.1	Tierhaltung	25
2.3.2	Fütterung der an der Atherosklerosestudie teilnehmenden Tiere	25
2.4	Blutgefäße	26
2.5	Studien an isolierten Gefäßsegmenten	26
2.5.1	Versuchsapparatur	26
2.5.2	Präparation	27
2.5.3	Versuchsprotokoll	29
2.5.4	Auswertung	31
2.5.5	Statistik	31
2.5.6	Gefäßbadreinigung	32
2.6	Färbung und Bestimmung der atherosklerotischen Fläche	32
2.6.1	Fixierung der Präparate	32

2.6.2	Färbung der Präparate mit Sudan IV	32
2.6.3	Fotografieren der Aortenpräparate	33
2.6.4	Bestimmung der Ausdehnung der atherosklerotischen Gefäßveränderungen	33
2.7	Bestimmung der Blutfette	33
3.0	Ergebnisse	36
3.1	In-vitro-Studie	36
3.1.1	Kontraktile Eigenschaften gesunder Gefäße	36
3.1.2	Einfluss des Endothels auf den Gefäßtonus gesunder Gefäße ..	37
3.1.3	Einfluss Organischer Nitrate und spontaner NO-Donoren auf den Gefäßtonus gesunder Gefäße	39
3.2	In-vivo-Studie	47
3.2.1.	Plasmalipide	47
3.2.2	Atherosklerotische Läsionen	47
3.2.3	Einfluss von Plasmacholesterol auf Intimaschäden	48
3.2.4	Kontraktile Eigenschaften atherosklerotischer Gefäße	49
3.2.5	Einfluss des Endothels auf den Gefäßtonus atherosklerotischer Gefäßsegmente	51
3.2.6	Einfluss von Organischen Nitraten und spontanen NO- Donoren auf den Gefäßtonus atherosklerotischer Gefäße	52
3.2.7	Effekte von Oxyhämoglobin und Superoxid Dismutase	55
4.0	Diskussion	57
4.1	Organbadstudien	57
4.1.1	Wirkung von Vasokonstriktoren	57
4.1.1.1	In-vitro-Studie	57
4.1.1.2	In-vivo-Studie	58
4.1.2	Endothelabhängige Vasorelaxation	59
4.1.2.1	Endothelabhängige Vasorelaxation, In-vitro- Studie	59

4.1.2.2	Endothelabhängige Vasorelaxation, In-vivo-Studie	60
4.1.3	Vasodilatation durch Nitrovasodilatoren	62
4.2	In-vitro-Studie	65
4.2.1	Bevorzugt venöse Gefäßerweiterung	65
4.2.2	Klinischer Bezug	68
4.3	In-vivo-Studie	70
4.3.1	Entwicklung einer experimentellen Atherosklerose	70
4.3.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede der Atherosklerosegenese	71
4.4	Zusammenfassung/Abstract	73
5.0	Literaturverzeichnis	74
	Publikationsverzeichnis	83
	Danksagungen	83
	Lebenslauf	84

A Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACh	Acetylcholin
ATP	Adenosintriphosphorsäure
BSG	Blutkörperniederschlagsgeschwindigkeit
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
EC ₅₀	Konzentration zur halbmaximalen Hemmung der Vorkontraktion
EDRF	Endothelial Derived Relaxing Factor (= NO)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
GTN	Glyceroltrinitrat
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HDL	High-Density-Lipoproteine
HWZ	Halbwertszeit
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbidmononitrat
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
LDL	Low-Density-Lipoproteine
n	Anzahl der eingesetzten Messwerte
NO	Stickstoffmonoxid
NaCl	Natriumchlorid
nNOS	neuronal NO-Synthase
NOS	NO-Synthase

o.g.	oben genannt
oxLDL	allgemeine Schreibweise für oxidiertes LDL
p	Signifikanzniveau
pD ₂ -Wert	Substanzkonzentration, die zu einer halbmaximalen Wirkung führt
PETN	Pentaerythrityltetranitrat
PHE	Phenylephrin
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
sGC	soluble guanylate cyclase (Guanylat cyclase)
SIN-1	3-Morpholino-Sydnonimin
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin
SOD	Cu ²⁺ /Zn ²⁺ -Superoxiddismutase
U	Units (= Einheiten)
VLDL	Very-Low-Density-Lipoproteine
V/V	Volumen pro Volumen

1.0 Einleitung

1.1 Organische Nitrate

In den Zivilisationsländern gehen etwa die Hälfte aller Todesfälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zurück. Sie stehen an der Spitze aller Todesursachen.

In der Bundesrepublik Deutschland leiden 5 bis 10 % der männlichen Bevölkerung an einer koronaren Herzkrankheit, die fast immer atherosklerotisch bedingt ist. Mit nahezu 50 % nimmt diese Krankheitsgruppe den mit Abstand größten Anteil der Ursachen von Frühinvalidität ein. Die koronare Herzkrankheit führt über eine Koronarperfusionsverminderung zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Bedarf am Herzmuskel, zur Myokardischämie. Folgen können die stabile und instabile Angina pectoris, Myokardinfarkt, Rhythmusstörungen einschließlich des plötzlichen Herztodes sowie die Ausbildung einer Herzinsuffizienz sein.

Ziel einer Intervalltherapie bei koronarer Herzkrankheit ist es, den Angina pectoris-Anfall zu vermeiden (Anfallsprophylaxe) bzw. die Anfallsfrequenz zu vermindern. Dies führt zu einer Steigerung der Belastbarkeit und zur Verbesserung der Lebensqualität.

In der Intervalltherapie spielen organische Nitrate eine wichtige Rolle. In der Akuttherapie eines Angina pectoris-Anfalls ist Glyceroltrinitrat das Mittel der Wahl.

Im Rahmen einer koronaren Ischämie fällt in minderperfundierten Myokardarealen aufgrund eines akuten Energiemangels die Kontraktionsfähigkeit aus [6], so dass sich diese Wandteile in der Systole passiv nach außen bewegen. Dies äußert sich in einer Abnahme der Auswurfraction und einer Zunahme des enddiastolischen Volumens [132]. Das erhöhte Herzvolumen führt zu einer Steigerung des sog. „Wandstress“ [6], was indirekt eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs zur Folge hat.

Organische Nitrovasodilatoren entwickeln ihre antianginösen Effekte in der Therapie der Angina pectoris sowohl im venösen, als auch im arteriellen Stromgebiet.

Auf der einen Seite weisen organische Nitrate eine direkte koronardilatatorische Wirkung auf, was besonders im Bereich exzentrischer Stenosen extramuraler Koronarien und größerer intramuraler Koronararterien ausgeprägt ist (70 % aller Stenosen) [67].

Diese pathologisch veränderten Gefäßabschnitte sind in der Regel kontrahiert, was den proximalen Koronarwiderstand zusätzlich erhöht. Organische Nitrate vermögen solche Stenosen im Mittel um 30 % zu erweitern [132].

Nitrate führen nicht zu einer Dilatation arterieller Widerstandsgefäße im Myokard.

Diese sind in poststenotischen Gefäßabschnitten durch Autoregulation via Adenosin bereits maximal dilatiert. So kommt es nach einer Erweiterung der proximal gelegenen Stenose zu einer Umverteilung des Blutflusses in diese minderperfundierte Areale („positiv steal“) [222]. Auf der anderen Seite kommt es zu einer Vasodilatation im venösen Stromgebiet („venöses Pooling“) mit Reduktion des venösen Blutrückstroms zum Herzen (Abb. 1.1). Das Blut wird in Abdomen und Extremitäten umverteilt. Die Vorlastsenkung führt zu einer Verminderung des linksventrikulären Füllungsdruckes mit Reduktion der Wandspannung und somit zu einer Entlastung des Herzens, da die Auswurfleistung des Herzens vom enddiastolischen Ventrikelvolumen abhängig ist. Die Kontraktionskraft nimmt zunächst proportional der Herzmuskelfaserlänge zu, um nach Überschreiten einer kritischen Länge wieder abzufallen. Diese Zusammenhänge werden als Frank-Starling-Mechanismus bezeichnet.

Der Ventrikel, der unter ischämischen Bedingungen eine Kugelform angenommen hat, nimmt wieder eine elliptische Form ein. Die Wiederherstellung der physiologischen Relation zwischen Quer- und Längsachse des Ventrikels bedingt eine Abnahme des Wandstress mit Verminderung des Sauerstoffbedarfs sowie eine Ökonomisierung der Herzarbeit. Weiter von Bedeutung ist eine subendokardiale Druckentlastung, die eine Reperfusion ermöglicht, da im Rahmen der Ischämie der Durchblutungsmangel häufig auf subendokardiale Bereiche beschränkt ist [132].

In hohen Dosen weisen organische Nitrate außer einer im Vordergrund stehenden vorlastsenkenden Wirkung auch eine Verminderung der Nachlast auf (Abb. 1.1). Theoretisch geht dies ebenfalls mit einer Verminderung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs einher. Von wenigen Ausnahmen abgesehen ist dieser Effekt jedoch als unerwünscht zu werten, da es hierdurch vermutlich zu den typischen Nebenwirkungen organischer Nitrate kommt. Die periphere arterielle Vasodilatation führt zu einem Absinken des Blutdrucks mit Orthostasereaktion. Dadurch kann es zu einer reflektorischen Erhöhung der Herzfrequenz und somit des kardialen Sauerstoffverbrauchs kommen. Der koronare Perfusionsdruck nimmt hierdurch ebenfalls ab, was zu einer Verminderung des koronaren Blutflusses und damit des koronaren Sauerstoffangebotes führt.

Ferner vermutet man, dass eine nitratinduzierte arterielle Vasodilatation in der zerebralen Zirkulation zum sog. „Nitratkopfschmerz“ führt.

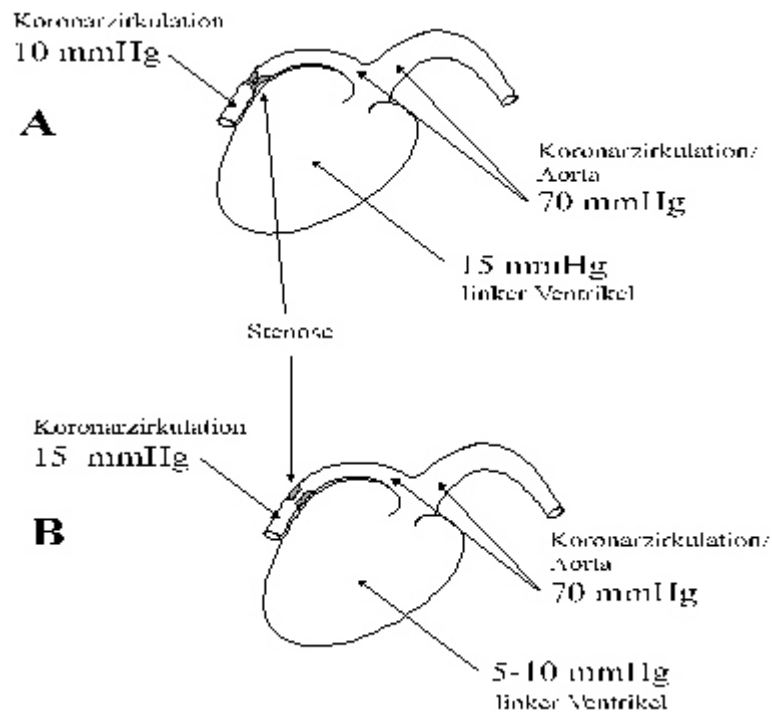


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der enddiastolischen Blutdrücke (mmHg) in Herz, Aorta und Koronarien vor und nach einer koronaren Stenose. Abbildung **A** stellt die Situation vor und Abbildung **B** nach Nitratapplikation dar. Bei erhöhtem enddiastolischem Ventrikeldruck sowie bei poststenotisch erniedrigtem koronaren Perfusionsdruck (**A**) ist eine suffiziente Durchblutung besonders der subendothelialen Myokardarealen nicht gewährleistet. Organischen Nitrates führen zu einer Senkung der Herzvorlast durch venöse Vasodilatation mit Reduzierung des enddiastolischen Ventrikeldrucks sowie zu einer Koronardilatation im stenosierte Gefäßabschnitt mit Verbesserung der myokardialen Durchblutung und Erhöhung des Sauerstoffangebots. Gleichzeitig ökonomisiert die Umkehrung der Druckverhältnisse die Herzarbeit und vermindern den Sauerstoffbedarf, da das Herz ein geringeres Blutvolumen auswerfen muss.

Die hämodynamische Wirksamkeit organischer Nitrates beruht auf deren Fähigkeit glatte Gefäßmuskulatur zu relaxieren. Diese Wirkung wird auf zellulärer Ebene über die Stimulation der zytosolischen löslichen Guanylatzyklase eingeleitet. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP), einem intrazellulären Botenstoff („second messenger“), der eine Absenkung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt und infolgedessen die Relaxation glatter Muskelzellen vermittelt (Abb. 1.3).

Von der zytosolischen löslichen Guanylatzyklase unterscheidet man ein Isoenzym, die membrangebundene Guanylatzyklase [27]. Dieses Isoenzym ist jedoch für die durch Nitrate induzierte Vasorelaxation nicht von Bedeutung. Es vermittelt die Vasorelaxation durch das Vorhofhormon (ANF, atrialer natriuretischer Faktor) [156].

Daneben scheint NO cGMP unabhängig Kaliumkanäle in glatten Muskelzellen zu aktivieren ($\Rightarrow$ Hyperpolarisation $\Rightarrow$ Vasodilatation) [28].

Der heterogenen Gruppe der organischen Nitrovasodilatoren ist gemeinsam, dass sie als inaktive Vorstufen („prodrugs“) zur Anwendung kommen. Erst durch Zerfall wird ein pharmakologisch aktiver Metabolit freigesetzt [97;31], der radikalem Stickstoffmonoxid entspricht [98;58] und im Inneren der Gefäßmuskelzelle seine Wirkung entfaltet.

Trotz eines nahezu identischen pharmakologischen Wirkprofils differieren die Pharmaka bezüglich Pharmakokinetik, Wirkungseintritt und Wirkungsdauer sowie in ihrer chemischen Struktur (Abb. 1.2) [4].

Grundsätzliche Unterschiede bestehen hinsichtlich der Freisetzung von NO [166]. Daher teilt man die Gruppe der Nitrovasodilatoren in die Untergruppen organische Nitrate und spontane NO-Donoren ein. Substanzen, deren chemisches Merkmal ein organischer Nitraterster ist, wie Glyceroltrinitrat, Isosorbiddinitrat, Isosorbidmononitrat und Pentaerythryltetranitrat werden enzymatisch in der Gefäßwand bioaktiviert [38;59;26]. Das verantwortliche Enzym konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Wahrscheinlich sind mehrere Enzymsysteme an der Bioaktivierung der organischen Nitrate beteiligt [4]. Einige Untersuchungen ergaben Hinweise auf einen Cytochrom P-450 abhängigen Enzymkomplex [26] sowie auf eine Beteiligung der Glutathion-S-Transferase z.B. bei GTN [93].

Andere Untersuchungen fanden diese Zusammenhänge jedoch nicht [87]. Weitere Nitrovasodilatoren wie S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin [166;118] und 3-Morpholino-Sydnonimin benötigen keine enzymatische Metabolisation.

Im Fall von SIN-1 konnte nachgewiesen werden, dass diese Substanz nicht nur NO, sondern auch O_2^- , welches in vivo unmittelbar zu Peroxynitrit reagiert, freisetzt [86].

SNAP kann durch die Kathalyse von Schwermetallen spontan NO freisetzen, jedoch herrschen im Gewebe eher Transnitrosierungsreaktionen vor, die zur Bildung spontan zerfallender Nitrosothiole führen. Diese Substanz hat jedoch ausschließlich experimentelle Bedeutung.

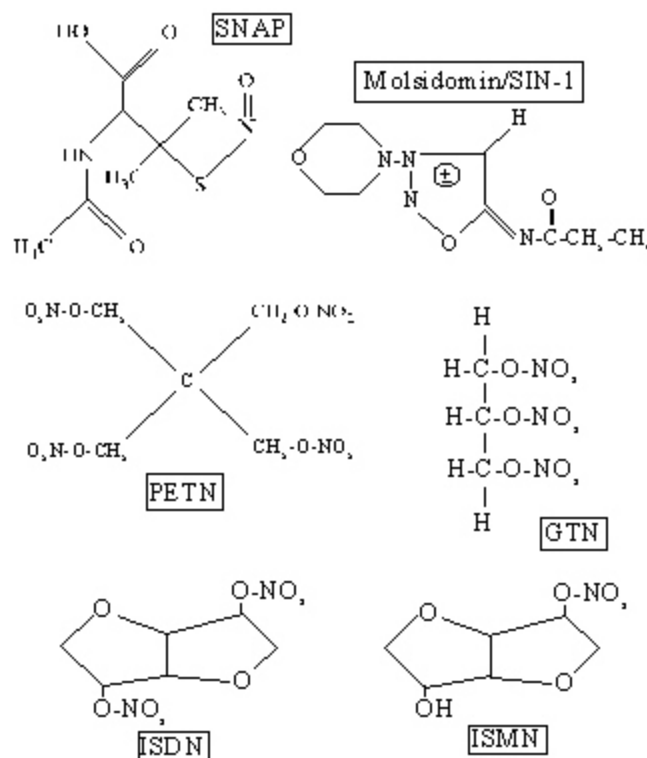


Abb. 1.2: Chemische Struktur der Nitrovasodilatoren Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN), Isosorbidmononitrat (ISMN), Pentaerythryltetranitrat (PETN), S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) und 3-Morpholino-Syndnonimin (SIN-1) [4].

Unter der Dauertherapie mit organischen Nitrovasodilatoren kann das Phänomen der Nitrattoleranz kommen auftreten [4]. Darunter versteht man eine in Abhängigkeit von Dosis und kontinuierlicher Medikation mit konstanten Plasmaspiegeln entstehende Desensibilisierung der Gefäße auf vasorelaxierende Reize durch NO.

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Sensibilisierung der glatten Gefäßmuskulatur gegenüber vasokonstriktorischem Stimuli [151]. Nach einem nitratfreien Intervall mit Nitratplasmaspiegelverminderung ist dieses Phänomen vollständig reversibel.

Der Mechanismus der Nitrattoleranz ist nicht genau geklärt. Diskutiert werden eine verringerte NO-Freisetzung [163;97;165;117] sowie eine reduzierte biologische NO-Aktivität [13;154]. Weiterhin gibt es Hinweise auf eine nitratinduzierte Gegenregulation mit Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [169;68;153;130].

1.2 Endothelfunktion und Atherosklerose

1.2.1 Endothel

Als Endothel bezeichnet man die Auskleidung des gesamten vaskulären Systems, sowie des Herzinnenraums mit einer dünnen Lage einschichtigen Plattenepithels. Das Endothel bildet eine nicht thrombosierende Schicht zur Hemmung der Blutplättchenaggregation, weiterhin ist es an der Fibrinolyse beteiligt. Vorwiegende Funktionen des Endothels sind Bildung einer Diffusionsbarriere zwischen Blut und Gefäßwand zur Regulation des Stoffaustausches zwischen dem intra- und dem extravaskulären Raum, sowie Regulation des Gefäßtonus durch Metabolisierung vasoaktiver Substanzen (Tab. 1.1).

Endotheleigenschaften	Wirkung
<i>Synthese von Prostazyklin (PGI₂)</i>	antiaggregatorisch und dilatatorisch wirksam [190]
<i>Rezeptoren für Serotonin und Histamin</i>	Kontrollfunktion bei Entzündungsreaktionen sowie immunologischer Prozesse
<i>Träger des Angiotensin-I-Converting-Enzyms (ACE)</i>	katalysiert aus Angiotensin I vasokonstriktorisch wirksames Angiotensin II [36]
<i>Rezeptoren für Low-density-Lipoproteine (LDL)</i>	erhöhtes LDL gilt als Risikofaktor für die Entstehung einer Atherosklerose
<i>Synthese des sog. „platelets-derived-growth-factor“ (PDGF)</i>	regt Fibroblasten und glatte Muskelzellen zur Proliferation an [180]
<i>Synthese des sog. „endothelium-derived-relaxing-factor“ (EDRF)</i>	vermittelt die endothelabhängige Vasodilatation [69]

Tab. 1.1: Endotheleigenschaften und Endothelfunktionen und daraus resultierende Wirkungen.

Für diese Studie ist die Bildung von NO/EDRF durch das Endothel von besonderem Interesse, da exogen zugeführte Nitrate den biologisch vorgegebenen Weg des endogenen NO nachahmen (siehe Abb. 1.3).

Furchgott und Zawadzki konnten 1980 an Streifenpräparaten von Kaninchenaorta nachweisen, dass die durch Acetylcholin induzierte Vasodilatation endothelabhängig ist.

Nur bei intaktem Endothel führt eine Acetylcholinapplikation zu einer Vasodilatation. Wird das Endothel jedoch z.B. mechanisch entfernt, führt dies zu einer Aufhebung der vasodilatativen Potenz von Acetylcholin und es kommt im Gegenteil zu einer Vasokonstriktion. So kam es zu der Vorstellung, dass Acetylcholin den s.g. „endothelium-derived-relaxing-factor“ im Endothel freisetzt, welcher die Gefäßrelaxation vermittelt [69].

1987 konnte nachgewiesen werden, dass EDRF mit NO identisch ist [108;98;170;107].

Mittlerweile kennt man eine Vielzahl vasorelaxierender Substanzen, wie Noradrenalin, Histamin, Angiotensin II, Bradykinin, Substanz P, Thrombin, Adenosinnukleotide etc., deren Wirkung durch endogenes NO vermittelt wird [146]. Endogenes NO wird im Endothel durch Stimulation eines Isoenzym der NO-Synthase, der endothelialen NO-Synthase (eNOS/NOS III) gebildet. Von der konstitutiv exprimierten endothelialen NO-Synthase unterscheidet man grundsätzlich die ebenso konstitutiv exprimierte neuronale NO-Synthase (nNOS/NOS I).

Weiterhin unterscheidet man die induzierbare NO-Synthase (iNOS/NOS II), die nur durch Zytokinstimulation z.B. im Rahmen eines septischen Schocks exprimiert wird [148].

Nach Bindung an einen spezifischen Rezeptor durch einen Agonisten, wird ein Signalreiz auf ein aktiviertes G-Protein übertragen. Vermutlich führt die Aktivierung der Phospholipase C zur vermehrten Bildung von Diacylglycerol und Inositoltriphosphat, was schließlich den intrazellulären Kalziumspiegel erhöht und die endothelialen NO-Synthase aktiviert.

Die endothelialen NO-Synthase, die spezifisch von NADPH und Kalzium abhängig ist [144], bildet via Oxidation aus L-Arginin NO und Citrullin [171]. Endogenes NO diffundiert in die glatte Gefäßmuskulatur, wo es die lösliche Guanylatzyklase aktiviert [37].

Das durch die lösliche Guanylatzyklase gebildete zyklische Guanosinmonophosphat vermittelt als „second messenger“ über einer Verminderung der zytosolischen Kalziumkonzentration die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur [4] (s. Abb. 1.3).

Organische Nitrate können als exogene Gefäßhormone angesehen werden, da ihre Wirkung dem endogenen EDRF weitgehend entspricht, was vor allem deutlich wird, wenn EDRF, wie z.B. bei der endothelialen Dysfunktion im Rahmen einer Atherosklerose, fehlt [137].

EDRF ist in der glatten Gefäßmuskulatur, wo es seine hauptsächliche Wirkung entfaltet, in größeren Mengen vorhanden, als im Gefäßlumen [34]. Endogenes NO, wie auch exogen zugeführtes NO wird im Gefäßlumen schnell durch freies Hämoglobin inaktiviert [71]. Es wird deutlich, dass der sehr kurzlebige EDRF (Halbwertszeit ca. 30-60 sec.) lediglich lokale Wirkungen entfalten kann.

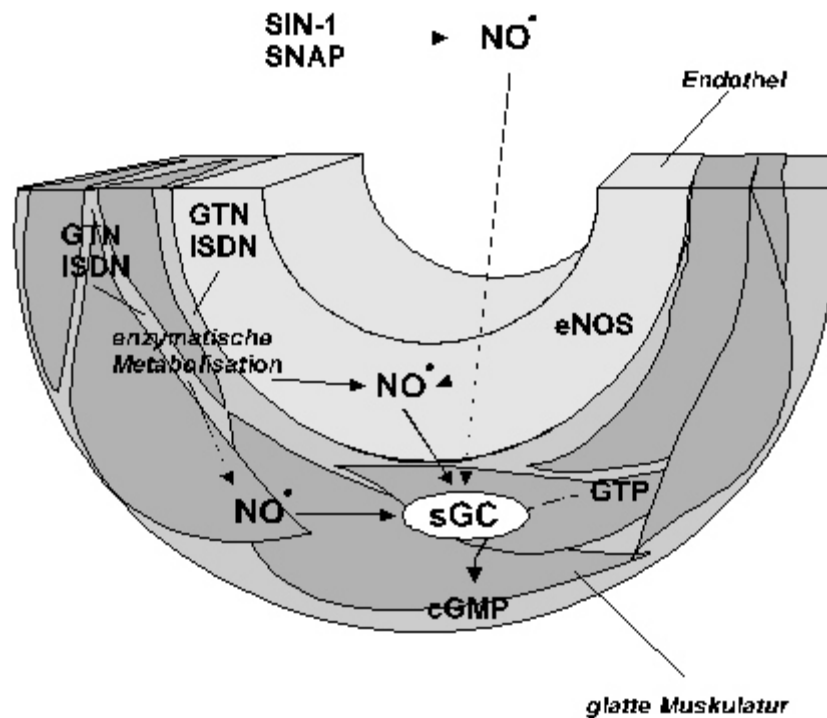


Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung des vermutlichen Mechanismus endogener und exogener NO-Synthese und NO-Freisetzung, sowie der Bioaktivierung von Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN), Isosorbidmononitrat (ISMN) und Pentaerythryltetranitrat (PETN) in der Endothelzelle und der glatten Muskelzelle. S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) und 3-Morpholino-Sydnominin (SIN-1) liberieren NO im Gefäßlumen bzw. an der Zellmembran. NO stimuliert die lösliche Guanylatzyklase (sGC). Das durch dieses Enzym gebildete zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle [118;156].

Eine durch Epitheldestruktion mit Verlust der endokrinen Epithelfunktion (z.B. durch atherosklerotische Plaquebildung) bedingte mangelnde lokale EDRF-Bildung kann somit nicht mit in der Blutbahn frei zirkulierendem endogenem NO aufgefangen werden kann [132].

Ein wesentliche physiologischer Stimulus der NOS-Expression und NO-Bildung im Sinne einer konstanten basalen EDRF-Freisetzung ist die mechanische Reizung des Endothels durch einen kontinuierlichen Blutstrom, dem sog. „shear-stress“ [184].

Dies hat zur Folge hat, dass bei einer Gefäßstenose die EDRF-Stimulation nicht nur lokal, sondern aufgrund des im poststenotischen Gefäßabschnitt verlangsamten Blutflusses dort ebenso vermindert ist.

Weiterhin ist das im Rahmen der Gerinnungskaskade erhöht anfallende vasokonstriktorisch wirksame Thrombin an der luminalen Seite des Endothels ein Reiz zur vermehrten EDRF-Freisetzung.

Hier stoßen aktivierte und zur Aggregation neigende Thrombozyten, außer dass sie plättchenaktivierenden Faktor, Serotonin und anderen vasokonstriktorisches Stoffe freisetzen, über Thromboplastin die Gerinnungskaskade an.

Daher kommt es bei intaktem Endothel nicht zu einer Vasokonstriktion, sondern zu einer Vasodilatation [40;20]. Eine weitere Funktion einer basalen EDRF-Liberierung ist in diesem Zusammenhang die Fähigkeit, die Plättchenaggregation zu hemmen. Dieser Effekt wird ebenso über cGMP vermittelt [21;64].

Ein weiterer Reiz zur EDRF-Freisetzung ist eine Gewebshypoxie [183]. So moduliert das Endothel u.a. via endogenem NO, neben anderen Substanzen wie z.B. Adenosin, das Sauerstoffangebot an Herz- und Skelettmuskulatur bei erhöhter Belastung.

Im Fall eines myokardialen Sauerstoffmangels bei koronarer Herzkrankheit kann dieser Mechanismus aufgrund einer endothelialen Dysfunktion durch Atherosklerose nicht mehr ablaufen, was die charakteristischen Angina pectoris-Beschwerden verstärkt (Abb. 1.1).

Die Mikrozirkulation und somit auch die Gewebedurchblutung werden ebenfalls über diesen Mechanismus variiert [104].

1.2.2 Endothelläsion und Atherosklerose

Die Entstehung der Atherosklerose kann durch ein multifaktorielles Geschehen, der „response to injury“-Hypothese erklärt werden. Initiale Schäden der Intima durch Lipoproteine und andere Risikofaktoren setzen Reparaturmechanismen in Gang, die letztlich zu dauerhaften Schäden der Gefäßwände führen [181;182]. Atherosklerose ist eine fortschreitende Erkrankung, die bereits in früher Jugend nachweisbar sein kann [198].

Epidemiologische Studien offenbaren eine Anzahl Risikofaktoren zur Entstehung einer Atherosklerose. Diese können eingeteilt werden in Faktoren mit starker genetischer Komponente und Faktoren, die überwiegend umweltbedingt sind (s. Tab. 1.2 und 1.3).

Grundvoraussetzung für die meisten Formen dieser Erkrankung ist jedoch ein Überfluss an atherogenen Lipoproteinen. Das gleichzeitige Auftreten von Risikofaktoren potenziert das Risiko einer Atherosklerose [131;158;202].

Studien konnten zeigen, dass es eine stark hereditäre Komponente der Atherosklerose gibt. Die Ausprägung der Erkrankung wird jedoch zu einem großen Teil von Umgebungsfaktoren bestimmt [141].

Hoher Fettgehalt der Nahrung	Studien weisen auf starke Assoziationen mit dem Lebensstil hin, Diät scheint der signifikanteste Faktor zu sein. Hoch fett- oder cholesterolhaltige Diät ist die Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer Atherosklerose im Tiermodell [9].
Nikotinabusus	Hohe Assoziation in epidemiologischen Studien. Klinische Untersuchungen zeigen Vorteile durch Nikotinentwöhnung [9].
Verminderte Antioxidantien	Klinische Studien mit Antioxidantien sind nicht eindeutig. Fettlösliche Antioxidantien schützen vor Atherosklerose im Tierexperiment [199].
Bewegungsmangel	Signifikante unabhängige assoziiert mit einer KHK [9].
Infektionen	Epidemiologischen Studien zeigen Verdachtsmomente, z.B. C. pneumoniae. Tierstudien scheinen diese Vermutungen zu Unterstützen [95].

Tab. 1.2: Umgebungsfaktoren, die Risikofaktoren zur Entstehung einer Atherosklerose darstellen [142].

Arterieller Hypertonus ist ein weiterer Risikofaktor. Einige atherogene Effekte scheinen durch das Renin-Angiotensin-(Aldosteron-) System vermittelt zu werden. So stimuliert Angiotensin II direkt die Proliferation glatter Muskelzellen, ebenso wie platlet-derived-growth factor, welches bei spontan hypertensiven Ratten erhöht ist [164]. ACE-Hemmer weisen somit neben der blutdrucksenkenden Wirkung auch antiproliferative und zytoprotektive Effekte auf [133].

Initiale Läsionen der Atherosklerose bestehen aus eine subendothelialen Akkumulation von cholesteringefüllten Makrophagen, sogenannten Schaumzellen. Solche Läsionen (“fatty streaks”) können an der Aorta bereits in der ersten Lebensdekade beobachtet werden [198]. “Fatty streaks” sind Vorläufer weiter fortgeschrittener Läsionen, die durch Anhäufung lipidreichem nekrotischen Gewebes und glatten Muskelzellen charakterisiert sind.

Typisch für solche fibrösen Läsionen ist eine fibröse Oberfläche (“fibrous cap”), bestehend aus glatten Muskelzellen und extrazellulärem Material. Diese umschließen einen lipidreichen nekrotischen Kern.

Hinzu treten Kalzifikationen, Ulzerationen in des Gefäßlumen, Haemorrhagien durch kleine Blutgefäße, die von der Media in die Läsion vorwachsen, was den Blutfluss behindern kann.

Die klinisch wichtigste Komplikation ist ein akuter Verschluss eines Gefäßes durch Thrombusbildung oder Blutgerinnsel, was zu einem Myokardinfarkt oder Apoplex führt. Gewöhnlich ist die Thrombose mit Plaqueruptur oder Erosion der Läsion verbunden.

Mit der Zeit gehen die Schaumzellen zugrunde und der lipidhaltige Inhalt bildet den nekrotischen Kern der Läsion.

Glatte Muskelzellen wandern von der Media der Gefäßwand ein und akkumulieren. Fibröses Gewebe wird von den glatten Muskelzellen gebildet, was zu einer Größenzunahme des fibrösen Plaque führt. Nach Überschreiten einer kritischen Größe erfolgt die weitere Ausdehnung in das Gefäßlumen.

Andererseits ist die Stabilität der fibrösen Kappe, somit der atherosklerotischen Läsion u.a. abhängig von der Bildung kollagener Fasern (Typ I und II) durch glatte Muskelzellen. Eine vermehrte Apoptose dieser Zellen führt somit zu einer Schwächung der fibrösen Oberfläche. Cytoplasmatische Überreste der glatten Muskelzellen lagern Kalzium ein, wodurch eine Kalzifizierung des atherosklerotischen Plaque initiiert wird [110].

Fibröse Plaques sind durch eine Zunahme an extrazellulärer Flüssigkeit und glatter Muskelzellen sowie von glatten Muskelzellen abstammender extrazellulärer Matrix charakterisiert. Zytokine und Wachstumsfaktoren sezerniert von Makrophagen und T-Zellen fördern die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima. Schönbeck *et al.* konnten zeigen, dass Interaktionen zwischen CD40 und CD40L (CD154) eine wichtige Rolle in diesem Prozess, somit in der Bildung fortgeschrittener Läsionen spielen. CD40 wird sezerniert von T- und B-Zellen sowie von Endothel- und glatten Muskelzellen [186]. An Mäusen ohne CD40L oder nach CD40L Antikörpergabe fanden sich weniger entzündliche und in ihrer Ausprägung mäßigere atherosklerotische Läsionen mit einem höheren fibrösen Anteil. Hieraus ergeben sich neue therapeutische Ansätze. Man verspricht sich von einem Eingreifen in das CD40 und CD40L System u.a. eine höhere Stabilität der Läsionen [187].

Es zeigte sich, dass z.B. akute durch Thromben induzierte koronare Ereignisse stärker von der Zusammensetzung und Vulnerabilität einer Läsion als von dem Ausmaß der Stenose abhängig sind. Vulnerable Läsionen weisen eine dünne fibröse Oberfläche und eine vergleichsweise höhere entzündliche Aktivität auf. Die Stabilität einer Läsion ist weiterhin abhängig von Kalzifikationen und Neovaskularisation. Die Thrombogenität einer Läsion wird verstärkt da Endothelzellen und Makrophagen verstärkt Prothrombinase (Faktor III), ein Schlüsselpotein der Gerinnungskaskade, in Anwesenheit von oxLDL, bei Entzündungen und bei Bindung von CD40 und CD40L sezernieren [186].

Aktivierte hyperaktive Thrombozyten, wie sie im Verlauf der Erkrankung auftreten, tragen durch Adhäsion an subendotheliales Bindegewebe und durch Freisetzung von Mediatoren sowohl zur Progression der atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen [92], als auch zum Entstehen thromboembolischer Komplikationen bei [62].

Auf Grund unterschiedlicher Fließeigenschaften des Blutes entstehen im Gefäßsystem Praedilektionsstellen zum Auftreten atherosklerotischer Läsionen. Diese Fließeigenschaften (“shear stress”) haben Einfluss auf die Morphologie des Endothels.

Bei laminarem Blutfluss weisen die Zellen eine ellipsoide Ausprägung und sind in Flussrichtung angeordnet. An Stellen mit turbulentem Blutfluss, z.B. an Verzweigungen der Arterien, Abgängen und Innenkurven, sind die Zellen von polygonaler Form ohne gemeinsame Ausrichtung. Diese Gebiete weisen eine vermehrte Permeabilität für Makromoleküle wie LDL auf [77]. Im Tiermodell zeigen sich nach einer fett- und cholesterinhaltigen Diät eine Ansammlung von Lipoproteiden in der Intima an Prädisilektionsstellen der Blutgefäße [142].

Untersuchungen an atherosklerotischen Läsionen menschlicher Arteria carotis legen nahe, dass unterschiedliche Fließeigenschaften das Auftreten von Apoptose beeinflussen. Tricot *et al.* fanden in Bereichen eines atheromatösen Plaque mit niedrigem Blutfluss und niedrigem “shear stress” eine erhöhte Apoptoserate, was Einfluss auf Plaqueerosionen und Thrombogenität hat [212].

LDL diffundiert passiv durch das Endothel. In der Gefäßwand geht der Bestandteil Apolipoprotein B (apoB) Interaktionen mit Proteoglykanen der Zellmatrix ein [29]. Lipoprotein A, ähnlich dem LDL, jedoch ein zusätzliches Polypeptid (Apolipoprotein(a)), enthaltend, ist besonders atherogen [82].

In der Gefäßwand erfährt LDL eine Reihe von Modifikationen wie Oxidation, Lipolyse, Proteolyse und Aggregation. Primär entsteht minimal oxidiertes LDL.

Im Mäusemodell konnte bei fehlen der Lipoxygenase eine in ihrer Ausprägung verminderte Atherosklerose diagnostiziert werden [45].

Cholesterolsynthesehemmer (CSE-Hemmer) weisen neben einer Lipidsenkung eine direkte hemmende Wirkung der LDL-Oxidation auf [10;78].

HDL weist neben der Fähigkeit freies Cholesterol aus der peripheren Zelle zu transportieren ebenso eine inhibierende Wirkung der Lipidoxidation auf.

Minimal oxigeniertes LDL wird zu hoch oxigeniertem LDL, dem oxLDL modifiziert.

Erhöhte LDL/VLDL-Spiegel	Assoziationen fanden sich in epidemiologischen Studien, Studien an genetischen Krankheiten und Tiermodellen. Positive Effekte einer Cholesterinreduktion [9].
Verminderte HDL-Spiegel	Assoziationen fanden sich in epidemiologischen Studien, unterstützt durch Studien genetischer Krankheiten sowie durch Tiermodelle [81].
Erhöhte Lipoprotein(a)-Spiegel	Assoziationen in einigen epidemiologischen Studien gezeigt, Tiermodelle sind jedoch widersprüchlich [127].
Erhöhter Blutdruck	Epidemiologische und klinische Studien zeigen positive Effekte einer Blutdrucksenkung, besonders im Bezug auf Apoplex [9].
Erhöhte Homocystein-Spiegel	Assoziationen fanden sich in epidemiologischen Studien, erhöht bei Homocystinurie [74].
Familienanamnese	Signifikanter unabhängiger Faktor [80].
Diabetes und Fettleibigkeit	Assoziationen fanden sich in epidemiologischen Studien und Tiermodellen [9].
Erhöhte Haemostasefaktoren	Signifikante unabhängige Assoziationen wurden beobachtet bei erhöhtem Fibrinogen, plasminogen activator inhibitor Typ I und Thrombozytenaktivität [9].
Depression/Verhaltenszüge	Assoziationen fanden sich in unterschiedlichen Studien [79].
Geschlecht (männlich)	Über sechzig Jährige: Verhältnis männlich zu weiblich 2:1 [162].
Systemische Entzündung	Hinweise auf eine Assoziation systemischer Entzündung (C-reaktives Protein, BSG) mit KHK [129].
Metabolisches Syndrom	Metabolische Entgleisungen mit Insulinresistenz sind häufig assoziiert mit einer KHK [141].

Tab. 1.3: Faktoren mit verstärkter gentischer Komponente, die Risikofaktoren zur Entstehung einer Atherosklerose darstellen [142].

Eine Oxidation durch Sauerstoffradikale aus glatten Muskel- und Endothelzellen sowie Makrophagen konnte nachgewiesen werden [18]. Weiterhin vermutet man eine Beteiligung oxidierend wirkender Enzyme wie Myeloperoxidasen, Sphingomyelinase und Phospholipase. Die Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen wird durch eine Reihe von Rezeptoren vermittelt.

Zwei dieser Rezeptoren (SR-A und CD36) sind anscheinend von besonderer Bedeutung, führt doch das Fehlen einer dieser Rezeptoren im Mausmodell zu einer mäßig reduzierten Atheroskleroseausprägung [201;57].

Endothelzellen stellen eine wichtige Barriere dar. Diese Zellen kontrollieren die Adhäsion, Aggregation und Invasion immunkompetenter Zellen. Bei einigen der o.g. Risikofaktoren der Atherosklerose ließ sich eine verminderte endothelabhängige Vasorelaxation feststellen.

Weiterhin fand sich eine vermehrte Bildung freier Sauerstoffradikale durch die NADH/NADPH Oxidase bei diesen Erkrankungen. Somit ist von einer Hemmung der physiologischen NO-Funktion auszugehen.

Darüber hinaus bilden sich im Rahmen der Interaktion zwischen Superoxidradikalen und NO toxische Radikale wie z.B. Peroxynitrit [33].

Die Stimulation der Bildung freier Sauerstoffradikale durch proinflammatorische Faktoren wie Angiotensin II, oxLDL oder Tumornekrosefaktor α führt zur Apoptose von Endothelzellen [51]. Sauerstoffradikale fördern die Proliferation glatter Muskelzellen.

Antioxidantien wie α -Tocopherol (Vitamin E) oder Ascorbinsäure (Vitamin C) weisen in diesem Zusammenhang positive Effekte z.B. auf die oxLDL-Bildung auf [23;103;177].

Östrogen wirken antiatherosklerotisch durch ihre Wirkung auf Plasmalipide und Stimulation von Prostacyklinen und NO [162].

NO induziert in atherosklerotischen Läsionen eine Apoptose der eingewanderten Makrophagen. Dies kommt einer Verminderung der Entzündungsaktivität gleich. Wang *et al.* konnten an hypercholesterolämischen (0,5% über 10 Wochen) New Zealand White Kaninchen nachweisen, dass eine anschließende zweiwöchige Fütterungsperiode mit L-Arginin zu einem Rückgang vorbestehender Atherome führte [218].

Gering oxidiertes LDL stimuliert Endothelzellen zur Bildung proinflammatorischer Moleküle wie Zelladhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren, z.B. Makrophagen koloniestimulierender Faktor [219].

Adhäsive Proteine mit einer speziellen Affinität zu zirkulierenden Monozyten wie die Immunglobuline ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) werden exprimiert.

Weiterhin interagieren Zelladhäsionsmoleküle, Endothelzellen-Glykoproteine, mit spezifischen Rezeptoren der Leukozyten. Hierzu gehören P- und E-Selektine [53;42]. NO bewirkt eine Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen [35;90].

Oxidiertes LDL ist jedoch in der Lage die Produktion von NO zu inhibieren. Mäuse mit einem Mangel an NO Synthase weisen eine verstärkte Atherosklerose auf [109].

Weiterhin zeigten Mäuse mit einem spontanen Mangel an Makrophagen koloniestimulierendem Faktor, welcher vielfältige Einflüsse auf die Funktion der Makrophagen ausübt, eine deutlich mildere Ausprägung der Läsionen [196]. Ebenso Nager mit einem Mangel an Monozyten chemotaktischem Protein (MCP-1) oder dessen Rezeptor (CCR2) [84;30].

Der Stellenwert von EDRF/NO bei der Regulation des Blutkreislaufs lässt sich sowohl im Tierexperiment, als auch in klinischen Studien nachvollziehen. In atherosklerotisch veränderten Blutgefäßen mit zerstörtem Endothel lässt sich jedoch endogenes NO nicht oder nur vermindert nachweisen [65]. Dieser Pathomechanismus trägt auch zur Rezidivneigung von 20 bis 30 % nach primär erfolgreicher Dilatation von Koronargefäßen bei symptomatischer koronarer Herzkrankheit mittels eines Ballonkatheter (PTCA) innerhalb von 4 bis 6 Monaten bei, da hierdurch die endotheliale Dysfunktion mit anhaltender Thrombozytenaktivierung nicht therapiert wird [61;135].

Tiermodelle zur Untersuchung der Atherosklerose

Untersuchungen am Menschen zur Atherosklerose sind bei langsamer Progression der Erkrankung, mangelnden Kontrollmöglichkeiten und nahezu unmöglicher postmortaler Untersuchung der Atheroskleroseausprägung sehr limitiert.

Daher greift man schon seit Jahrzehnten auf eine Vielzahl von Tiermodellen mit genetischer oder artifiziell induzierter Atherosklerose zurück.

Das Modell des cholesteringefütterten Kaninchen ist das häufigste verwendete Tiermodell zur Untersuchung der Atherosklerose und schon seit der Jahrhundertwende bekannt [99].

Wie in anderen Tiermodellen zur Untersuchung der Atherosklerose und beim Menschen entwickelt sich beim Kaninchen die Atherosklerose fokal in spezifischen Arealen der Arterien, die allerdings etwas zwischen den Spezies variieren.

Trotz dieser Unterschiede werden die meisten Ergebnisse aus Versuchen mit Kaninchen durch Studien an anderen Tieren wie z.B. Affen bestätigt und sind im Einklang mit Untersuchungen am Menschen [102].

Die in dieser Studie eingesetzten weißen Neuseeländer Kaninchen entwickeln spontan keine atherosklerotischen Gefäßveränderungen der Intima. Möglich ist eine Degeneration der Media [83], die der humanen sklerosierenden Mediaverkalkung vom Typ Mönckenberg ähnelt [73].

Unter einer mehrwöchigen 2 %-igen Cholesteroldiät kommt es zu einem massiven Anstieg des Plasmacholesterols. Das Cholesterol akkumuliert in der Intima der größeren Gefäße, besonders im Aortenbogen und der Aorta thoracica [7].

Histologische Untersuchungen der atherosklerotischen Veränderungen in Kaninchengefäßen weisen Gemeinsamkeiten zu den beim Menschen auftretenden sog. „fatty streaks“ auf.

Es zeigen sich proliferierende glatte Muskelzellen, lipidgefüllte sog. Schaumzellen und extrazelluläre Cholesterin- bzw. Kalziumablagerungen. Diese Läsionen gehen mit einer verminderten endothelabhängigen Vasorelaxation einher [215], deren Ausmaß mit der Ausprägung der Läsionen korreliert [102] und durch einen Endothelverlust bedingt ist [125].

Daley *et al.* konnten zeigen, dass auch ein vergleichsweise niedriger Futtercholesterolgehalt (0,125 bis 0,5 %) innerhalb einer relativ kurzen Zeit (6 Monate) ausgeprägte atherosklerotische Läsionen in weißen Neuseeländer Kaninchen hervorrufen kann, die histologisch humanen Plaques ähnlich sind [47;48].

1.3 Fragestellung

Schon auf Grund der hohen Inzidenz der koronaren Herzkrankheit in der Bundesrepublik Deutschland von 10 % der männlichen Bevölkerung, zu deren Akut- und Intervalltherapie organische Nitrate maßgeblich beitragen, wird die Bedeutung dieser Substanzgruppe deutlich. Trotz ihrer Bedeutung und breiten Verwendung, sowie der intensiven Forschung bezüglich dieser Substanzgruppe fehlt bisher eine vergleichende Studie über die unterschiedliche

Ausprägung der bevorzugt venösen Gefäßdilatation bei gewöhnlich therapeutisch eingesetzten Nitrovasodilatoren in verschiedenen Gefäßen der gleichen Spezies unter identischen Bedingungen. Hier soll diese Studie einen Überblick geben.

Bisher veröffentlichte Daten über nitrovasodilatatorinduzierte Vasorelaxation zeigen ein heterogenes Bild, was anhand eines Überblicks in Tabelle 1.4 deutlich wird.

Gefäß	EC₅₀ [nM]	Ratio (a/v)	Vorkontraktion	Quelle
Mesenterialarterie, Rind	27	0,027	Histamin	[11]
Mesenterialvene, Rind	1,000		Serotonin	[14]
Lungenarterie, Rind	40	20	KCl	[56]
Lungenvene, Rind	2		KCl	
Femoralarterie, Hund	5,000	8,1	Noradrenalin	[143]
Femoralvene, Hund	610		KCl	[194]
Femoralarterie, Hase	1,000	200	Noradrenalin	[160]
Femoralvene, Hase	5			
Koronararterie, Schwein	580	1,3	Prostaglandin-	[114]
Vena cordis magna, Schwein	490		F2-alpha	[115]

Tab.1.4: Überblick über veröffentlichte Daten bezüglich vasorelaxierender Effekte von Glyceroltrinitrat aus In-vitro-Studien. Als EC₅₀ wird die Konzentration zur halbmaximalen Hemmung der Vorkontraktion bezeichnet [nach 4].

Zu diesem Zweck untersuchten wir im ersten Teil der Studie (In-vitro-Studie) anhand eines Tiermodells mit männlichen weißen Neuseeländer Kaninchen die organischen Nitrate Glyceroltrinitrat, Isosorbiddinitrat, Isosorbidmononitrat, Pentaerythrityltetranitrat, sowie die spontanen NO-Donoren S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin und 3-Morpholino-Sydnominin an Gefäßen der Lungenzirkulation und an Gefäßen des großen Kreislaufs. Exogen zugeführtes NO weist in Gefäßarealen, in denen das Epithel mit Verlust der endokrinen Epithelfunktion (mangelnde lokale EDRF-Bildung durch atherosklerotische Plaquebildung) destruiert ist, eine stärkere Wirksamkeit auf [195;5;146].

Hier ist es von Interesse, die Wirkungsunterschiede organischer Nitrate zu quantifizieren.

Im zweiten Teil der Studie (In-vivo-Studie) untersuchten wir unter zur Kontrollgruppe vergleichbaren Bedingungen wie Vorbehandlung und Vorkontraktion die organischen Nitrate

Isosorbidmononitrat (ISMN), Pentaerythryltetranitrat (PETN) und den spontanen NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) auf Unterschiede in ihrer vasodilatatorischen Aktivität an atherosklerotisch veränderten Aorten im Vergleich zu gesunden Gefäßen.

In diesem Tiermodell entwickelten männliche weißen Neuseeländer Kaninchen über einen Zeitraum von 4 Monaten auf Grund einer massiven Cholesterolfuhr eine Atherosklerose.

Wir ermittelten das morphologische Ausmaß der atherosklerotischen Aortenplaques mittels Computer-Scanner.

Weibliche weiße Neuseeländer Kaninchen weisen im Vergleich zu männlichen Tieren eine erhöhte basale EDRF-Freisetzung auf [91], was vermuten lässt, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der endothelialen Funktion gibt. Dies ist möglicherweise von Bedeutung, da Frauen prämenopausal eine wesentlich geringere Inzidenz der koronaren Herzerkrankung aufweisen [105]. Somit kann im Vergleich zu bereits an weiblichen weißen Neuseeländer Kaninchen erhobenen Daten [124] verglichen werden, in welchem Ausmaß das Geschlecht die Atheroskleroseentwicklung und darüber hinaus die endothelabhängige Vasorelaxation beeinflusst.

Außerdem ermittelten wir den abschwächenden Einfluss von Superoxidradikalen auf die Aktivität von NO. Diese werden in atherosklerotisch veränderten Gefäßen vermehrt gebildet und reagieren mit NO zu Peroxynitrit. Hierfür wurden den Dosiswirkungskurven von Acetylcholin und dem spontanen NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin eine Vorinkubation der Aortenringe mit Superoxid-Dismutase vorangestellt.

Zusammenfassend gehen die hier vorgestellten Studien der Fragestellung nach, ob und in welcher Ausprägung Unterschiede in der bevorzugt venösen Gefäßdilatation zwischen Nitrovasodilatoren in-vitro auftreten, ferner ob und in welcher Ausprägung Unterschiede in der vasodilatativen Aktivität an gesunden und atherosklerotisch veränderten Blutgefäßen zwischen Nitrovasodilatoren in-vitro auftreten.

Weiterhin wird im Vergleich zu bereits an weiblichen weißen Neuseeländer Kaninchen erhobenen Daten der Frage nachgegangen, ob und in welcher Ausprägung Unterschiede in der dilatativen Aktivität von Nitrovasodilatoren an gesunden und atherosklerotisch veränderten Blutgefäßen zwischen männlichen und weiblichen Tieren in-vitro auftreten, ferner in welchem Ausmaß das Geschlecht die Atheroskleroseentwicklung beeinflusst.

2.0 Material und Methoden

2.1 Untersuchungssubstanzen und Lösungen

2.1.1 Organische Nitrovasodilatoren

- Glyceroltrinitrat
- S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin
- Isosorbiddinitrat
- Isosorbidmononitrat
- Pentaerythryltetranitrat
- 3-Morpholino-Sydnonimin

Die Synthese von SNAP wurde in unserem Labor nach Vorgabe durch Field *et al.* [60] durchgeführt. Das Produkt wurde in Methanol einmal rekristallisiert. Die Analyse von SNAP beinhaltete sowohl eine Dünnschichtchromatographie auf Merck RP 18 Platten mit Methanol/Wasser 7/3 (V/V) als Eluent, sowie eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

Zur Bestimmung freier Sulfidgruppen wurde ein Sprühnachweis mit 1.5 g Natriumnitroprussid, gelöst in einem Aliquot einer Lösung aus 5 ml 2 N Salzsäure, 95 ml Methanol und Ammoniak (25%), durchgeführt. Es wurden keine nachweisbaren Mengen an Sulfid gefunden. Der Nachweis der Nitrogruppe wurde durch Besprühen des entwickelten Chromatogramms in zwei Schritten erreicht: Sprühen von in Methanol suspendiertem Zn-Staub (Partikelgröße < 60 µm), gefolgt durch Sprühen von 250 mg Schwefelsäure/α-Naphtylamin in Essigsäure. Die kurze Erwärmung der Chromatographieplatte führte zu einer rötlichen Verfärbung. Der Schmelzpunkt der verwendeten Präparation lag bei 148.3°C (unter Zersetzung).

Zusätzlich wurde die Eigenschaft von SNAP, NO freizusetzen, in einem Oxyhämoglobinassay [58] nachgewiesen. 1 mM SNAP ergab eine NO-Bildungsrate von $1.28 \pm 0.01 \mu\text{M min}^{-1}$ (n=3). Die Substanzen ISMN, ISDN und PETN wurden freundlicherweise von ISIS Pharma, Zwickau, SIN-1 von Cassella-Pharma GmbH, Frankfurt/Main, zur Verfügung gestellt. GTN wurde als Perlinganit (Lösung) der Firma Schwarz Pharma AG, Monheim, verwendet.

2.1.2 *Sonstige verwendete Substanzen*

- Ketamin (Ketavet[®], 100 mg/ml Amp.), Firma Parke-Davis
- Diazepam (Valium[®], 5 mg/ml Amp.), Firma Roche, Basel
- Xylazin (Rompun[®], 2%), Firma Bayer, Leverkusen
- Heparin (Liquemin[®]), Firma Roche, Basel
- Acetylcholin Firma Sigma, Deisenhofen
- Phenylephrin Firma Sigma, Deisenhofen
- Sudan IV Firma Sigma, Deisenhofen
- SOD Firma Sigma, Deisenhofen
- DMSO, Methanol und Formaldehyd, Firma Merck, Darmstadt

2.1.3 *Präparation von Oxyhämoglobin*

Eine Oxyhämoglobinlösung (HbO₂) wurde hergestellt, indem 20 mg Hämoglobin (Rind, doppelt kristallisiert) (Firma Sigma, Deisenhofen) in 1 ml Aqua bidest. unter Rühren (3 min) gelöst wurden. Danach wurde das Hämoglobin, nachdem es an der Oberfläche für 10 min vorsichtig mit Carbogen (95% O₂; 5 % CO₂) begast wurde, durch eine Spatelspitze Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) (Merck, Darmstadt) reduziert. In einer Sephadex Säule wurde die Lösung dann entsalzt. Sephadex G25 (Pharmacia, LKB, Freiburg i. B.), in Phosphatpuffer (pH 7,7) suspensiert, wurde in eine mit Filterwolle verschlossene Pasteurpipette gefüllt und zweimal mit dem Puffer gespült. Dann wurde die vorher bereitete Oxyhämoglobinlösung auf die Säule aufgetragen und mit dem Puffer eluiert. Die dunkelrote Fraktion wurde unter der Pasteurpipette in einem eisgekühlten und lichtgeschützten Wheatonglas aufgefangen. Zur Konzentrationsbestimmung der erstellten Lösung wurde mit einem Photometer die Extinktion bei 415 nm gemessen. Dazu wurden je dreimal 10 µl der Lösung mit einer genauen Pipette abgenommen und mit 2990 µl Aqua bidest. verdünnt. Diese Verdünnungen wurden gegen Aqua bidest. als Leerwert gemessen. Nach Mittelung der Ergebnisse wurden die Konzentration unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für $E_{415\text{ nm}} = 131\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ berechnet.

$$\text{Formel: } E = \epsilon \times c$$

Konzentration (µM) = Extinktion der Lösung / Extinktionskoeffizient x 300 (Verdünnung).

2.1.4 Präparation der Stammlösungen

Die Stammlösungen der Untersuchungssubstanzen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn folgendermaßen frisch hergestellt:

- **GTN** Stammlösung [1 mM]: 227.1 µl Perlinganit® + 772.9 µl Aqua bidest., Verdünnungsreihe mit Aqua bidest.: [1 mM bis 0,1 µM].
- **SNAP** Stammlösung [10 mM, MG: 220.2]: 2.2 mg + 100 µl Methanol + 900 µl Aqua bidest., Verdünnungsreihe mit Aqua bidest.: [10 mM bis 0,1 µM].
- **ISDN** Stammlösung [10 mM, MG: 235.6]: 2.36 mg + 100 µl DMSO + 900 µl Aqua bidest., Verdünnungsreihe mit Aqua bidest.: [10 mM bis 0,1 µM].
- **ISMN** Stammlösung [0,1 M, MG: 191.2]: 21.24 mg + 1 ml Aqua bidest., Verdünnungsreihe mit Aqua bidest.: [0,1 M bis 0,1 mM].
- **PETN** Stammlösung [10 mM, MG: 316.1]: 12,65 mg + 800 µl DMSO + 200 µl Aqua bidest., Verdünnung auf 1 mM: 100µl Stamm + 500 µl DMSO + 400 µl Aqua bidest. Verdünnungsreihe mit Aqua bidest.: [0,1 mM bis 10 nM].
- **SIN-1** Stammlösung [10 mM, MG: 206.7]: 2.07 mg + 1 ml Aqua bidest., Verdünnungsreihe mit Aqua bidest.: [10 mM bis 0,1 µM].
- **Phenylephrin** Stammlösung [10 nM, MG: 204,7]: 2,04 mg + 1 ml Aqua bidest. Verdünnungsreihe mit Aqua bidest.: [10 nM bis 10 µM].
- **Acetylcholin** Stammlösung [1 nM, MG: 181,7]: 1,82 mg + 1 ml Aqua bidest. Verdünnungsreihe mit Aqua bidest.: [1 nM bis 10 µM].
- **KCl** Stammlösung [4 M, MG: 74,56]: 5,9685 mg + 20 ml Aqua bidest.
- **SOD** Stamm [4200 U/ml] Stammlösung 0,476 mg SOD/ml; Endkonzentration im 10 ml Organbad: 200 U/ml.

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die DMSO-Lösungsmittelkonzentration von 0,1 bis 0,8 % keinen Einfluss auf den Gefäßtonus hat. Die Maximalkonzentration an Methanol führte ebenfalls nicht zur Beeinträchtigung des Vasotonus. Bei den Substanzen SNAP und Acetylcholin war es notwendig, die Stammlösungen und Verdünnungsreihen bis zu ihrer Verwendung im Organbad in Eiswasser mit Lichtschutz zu lagern.

Alle Konzentrationen in Text, Graphiken und Tabellen sind mit Ausnahme der oben genannten Verdünnungsreihen als Endkonzentrationen im Organbad angegeben.

2.2 Physiologische Nähr- und Pufferlösung

Als physiologische Nährlösung diente eine modifizierte Krebs-Henseleit Lösung mit folgender Zusammensetzung:

Ionenzusammensetzung:			
Kationen (mM)		Anionen (mM)	
Natrium	143,07	Chlorid	125,96
Kalium	5,87	Hydrogencarbonat	25,00
Kalzium	1,60	Dihydrogenphosphat	1,18
Magnesium	1,18	Sulfat	1,18
<i>Summe</i>	154,5	<i>Summe</i>	154,5
Glucose		5,05 (mM)	

Die Krebs-Henseleit-Lösung wurde täglich unter Verwendung der folgenden zuvor hergestellter Elektrolyt-Stammlösungen angesetzt:

Stammlösungen:			
Salz	Molarität	MG	Einwaage
KH ₂ PO ₄	0,235 M	136,09	15,99 g/500 ml
KCl	0,939 M	74,56	34,99 g/500 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,235 M	246,48	28,96 g/500 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,320 M	147,02	23,52 g/500 ml

Für den Ansatz von 1 l Nährlösung wurden jeweils eingesetzt (Stammlösungen je 5 ml):

NaCl:	6,9 g	Glucosemonohydrat:	1,1 g
NaHCO ₃ :	2,1 g	Aqua bidestillata	(ad 1,0 l)

Der pH-Wert der mit Carbogen (O₂/CO₂, 95/5, V/V) begasten Lösung lag bei einer Organbadtemperatur von konstant 37°C zwischen 7,35 und 7,45. Die hier verwendeten Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Das Carbogengas wurde von der Firma Linde AG geliefert.

2.3 Versuchstiere

Alle in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an männlichen weißen Neuseeländer Kaninchen. Zwei Gruppen dieser Kaninchen kamen zum Einsatz. Im ersten Teil der Studie zur Untersuchung der Wirkung von Nitrovasodilatoren an gesunden Gefäßen wurden (In-vitro-Studie) 42 männlichen Kaninchen mit einem Körpergewicht von 2,2 bis 2,6 kg und einem Alter von 20 Wochen verwendet.

In der zweiten Versuchsreihe, die zur Fragestellung die Entwicklung der Atherosklerose und endothelialen Dysfunktion sowie deren Auswirkungen hatte (In-vivo-Studie), wurden 18 Kaninchen mit einem Körpergewicht von 2,6 bis 2,9 kg eingesetzt. Neun dieser Tiere wurden in einem Alter von 10-12 Wochen einer 15 Wochen dauernden cholesterolreichen Diät zugeführt. Weitere neun Tiere dienten der Kontrolle bei gleichem Futter ohne Cholesterolzusatz. Die tägliche Fütterung mit 40 g/kg Körpergewicht. der unterschiedlichen Futtersorten führte zu einer wöchentlichen Gewichtszunahme von 35-50 g in der Kontrollgruppe und 50-65 g in der Cholesterolgruppe. Die Futterpellets wurden von den Tieren gut angenommen. Die Tiere wurden von der Lippischen Versuchstierzucht GmbH geliefert.

2.3.1 Tierhaltung

In der Tierversuchsanlage der Düsseldorfer Universität wurden die Kaninchen einzeln in Edelstahlkäfigen auf Lochgittern gehalten. Die Käfige hatten eine Größe von 72 x 52 x 36 cm. Die Umgebungstemperatur betrug 18-20°C, die relative Luftfeuchtigkeit 55 % $\pm$ 5 %. Der durch Kunstlicht (300 Lux) aufrechterhaltene Tag-Nacht-Rhythmus war auf 12 Stunden (7⁰⁰ - 19⁰⁰ Uhr) festgelegt. Die Tiere erhielten mittels einer automatischen Tränke entkeimtes Wasser (ad libitum).

2.3.2 Fütterung der an der Atherosklerosestudie teilnehmenden Tiere (In-vivo-Studie)

Die 18 Kaninchen der Atherosklerosestudie wurden zu Beginn in zwei Gruppen unterteilt:

- Gruppe 1 (n=9) erhielt Standardfutter
- Gruppe 2 (n=9) erhielt Standardfutter, angereichert mit 7,5 g/kg KG Cholesterol

Das Cholesterin wurde in entsprechender Menge vom Hersteller (Firma Norlin GmbH, Bad Salzuflen) als Zusatz mit dem Standardfutter gemischt und zu Pellets verarbeitet.

Während der Fütterungsstudie erhielt jedes Tier täglich eine Futtermenge von 40 g/kg Körpergewicht. Zur Futteranpassung an das Körpergewicht der Kaninchen wurde jedes Tier wöchentlich gewogen.

Pro Versuchstag wurde ein Kaninchen eingesetzt, so das die Fütterung der Tiere zeitlich versetzt begonnen wurde. Pro Woche wurden 4 Kaninchen neu in den Versuch einbezogen. Die Fütterungsdauer von 15 Wochen wurde streng eingehalten.

2.4 Blutgefäße

Untersuchte Blutgefäße (s. auch Abb.2.2):

In-vitro-Studie (gesunde Gefäße)	In-vivo-Studie (gesunde und atherosklerotische Gefäße)
<i>je 1 Gefäßring pro Versuchstag</i>	<i>je 4 Gefäßringe pro Versuchstag, entweder</i>
Aorta thoracica Vena cava inferior, Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis	Aorta thoracica gesund, oder Aorta thoracica atherosklerotisch

2.5 Studien an isolierten Gefäßsegmenten

2.5.1 Versuchsaapparatur (siehe auch Abb. 2.1)

Die Versuchsaapparatur setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- Umlaufthermostat mit Wasserbad zur Aufrechterhaltung einer konstanten Gefäßbadtemperatur von 37°C, Typ NB 22, Firma Haake
- 4 doppelwandige Organbäder mit einem maximalen Füllungsvolumen von 25 ml
- 4 kleine Edelstahlstangen mit Haken (Eigenanfertigung Institut für Pharmakologie)

- 4 Fritten zur Gefäßbegasung der 25 ml Organbäder mit Carbogen
- 1 Fritte zur Begasung des 2 l Krebs-Henseleit-Vorratsgefäßes
- 8 Triangeln aus Edelstahl (Eigenanfertigung Institut für Pharmakologie)
- Kunststofffaden zur Fixierung der Triangeln mit Gefäßsegmenten, Synthofil®, 1,5 metric, 4/0 USP, Firma Braun-Melsungen (keine Längenänderung durch Feuchtigkeit)
- Isometrischer Spannungsmesser, Typ Statham
- Digitaler Punktdruckmesser, Typ LPD 12, Firma Linseis, Selb
- 4 Verstärker (Eigenanfertigung Institut für Pharmakologie, Ing. Springer)
- Schreiber zur Dokumentation auf Druckfahnen
- Doppelwandiges Krebs-Henseleit-Lösung-Vorratsgefäß mit 2l Flüssigkeitsvolumen
- Eppendorfpipetten mit verschiedenen Volumina
- spezielle Scheren und Pinzetten

2.5.2 Präparation

Anästhesie: Zur Sedierung und Einleitung der Anästhesie wurde den Kaninchen Ketamin (Ketanest®) [25 mg/kg KG] und Xylazine (Rompun®) [5 mg/kg KG] in den Musculus Tibialis injiziert. Zur Kontrolle der nach 5-15 Minuten einsetzenden Narkose wurde die beginnende Muskelrelaxation und der erlöschende Lidschlussreflex herangezogen. Durch einen venösen Zugang über eine Ohrvene des Kaninchens, offengehalten mittels Kochsalzlösung, wurde zur Erhaltung der Narkosetiefe eine zweite Ketamindosis [10 mg/kg KG] und Diazepam (Valeron®) [0,5 mg/kg KG] injiziert.

Tracheotomie und Beatmung: Nachdem bei dem Kaninchen die Narkose eingetreten war, begann die Tracheotomie. Hierfür wurde der Kopf des Kaninchen mittels einer Nackenrolle überstreckt. Dann wurde das Fell und die über der Trachea sehr dünne Haut vorsichtig in Längsrichtung mit einem Skalpell gespalten und die darunterliegende Trachea freipräpariert, ohne sie zu verletzen. Auf Höhe des 3 bis 4 Trachealringes wurde die Trachea nun mit einem kleinen Längsschnitt eröffnet und der Beatmungsschlauch platziert. Zur künstlichen Beatmung mit Raumluft, einer Beatmungsfrequenz von 40/min und einem Beatmungsdruck von 15 mm Hg diente eine Beatmungspumpe nach Schuler (Firma Braun-Melsungen).

Präparation der Gefäße: Nach erfolgter Tracheotomie des Tieres wurde das Sternum in Längsrichtung gespalten. Dann wurde der Thorax durch zwei Schnitte im 6. Interkostalraum, dem Rippenbogen nach rechts und links bis zur Axillarlinie folgend, vorsichtig weiter eröffnet. Die Blutungen aus der Arteria thoracica interna wurden durch Gefäßklemmen unterbunden, an denen dann der Thorax nach rechts und links geöffnet und der Herzbeutel zugänglich wurde. Anschließend wurde [5 mg/kg KG] Heparin als Antikoagulanz über den venösen Zugang injiziert.

Vor der Entfernung des Herzens wurde die Vena cava direkt vor ihrem Diaphragmadurchtritt abgebunden, um sie später bei der weiteren Präparation leichter aufsuchen zu können. Die Aorta wurde daraufhin unmittelbar proximal nach ihrem Abgang vom Herz durchtrennt, während die Vena cava inferior, die Vena pulmonalis und die Arteria pulmonalis möglichst distal durchtrennt wurden und mit dem Herzen aus dem Tier entnommen wurden. Diese Blutgefäße wurden der besseren Übersicht wegen erst außerhalb des Tieres vom Herz getrennt. Zuletzt wurde ein Stück Aorta thoracica entnommen. Alle Gefäße wurden direkt mit physiologischer Krebs-Henseleit-Lösung durchspült und getränkt.

Für die Atherosklerosestudie war es weiterhin notwendig, die Aorta, vom Aortenbogen bis zur Aortenbifurkation, dem Tier zu entnehmen. Hierzu wurde zuerst das Diaphragma durchtrennt und die Bauchdecke, sowie das Peritoneum eröffnet. Im Anschluss daran wurde sowohl der Inhalt des Situs visceralis, als auch des Situs retroperitonealis auf die linke Körperhälfte verlagert, so dass sich die Aorta darstellte. Nun konnte das Blutgefäß von seiner Umgebung freipräpariert und in einem Stück (ca. 20 cm Länge) vorsichtig, unter Vermeidung von Zug oder Stauchung, entnommen werden. Das Blutgefäß wurde während der gesamten Präparation mit physiologischer Krebs-Henseleit-Lösung um- und durchspült.

In einer mit Pufferlösung gefüllten Glasschale wurden die entnommenen Gefäße sodann von dem restlichen, sie umgebenden Fett- und Bindegewebe, sowie Blutkoagel gereinigt. Dann wurden von der thorakalen Aorta, der Vena Cava, der Arteria pulmonalis und der Vena pulmonalis jeweils ein 5 cm langes Gefäßsegment präpariert.

Im Verlauf der Präparation wurde darauf geachtet, dass die Gefäßsegmente ständig von frischer physiologischer Krebs-Henseleit-Lösung umspült wurden.

Schließlich wurde jeder Gefäßring unter größter Vorsicht zwischen zwei Edelstahltriangeln aufgezogen. Hierbei durften die Gefäßsegmente weder gedehnt, noch gestaucht werden.

Besonders das Endothel an der Gefäßinnenseite musste vor Schäden durch die Triangeln bewahrt bleiben.

Zum Einhängen in die Versuchsanordnung wurde jeweils eine der Edelstahltriangeln an einem Haken einer Haltestange befestigt. Die zweite Triangel am oberen Rand des Gefäßes wurde mittels eines feuchtstabilen Kunststofffadens (Synthofil®) direkt mit dem Zugaufnehmer (Statham Transducer) verbunden. Die Gefäße wurden locker eingehängt, um Schäden an den Gefäßringen und einer unkontrollierten Vorspannung vorzubeugen (Abb. 2.1).

2.5.3 Versuchsprotokoll (siehe auch Abb. 2.2)

Äquilibration: Nach Eichung der Versuchsanordnung und Aufhängen der Gefäße wurden diese durch Vordehnung mittels einer Eichschraube auf eine bestimmten Ruhespannung gebracht, die für jeden Gefäßtyp in Vorversuchen individuell ermittelt wurde. Während der Äquilibrationsphase von einer Stunde wurde alle 15 Minuten die Pufferlösung gewechselt und durch frische mit gleicher Temperatur und Oxygenierung ersetzt. Bis zur Einstellung eines stabilen Ruhetonus wurde die Vordehnung über die gesamte Äquilibrationsphase hinweg regelmäßig auf die festgelegten Werte korrigiert.

Stabile und reproduzierbare Ergebnisse stellten sich bei folgenden Ruhespannungen ein:

Blutgefäß:	Ruhespannung:
Aorta thoracica	2,0 g
Vena cava	0,5 g
Arteria pulmonalis	1,0 g
Vena pulmonalis	0,5 g

Kontraktionstest: Es wurden sowohl in der In-vitro-Studie, als auch in der In-vivo-Studie 2 kontraktile Stimuli nacheinander eingesetzt.

1) Kaliumchlorid (KCl): Durch Zugabe einer Einzeldosis KCl [60 mM] wurde die Kontraktion der Gefäße mittels Depolarisation ausgelöst.

2) Phenylephrin (PHE): Die Kontraktion der Gefäße erfolgte nach kumulativer Applikation von Phenylephrin [Dosiswirkungskurve: 10 nM bis 1 µM] durch α_1 -Rezeptorstimulation.

Endotheltest mit Acetylcholin (ACh): In der In-vitro-Studie wurde der Zustand des Endothels nach Vorkontraktion der Blutgefäße mit einer Einzeldosis Phenylephrin [0,5 µM] und anschließender kumulativer Applikation von Acetylcholin [Dosiswirkungskurve: 1 nM bis 10 µM] ermittelt. Bei der In-vivo-Studie mit atherosklerotischen Gefäßen dienten 0,2 µM Phenylephrin zur Vorkontraktion. Acetylcholin wirkt auf spezifische ACh-Rezeptoren. So konnte das Ausmaß artifizierter Schädigung des Endothels durch Präparation, sowie die Größe der durch Atherosklerose verursachten endothelialen Dysfunktion in der Fütterungsstudie ermittelt werden. In der Atherosklerosestudie schloss sich nach erneuter Vorkontraktion mit Phenylephrin [0,2 µM] eine zweite Dosiswirkungskurve mit Acetylcholin an. Zwei Aortenringe wurden diesmal jedoch 15 min mit SOD [200 U/ml], die zwei weiteren Aortenringe mit HbO₂ [10 µM] vorinkubiert.

Nitrovasodilatoren: Die Vasorelaxation der Gefäßsegmente durch die Nitrate wurde durch kumulative Applikation der Komponenten nach Erreichen einer stabilen Vorkontraktion mittels Phenylephrin [3 µM] untersucht.

<i>In-vitro-Studie</i>	Organbadkonzentrationen
Glyceroltrinitrat	0.1 nM bis 10 µM
S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin	0.1 nM bis 10 µM
Isosorbiddinitrat	0.1 nM bis 0.1 mM
Isosorbidmononitrat	10 nM bis 1 mM
Pentaerythrityltetranitrat	10 pM bis 10 µM
3-Morpholino-Sydnominin	0.1 nM bis 10 µM

In der In-vivo-Studie (Atherosklerosestudie) wurde jeweils ein Aortenring vor einer SNAP Dosiswirkungskurve 15 min mit SOD [200 U/ml] vorinkubiert.

<i>In-vivo-Studie</i>	Organbadkonzentrationen
Isosorbidmononitrat	10 nM bis 1 mM
Pentaerythrityltetranitrat	10 pM bis 10 µM
S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin	0.1 nM bis 10 µM
S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin	0.1 nM bis 10 µM
+ SOD	

2.5.4 Auswertung

Die Auswertung der durch Vasokonstriktion und Vasodilatation bewirkten Tonusänderungen der Gefäße erfolgte für jedes Blutgefäß individuell durch eine zwischen der Äquilibrierungstonus- und der Ruhetonuslinie nach Auswaschung gezogenen Gerade.

Von diesen Geraden ließen sich die auf dem Schreiberpapier erfassten Tonusänderungen in mm ausmessen. Dieses Verfahren erlaubte eine Genauigkeit von etwa $\pm 0,5$ mm, was bei einem Schreiberausschlag von 3-6 cm einer Abweichung von etwa 1 % entspricht. Gemäß der Eichung entsprach 1 cm Schreiberausschlag einer Kraftentwicklung von 1 g, was eine Umrechnung der in mm gemessenen Tonusänderung in Gramm zuließ. Die Berechnung der Dosiswirkungskurven und der pD_2 -Werte erfolgte auf der Basis prozentualer Änderungen, wobei der stabile Tonus der jeweiligen Vorkontraktion bzw. erzielten Maximalkontraktion dem Wert 100 % entsprach.

2.5.5 Statistik

Das Ausmaß der Vasorelaxation durch die verschiedenen Wirkstoffe wird in Prozent der am Anfang des Experiments durch Phenylephrin vermittelten Vorkontraktion angegeben. Die Konzentration der Nitrovasodilatoren, die zu einer halbmaximalen Inhibition der Vorkontraktion führten (pD_2 -Werte), wurden mittels der individuellen Konzentration-Wirkungskurve nach der Methode von Hafner *et al.* [88] berechnet.

Alle Daten wurden mittels „One way analysis of variance“ (ANOVA) und nachfolgendem Student-Newman Keuls Test (SAS PC Software 6.04, PROC ANOVA, auch zur Berechnung der aufgezeichneten Konzentrations-Wirkungskurven benutzt) analysiert.

Die Ergebnisse wurden als Durchschnittswerte mit Standardfehler angegeben. Die pD_2 -Werte wurden zur Untersuchung auf Signifikanz herangezogen, P-Werte von weniger als 0.05 wurden als signifikant angenommen. Die unterschiedlichen arteriovenösen Wirkungen der einzelnen Nitrovasodilatoren wurden als Ratio angegeben. Das jeweilige Ratio wurde ermittelt durch Division der Konzentration, die zu einer halbmaximalen Inhibition der arteriellen Vorkontraktion führte, durch die venösen Konzentration.

2.5.6 Gefäßbadreinigung

Nach jedem Versuchstag wurden die Organbäder gründlich gereinigt, um Haftung organischer Nitrate am Glas und der damit verbundenen Versuchsverfälschung (z.B. Toleranzentstehung während der Äquilibrationsphase) durch Auswaschen vorzubeugen [2]. Nach viermaligem Ausspülen der Organbäder mit heißem Aqua bidest. und mechanischer Reinigung mit Reagenzglasbürsten wurde jedes Gefäß mit Perchlorsäure (70 %) aufgefüllt.

Vor dem nächsten Versuch wurde die Perchlorsäure entfernt und die Organbäder mit Aqua bidest. gespült, bis sie nach Prüfung mit pH-Papier neutral waren.

2.6 Färbung und Bestimmung der atherosklerotischen Fläche

2.6.1 Fixierung der Präparate

10 ml Formalin 37 % wurden mit 90 % Aqua bidest., welches 2,5 g Calciumacetat enthielt, vermischt. Die fertige Lösung wies einen pH von 6,8 auf. Nach Beendigung der Gefäßversuche erfolgte die Fixierung der Aortenringe, sowie des Aortenbogens und der Bauchorta in der so hergestellten Formollösung. Nach ca. 3-4 Stunden wurde die Fixierlösung gewechselt und die Präparate bei 4°C gelagert. Ein Austausch der Lösung sowie eine Kontrolle der Präparate fand alle 4-6 Wochen statt.

2.6.2 Färbung der Präparate mit Sudan IV

50 ml Aceton mussten mit 50 ml 70 % Alkohol gemischt werden. In dieses Gemisch brachte man dann 0,1 g Sudan IV, verschloss das Gefäß sorgfältig und schüttelte kräftig.

Die Lösung sollte dann ca. 2-7 Tage stehen. Vor der Anwendung wurde die Sudan IV-Lösung mittels Vakuum-Saugpumpe filtriert. Die fixierten Präparate wurden zunächst in Aqua bidest. ausgewaschen. Dann fand eine Vorbehandlung in 70 % Alkohol für 2-3 Minuten statt. Die Färbung erfolgte anschließend in der Sudan IV-Lösung für die Dauer von 2-3 Minuten. Eine Nachbehandlung, wiederum in 70 % Alkohol für 2-3 Minuten, sowie ein sich daran anschließendes Auswaschen beendeten den Färbeprozess.

Die gefärbten Präparate wurden ebenfalls in der Formolfixierlösung aufbewahrt.

2.6.3 Fotografieren der Aortenpräparate

Die mit Sudan IV gefärbten Präparate wurden jeweils unter gleichen Bedingungen auf weißem Hintergrund fotografiert. Zum Teil wurden hierbei einige Gefäßteile auf dem Untergrund angeklebt, um eine bestmögliche Auflage zu gewährleisten. Blitzlichtaufnahme bei Blende 32 mit 1/250 Sek.. **Kamera:** Mamiya RZ 67 Professional, **Objektiv:** Mamiya Sektor 2,8 / 110 mm. **Film:** Kodak TMX 6025, der größeren Genauigkeit wegen Verwendung von Schwarz-Weiß-Negativen (6x7 cm).

2.6.4 Bestimmung der Ausdehnung der atherosklerotischen Gefäßveränderungen

Für die Auswertung der Ausdehnung der atherosklerotischen Plaques wurde ein Computerscanner der Firma Molecular Dynamics (Modell 300 A) verwendet. Ermittelt wurde der prozentuale Anteil der atherosklerotisch veränderten Gefäßinnenfläche, bezogen auf die gesamte Intima der Aortenpräparate durch einen Computerscanner. Mit dem Computerprogramm Image Quant 3.15 war es möglich, zunächst die Gesamtfläche jeweils der Aortensegmente aufgrund der im Fotonegativ auftretenden Farbunterschiede zwischen Bildhintergrund und der Aortengesamtfläche, festzulegen.

In einem zweiten Schritt konnte anschließend aufgrund der durch die atherosklerotischen Läsionen bedingten Kontrastdifferenzen im jeweiligen Gefäßsegment, das Ausmaß der atherosklerotischen Fläche bestimmt werden. Die einzelnen Flächenmaße wurden per Flächenintegration errechnet. Dadurch, dass zum einen die Gesamtfläche der Aortensegmente, zum anderen die nur atherosklerotischen Fläche berechnet wurde, ließ sich der prozentuale Teil der atherosklerotischen Veränderungen an der Gesamtfläche des Gefäßes bestimmen.

2.7 Bestimmung der Blutfette (Triglyzeride, Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterol)

Zur Bestimmung der Blutfette wurde dem Versuchstier vor der Präparation 5 ml Blut entnommen und in einem Glasröhrchen gesammelt. Nach 30 min wurde die Probe für 15 min mit 4000 g zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde am gleichen Tag im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Universität Düsseldorf nach publizierten Standardmethoden [136;159;175] untersucht.

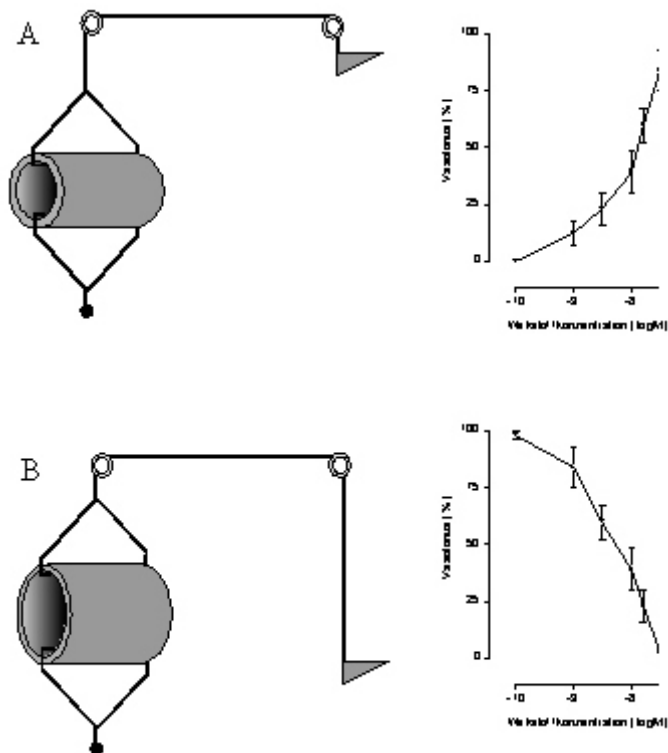
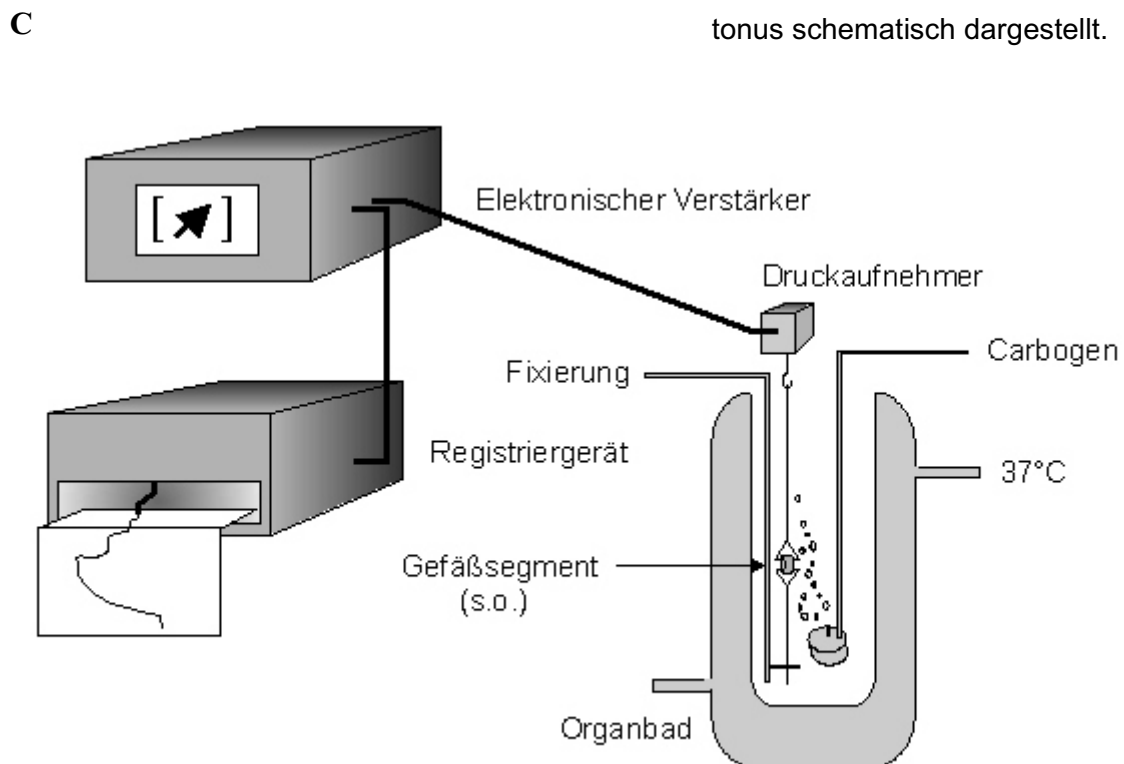


Abb. 2.1:

In Grafik **A** und **B** wird das Messverfahren schematisch dargestellt. Die Reaktion des isolierten Blutgefäßes auf einen pharmakologischen Reiz wird mit einem der physiologischen Funktion adäquaten Meßsystem erfasst.

Die Verengung eines Gefäßes (**A**) als Reaktion auf einen Vasokonstriktor, als auch die Erweiterung eines Gefäßes (**B**) als Reaktion auf einen Vasodilatator wird mit Hilfe der Änderung des Abstandes zweier Bügel, die das Gefäß aufgespannt halten, registriert.

In Grafik **C** wird der Versuchsaufbau zur Messung des Gefäßtonus schematisch dargestellt.



In-vitro-Studie		In-vivo-Studie			
42 Weiße Neuseeländer Kaninchen		18 Weiße Neuseeländer Kaninchen			
Präparation je eines Gefäßbrings <i>Aorta, Vena Cava</i> <i>Arteria pulmonalis, Vena pulmonalis</i> pro Tier		9 Kaninchen Kontrollgruppe		9 Kaninchen Cholesteroldiät	
		Präparation von je 4 Gefäßbringen thorakaler <i>Aorta</i> pro Tier			
Dosiswirkungskurve von Phenylephrin					
Dosiswirkungskurve von Acetylcholin nach Vorkontraktion mit 0,5 µM Phenylephrin		Dosiswirkungskurve von Acetylcholin nach Vorkontraktion mit 0,2 µM Phenylephrin			
		Vorinkubation zweier Aortenringe mit Oxyhämoglobin		Vorinkubation zweier Aortenringe mit SOD	
		Dosiswirkungskurve von Acetylcholin nach Vorkontraktion mit 0,2 µM Phenylephrin			
Dosiswirkungskurven kumulativ applizierter Nitrate (s. u.) nach Vorkontraktion mit 3 µM Phenylephrin					
je Versuchstag alle 4 Gefäßarten entweder mit SNAP oder PETN oder ISDN oder ISMN oder GTN oder SIN-1		je 1 Gefäß- ring mit PETN	je 1 Gefäß- ring mit ISMN	je 1 Gefäß- ring mit SNAP	je 1 Gefäß- ring mit SNAP +SOD

Abb. 2.2: Protokoll der gesamten Studie, aufgeteilt In-vitro-Studie, Wirksamkeit von Nitrovasodilatoren an gesunden Gefäßen, und In-vivo-Studie (Atherosklerosestudie), Wirksamkeit von Nitrovasodilatoren an atherosklerotischen Gefäßen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesunder Gefäße. Alle Konzentrationen siehe Material und Methoden. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

3.0 Ergebnisse

3.1 In-vitro-Studie

3.1.1 Kontraktile Eigenschaften gesunder Gefäße

Wir untersuchten die kontraktile Eigenschaften von Aorta, Vena cava, Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis durch Applikation der vasokonstriktorisch wirksamen Substanzen Kaliumchlorid und Phenylephrin in die Organbäder.

Eine Einzeldosis Kaliumchlorid [60 mM] führte bei allen untersuchten Gefäßtypen zu einer sich schnell entwickelnden, stabilen Kontraktion. Es traten keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Vasokonstriktion [g] auf. Lediglich im Fall der Vena cava waren diese vasokonstriktischen Effekte schwächer ausgeprägt (Tab. 3.1).

	Vasokonstriktorische Maximaleffekte von		pD ₂ -Werte von
	KCl [g]	PHE [g]	PHE [-logM]
Aorta thoracica	8,96 ± 1,4	14 ± 1,9	6,52 ± 0,03
Vena cava	1,17 ± 0,4 ^{abc}	1,4 ± 1,09 ^{abc}	5,60 ± 0,08 ^{abc}
Arteria pulmonalis	8,58 ± 1,4	10,2 ± 1,6	6,29 ± 0,02 ^b
Vena pulmonalis	6,26 ± 1,1	5,5 ± 1,09 ^{ac}	6,37 ± 0,05 ^c

Tab. 3.1: Vasokonstriktorische Maximaleffekte der untersuchten Gefäßsegmente nach Applikation der höchsten eingesetzten Konzentration von Kaliumchlorid [60 mM] und Phenylephrin [10 µM], angegeben in Gramm. Die Phenylephrinkonzentration, die zu einer halbmaximalen Kontraktion führte (pD₂-Wert), wurde anhand der entsprechenden Dosiswirkungskurve berechnet und in -logM angegeben (n = 42).

^a Unterschied signifikant zwischen Arterie und Vene der gleichen Zirkulation;

^b Unterschied signifikant zwischen den Arterien, bzw. Venen der jeweils anderen Zirkulation;

^c Unterschied signifikant zwischen Arterie und Vene der jeweils anderen Zirkulation (jeweils P<0,05).

Phenylephrin wurde kumulativ [10 nM bis 10 µM] in die Organbäder gegeben. Der maximale kontraktile Effekt stellte sich bei 10 µM Phenylephrin ein (Abb. 3.1).

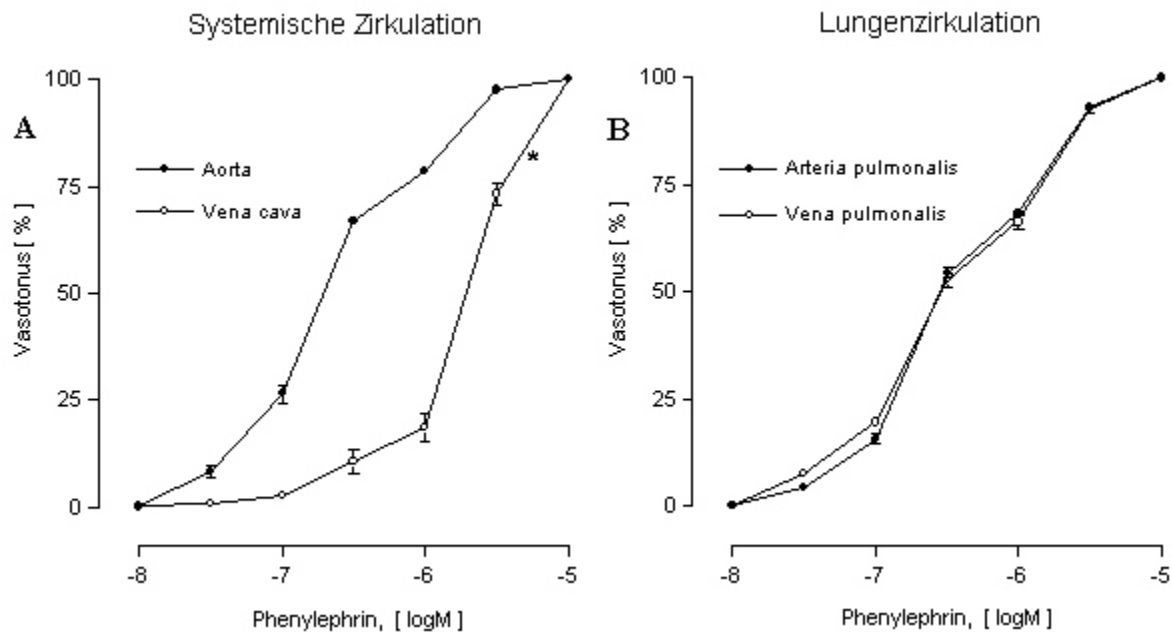


Abb.: 3.1: Vasokonstriktorische Aktivität von Phenylephrin an isolierter Aorta und Vena cava (**A**), sowie an isolierter Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis (**B**) männlicher weißer Neuseeländer Kaninchen der In-vitro-Studie. Jede Dosiswirkungskurve ist aus den Mittelwerten von 42 unterschiedlichen Tieren gebildet worden. Die vasokonstriktorische Aktivität wird als Prozentwert der maximalen Kontraktion angegeben. (S.E.M. jeweils als Balken angegeben). Signifikanter Unterschied der Phenylephrin pD_2 -Werte zwischen Aorta und V. cava mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$).

Die verschiedenen Gefäßtypen zeigten signifikante Unterschiede in ihrer maximalen kontraktile Reaktion. Im systemischen Kreislauf waren diese Unterschiede sehr ausgeprägt, was sich deutlich in einer, im Vergleich zwischen Aorta und Vena cava, um den Faktor 10 verstärkten Kontraktion zeigte. In der Lungenzirkulation waren diese Unterschiede weniger deutlich. Die Kontraktion der Arteria pulmonalis war lediglich um den Faktor zwei im Vergleich zur Vena pulmonalis verstärkt. Zwischen Aorta und A. pulmonalis traten keine signifikanten Unterschiede auf.

3.1.2 Einfluss des Endothels auf den Gefäßtonus gesunder Gefäße

Zur Überprüfung der Endothelfunktion der untersuchten Gefäßsegmente wurde nach submaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin [$0,5 \mu M$] eine kumulative Applikation von Acetylcholin [$1 nM$ bis $10 \mu M$] angeschlossen.

Vena cava, Vena pulmonalis und Aorta zeigten die beste endothelabhängige Relaxation, was sich in einer nahezu vollständigen Inhibition der Vorkontraktion durch 0,5 μ M Acetylcholin zeigte. Diese Reaktion war bei der Arteria pulmonalis signifikant schwächer ausgeprägt. Signifikante Unterschiede in der maximalen Vasorelaxation [%] traten jeweils zwischen Arterie und Vene der gleichen Zirkulation, zwischen beiden Arterien sowie zwischen Vena cava und Arteria pulmonalis auf. (Tab. 3.2; Abb. 3.2).

Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Effektivität von Acetylcholin, die als pD_2 -Werte ermittelt wurde. Auch hier war Acetylcholin an venösen Gefäßen wirksamer als an arteriellen Gefäßen. Der arteriovenöse Wirkungsunterschied war im systemischen Kreislauf (Ratio arteriell/venös: 30,9) ausgeprägter als in der Lungenzirkulation (Ratio arteriell/venös: 8,9). Alle Gefäße zeigten signifikant differierende pD_2 -Werte.

	Vasorelaxierende Maximaleffekte auf 0,5 μ M ACh [%]	pD_2 -Werte von ACh [-logM]
Aorta thoracica	71,6 $\pm$ 2,48	6,54 $\pm$ 0,07
Vena cava	87,3 $\pm$ 5,51 ^{ac}	8.03 $\pm$ 0,20 ^{abc}
Arteria pulmonalis	61,4 $\pm$ 3,66 ^b	6,12 $\pm$ 0,13 ^b
Vena pulmonalis	81 $\pm$ 6,38 ^a	7,07 $\pm$ 0,15 ^{ac}

Tab. 3.2: Vasorelaxierende Maximaleffekte der Aortensegmente nach Applikation von 0,5 μ M Acetylcholin, angegeben in Prozent. Die Acetylcholkonzentration, die zu einer halbmaximalen Inhibition der Vorkontraktion durch 0,5 μ M Phenylephrin führte (pD_2 -Wert), wurde anhand der entsprechenden Dosiswirkungskurve berechnet und in -logM angegeben (n = 42).

^a Unterschied signifikant zwischen Arterie und Vene der gleichen Zirkulation;

^b Unterschied signifikant zwischen den Arterien, bzw. Venen der jeweils anderen Zirkulation;

^c Unterschied signifikant zwischen Arterie und Vene der jeweils anderen Zirkulation (jeweils $P < 0,05$).

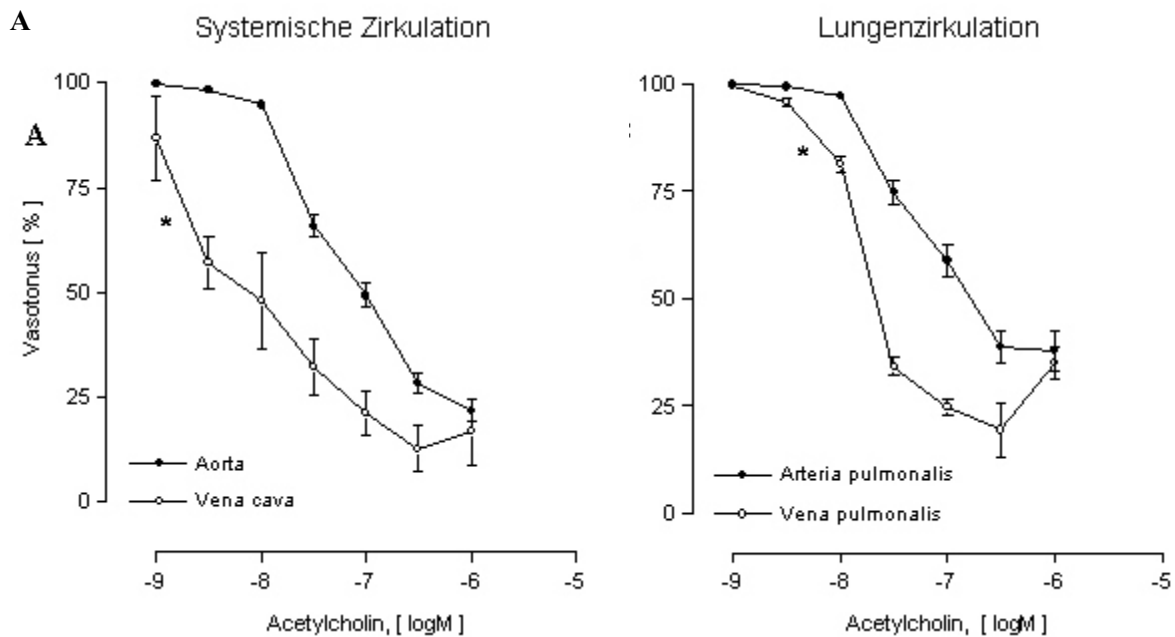


Abb.: 3.2: Endothelabhängige Vasorelaxation durch Acetylcholin an isolierter Aorta und Vena cava (A), sowie an isolierter Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis (B) männlicher weißer Neuseeländer Kaninchen der In-vitro-Studie. Jede Dosiswirkungskurve ist aus den Mittelwerten von 42 unterschiedlichen Tieren gebildet worden. Die vasodilatatorische Aktivität wird als Prozentwert der maximalen Kontraktion angegeben. (S.E.M. jeweils als Balken angegeben). Signifikante Unterschiede zwischen Arterie und Vene mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$).

3.1.3 Einfluss Organischer Nitrate und spontaner NO-Donoren auf den Gefäßtonus gesunder Gefäße

Alle organischen Nitrate und spontanen NO-Donoren zeigten eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation, die in einer nahezu vollständigen Inhibierung der Vorkontraktion (Phenylephrin 3 μM) von Aorta, Vena cava, Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis resultierte.

Alle Substanzen wiesen an venösen Blutgefäßen eine signifikant stärkere Effektivität, mit pD_2 -Wert bezeichnet, auf. Vena cava war am stärksten sensitiv (Tab. 3.3 und 3.4).

Alle untersuchten Substanzen unterschieden sich signifikant bezüglich ihrer Wirksamkeit. Ausnahmen stellten an der Aorta die Substanzen ISDN und Sin-1 sowie GTN und SNAP, an der Vena cava GTN und ISDN sowie GTN und Sin-1, an der Arteria pulmonalis GTN und SNAP, GTN und PETN sowie ISDN und Sin-1, an der Vena pulmonalis GTN und SNAP dar.

Systemischer Kreislauf		
	Aorta [-log M]	Vena cava [-logM]
PETN	7,90 + 0,15	9,92 + 0,23
GTN	7,07 + 0,10 ^a	8,24 + 0,11 ^{cd}
ISDN	6,25 + 0,11 ^b	7,96 + 0,23 ^c
ISMN	3,88 + 0,09	6,53 + 0,10

Tab. 3.3: pD₂-Werte der Nitrovasodilatoren Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN), Isosorbidmononitrat (ISMN), Pentaerythritoltetranitrat (PETN) an isolierten Gefäßsegmenten von Aorta und Vena cava. Die pD₂-Werte stellen die mittlere Konzentration dar, die in 7 individuellen Experimenten an Gefäßsegmenten unterschiedlicher Tiere zu einer halbmaximalen Inhibition der Vorkontraktion durch 3 µM Phenylephrin führte [-logM]. Alle organischen Nitrate und spontanen NO-Donoren unterschieden sich signifikant bezüglich ihrer Wirksamkeit (P<0,05).Ausnahmen:

^a GTN und SNAP an Aorta

^b ISDN und SIN-1 an Aorta

^c GTN und ISDN an Vena cava

^d GTN und SIN-1 an Vena cava

Systemischer Kreislauf		
	Aorta [-log M]	Vena cava [-logM]
SNAP	7,02 + 0,10 ^a	9,02 + 0,12
SIN-1	6,45 + 0,09 ^b	8,04 + 0,12 ^d

Tab. 3.4: pD₂-Werte der spontan NO liberierenden Nitrovasodilatoren S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) und 3-Morpholino-Sydnominin (SIN-1) an isolierten Gefäßsegmenten von Aorta und Vena cava. Die pD₂-Werte stellen die mittlere Konzentration dar, die in 7 individuellen Experimenten an Gefäßsegmenten unterschiedlicher Tiere zu einer halbmaximalen Inhibition der Vorkontraktion durch 3 µM Phenylephrin führte [-logM]. Alle organischen Nitrate und spontanen NO-Donoren unterschieden sich signifikant bezüglich ihrer Wirksamkeit (P<0,05).Ausnahmen:

^a GTN und SNAP an Aorta

^b ISDN und SIN-1 an Aorta

^d GTN und SIN-1 an Vena cava

Lungenkreislauf		
	Arteria pulmonalis [-logM]	Vena pulmonalis [-logM]
PETN	7,66 + 0,10 ^a	8,45 + 0,12
GTN	6,92 + 0,09 ^{ab}	7,58 + 0,05 ^d
ISDN	6,30 + 0,11 ^c	7,09 + 0,11
ISMN	4,63 + 0,04	5,05 + 0,10

Tab. 3.5: pD₂-Werte der Nitrovasodilatoren Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN), Isosorbidmononitrat (ISMN), Pentaerythritoltetranitrat (PETN) an isolierten Gefäßsegmenten von Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis. Die pD₂-Werte stellen die mittlere Konzentration dar, die in 7 individuellen Experimenten an Gefäßsegmenten unterschiedlicher Tiere zu einer halbmaximalen Inhibition der Vorkontraktion durch 3 µM Phenylephrin führte [-logM]. Alle organischen Nitrate und spontanen NO-Donoren unterschieden sich signifikant bezüglich ihrer Wirksamkeit (P<0,05). Ausnahmen:

^a GTN und PETN an Arteria pulmonalis

^b GTN und SNAP an Arteria pulmonalis

^c SIN-1 und ISDN an Arteria pulmonalis

^d GTN und SNAP an Vena pulmonalis

Lungenkreislauf		
	Arteria pulmonalis [-logM]	Vena pulmonalis [-logM]
SNAP	7,06 + 0,08 ^b	7,57 + 0,08 ^d
SIN-1	6,40 + 0,03 ^c	6,93 + 0,09

Tab. 3.6: pD₂-Werte der spontan NO liberierenden Nitrovasodilatoren S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) und 3-Morpholino-Sydnominin (SIN-1) an isolierten Gefäßsegmenten von Aorta, Vena cava, Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis. Die pD₂-Werte stellen die mittlere Konzentration dar, die in 7 individuellen Experimenten an Gefäßsegmenten unterschiedlicher Tiere zu einer halbmaximalen Inhibition der Vorkontraktion durch 3 µM Phenylephrin führte [-logM]. Alle organischen Nitrate und spontanen NO-Donoren unterschieden sich signifikant bezüglich ihrer Wirksamkeit (P<0,05). Ausnahmen:

^b GTN und SNAP an Arteria pulmonalis

^c SIN-1 und ISDN an Arteria pulmonalis

^d GTN und SNAP an Vena pulmonalis

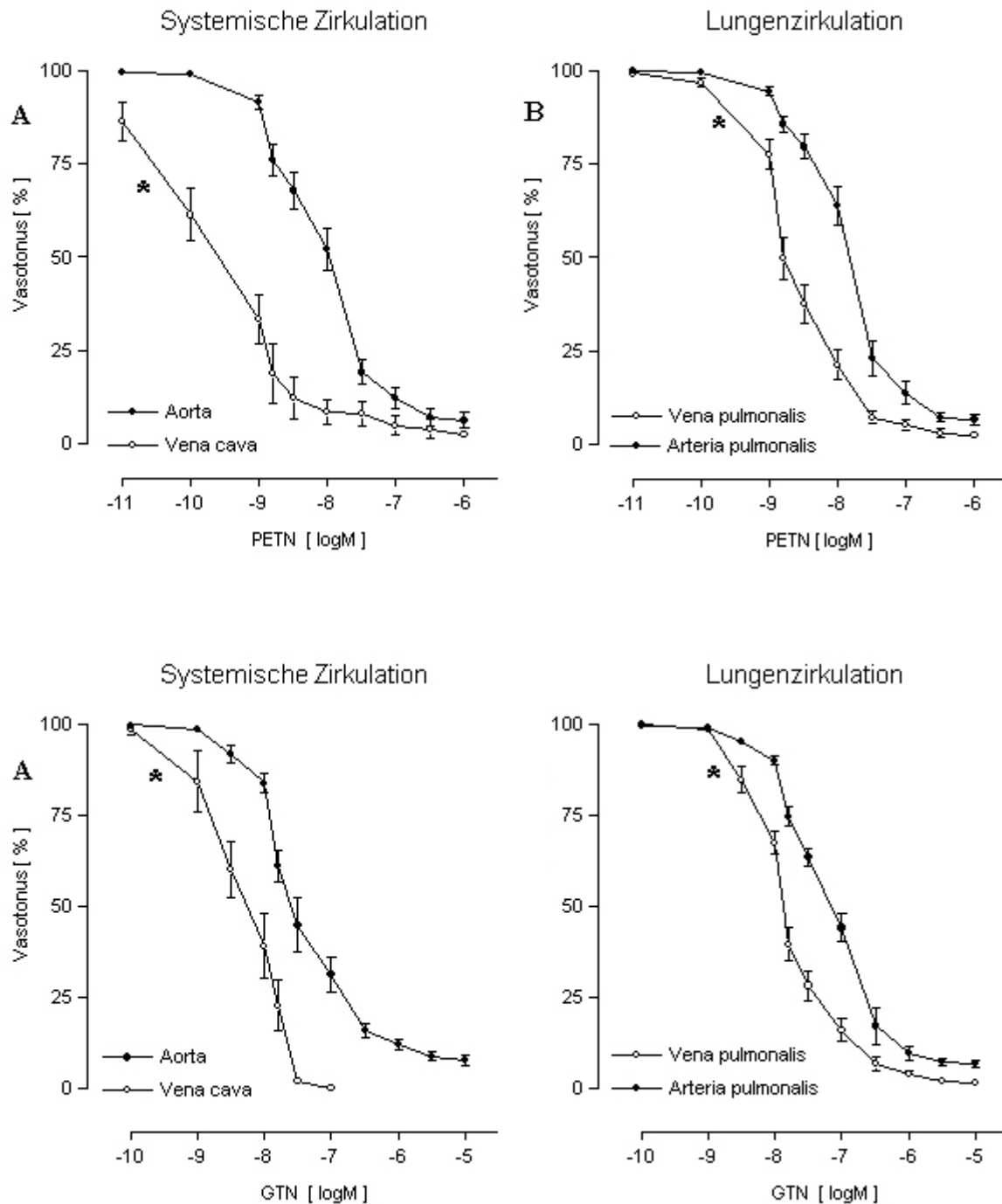


Abb. 3.3: Vasorelaxierende Aktivität von PETN und GTN an isolierter Aorta und Vena cava (**A**), sowie an isolierter Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis (**B**) männlicher weißer Neuseeländer Kaninchen der In-vitro-Studie. Jede Dosiswirkungskurve ist aus den Mittelwerten von 7 unterschiedlichen Tieren gebildet worden. Die vasodilatatorische Aktivität wird als Prozentwert der maximalen Kontraktion durch 3 μ M Phenylephrin angegeben (S.E.M. jeweils als Balken angegeben). Signifikante Unterschiede zwischen Arterie und Vene mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$).

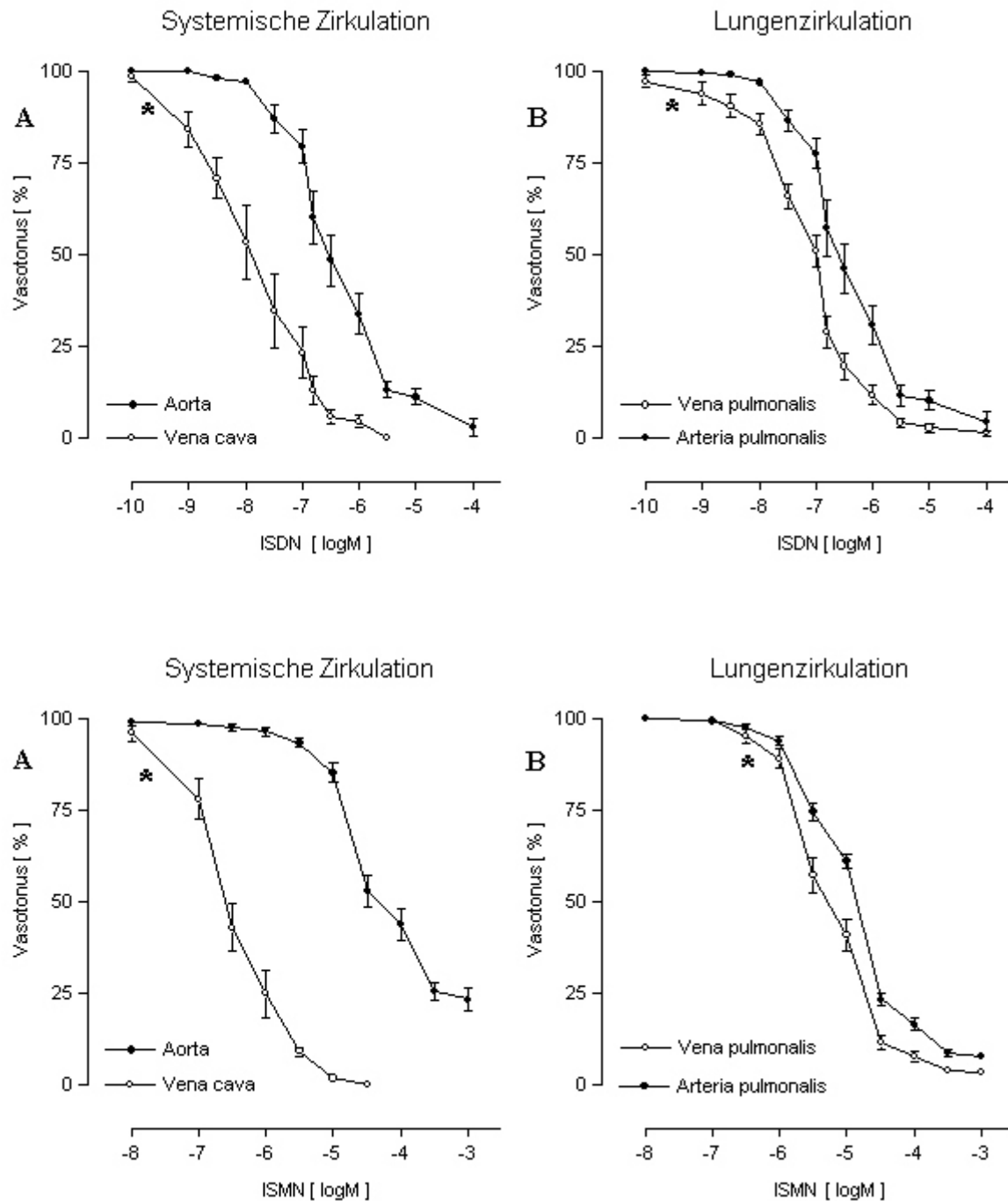
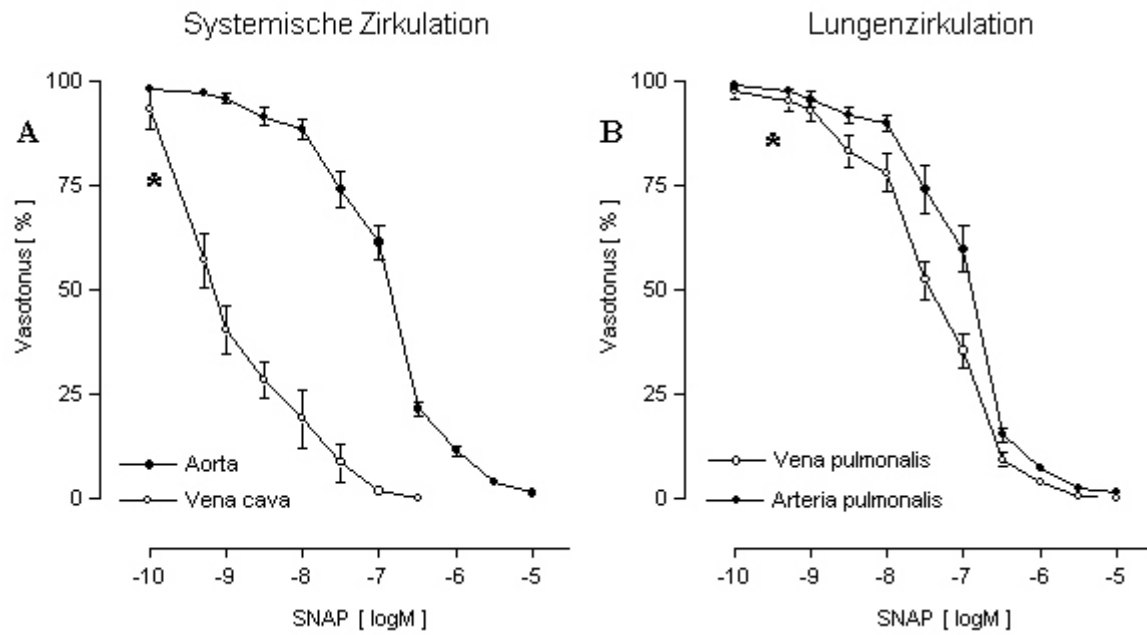


Abb. 3.4: Vasorelaxierende Aktivität von ISDN und ISMN an isolierter Aorta und Vena cava (A), sowie an isolierter Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis (B) männlicher weißer Neuseeländer Kaninchen der In-vitro-Studie. Jede Dosiswirkungskurve ist aus den Mittelwerten von 7 unterschiedlichen Tieren gebildet worden. Die vasodilatatorische Aktivität wird als Prozentwert der maximalen Kontraktion durch 3 μ M Phenylephrin angegeben (S.E.M. jeweils als Balken angegeben). Signifikante Unterschiede zwischen Arterie und Vene mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$).



.HA

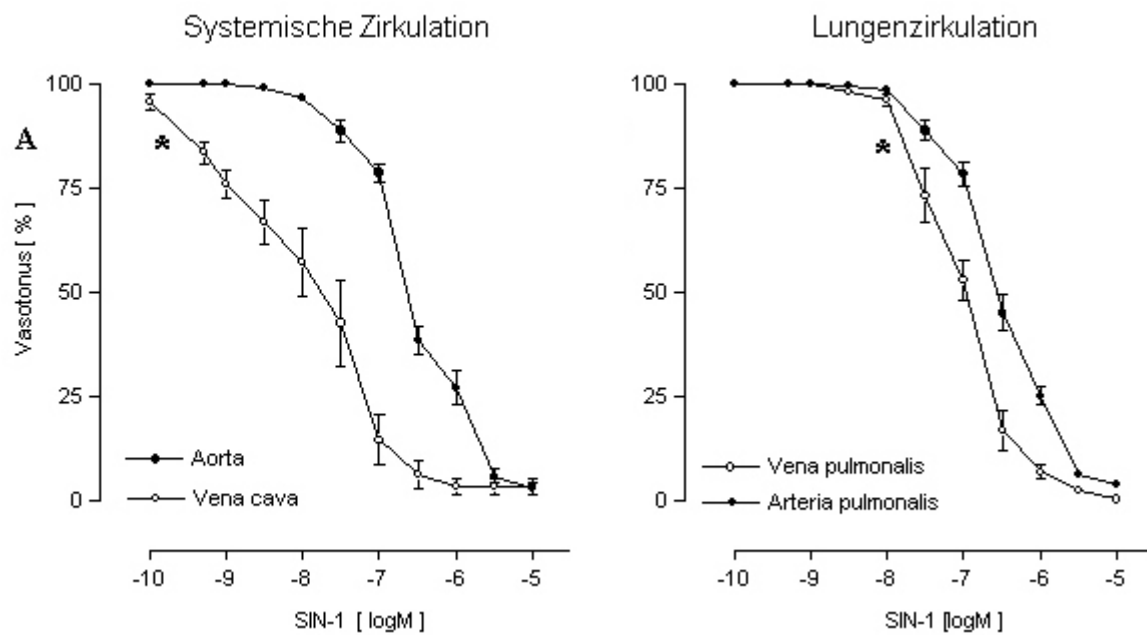


Abb. 3.5: Vasorelaxierende Aktivität von SNAP und SIN-1 an isolierter Aorta und Vena cava (A), sowie an isolierter Arteria pulmonalis und Vena pulmonalis (B) männlicher weißer Neuseeländer Kaninchen der In-vitro-Studie. Jede Dosiswirkungskurve ist aus den Mittelwerten von 7 unterschiedlichen Tieren gebildet worden. Die vasodilatatorische Aktivität wird als Prozentwert der maximalen Kontraktion durch 3 μ M Phenylephrin angegeben (S.E.M. jeweils als Balken angegeben). Signifikante Unterschiede zwischen Arterie und Vene mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$).

Ausgeprägt Unterschiede traten in den arteriovenösen Ratios, berechnet aus dem Quotienten der jeweiligen pD_2 -Werte, auf, was im systemischen Kreislauf besonders ausgeprägt war (Tab. 3.7; Abb. 3.6).

Im Vergleich zur Lungenzirkulation war das Ausmaß der bevorzugt venösen Relaxation im systemischen Kreislauf um bis zu zwei Zehnerpotenzen stärker ausgeprägt, was im Fall von ISMN sehr deutlich wurde (Tab. 3.5 und 3.7; Abb. 3.6).

Aber auch im systemischen Kreislauf traten Unterschiede in der Ausprägung der bevorzugt venösen Gefäßerweiterung auf. ISMN z.B. wies ein um den Faktor 20 verstärktes Ratio im Vergleich zu GTN auf. GTN, sowie ISDN waren fünffach weniger venoselektiv als der spontane NO-Donor SNAP (Tab. 3.7).

PETN war in allen Gefäßsegmenttypen der stärkste Nitrovasodilatator (Abb. 3.3; Tab. 3.3 und 3.5). Weiterhin wies diese Substanz ein hohes arteriovenöses Ratio im systemischen Kreislauf auf (Tab. 3.7). ISMN hingegen war der am wenigsten potente Vasodilatator. Die Substanz zeigte jedoch im systemischen Kreislauf das höchste arteriovenöses Ratio. Im Lungenkreislauf wiederum wies ISMN das im Vergleich zu anderen Nitrovasodilatoren niedrigste Ratio auf (Tab.3.5 und 3.7; Abb. 3.5).

	Bevorzugt venöse Vasodilatation im	
	Systemischen Kreislauf	Lungenkreislauf
PETN	104,7	6,2
GTN	14,8	4,6
ISDN	51,3	6,2
ISMN	446,7	2,6
SNAP	100,0	3,2
SIN-1	38,9	3,4

Tab. 3.7: Dargestellt ist das Verhältnis der halbmaximal wirksamen vasodilatativen Konzentration in Aorta/Vena cava (systemischen Kreislauf) und in Arteria pulmonalis/Vena pulmonalis (Lungenzirkulation). Je größer dieses Verhältnis umso venoselektiver ist die Substanz.

Die spontanen NO-Donoren SNAP und SIN-1 relaxierten ebenso bevorzugt venöse Blutgefäße. SNAP war signifikant potenter als SIN-1. Im systemischen Kreislauf entwickelte SNAP ein weit stärkeres arteriovenöses Ratio als SIN-1. In der Lungenzirkulation war dieser Unterschied nicht ausgeprägt (Tab.3.4, 3.6 und 3.7, Abb. 3.5).

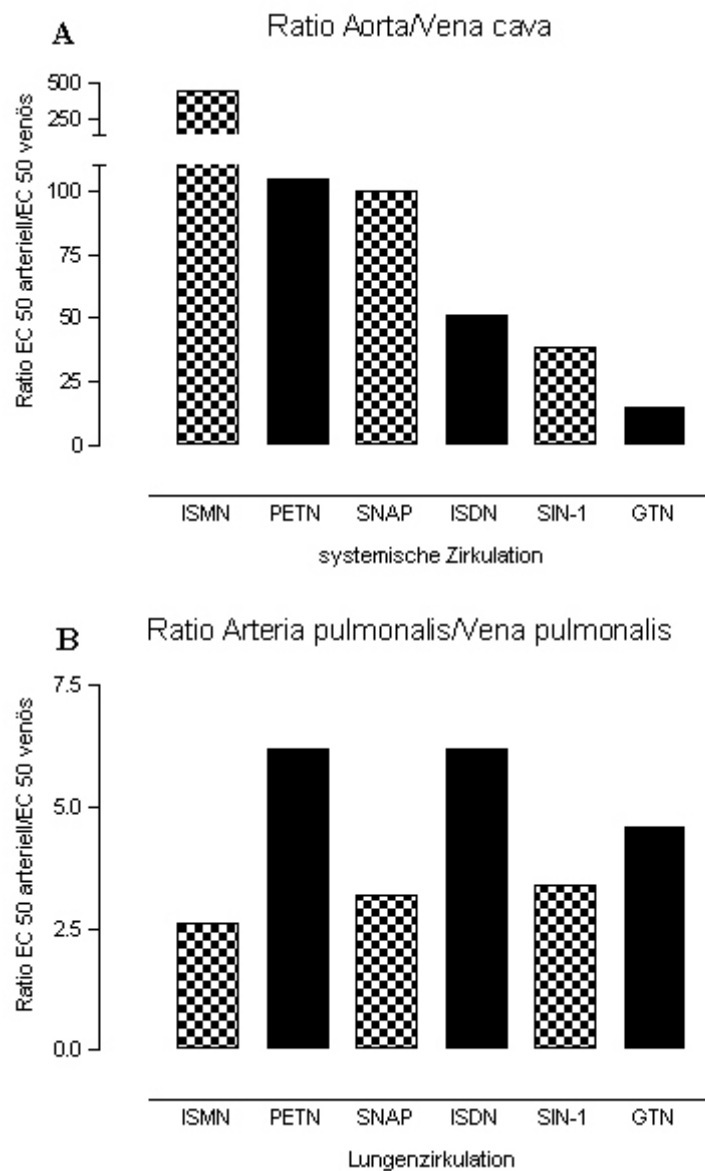


Abb. 3.6: Die arteriovenösen Wirkunterschiede der organischen Nitrovasodilatoren Pentaerythritoltetranitrat (PETN), Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Isosorbidmononitrat (ISMN), sowie der spontan Stickstoffmonoxid (NO)-liberierenden Nitrate S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) und 3-Morpholino-Sydnomin (SIN-1) im systemischen Kreislauf (**A**) und in der Lungenzirkulation (**B**) angegeben als Ratios. Die Ratios berechnen sich aus der Division der arteriellen pD_2 -Werte durch die venösen pD_2 -Werte.

3.2 In-vivo-Studie

3.2.1. Plasmalipide

Die Fütterung der Kaninchen mit cholesterolreicher Diät über 15 Wochen führte primär zu einem, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne cholesterolangereicherte Nahrung (Plasma-cholesterol: 46 mg/dl), ausgeprägten Anstieg der Plasmacholesterolverte auf 1358 mg/dl. Die Konzentration der Triglyzeride nahm dagegen nur leicht zu, während die HDL-Cholesterolfraktion nicht beeinflusst wurde (Tab. 3.8).

	Kontrollgruppe [mg/dl]	Cholesterolgegruppe [mg/dl]
Cholesterol	46 ± 5.1	1358 ± 111*
HDL-Cholesterol	29 ± 1.4	27 ± 3,3
Triglyzeride	35 ± 1.6	76 ± 9,5*

Tab. 3.8: Konzentration der Lipide im Serum von weißen Neuseeländer Kaninchen nach 15-wöchiger Fütterung mit Standardfutter (Kontrollgruppe) oder mit Cholesterolfutter (Cholesterolgegruppe). Angegeben sind die Mittelwerte ($\pm$ S.E.M., n = 9) (*, P<0,05).

3.2.2 Atherosklerotische Läsionen

Das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen in den untersuchten Aortensegmenten wurde durch Ermittlung des Verhältnisses der mit Sudan IV gefärbten atheromatösen Plaques zur gesamten Aortenintima mittels Laserscanner in Prozent bestimmt. Die Aorten der Kaninchen mit cholesterolreicher Nahrung wiesen gut sichtbare atherosklerotische Läsionen auf, welche im Aortenbogen stärker ausgeprägt waren, als in den Segmenten der thorakalen und abdominalen Aorta (Tab. 3.9).

Die Verteilung der Läsionen war nicht homogen und der prozentuale Anteil der geschädigten Intimaoberfläche variierte innerhalb der thorakalen Aortensegmente, die für diese funktionelle Untersuchung herangezogen wurden.

Atherosklerotische Läsionen [%]	
Aortenbogen	57,8 ± 6,4
Thorakale Aorta	40,6 ± 4,7
Abdominale Aorta	40,3 ± 5,5

Tab. 3.9: Fläche der atherosklerotischen Intimaläsionen angegeben als Prozentsatz der gesamten Intimaoberfläche mit S.E.M im Verlauf der Aorta aus 9 verschiedenen Experimenten.

3.2.3 Einfluss von Plasmacholesterol auf Intimaschäden

In diesem Abschnitt untersuchten wir, ob die Höhe der Plasmacholesterolkonzentration einen Einfluss auf die Ausprägung von Intimaschäden hat. Es konnte jedoch keine lineare Korrelation der Plasmacholesterolkonzentration mit dem Ausmaß der Intimaläsion oder mit der eingeschränkten maximalen Acetylcholinrelaxation (Ausmaß der endothelialen Dysfunktion) in Aortensegmenten cholesterolgefütterter Kaninchen nachgewiesen werden (Tab. 3.10; Abb. 3.7).

x-Achse	y-Achse	a	b	r	P
Plasma- cholesterol	Intima- läsionen	-0,01	52,84	0,0201	0,61
Plasma- cholesterol	Relaxation ACh	0,02	8,31	0,253	0,51

Tab. 3.10: Koeffizient für lineare Korrelationen zwischen den Parametern, die unter x-Achse und y-Achse gegeben sind. Die Daten wurden an Gefäßsegmenten thorakaler Aorta von weißen Neuseeländer Kaninchen der Cholesterolgegruppe ausgewertet, wobei nur Daten von Experimenten aus identischen Aortensegmenten korreliert wurden (a = Ordinatenschnittpunkt, b = Steigung, r = Korrelationskoeffizient, P = Grad der Signifikanz).

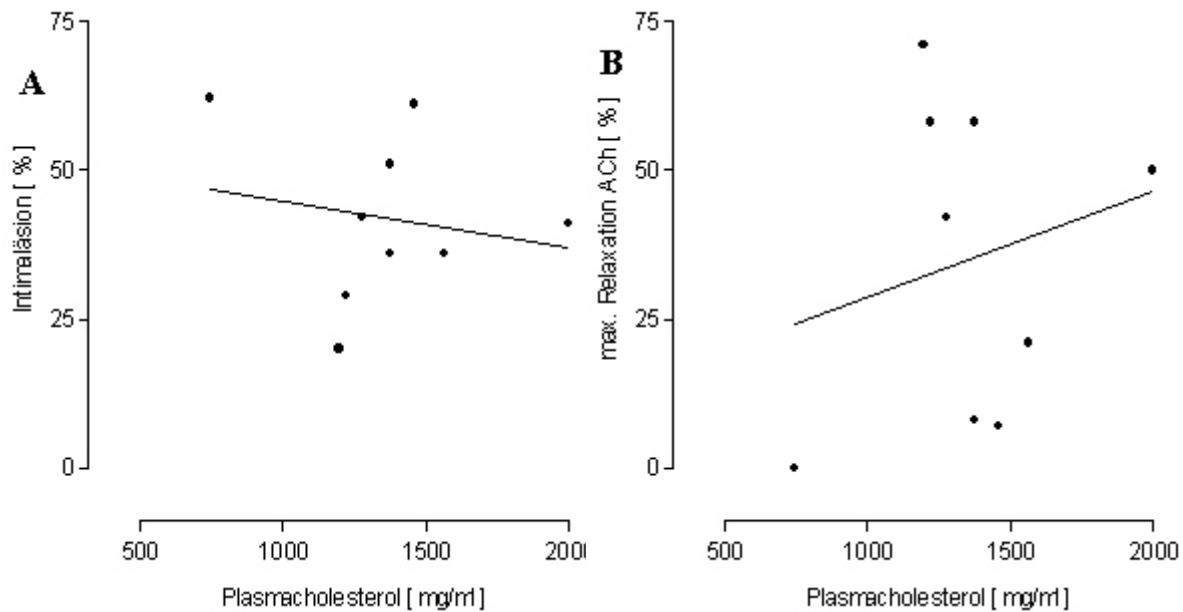


Abb. 3.7: Lineare Korrelation zwischen dem Prozentsatz der atherosklerotischen Läsionen der Intimaoberfläche (**A**) und zwischen dem Prozentsatz der endothelabhängigen Vasorelaxation durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Acetylcholin (**B**) an isolierten Aortensegmenten weißer Neuseeländer Kaninchen der Atherosklerosegruppe (4 Ringe/Tier) und der Höhe des Plasmacholesterols im jeweils identischen Tier.

3.2.4 Kontraktile Eigenschaften atherosklerotischer Gefäße

In der Atherosklerosestudie wurde die Kontraktilität der Aortensegmente durch kumulative Zugabe von Kaliumchlorid [60 mM] und Phenylephrin [10 nM bis 10 μM] in die Organbäder untersucht. Die Aortensegmente der Standardgruppe und der Cholesterolgegruppe zeigten in ihrer maximalen vasokonstriktorisches Reaktion auf KCl und Phenylephrin keine signifikanten Unterschiede. In der Cholesterolgegruppe zeigte sich eine leichte, jedoch signifikante Steigerung des Phenylephrin pD_2 -Wertes auf $-6,45 \pm 0,03$, verglichen zur Standardgruppe ($6,28 \pm 0,05$) (Tab. 3.11; Abb. 3.8).

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die kontraktile Reaktion der Aortensegmente der Kontrollgruppe nach Vorinkubation mit Oxyhämoglobin [10 $\mu\text{M/l}$] deutlich anstieg (von $5,19 \pm 0,68$ g auf $8,69 \pm 0,5$ g). Einen weniger deutlichen Anstieg beobachtete man nach Vorinkubation mit Superoxid Dismutase [200 U/ml] (von $5,03 \pm 0,61$ g auf $6,62 \pm 0,5$ g).

Ähnliche Ergebnisse traten in der Cholesterolgegruppe auf (Oxyhämoglobin: $4,5 \pm 0,6$ g auf $7,02 \pm 0,9$ g; Superoxid Dismutase: $4,1 \pm 0,4$ g auf $5,3 \pm 0,5$ g).

	Vasokonstriktorische Maximaleffekte		pD ₂ -Werte von
	von KCl [g]	von PHE [g]	PHE [-logM]
Kontrollgruppe	7,3 ± 0,24	13,4 ± 0,37	6,28 ± 0,05
Atherosklerosegruppe	6,8 ± 0,33	12,5 ± 0,51	6,45 ± 0,03*

Tab. 3.11: Vasokonstriktorische Maximaleffekte der Aortensegmente der In-vivo-Studie nach Applikation der höchsten eingesetzten Konzentration von Kaliumchlorid [60 mM] und Phenylephrin [10 µM], angegeben in Gramm. Die Phenylephrinkonzentration, die zu einer halbmaximalen Kontraktion führte (pD₂-Wert), wurde anhand der entsprechenden Dosiswirkungskurve berechnet und in -logM angegeben (n = 18). Signifikanter Unterschied der Phenylephrin pD₂-Werte zwischen Kontrollgruppe und Atherosklerosegruppe mit * gekennzeichnet (P<0,05).

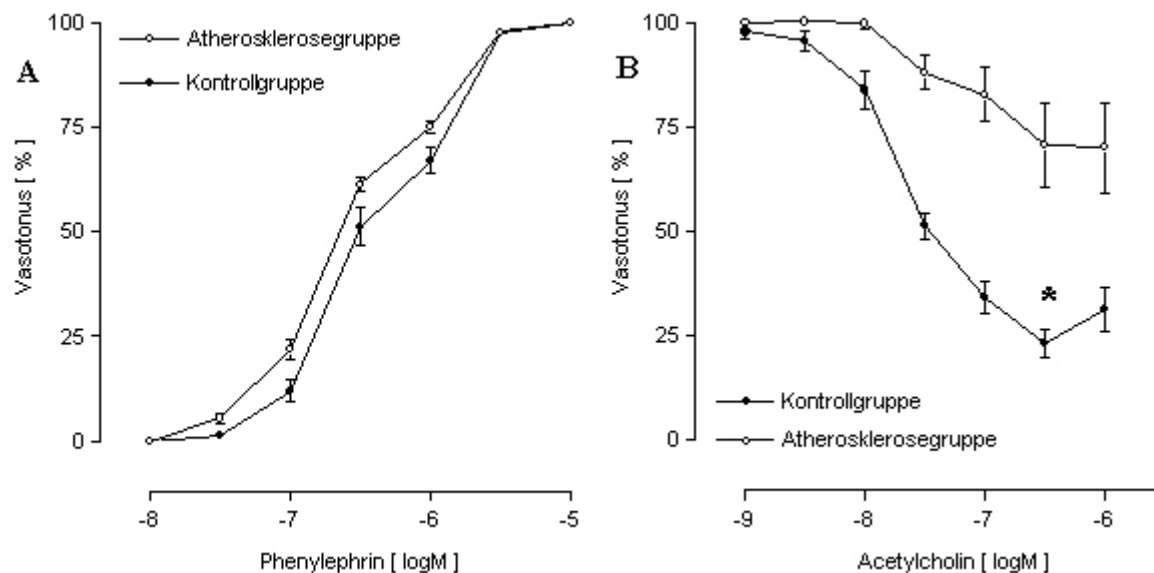


Abb. 3.8: Vasokonstriktorische Aktivität durch Phenylephrin (**A**) und endothelabhängige Vasodilatation durch Acetylcholin nach Vorkontraktion mit 0,2 µM Phenylephrin (**B**) an isolierter Aorta männlicher weißer Neuseeländer Kaninchen der Kontrollgruppe und der Atherosklerosegruppe. Jede Dosiswirkungskurve ist aus den Mittelwerten von 18 unterschiedlichen Tieren gebildet worden. Der jeweilige Vasotonus wird als Prozentwert der maximalen Kontraktion angegeben (S.E.M. jeweils als Balken angegeben). Signifikante Unterschiede der pD₂-Werte mit * gekennzeichnet (P<0,05).

3.2.5 Einfluss des Endothels auf den Gefäßtonus atherosklerotischer Gefäßsegmente

In der Atherosklerosestudie wurde neben der Bestimmung der atherosklerotischen Fläche auch das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion bestimmt.

Hierzu wurden die Aortensegmente nach submaximaler Kontraktion mit Phenylephrin [0,2 µM] wie in der In-vitro-Studie steigenden Dosen von Acetylcholin ausgesetzt.

Die Vasorelaxation der Kontrollgefäße nahm bis zu einer Acetylcholindosis von 0,5 µM zu. Höhere Dosen führten zu einer Vasokonstriktion.

Aortensegmente der Cholesterolgegruppe zeigten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigte Reaktion auf Acetylcholin (Tab. 3.12; Abb. 3.8).

	pD ₂ -Werte von ACh [-logM]
Kontrollgruppe	6,99 ± 0,10
Atherosklerosegruppe	7,19 ± 1,22*

Tab. 3.12: Vasorelaxierende Maximaleffekte der Aortensegmente der In-vivo-Studie nach Applikation von 0,5 µM Acetylcholin, angegeben in Prozent. Die Acetylcholkonzentration, die zu einer halbmaximalen Kontraktion führte (pD₂-Wert), wurde anhand der entsprechenden Dosiswirkungskurve berechnet und in -logM angegeben (n = 9) (*, P<0,05).

Weiterhin wurde untersucht, ob die endotheliale Dysfunktion, dargestellt als mittlerer vasorelaxierender Maximaleffekt von Acetylcholin [0,5 µM], durch das Ausmaß der Intimaläsionen beeinflusst wird (Tab. 3.13; Abb. 3.9).

x-Achse	y-Achse	a	b	r	P
Intima-läsionen	Relaxation ACh	-1,65	102,28	-0,938	0,0002

Tab. 3.13: Lineare Korrelationen zwischen den Parametern, die unter x-Achse und y-Achse gegeben sind. Die Daten wurden an Gefäßsegmenten thorakaler Aorta von weißen Neuseeländer Kaninchen der Cholesterolgegruppe ausgewertet, wobei nur Daten von Experimenten aus identischen Aortensegmenten korreliert wurden (a = Ordinatenschnittpunkt, b = Steigung, r = Korrelationskoeffizient, P = Grad der Signifikanz).

In einer linearen Korrelation konnte nachgewiesen werden, dass die endothelabhängige Vaso-relaxation von der Ausprägung der atherosklerotischen Intimaschäden abhängig ist ($P < 0,0002$) (Tab. 3.13; Abb. 3.9).

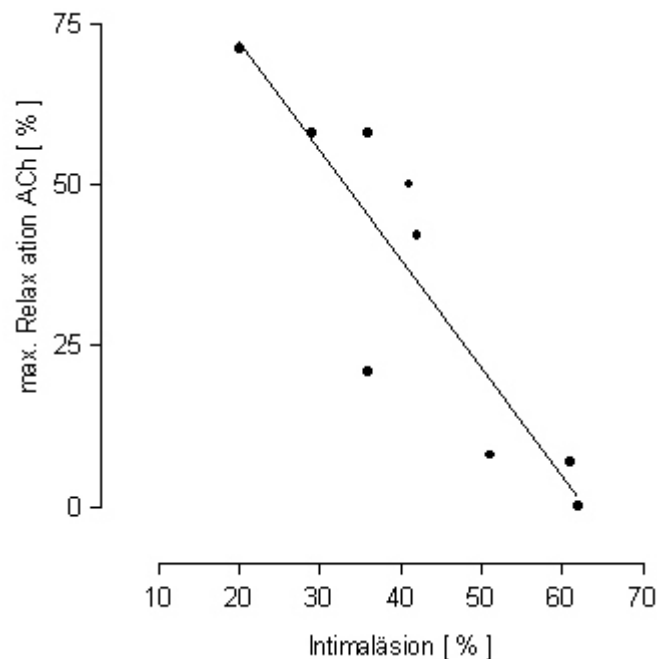


Abb. 3.9: Lineare Korrelation zwischen dem Prozentsatz der endothelabhängigen Vaso-relaxation durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Acetylcholin an isolierten Aortensegmenten männlicher weißer Neuseeländer Kaninchen der Atherosklerosegruppe (4 Ringe/Tier) und dem Prozentsatz der mit Sudan IV gefärbten atherosklerotischen Läsionen (Intimaläsion), die in der Intimaoberfläche der identischen Gefäße mit Hilfe eines Laserscanners ermittelt wurden ($P = 0,0002$).

3.2.6 Einfluss von Organischen Nitraten und spontanen NO-Donoren auf den Gefäßtonus atherosklerotischer Gefäße

Zur Untersuchung der Einflüsse von Atherosklerose auf die Wirkung von Nitrovasodilatoren mit unterschiedlichen Mechanismen der NO-Freisetzung wurden die Substanzen ISMN, PETN, SNAP und SNAP + SOD an Gefäßsegmenten isolierter thorakaler Aorta von männlichen Kaninchen untersucht, die entweder einer Cholesteroldiät unterzogen wurden, oder cholesterolfreies Futter bekamen.

Alle Nitrovasodilatoren zeigten auch in den atherosklerotischen Aortensegmenten der In-vivo-Studie konzentrationsabhängige Relaxationen (Tab. 3.14).

	SNAP [-logM]	ISMN [-logM]	PETN [-logM]
Kontrollgruppe	6,76 ± 0,06	4,16 ± 0,05	7,46 ± 0,10
Cholesterolgegruppe	6,22 ± 0,15*	4,05 ± 0,21	7,11 ± 0,26

Tab. 3.14: Konzentrationen der Nitrovasodilatoren, die zu einer halbmaximalen Inhibition der Gefäßvorspannung durch 3 µM Phenylephrin führten, berechnet aus der individuellen Konzentrationswirkungskurve (Mittelwert ± Standardfehler aus 9 unterschiedlichen Experimenten (Tieren) mit jeweils einem Gefäßring). Signifikante Unterschiede der pD₂-Werte von SNAP zwischen Kontrollgruppe und Cholesterolgegruppe mit * gekennzeichnet (P<0,05). ISMN und PETN wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Die kumulative Applikation von SNAP führte in den atherosklerotischen Gefäßen zu einer Vasorelaxation (Abb. 3.10), die signifikant schwächer ausgeprägt war, als in der Kontrollgruppe. Die zugehörige Dosiswirkungskurve der Cholesterolgegruppe war nach rechts verschoben und der pD₂-Wert nahm von 6,76 ± 0,06 nach 6,22 ± 0,14 ab. Eine direkte signifikante Korrelation konnte in der Cholesterolgegruppe zwischen den pD₂-Werten von SNAP und der korrespondierenden maximalen Relaxation durch 0,5 µM Acetylcholin nachgewiesen werden (Tab. 3.15; Abb. 3.11).

Eine ansteigende Konzentration von ISMN und PETN induzierte ebenso eine dosisabhängige Vasorelaxation in atherosklerotischen Gefäßen.

Insgesamt war PETN um drei Zehnerpotenzen wirksamer als ISMN.

Im Gegensatz zu SNAP wurden ISMN und PETN in ihrer Effektivität nicht durch eine atherosklerotisch bedingte endotheliale Dysfunktion beeinträchtigt (Tab. 3.14).

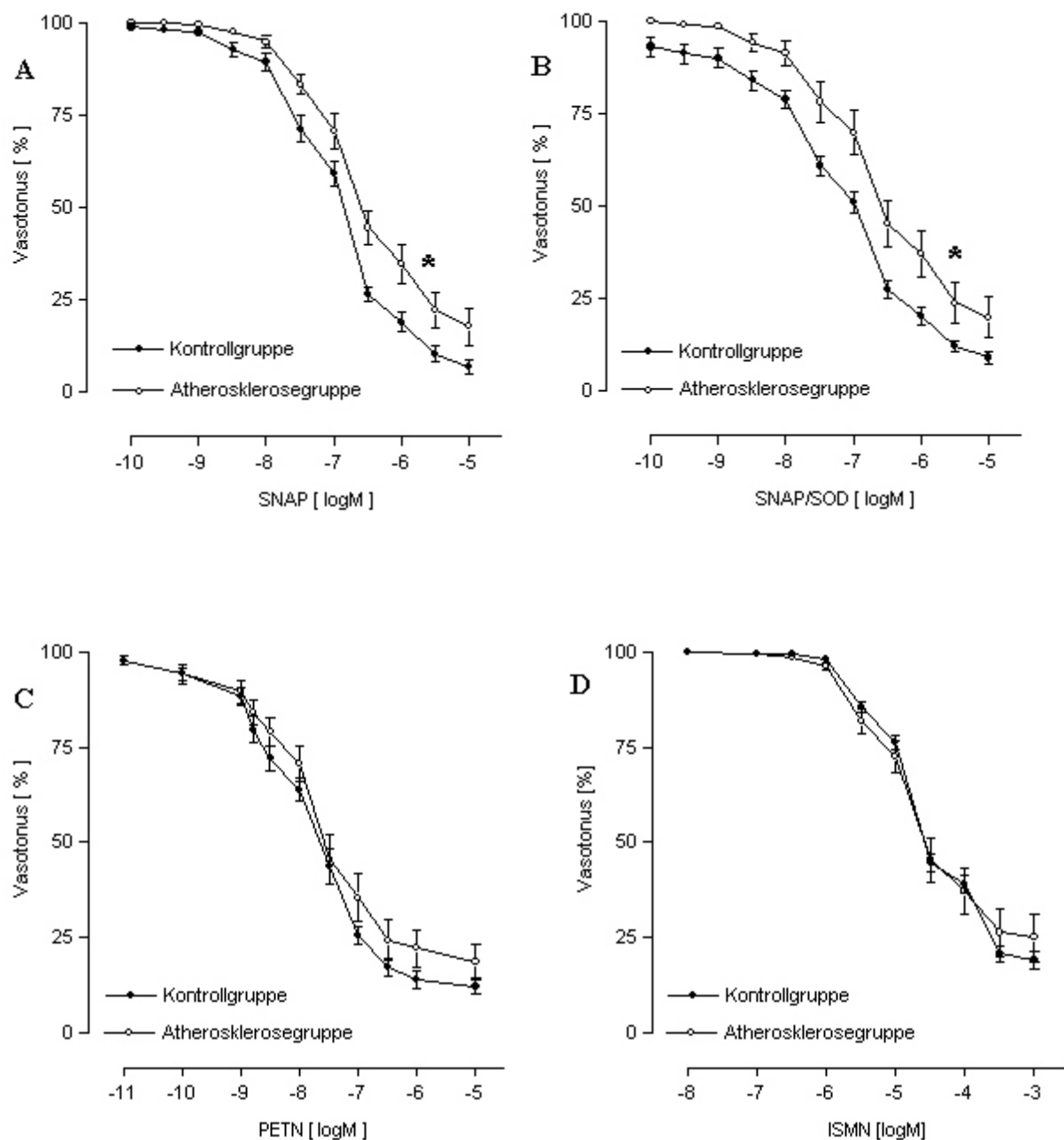


Abb. 3.10: Vasorelaxierende Aktivität von S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) mit (B) und ohne Superoxiddismutase (SOD) (A), sowie von Pentaerythryltetranitrat (PETN) (C) und Isosorbidmononitrat (ISMN) (D) Vorinkubation an isolierten Aortensegmenten von männlichen weißen Neuseeländer Kaninchen der Kontrollgruppe und der Atherosklerosegruppe der In-vivo-Studie. Jede Dosis-wirkungskurve ist aus den Mittelwerten von 9 unterschiedlichen Tieren gebildet worden. Die vasodilatative Aktivität wird als Prozentwert der maximalen Kontraktion angegeben (S.E.M. jeweils als Balken angegeben). SOD führte zu einer Wirkungsverbesserung in der Kontrollgruppe, in der Atherosklerosegruppe fanden sich kein signifikanter Unterschied (s. Tab. 3.16 und 3.17). Signifikante Unterschiede der PD_{50} -Werte mit * gekennzeichnet ($P < 0,05$).

x-Achse	y-Achse	a	b	r	P
Relaxation ACh	pD ₂ -Wert SNAP	0,01	5,77	0,727	0,03

Tab. 3.15: Lineare Korrelationen zwischen den Parametern, die unter x-Achse und y-Achse gegeben sind. Die Daten wurden an Gefäßsegmenten thorakaler Aorta von weißen Neuseeländer Kaninchen der Cholesterolgegruppe ausgewertet, wobei nur Daten von Experimenten aus identischen Aortensegmenten korreliert wurden (a = Ordinatenschnittpunkt, b = Steigung, r = Korrelationskoeffizient, P = Grad der Signifikanz).

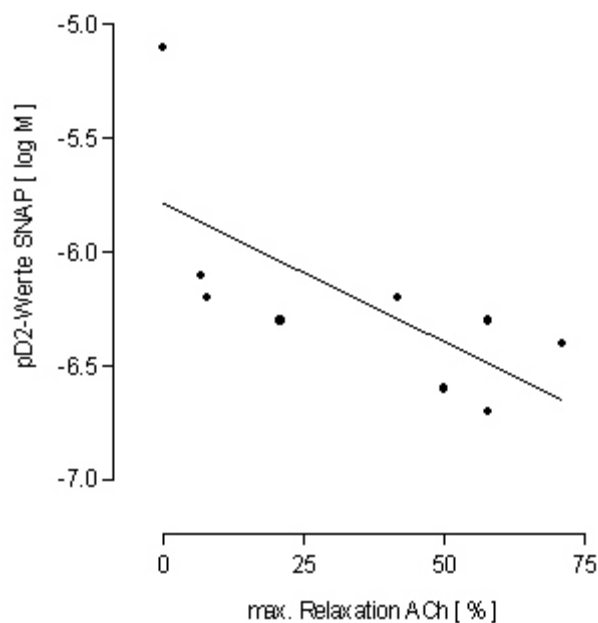


Abb. 3.11: Lineare Korrelation zwischen den pD₂-Werte von S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) an isolierten Aortensegmenten männlicher weißer Neuseeländer Kaninchen der Atherosklerosegruppe (2 Ringe/Tier) und dem Prozentsatz der endothelabhängigen Vasorelaxation durch 1 µmol/l Acetylcholin (ACh) (4 Ringe/Tier) an identischen Aortensegmenten (P = 0,03).

3.2.7 Effekte von Oxyhämoglobin und Superoxid Dismutase

Oxyhämoglobin inhibierte die vasodilatatorischen Effekte von Acetylcholin vollständig und 0,5 µM Acetylcholin führten bereits zu einer Vasokonstriktion.

Kontrollgruppe	ohne Vor- inkubation	mit SOD	mit HbO ₂
Maximale Acetylcholinrelaxation [%]	76,8 + 3,6	72,6 ± 4,6	-3,2 ± 4,3#
Maximale SNAP-Relaxation [%]	93,1 ± 1,8	90,9 ± 1,6	-
pD ₂ -Werte von SNAP	-6,76 ± 0,06	-7,06 ± 0,12	-

Tab. 3.16: Die Werte stellen die Mittelwerte ± Standardfehler von 9 Experimenten (Tieren) mit jeweils 1-4 Aortensegmenten dar. Die maximale Vasorelaxation von Acetylcholin [0,5 µM] und S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) [10 µM] werden als maximale Inhibition der Vorkontraktion durch Phenylephrin dargestellt (# = Vasokonstriktion).

In Anwesenheit von HbO₂ entwickelte Acetylcholin keine Vasorelaxation, es kam zu einer Vasokonstriktion. SOD [200 U/ml] hatte keinen Einfluss auf die Wirkung von Acetylcholin. Die vasorelaxierende Wirkung von SNAP in Kontrollgefäßen wurde jedoch signifikant verbessert (Tab. 3.16). In der Cholesterolgegruppe zeigten sich keine Auswirkungen (Tab. 3.17).

Cholesterolgegruppe	ohne Vor- inkubation	mit SOD	mit HbO ₂
Maximale Acetylcholinrelaxation [%]	29,4 + 10,16	29,1 + 7,2	-13,8 + 5,05#
Maximale SNAP-Relaxation [%]	82,2 + 5,02	80,0 + 5,48	-
pD ₂ -Werte von SNAP	-6,22 + 0,15	-6,25 + 0,23	-

Tab. 3.17: Die Werte stellen die Mittelwerte ± Standardfehler von 9 Experimenten (Tieren) mit jeweils 1-4 Aortensegmenten dar. Die maximale Vasorelaxation von Acetylcholin [0,5 µM] und S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) [10 µM] werden als maximale Inhibition der Vorkontraktion durch Phenylephrin dargestellt (# = Vasokonstriktion).

4.0 Diskussion

4.1 Organbadstudien

4.1.1 Wirkung von Vasokonstriktoren

Wir untersuchten die kontraktile Eigenschaften von gesunder Aorta thoracica, Vena cava, Arteria und Vena pulmonalis (In-vitro-Studie) sowie gesunder und atherosklerotisch veränderter Aorta thoracica (In-vivo-Studie) männlicher weißer Neuseeländer Kaninchen.

4.1.1.1 *In-vitro-Studie*

Die Unterschiede in der Kontraktilität waren im systemischen Kreislauf zwischen Aorta und Vena cava stärker ausgeprägt, als in der Lungenzirkulation zwischen Arteria und Vena pulmonalis. Dieser Effekt trat sowohl beim vasokonstriktorischem Maximaleffekt durch $10\text{ }\mu\text{m}$ Phenylephrin (Faktor 10 zwischen Aorta und Vena Cava im Vergleich zu Faktor 2 zwischen Arteria und Vena pulmonalis), als auch in der Phenylephrin-Dosiswirkungskurve durch den pD_2 -Wert verdeutlicht, auf (Tab. 3.1).

Aorta sowie Arteria pulmonalis wiesen in ihrer kontraktile Antwort auf KCl und Phenylephrin einen im Vergleich zu den Venen verstärkten vasokonstriktorischem Effekt auf. Arterien vom elastischen Typ weisen eine im Vergleich zu Venen größere Schicht glatter Muskelzellen auf, was bei der unterschiedlichen kontraktile Antwort der untersuchten Blutgefäße auf KCl von Bedeutung ist.

Die Gefäßsegmente der Arteria pulmonalis gehören zur Lungenzirkulation, somit zum Niederdrucksystem. Diese weisen eine dünnere Muskelschicht als die Aorta auf, was kontraktile Unterschiede zwischen den untersuchten Arterien nach KCl-Gabe erklärt.

Die vergleichsweise zur Vena pulmonalis schwache Kontraktion der Vena Cava ist wahrscheinlich bedingt durch die Ausrichtung der jeweiligen Muskelfasern, sowie durch die Versuchsanordnung mit Verwendung von 5 cm messenden intakten Gefäßsegmenten.

In Gefäßsegmenten der Vena cava herrschen Muskelfasern mit einer longitudinalen Anordnung vor, während man in der Vena pulmonalis größtenteils eine diagonale Anordnung der glatten Gefäßmuskulatur findet, welche weitestgehend der in Arterien entspricht [134].

Vasokonstriktorisches Differenzen zwischen den untersuchten Gefäßen nach Applikation des α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin könnten sowohl durch den Aufbau der jeweiligen Gefäßwand, als auch durch die Dichte an α -Rezeptoren bedingt sein.

4.1.1.2 *In-vivo-Studie*

In der In-vivo-Studie traten Unterschiede in der Kontraktilität der Aortensegmente zwischen der Gruppe der Kaninchen mit cholesterolhaltigem Futter und der Gruppe mit Standardfutter auf.

Der pD_2 -Wert des α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin, als Maß für die halbmaximale kontraktile Wirkung dieser Substanz, wies in der Cholesterolgegruppe eine signifikante Verbesserung auf (Abb. 3.11).

In der maximalen vasokonstriktorisches Reaktion auf 10 μ m Phenylephrin fanden wir jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Aortensegmenten der Standardgruppe und der Cholesterolgegruppe (Abb. 3.11).

Eine gestörte Gefäßtonusregulation atheromatöser Gefäße mit verstärkter Reaktion auf kontraktile Substanzen wurde auch schon von anderen Autoren berichtet [72]. So führte bei Basilararterien eine Behandlung mit Methylenblau oder eine mechanische Entfernung des Endothels zu einem Anstieg der Kontraktilität nach Stimulation mit PGF_2 alpha [113].

Das Ergebnis einer vergleichbaren maximalen Vasokonstriktion jedoch, sowie anderweitig publizierte Daten [213] legen nahe, dass ein direkter Einfluss der Atherosklerose auf den intrazellulären kontraktilen Mechanismus eher unwahrscheinlich ist.

Die kleinen, jedoch signifikanten Unterschiede der pD_2 -Werte zwischen den beiden Gruppen könnten dadurch bedingt sein, dass das Endothel selbst z.B. durch Produktion von EDRF/NO und/oder Prostazyklin bedingt, den durch PGF_2 alpha induzierten transmembranen Kalziumeinstrom durch rezeptorkontrollierte Kalziumkanäle abschwächt [113].

Denkbar wären auch leichte Variationen in der Empfindlichkeit von α_1 -Adrenozeptoren, die durch atherosklerotische Veränderungen bedingt sein könnten [70].

4.1.2 Endothelabhängige Vasorelaxation

Endothelzellen spielen eine obligatorische Rolle bei der Vasorelaxation durch eine Vielzahl von Substanzen (ACh, Bradykinin, Substance P, Thrombin, ATP) [69;70;172;173]. Sie setzen den sogenannten Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF) frei. EDRF, mit NO identisch [170], ist der biologische Transmitter, der die Erregung vom endothelialen muscarinergen Rezeptor zum Second Messenger im glatten Gefäßmuskel überträgt [69].

NO-bindendes Oxyhämoglobin inhibiert somit eine endothelabhängige Vasorelaxation vollständig [155]. Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Oxyhämoglobin die vasodilatatorischen Effekte von Acetylcholin völlig unterdrückte und 0,5 µM Acetylcholin bereits zu einer Vasokonstriktion führten (Tab. 3.16).

Die Funktion des Endothels der durch Phenylephrin submaximal vorkontrahierten Gefäße wurde in dieser Studie durch kumulative Applikation von 1 nM bis 10 µM Acetylcholin in die Organbäder untersucht.

Um jegliche Einflüsse durch die Gefäßspannung auf die acetylcholininduzierte Vasorelaxation zu vermeiden, wurden die Experimente nach Erreichen einer vergleichbaren Vorkontraktion durchgeführt, wozu unterschiedliche Phenylephrinkonzentrationen notwendig waren.

4.1.2.1 *Endothelabhängige Vasorelaxation, In-vitro-Studie*

In unseren Versuchen zeigten Venen von Kaninchen eine im Vergleich zu Arterien stärkere endothelabhängige Vasorelaxation. Vena cava inferior und Vena pulmonalis wiesen die beste dosisabhängige Vasorelaxation durch Acetylcholin auf, während Aorta thoracica schwächer auf diese Substanz reagierte.

Bisher publizierte Daten legen nahe, dass die endothelabhängige Vasorelaxation in Venen schwächer ausgebildet ist, als in Arterien. Dies konnte im direkten Vergleich der Vasorelaxation von Gefäßpräparationen mit intaktem Endothel z.B. von Femoralvenen und Arteria mammaria durch Acetylcholin, oder von Vena cordis magna und Koronararterie durch Substance P sowie an tierischen [113;116;118;49;214] und menschlichen Koronarien [128], ebenso an peripheren Gefäßen [205;206;139] gezeigt werden.

Diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass die Stimulation von venösen Endothelzellen zu einer im Vergleich zu arteriellen Endothelzellen niedrigeren Produktion von endogenem NO führt. Vergleichbare Ergebnisse zeigten Untersuchungen von Luscher, der ebenfalls eine bessere Freisetzung von EDRF/NO aus Arterien im Vergleich zu Venen fand [140].

Andererseits fanden D'Orleans-Juste *et al.* in Kulturen von bovinen arteriellen und venösen Endothelzellen eine vergleichbare Produktion an EDRF und Prostazyklin [46].

In unseren Versuchen zeigt sich jedoch, dass Venen von Kaninchen stärker endothelabhängig relaxierten, als Arterien. Die Ergebnisse dieser Studie sprechen beim Kaninchen für eine verglichen zu Arterien größere Sensitivität von venösen Gefäßen NO gegenüber. Gestützt wird das Ergebnis dadurch, dass die untersuchten Venen eine hohe Sensitivität spontan freigesetztem NO gegenüber zeigten. So wiesen SNAP und SIN-1 sowohl in der systemischen Zirkulation, als auch in der Lungenzirkulation eine signifikant bessere Wirkung, ausgedrückt durch den pD_2 -Wert, auf (Tab. 3.4 und 3.6).

Hier scheinen Gefäße vom Kaninchen unterschiedlich zu Gefäßen vom Schwein und vom Menschen zu sein. Eine vergleichsweise hohe NO-Empfindlichkeit der Kaninchenvenen kann als Ursache angenommen werden.

Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass exogenes NO die Ca^{2+} -Freisetzung aus Ca^{2+} -Speichern in Venen stärker hemmt, als in Arterien [211]. Gleichzeitig führt exogenes NO zu einem stärkeren Anstieg von cGMP in Arterien, wobei vergleichsweise wenig cGMP zur Relaxation von Venen notwendig war [203].

4.1.2.2 *Endothelabhängige Vasorelaxation, In-vivo-Studie*

In der In-vivo-Studie an Gefäßsegmenten von cholesterolfütterten Tieren wies Acetylcholin eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe, verminderte maximale Vasorelaxation auf (Tab. 3.12). In der vasorelaxierenden Effektivität von Acetylcholin zeigte sich jedoch zwischen der Kontrollgruppe und der Cholesterolgegruppe kein Unterschied, was sich in nahezu identischen pD_2 -Werten äußerte (Tab. 3.12). In allen Gefäßen der Cholesterolgegruppe war nahezu die Hälfte der Intimaoberfläche durch atherosklerotische Läsionen beschädigt (Tab. 3.9).

Vergleichbare endotheliale Dysfunktionen bezüglich maximaler Vasorelaxation wurden bereits vorher in verschiedenen atherosklerotischen Gefäßen wie Rinderkoronararterien [94], Aorta thoracica männlicher Kaninchen [178] Arteria iliaca vom Affen [66] sowie an Gefäßen cholesterolfütterter weiblicher Kaninchen [119] beschrieben.

Eine Verminderung der endothelabhängigen Vasorelaxation kann durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden.

Dieser Effekt ist sehr wahrscheinlich auf atherosklerotische Intimaschäden zurückzuführen, da die gemessene maximale Vasodilatation durch Acetylcholin mit Verschlechterung der Intimaläsionen abnahm (Tab. 3.10).

Möglich wären eine reduzierte NO-Freisetzung auf Grund von Störungen der Signaltransduktion in der Membran von Endothelzellen [63], sowie eine verminderte gefäßrelaxierende Potenz von endogen produziertem NO.

Die Wirkungsverminderung von NO könnte durch eine vermehrte Zerstörung durch Radikale oder durch eine reduzierte Aktivität der löslichen Guanylatzyklase der Gefäßmuskulatur verursacht werden [185;204].

Möglich wäre ebenso eine Steigerung der direkten vasokonstriktorischen Wirkung des Acetylcholin auf Grund der Endothelschäden, die der Wirkung von endogenem NO entgegensteht. Atherosklerose bedingte jedoch eine Einschränkung der acetylcholininduzierten maximalen Relaxation in Aortenringen, was auch von anderen Autoren in Präparationen nach Cholesteroldiät beschrieben wurde [101;215;65;41].

Zwischen männlichen und weiblichen Tieren traten Unterschiede in der Ausprägung der Acetylcholinrelaxation mit Hinweis auf eine bessere weibliche endotheliale Funktion bei vergleichbarem Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen auf [119].

Möglicherweise ist dieser Unterschied auf einen höheren Plasmacholesterolspiegel in männlichen Kaninchen zurückzuführen. Wir fanden jedoch keine direkte Korrelation zwischen den Plasmacholesterolverwerten und der Ausprägung der Intimaläsionen.

Eine besser erhaltene endotheliale Funktion ist wahrscheinlich durch protektiv wirksame Geschlechtsunterschiede auf andere funktionelle Systeme zu erklären. So weisen Aorten weiblicher Neuseeländer Kaninchen eine erhöhten EDRF-Freisetzung auf [91].

EDRF könnte einen denkbaren Faktor für diese beobachteten Geschlechtsunterschiede in der Ausprägung einer endothelialen Dysfunktion darstellen.

Weitere Publikationen stützen diese Hypothese. Die Behandlung von cholesterolfütterten Kaninchen mit L-Arginin, dem Vorläufer der NO-Biosynthese, führte zu einer Reduktion der Atheroskleroseentstehung in Aorta und Koronararterie [43;217], während die Inhibition der NO-Synthese einen umgekehrten Effekt hatte [161].

Nitrate haben ebenfalls einen protektiven Effekt auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion in Kombination mit Atherosklerose [119].

Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass EDRF oder therapeutisches NO die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion einschränkt und somit eine erhöhte EDRF-Freisetzung in weiblichen Tieren mit einem verminderten Dysfunktionsausmaß im Vergleich zu männlichen Tieren einhergeht. Die erhöhte EDRF-Freisetzung in weiblichen Tieren ist wahrscheinlich estradiolbedingt [176].

4.1.3 Vasodilatation durch Nitrovasodilatoren

Nitrovasodilatoren werden in der Therapie der Angina pectoris, des Herzinfarktes und der Linksherzinsuffizienz eingesetzt. Sie umfassen eine unterschiedliche Gruppe pharmakologischer Substanzen die durch Freisetzung von NO glatte Muskelzellen relaxieren. Grundsätzlich wirken sie somit auf alle Arten von Blutgefäßen. Lediglich das Ausmaß der jeweiligen Relaxation variiert zwischen den unterschiedlichen anatomischen Regionen und den untersuchten Spezies. So werden größere Koronargefäße bevorzugt dilatiert, während an koronare Widerstandsgefäßen (Durchmesser $<100\ \mu\text{m}$) nur minimale Effekte auftreten [89].

Alle in dieser Studie untersuchten Nitrovasodilatoren, die spontanen NO-Donoren, sowie die organischen Nitrate mit einer metabolisch induzierten NO-Freisetzung, zeigten eine konzentrationsabhängige Vasodilatation, was sich in einer nahezu vollständigen Aufhebung der Vorkontraktion durch Phenylephrin zeigte, wobei venöse Gefäße bevorzugt relaxiert wurden.

Zwischen den untersuchten Nitrovasodilatoren traten deutliche Unterschiede sowohl in ihrer Wirksamkeit (pD_2 -Wert), als auch in ihrer bevorzugt venösen Vasodilatation auf.

Im Vergleich der organischen Nitrate untereinander war in allen untersuchten Gefäßen der Lungen- und der systemischen Zirkulation PETN am stärksten und ISMN am schwächsten wirksam (Tab. 3.3 bis 3.6).

Eine ähnliche Abstufung in der Wirksamkeit organischer Nitrate fanden Toyoda *et al.* an mit Norepinephrin vorkontrahierten Gefäßpräparaten von Arteria und Vena femoralis männlicher Kaninchen [210]. Hinsichtlich der bevorzugt venösen Vasodilatation fanden Toyoda *et al.* ebenfalls bei ISMN eine stärkere venoselektive Wirkung, verglichen zu ISDN und GTN.

Stiefel [200] zeigte an Nierenarterien und Venen vom Kaninchen, dass GTN nur moderat stärker sensitiv auf venöse Gefäße wirkt, was sich durch Ergebnisse dieser Studie bestätigte. Hier ermittelten wir das vergleichsweise niedrigste arteriovenöse Ratio für GTN (Tab. 3.7).

Zwar weisen alle organischen Nitrate grundsätzlich ähnliche Wirkmechanismen auf, trotzdem treten Unterschiede sowohl in der Wirkstärke, als auch in der bevorzugt venösen Vasodilatation auf. Ursache hierfür könnten unterschiedliche Wege in der Metabolisation sein [89]. So beeinflussen Variationen in der chemischen Struktur organischer Nitrate deren Metabolisierung zu pharmakologisch aktiven Komponenten [209].

Die Metabolite z.B. von GTN und ISDN sind selbst vasodilatatorisch aktiv, wenn auch nicht so potent wie ihre Ausgangssubstanzen [12;207;85], was die im Vergleich zu allen untersuchten Substanzen schlechteste Wirksamkeit von ISMN erklären könnte.

Vergleichbare Ergebnisse fanden Schröder und Hinz, welche die intrazelluläre cGMP-Bildung durch PETN, GTN und ISDN in Affennierenzellen untersuchten [189]. PETN stellte sich im Vergleich zu GTN und ISDN als stärkster Aktivator der cGMP-Synthese heraus. Das gleiche galt für die Metabolite Pentaerithrityltrinitrat (PETriN) und Pentaerithrityldinitrat (PEDiN), die zu einer mit PETN vergleichbaren Erhöhung des cGMP-Spiegels führten.

Somit könnten die Wirksamkeitsdifferenzen zwischen den organischen Nitrovasodilatoren durch Unterschiede in ihrer Bioaktivierung und der Aktivität der entstandenen Metaboliten bedingt sein.

In diesem Zusammenhang ist die Möglichkeit einer Enantioselektivität bezüglich der unterschiedlichen vaskulären Effekte organischer Nitrate von Interesse. Es gibt Hinweise, dass die Enantioselektivität zwischen den einzelnen Substanzen variiert.

So wiesen Bennet *et al.* zwischen den beiden Stereoisomeren von ISDN einen um den Faktor 10 verschiedene Wirksamkeitsdifferenz, bezogen auf Vasorelaxation und cGMP Anstieg in isolierter Rattenaorta [24].

Sie waren jedoch in einer weiteren Untersuchung von Bennet *et al.* gleichwertig in ihrer Fähigkeit lösliche Guanylatzyklase zu aktivieren. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die lösliche Guanylatzyklase nicht der einzige Angriffspunkt der Stereoisomere sein kann [25].

Axelsson *et al.* hingegen fanden eine vergleichbare Wirksamkeit der Stereoisomeren von Butanol-1-2-3-4-tetranitrat (Erythritoltetranitrat und Threitol-tetranitrat) auf bovine Arteria mesenterica [15].

Schröder und Hinz fanden keine Erhöhung des cGMP-Spiegels durch den Phase II Metaboliten PETriN-Glucoronid, während der PETN Metabolit PETriN von allen Abbauprodukten am stärksten wirksam war. Sie führen diese Unterschiede auf sterisch bedingte Reduzierung der Bioaktivierung oder Verminderung der Membranpenetration zurück [189].

Auf der anderen Seite beeinflusst die jeweilige Fähigkeit eines Gefäßabschnittes zur Bioaktivierung von organischen Nitraten deren Wirksamkeit [24].

Dies könnte die bevorzugt venöse Vasodilatation, sowie die bei weitem überwiegende Erweiterung größerer ($> 200 \mu\text{m}$) Coronargefäße [193], ferner die gesteigerte Wirksamkeit in atherosklerotischen Abschnitten erklären.

Das venöse Pooling und die Abwesenheit eines „coronary steal“, wie er bei andern Vasodilatoren (z.B. Dipyridamol), die coronare Widerstandsgefäße $<100 \mu\text{m}$ ebenfalls dilatieren, vorkommt, machen die positiven Effekte der Nitrovasodilatoren aus [89].

Es traten ebenfalls Differenzen zwischen den spontanen NO-Donoren SNAP und SIN-1 in der Wirksamkeit auf, die sich nicht durch Unterschiede in der Bioaktivierung erklären lassen.

Der Abbau von SIN-1 führt zu einer stoichiometrischen Bildung von NO und Superoxid (O_2^-), welches schnell zu Peroxynitrit reagiert.

Die vergleichsweise verminderte Wirkung von SIN-1 ist somit sehr wahrscheinlich bedingt durch die Superoxidradikalbildung, welche zu einem partiellen Abbau des gebildeten NO bedingt.

In der In-vivo Studie untersuchten wir die Sensitivität der glatten Aortenmuskulatur auf NO. Dosiswirkungskurven für SNAP wurden durchgeführt um weitere Daten zum Mechanismus der endothelialen Dysfunktion zu erhalten, da die Bestimmung der endothelabhängigen Vasorelaxation durch Acetylcholin nicht zwischen der endothelialen Produktion und der vasorelaxierenden Effizienz von EDRF differenziert.

In oxygenierten Pufferlösungen ist dieses Nitrosothiol ein spontaner NO-Donor. Dies konnte über Messung der NO-Freisetzung verifiziert werden (siehe Material und Methoden), sowie durch eine konzentrationsabhängige Verminderung der vasorelaxierenden Wirkung in Kaninchenaorta durch Oxyhämoglobin.

Die Wirksamkeit von SNAP in atherosklerotischen Gefäßen war im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($P < 0,0001$) reduziert (Abb. 3.14). Untersuchungen in Gefäßen von weiblichen Neuseeländer Kaninchen zeigten dies ebenfalls. Signifikanten Unterschiede traten an atherosklerotisch veränderten Gefäßen zwischen männlichen und weiblichen Tieren nicht auf. Da Untersuchungen zur Effektivität organischer Nitrate wie PETN und ISDN zeigten, dass intrazellulär gebildetes NO nicht durch eine experimentelle Atherosklerose abgeschwächt wurde, kann die hier festgestellte verstärkte endotheliale Dysfunktion nicht auf eine reduzierte aortale Sensibilität auf exogenes NO zurückzuführen sein [119].

Wahrscheinlicher ist eine reduzierte EDRF Produktion und Freisetzung durch Endothelzellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Atherosklerose die Produktion und Freisetzung von EDRF durch Beeinträchtigung von G-Proteinen und G-Protein abhängiger Signalweiterleitung [63], sowie durch gesteigerte intrazelluläre Superoxidradikalbildung in endothelialen Zellen [168] beeinflusst. Vermutlich vermindern erhöhte EDRF-Spiegel die Ausprägung derartiger Veränderungen in der Prämenopause. Dieser Effekt könnte durch eine antioxidative Wirkung von EDRF bedingt sein [32].

Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen an atherosklerotischen Gefäßen von Kaninchen überein, wo ebenfalls eine verminderte Sensitivität exogenem [216] und endogenem NO [204] gegenüber gefunden wurde.

Andererseits ist nach unseren Ergebnissen der Zugang von biologisch aktivem NO in den glatten Aortenmuskel beim Kaninchen vermutlich durch die Atherosklerose vermindert.

Der zugrundeliegende Mechanismus könnte verbunden sein, mit Reaktionen, die den Transport, die Lebensdauer und die Zielgebiete von endogenem und exogenem NO betreffen. NO selbst kann unterschiedliche Radikale bilden, wie Nitrosonium und Nitroxyl [197].

4.2 In-vitro-Studie

4.2.1 Bevorzugt venöse Gefäßerweiterung

Organische Nitrate wie GTN setzen nach enzymatischer Metabolisation im Gefäßsystem die aktive Komponente NO frei [58;38]. Einer Gefäßerweiterung gehen z. B. im Fall von GTN die Bildung der Dinitrate 1,2-GDN und 1,3-GDN, sowie die Aktivierung von cGMP voraus [31].

Weitere organische Nitrate wie ISDN und PETN durchlaufen einen vergleichbaren Bioaktivierungsprozess [4].

Im Vergleich zu anderen antianginösen Medikamenten wie Kalziumantagonisten und Betablocker steht die Senkung der Vorlast durch die bevorzugt venöse Wirkung organischer Nitrate im Vordergrund [19]. Weiterhin unterscheiden sich diese Substanzen in ihrer bevorzugt venösen Wirkung zu Nitroprussid-Natrium [8], welches ebenso NO freisetzt, dessen Bioaktivierungsprozess sich jedoch von dem organischer Nitrate unterscheidet [126].

Die bevorzugt venöse Gefäßerweiterung konnte In-vitro [210;178] und In-vivo [100;75] nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Koronarzirkulation vom Schwein [118].

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Arterien und Venen ist die Ausprägung der endogene NO-Produktion durch Endothelzellen. So ist die endothelbedingte, somit NO induzierte Vasorelaxation in Venen schwächer ausgeprägt als in Arterien [49;139;118]. Gleichzeitig benötigen Venen vergleichsweise weniger cGMP pro Milligramm Protein zur maximalen Relaxation [203]. Im Einklang hierzu stehen Untersuchungen an tierischem [106] und menschlichem Gewebe [208], die eine höhere Konzentration von GTN in Arterien im Vergleich zu Venen nachwiesen.

Eine bevorzugte Vorlastsenkung und die daraus resultierenden positiven Effekte für herzkranken Patienten könnte in der enzymatischen Bioaktivierung der organischen Nitrate bedingt sein. Differenzen in der endogenen NO-Produktion zwischen Arterien und Venen könnte die in Venen und Arterien unterschiedliche Bioaktivierung der organischen Nitrate bedingen, die zu einer bevorzugt venösen Vasodilatation führt. Ein möglicher Hinweis hierzu ist die Tatsache, dass vom Endothel produziertes NO die vasorelaxierende Fähigkeit von organischen Nitraten wie GTN vermindert [5;146;118;3;52]. Kojda *et al* konnten einen hemmenden Effekt mikromolarer Mengen NO auf die vaskuläre Bioaktivierung von GTN zu Dinitratmetaboliten, die Akkumulation von cGMP und die Vasorelaxation ebenso wie eine Desensibilisierung der sGC nachweisen. Für diesen Effekt ist eine kontinuierliche NO Applikation wichtiger, als die absolute NO-Konzentration [122].

In der Koronarzirkulation vom Schwein konnte nach Vorbehandlung mit NO eine Verminderung der Vasorelaxation durch GTN beobachtet werden [118;225].

Die Identität des Enzyms, welches die vaskuläre Bioaktivierung von GTN vermittelt, ist bisher nicht geklärt. Ein möglicher Weg ist die NO-Bildung über Cytochrom P₄₅₀-Oxidation.

Schröder *et al.* konnten an Nierenzellen durch einen Cytochrom P-Inhibitor eine verminderte Bildung von cGMP nachweisen [188]. Möglich wäre ein hemmender Effekt des NO durch Bindung an das Hämoprotein [122]. Ein Nachweis dieser Mechanismen in der glatten Muskelzelle stehen jedoch noch aus.

Wie oben erwähnt, geht die Verminderung der nitrovasodilatatorinduzierten Vasorelaxation durch NO-Vorbehandlung mit einer reduzierten cGMP-Bildung einher. Eine Desensibilisierung der sGC konnte nach Vorbehandlung mit GTN [13;122] und als Folge einer endogenen NO-Produktion nachgewiesen werden [146;122].

Eine direkte Interaktion zwischen NO und dem Enzym gilt als wahrscheinlich [192], wobei eine Nitrosierung freier Sulfhydrylgruppen eine Rolle spielen könnte [17;122].

In-vitro ist eine Desensibilisierung der sGC als wahrscheinliche Ursache anzunehmen. In-vivo könnte als Ursache die unterschiedliche Flussgeschwindigkeit zwischen Venen und Arterien hinzukommen. Dieser sog. "shear stress", welcher in Venen weniger stark ausgeprägt ist, stellt einen wesentlichen Stimulus der NO Produktion dar [182].

Ein gewichtiger Hinweis für die hemmende Wirkung der endothelialen NO-Produktion ist die Beobachtung einer Zunahme der gefäßerweiternden Wirkung z.B. von GTN nach Entfernung des Endothels. Auch Nitroprussid-Natrium, welches im Körper NO auf nicht enzymatischem Weg bildet, war nach mechanischer Entfernung des Endothels und somit der endothelialen NO-Synthase deutlich stärker wirksam [195]. Ein Grund für eine verstärkte Vasorelaxation nach Endothelentfernung könnte eine Hochregulation der löslichen Guanylatzyklase sein, was zu einer „Supersensitivität“ führt [146].

Beweisend für die Verantwortlichkeit der endothelialen NO-Synthase ist die Untersuchung an Aorten von Mäusen mit genetischer Ausschaltung der endotheliale NO-Synthase (eNOS-“knock-out“). Blutgefäße dieser Tiere weisen eine Hypersensitivität den Nitrovasodilatoren gegenüber auf [121].

Die Frage, ob der inhibitorische Einfluss von NO auf die Bioaktivierung organischer Nitrate oder die Verminderung der cGMP-Aktivierung durch NO vorherrscht, kann mit den vorliegenden Daten nicht schlüssig geklärt werden. Betrachtet man die mangelnde Venoselektivität von Nitroprussid-Natrium, könnte man von einem Überwiegen der Hemmung der Bioaktivierung organischer Nitrate ausgehen.

Andererseits scheint NO zumindest in-vitro selbst venoselektiv zu sein, was sich in dieser Untersuchung an Hand der spontan NO-liberierenden Substanzen SIN-1 und SNAP zeigen ließ (Tab. 3.4 und 3.6).

4.2.2 Klinischer Bezug

In-vitro- [210] sowie In-vivo-Untersuchungen [174] zeigen, dass organische Nitrate eine unterschiedliche Wirkstärke in der arteriellen und der venösen Strombahn aufweisen, wobei sie die Vorlast relativ stärker beeinflussen, als den systemischen Gefäßtonus, den arteriellen Blutdruck und die Auswurfleistung des Herzen. Da sich die einzelnen Nitrate jedoch, wie in dieser Studie gezeigt, in der Ausprägung ihrer Vasodilatation unterscheiden und es in der Klinik Situationen wie z.B. gesteigerter Sauerstoffverbrauch des Herzens in Verbindung mit systemischer Hypotension aufgrund von ischämieinduzierter linksventrikulärer Dilatation gibt, ist es von Vorteil Nitrate einzusetzen, die selektiv stärker auf der venösen, als auf der arteriellen Seite wirken.

Um diese Wirkungsunterschiede der organischen Nitrate In-vivo zu untersuchen, wählten Muikku *et al.* Patienten, die sich einer Operation mit kardiopulmonalem Bypass unterzogen. Hier konnte man unter konstanten Flussbedingungen und ohne störende Einflüsse durch Herzaktivität als Reaktion auf den peripheren Gefäßtonus die Wirkung organischer Nitrate auf Venen und Venolen, sowie Arterien und Arteriolen ermitteln. Es wurden die Abnahme des zurückfließenden Volumens in das Reservoir der Herzlungenmaschine als Maß für die venöse Kapazität und zugleich der arterielle Druck bestimmt. Sie verabreicht die organischen Nitrate GTN und ISDN als i.v. Bolus.

In-vivo konnte gezeigt werden, dass organische Nitrate venös stärker wirken, als auf der arteriellen Seite, wobei GTN stärker wirksam war, als ISDN.

Im einzelnen fanden Muikku *et al.* in ihrer Untersuchung bei Bolusapplikation eine um den Faktor 4 bis 8 stärkere venöse Spitzendilatation durch GTN, verglichen zu ISDN. Beide Substanzen waren bei einem Dosisratio von 1/8 äquipotent. Gleichzeitig reduzierte GTN den mittleren arteriellen Druck in den ersten Minuten nach Bolusapplikation stärker als ISDN [150]. Vergleichbare Unterschiede in der Wirkungspotenz organischer Nitrate fanden Toyoda *et al.* in-vitro an isolierten Venen und Arterien mit der Abstufung GTN>ISDN>ISMN [210].

In der hier vorgestellten Studie zeigten die drei organischen Nitrate die gleiche Abstufung in ihrer Wirksamkeit, bezogen auf ihre pD_2 -Werte (s. Tab. 3.3 und 3.5).

Durkin *et al.* [55] fanden beim Vergleich einer GTN und einer ISDN Infusion im Dosisratio von 1 : 2 zur präoperativen Hypotension im Rahmen koronarer Bypassoperation eine bessere arterielle Wirkung von GTN.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen dieser Studie überein. Hier zeigte GTN im systemischen Kreislauf mit 14,8 und im Lungenkreislauf mit 4,6 ein geringeres arteriovenöses Ratio als ISDN mit 51,3 in der systemischen und 6,2 in der Lungenzirkulation (siehe Tab. 3.7) [96].

Die Untersuchungen von Toyoda *et al.* ergaben ebenfalls Unterschiede in der Venoselektivität. Besonders ISMN wies, wie in dieser Arbeit gezeigt (siehe Tab. 3.7), die ausgeprägteste Venoselektivität auf [210]. Untersuchungen von Stiefel und Kraye mit ISDN und ISMN an isolierten Nierengefäßen ergaben eine um den Faktor 7 bis 20 verstärkte Wirkung der Substanzen auf die untersuchten venösen Gefäße im Vergleich zu den Arterien [200].

Andererseits gibt es auch Untersuchungen mit differierenden Ergebnissen.

Rezakovic *et al.* [174] verglichen GTN und ISDN als Dauerinfusion in einem stöchiometrischen Dosisäquivalent von 1:1,5 über 30 min bei Patienten mit Myokardinfarkt. Sie fanden, dass GTN überwiegend den pulmonalarteriellen Druck und die Vorlast beeinflusste, während ISDN auf den systemischen Widerstand, die Nachlast wirkte. Sie bezeichneten GTN als überwiegend venösen und ISDN als gemischt arteriovenösen Gefäßdilator.

Diese im Gegensatz zu den Ergebnissen von Muikku *et al.* und dieser Studie stehenden Aussagen liegen wahrscheinlich in der unterschiedlich langen Wirkungsdauer der verglichenen organischen Nitrate.

Muikku *et al.* untersuchten i.v. Bolusgaben der Substanzen. In dieser Studie wurden die mit einer i.v. Bolusgabe vergleichbaren direkten Wirkungen der organischen Nitrate gemessen.

ISDN/ISMN weisen eine im Vergleich zu GTN verlängerte Wirkung auf, was im Rahmen einer Dauerinfusion zu hämodynamisch relevanten Konsequenzen führen kann.

Eine Venodilatation ist bereits bei niedrigen Dosen organischer Nitrate maximal ausgeprägt, eine Dosiserhöhung führt nur zu einer geringen weiteren Gefäßerweiterung (s. auch Abb. 1.1).

Eine Systemische arterielle Gefäßerweiterung hingegen beginnt zwar ebenfalls schon unter niedrigen Dosen organischer Nitrate, aber erst hohe Dosen bedingen eine arterioläre Dilatation [1].

So könnte es unter einer kontinuierlichen Infusion dieser Substanzen zu einer Akkumulation mit verlängerter Wirkungsdauer und verstärkter arterieller Wirkung kommen.

Dies wird unterstützt durch Untersuchungen von Cintron *et al.*, die bei Patienten mit Myokardinfarkt fanden, dass zu einer anhaltenden Verminderung des pulmonalarteriellen Druckes ansteigende Dosen von GTN notwendig waren, während ISDN bei gleichbleibender Dosis wirksam blieb [39].

Die Ergebnisse dieser Studie, ebenso wie die von Muikku, könnten z.B. bei Bolusapplikation organischer Nitrate im Rahmen einer Operation mit cardiopulmonalem Bypass von klinischer Relevanz sein, wobei schnelles venöses Pooling und eine Abnahme des arteriellen Widerstandes notwendig werden können.

4.3 In-vivo-Studie

4.3.1 Entwicklung einer experimentellen Atherosklerose

Anitschkow und Chaladow [7] beschrieben als erste das Tiermodell der experimentellen Induktion einer Atherosklerose beim Hasen durch Anreicherung der Standardnahrung mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen. Dieses Modell ist heute allgemein anerkannt. In dieser Studie entwickelten cholesterolgefütterte Hasen deutliche atherosklerotische Intimaläsionen an der Aorta.

Das Ausmaß der Läsionen fiel jedoch vergleichsweise moderat aus, betrachtet man die lange Fütterungszeit von 15 Wochen, sowie den hohen Cholesterolanteil von 0,75 % in der Standardnahrung (Tab. 3.9).

Die Verteilung des Ausmaßes der atherosklerotischen Läsionen mit stärkster Ausprägung im Aortenbogen und Abnahme Intimaschäden nach distal findet man auch beim Menschen [223]. Andere Untersucher fanden vergleichbare prozentuale Intimaläsionen in weißen Neuseeländer Kaninchen schon nach einer kürzeren Fütterungsperiode mit einem Nahrungscholesterolanteil von 1 % [102].

Verbeuren *et al.* fanden in ihren Untersuchungen stärker ausgeprägte Intimaschäden nach gleicher Fütterungszeit mit einer Diät, die nur 0,28 % Cholesterol enthielt [216].

Plasmacholesterolemessungen ergaben niedrigere Werte als in dieser Studie. Dies legt nahe, dass Variationen bei bereits erhöhtem Plasmacholesterolspiegel keinen Einfluss auf das Ausmaß der atherosklerotischen Intimaläsionen haben.

Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass wir bei weiteren Datenanalysen keine lineare Korrelation zwischen dem Ausmaß der Intimaläsionen und der Höhe des Plasmacholesterols feststellen konnten (Tab. 3.10).

4.3.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Atherosklerosegenese

An Aortensegmenten aus hypercholesterolämischen Kaninchen war die endothelabhängige Relaxation deutlich abgeschwächt. So fiel die Relaxation durch 0,5 μ M Acetylcholin von $76,8 \pm 3,6$ % (gesund) auf $29,4 \pm 10,2$ % (atherosklerotisch) ab (s. Abb. 3.8). Gleichzeitig war auch die Empfindlichkeit gegenüber SNAP deutlich reduziert (s. Abb. 3.10), welches NO extrazellulär freisetzt. Im Gegensatz hierzu blieb die Wirkung der organischen Nitrate ISMN und PETN, die intrazellulär NO nach Biotransformation freisetzen, vollständig erhalten (s. Abb. 3.10).

Gefäße von cholesterolfütterten Kaninchen produzieren exzessive Mengen an Superoxidanionen [168].

Diese Ereignisse weisen darauf hin, dass der Abbau von NO im Extrazellulärraum der Gefäßwand - z.B. durch Oxidation zu Peroxynitrit - eine Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion spielt [22;220].

Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher nicht geklärt. Veränderungen in der Expression entweder der Superoxidanionen oder der SOD können beteiligt sein. Deswegen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Substitution von SOD in das Organbad beim Akutversuch die verminderte endothelabhängige Vasorelaxation durch Acetylcholin bzw. die SNAP-induzierte Gefäßerweiterung verbessert. Mit Ausnahme eines leichten positiven Einflusses auf Aorten männlicher Kaninchen fanden sich jedoch keine Effekte (Tab. 3.16) [124]. Die in diesem Fall dem Organbad zugegebene konventionelle Cu/Zn SOD kann jedoch aufgrund des pKa-Wertes von der Endotheloberfläche abgestoßen werden und somit wirkungslos bleiben [120].

Untersuchungen mit membrangängiger Superoxiddismutase zeigten eine Verbesserung der eingeschränkten endothelialen Relaxation [149].

Als klinisches Korrelat zum extrazellulären NO-Abbau kann eine Untersuchung gewertet werden, die an hypercholesterolämischen Patienten eine Verminderung der Vasodilation der Widerstandsgefäße durch Nitroprussid-Natrium nachwies [44].

Weitere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion bei weiblichem Geschlecht möglicherweise verzögert abläuft [119]. So war die endotheliale Dysfunktion im Fall weiblicher Kaninchen bei gleichem Alter und gleicher Dauer der Hypercholesterolämie im Vergleich zu männlichen Tieren deutlich geringer ausgeprägt, während sich bei der Plaquegröße selbst keine Unterschiede fanden [124].

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen an Primaten und Kaninchen, bei denen nach cholesterolhaltiger Diät und Oophorektomie eine exogene Östrogensubstitution zu einer verbesserten endothelabhängigen Vasorelaxation führte [221].

Die organischen Nitrate PETN und ISMN werden in ihrer vasodilatativen Potenz jedoch nicht durch das Geschlecht beeinflusst (Abb. 3.11) [124].

Somit liegt die Vermutung nah, dass der Abbau von intersitiellem NO in weiblichen Tieren weniger stark ausgeprägt ist als im Vergleich zu männlichen Tieren. Es gibt Hinweise auf eine östrogenvermittelte Verminderung der Superoxidanionenproduktion [16]. Zusätzlich vermutet man eine vergleichsweise höhere basale NO-Freisetzung in Gefäßen weiblicher Tiere [91].

Da der Endothelfunktion nach heutigen Erkenntnissen eine wichtige Rolle zur Verhinderung einer Thrombozytenaggregation zukommt, wäre es also denkbar, dass der hier gefundene Zusammenhang zwischen Geschlecht und Endothelfunktion zu der vergleichsweise geringen Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen bei Frauen vor der Menopause beiträgt [176;105].

4.4 Zusammenfassung/Abstract

Die Atherosklerose liegt einer Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen zugrunde, deren Folgen – wie Schlaganfall und Herzinfarkt – die häufigste Todesursache in den Industrienationen sind. Es handelt sich dabei um pathologische Veränderungen der arteriellen Gefäßwand, die eine drastische Einschränkung der Gefäßfunktion nach sich ziehen. Diese pathologischen Veränderungen sind das Ergebnis eines multifaktoriellen Geschehens, an welchem auch eine starke Verminderung der Bioaktivität des einzigen radikalischen körpereigenen Botenstoffes, Stickstoffmonoxid (NO), beteiligt ist. Die auch in der Klinik nachweisbare resultierende Einschränkung der Gefäßfunktion wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, inwieweit sich Faktoren wie das Geschlecht, das Blutgefäßbett und der NO-Bildungsort auf die Effekte von NO bei Atherosklerose auswirken. Um dies zu erreichen, wurde die Wirkung verschiedener NO-Donatoren wie organische Nitrate (GTN, ISMN, ISDN und PETN), das Sydnominin SIN-1 und das Nitrosothiol SNAP in venösen und arteriellen Blutgefäßen von gesunden und atherosklerotischen Kaninchen untersucht. Gleichzeitig wurde die endogene vaskuläre NO-Produktion durch den Acetylcholinintest erfaßt. Im ersten Teil der Studie ließ sich zeigen, dass alle verwendeten NO-Donatoren eine signifikant bessere Wirkung in venösen Blutgefäßsegmenten aufwiesen. Dabei waren die ISMN und PETN die weitaus venoselektivsten Vasodilatoren. So war nach Untersuchungen in gesunden Tieren z.B. ISMN an der Vena cava inferior etwa 450-Mal stärker wirksam als an der Aorta. Auch bei der durch Acetylcholin ausgelösten endothelabhängigen Relaxation reagierten venöse Gefäße empfindlicher. Somit zeigen venöse Gefäße bei gesunden Tieren eine größere Empfindlichkeit gegenüber der Wirkung von NO als Leitungsarterien. Bei Aortensegmenten aus hypercholesterolämischen Kaninchen waren starke atherosklerotische Veränderungen nachweisbar. In diesen Aortensegmenten war die endothelabhängige Relaxation deutlich abgeschwächt. So fiel die Relaxation durch 0,5 µM Acetylcholin von 76,8±3,6 % (gesund) auf 29,4±10,2 % (atherosklerotisch) ab. Gleichzeitig war auch die Empfindlichkeit gegenüber SNAP deutlich reduziert. Dieser NO-Donator setzt extrazellulär NO frei. In krasssem Gegensatz dazu blieb die Wirkung der organischen Nitrate ISMN und PETN, also NO-Donatoren, die intrazellulär NO freisetzen, vollständig erhalten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der Abbau von NO im Extrazellulärraum der Gefäßwand – z. B. durch Oxidation – eine Rolle für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion spielt. Weitere Untersuchungen zeigten dann, dass diese pathologische Vorgänge bei weiblichem Geschlecht möglicherweise verzögert ablaufen. So war die endotheliale Dysfunktion bei weiblichen Tieren bei gleichem Alter und gleicher Dauer der Hypercholesterolämie deutlich geringer ausgeprägt als bei männlichen Kaninchen, während sich bei der Plaquegröße selbst kein Unterschied fand. Da der Endothelfunktion nach heutigen Erkenntnissen eine wichtige Rolle für Verhinderung einer Aggregatbildung von Thrombozyten zukommt, wäre es also denkbar, dass der hier gefundene Zusammenhang zwischen Geschlecht und Endothelfunktion zu der bekanntermaßen vergleichsweise geringen Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen bei Frauen vor der Menopause beiträgt. Zusammengefasst zeigen die hier vorgestellten Resultate eine schwächere Wirkung von NO in arteriellen als in venösen Blutgefäßen. Bei Atherosklerose ist Wirkung von NO vor allem dann eingeschränkt, wenn es in den Extrazellulärraum diffundiert bzw. diesen überwinden muss um zum Wirkort zu gelangen. Dieser Verlust der NO-Wirkung ist bei weiblichem Geschlecht signifikant geringer ausgeprägt. Schließlich sind organische Nitrate bei Atherosklerose auch deshalb gut wirksam, weil sie erst in der glatten Muskelzelle das Wirkprinzip NO freisetzen.

5.0 Literaturverzeichnis

1. **Abrams J:** Hemodynamic effects of nitroglycerin and longacting nitrates. *American Heart Journal* 110: 216-224; 1985.
2. **Ahlner J, Axelsson KL, Ekstam Ljusegren M, Grundström N, Anderson RGG:** Demonstration of a high affinity component of glyceryl trinitrate induced vasodilation in the bovine mesenteric artery. *J Cyclic Nucl Prot Phosphoryl Res* 11: 445-456; 1987a.
3. **Ahlner J, Axelsson KL, Ekstam Ljusegren M, Norlander B, Anderson RGG:** Retention and subsequent liberation of glyceryl trinitrate in organ baths influences the relaxation of bovine mesenteric arteries contracted by various agents. *Pharmacol Toxicol* 61: 316-319; 1987b.
4. **Ahlner J, Andersson RGG, Torfgård K, Axelsson KL:** Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of action. *Pharmacol Rev* 43: 351-423; 1991.
5. **Alheid U, Dudel C, Forstermann U:** Selective inhibition by gossypol of endothelium-dependent relaxations augments relaxations to glyceryl trinitrate in rabbit coeliac artery. *Br J Pharmacol* 92(1): p237-40; 1987.
6. **Amende I, Simon R, Hood WP, Lichtlen PR:** Effects of nitroglycerine on left ventricular diastolic properties in man. *Z Kardiol* 72 (Suppl. III): 62-65; 1983.
7. **Anitschkow N, Chalatow S:** Über experimentelle Cholesterin-Steatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einige pathologischer Prozesse. *Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie* 24: 1-9; 1913.
8. **Armstrong PW, Walker DC, Burton JR et al.:** Vasodilator therapy in acute myocardial infarction. A comparison of sodium nitroprusside and nitroglycerin. *Circulation* 52(6): 1118-22; 1975.
9. **Assmann G, Carmena R, Cullen P et al.:** Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. *Circulation* 100(18): 1930-8; 1999.
10. **Aviram M, Dankner G, Cogan U et al.:** Lovastatin inhibits low-density lipoprotein oxidation and alters its fluidity and uptake by macrophages: in vitro and in vivo studies. *Metabolism* 41(3): p229-35; 1992.
11. **Axelsson KL, Karlsson JOG, Pettersson G:** Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sci* 24: 1779-1786; 1979.
12. **Axelsson KL, Andersson RGG, Wikberg JES et al.:** Correlation between vascular smooth muscle relaxation and increase in cyclic GMP induced by some organic nitro esters. *Acta Pharmacol Toxicol*; 49: 270-276; 1981.
13. **Axelsson KL, Andersson RGG:** Tolerance towards glyceryl trinitrate, induced in vivo, is correlated to a reduced cGMP-response and an alteration in cGMP-turnover. *Eur J Pharmacol* 88: 71-79; 1983.
14. **Axelsson KL, Karlsson JOG:** Nitroglycerin tolerance in vitro: effect on cGMP turnover in vascular smooth muscle. *Acta Pharmacol Toxicol* 55: 203-210; 1984.
15. **Axelsson KL, Anderson C, Ahlner J et al.:** Comparative in vitro study of a series of organic nitroesters: Unique biphasic concentration-effekt curves for glyceryl trinitrate in isolated bovine arterial smooth muscle and lack of stereoselectivity for some glyceryl trinitrate analogues. *J Cardiovasc Pharmacol* 19: 953-957; 1992.
16. **Arnal JF, Clamens S, Pechet C et al.:** Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4108-4113; 1996.
17. **Barnett DJ, McAninly J, Williams DLH:** Transnitrosation between nitrosothiols and thiols. *J Chem Soc Perkin Trans 2*: 1131-1133; 1994.
18. **Basha BJ, Sowers JR:** Atherosclerosis: an update. *Am Heart J* 131(6): p1192-202; 1996. Bassenge E, Stewart DJ: Effects of nitrates in various vascular sections and regions. *Z Kardiol* 75 (3): 1-7; 1986.
19. **Bassenge E, Stewart DJ:** Effekts of nitrates in various sections and regions. *Z Kardiol* 75 (3): 1-7; 1986.
20. **Bassenge E, Busse R:** Endothelial modulation of coronary tone. *Progress in cardiovascular diseases*, XXX, No 5: 349-380; 1988.
21. **Bassenge E, Busse R:** Freisetzung von EDRF aus Arterien: ein neues antiaggregatorisches Prinzip. *Cor Vas* 2: 113-117; 1988.
22. **Beckman JS, Crow JP:** Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* 21: 330-334; 1993.

23. **Belcher** JD, Balla J, Balla G et al.: Vitamin E, LDL, and endothelium. Brief oral vitamin supplementation prevents oxidized LDL-mediated vascular injury in vitro. *Arterioscler Thromb* 13(12): 1779-89; 1993.
24. **Bennett** BM, Hayward LD, Murad F: Effects of the D and L stereoisomers of isosorbide dinitrate on relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta and comparison to glyceryl trinitrate. *J Appl Cardiol* 1: 200-209; 1986.
25. **Bennett** BM, Schröder H, Hayward LD et al.: Effects of in vitro organic nitrate tolerance on relaxation, cyclic GMP accumulation, and guanylate cyclase activation by glyceryl trinitrate and the enantiomers of isosorbide dinitrate. *Circ Res* 63: 693-701; 1988.
26. **Bennett** BM, McDonald BJ, James MJ: Hepatic P-450-mediated activation of rat aortic guanyl cyclase by glyceryl trinitrate. *J Pharmacol Exp Ther* 261: 716-723; 1992.
27. **Böhme** E, Grossmann G, Herz J, Mülsch A, Spies C, Schulz G: Regulation of cyclic GMP formation by soluble guanylate cyclase. Stimulation by NO-containing compounds. In Greengard P, Robinson GA, Paoletti R, Nicosia S (ED.): *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*, Vol 17 (Raven: New York): 259; 1984.
28. **Bolotina** VM, Najibi JJ, Palacino PJ, Pagano PJ, Cohen RA: Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853; 1994.
29. **Boren** J, Olin K, Lee I et al.: Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 101(12): 2658-64; 1998.
30. **Boring** L, Gosling J, Cleary M et al.: Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394(6696): 894-7; 1998.
31. **Brien** JF, McLaughlin BE, Breedon TH, Bennett BM, Nakatsu K, Marks GS: Biotransformation of glyceryl trinitrate occurs concurrently with relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 237(2), 608-14; 1986.
32. **Bruckdorfer** KR, Jacobs M, Rice-Evans C: Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide), lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 18(6), 1061-3; 1990.
33. **Buga** GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ: Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 17(2): 187-93; 1991.
34. **Busse** R, Trogisch G, Bessange E: The role of endothelium in the control of the vascular ton. *Basic Research in Cardiology* 80: 475-490; 1985.
35. **Busse** R, Fleming I: Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 33(3): p181-94; 1996.
36. **Caldwell** PRB, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL: Angiotensin-converting enzyme: Vascular endothelial localization. *Science* 191: 1050-1051; 1976.
37. **Chu** A, Chambers DE, Lin CC, Kuehl WD, Cobb FR: Nitric oxide modulates epicardial coronary basal vasomotor tone in awake dogs. *Am J Physiol* 258: H1250-H1254; 1990.
38. **Chung** SJ, Fung HL: Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 235: 614-619; 1990.
39. **Cintron** GB, Glasser SP, Weston BA, Linares E, Conti CR, Crawford M, Elkayam U, Greenberg P, Hood WB, Muller H, Packer M, Salel A, Weber K, Weiss M, Key R: Effects of intravenous isosorbide dinitrate versus nitroglycerin on elevated pulmonary arterial wedge pressure during acute myocardial infarction. *American J Cardiol* 61, 21-25; 1988.
40. **Cohen** RA, Sheppard JT, Vanhoutte PM: Inhibitory role of endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 221: 273-274; 1983.
41. **Collins** P, Shay J, Jiang C, Moss J: Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal. *Circulation* 90(4), 1964-8; 1994.
42. **Collins** RG, Velji R, Guevara NV et al.: P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 191(1): 189-94; 2000.
43. **Cooke** JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME: Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 90(3), 1168-72; 1992.
44. **Creager** MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ: Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 86: 228-234; 1990.
45. **Cyrus** T, Witztum JL, Rader DJ et al.: Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* 103(11): p1597-604; 1999.

46. **D'Orleans-Juste** P, Mitchell JA, Wood EG, Hecker M, Vane JR: Comparison of the release of vasoactive factors from venous and arterial bovine cultured endothelial cells. *Can J Physiol Pharmacol* 70, 687-694; 1992.
47. **Daley** SJ, Herderick EE, Cornhill JF et al.: Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. Part 1: Differing lesion area and volume despite equal plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb* 14(1): 95-104; 1994.
48. **Daley** SJ, Klemp KF, Guyton JR et al.: Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. Part 2: Differing morphological severity of atherogenesis despite matched plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb* 14(1): 105-41 1994.
49. **DeMay** JG, Vanhoutte PM: Heterogeneous behaviour of the canine arterial and venous wall: importance of the endothelium. *Circ Res* 51, 439-447; 1982.
50. **Dimmeler** S, Zeiher AM: NO-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* 6(10): 964-8; 1999.
51. **Dimmeler** S, Zeiher AM: Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept* 90(1-3): 19-25; 2000.
52. **Dinerman** JL, Lawson DL, Metha JL: Interactions between nitroglycerin and endothelium in vascular smooth muscle relaxation. *Am J Physiol* 260: H698-H701; 1991.
53. **Dong** ZM, Chapman SM, Brown AA et al.: The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102(1): 145-52; 1998.
54. **Dück** KD, Richard F: Langzeittherapie bei Koronarer Herzkrankheit. Wirkungsverlust durch Toleranzentwicklung? *Z Ges Inn Med* 45: 736-741; 1990.
55. **Durkin** MA, Thys D, Morris RB, Kaplan J, Cahalan M, Barash PG: Control of perioperative hypertension during coronary artery surgery. A randomised double-blind study comparing isosorbide dinitrate and nitroglycerin. *Europ Heart J* 9 (Suppl. A): 181-185; 1988.
56. **Edwards** JC, Ignarro LJ, Hyman AL, Kadowitz PJ: Relaxation of intrapulmonary artery and vein by nitrogen oxide-containing vasodilators and cyclic GMP. *J Pharmacol Exp Ther* 228: 33-42; 1984.
57. **Febbraio** M, Podrez EA, Smith JD et al.: Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105(8): 1049-56; 2000.
58. **Feelisch** M, Noack E: Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and aktivation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* 139: 19-30, 1987.
59. **Feelisch** M, Kelm M: Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Res Commun* 180: 286-293; 1991.
60. **Field** L, Dilts RV, Ravichandran R, Lenhert G, Carnahan GE: An unusual stable thionitrit from N-acetyl-D,L-penicillamin; x-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamina)-2-carboxyl-1,1-dimethylethyl thionitrit. *JCS Chem Comm* 1157: 249-250; 1978.
61. **Fischell** TA, Ginsburg R: Loss of endothelium-dependent arterial relaxation following ballon angioplasty. *Appl Cardiol* 2 (6): 489-504; 1987.
62. **Fitzgerald** GA, Fisher DM, Doran J, Oates JA: Pharmacological modulation of arachidonic acid metabolism in platelet-vascular interactions. In: Interactions of the platelets with the vessel wall. Oates JA, Hawinger J, Ross R (eds). American Physiological Society Bethesda, 103-110; 1985.
63. **Flavahan** NA: Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction: Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation* 85: 1927-1938; 1992.
64. **Förstermann** U, Alheid U, Fröhlich JC: Human endothelium-derived relaxing factor (EDRF) inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res* 47: 561-571; 1987.
65. **Förstermann** U, Mugge A, Alheid U, Haverich A, Frolich JC: Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res* 62(2): 185-90; 1988.
66. **Freiman** PC, Mitchell GG, Heistad DD, et al.: Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ Res* 58(6): p783-9; 1986.
67. **Freudenberg** H, Lichtlen PR: Das normale Wandsegment bei Koronarstenose-eine postmortale Studie. *Z Kardiol* 70: 863-869; 1981.
68. **Fung** H.L: Solving the mystery of nitrate tolerance. A new scent on the tail. *Circulation* 88: 1; 1993.
69. **Furchgott** RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789): p373-6; 1980.
70. **Furchgott** RF: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 5, 557-73; 1983.
71. **Furchgott** R.F, Cherry P.D, Zawadzki J.V, Jothianandan D: Endothelial cells as mediators of vasodilatation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharm.* 6 (Suppl. 2): 336-343; 1984.
72. **Galle** J, Bassenge E: Einfluß der „low-density“-Lipoproteine (LDL) auf die Vasomotorik. *Z. Kardiol.* 80: Suppl. 9, 15-20; 1991.

73. **Garbarsch** C, Matthiesen ME, Helin P, Lorenzen I : Spontaneous aortic arteriosclerosis in rabbits of the Danish Country strain. *Atherosclerosis* 12: 291-300; 1970.
74. **Gerhard** GT, Duell PB: Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 10(5): p417-28; 1999.
75. **Gerson** JI, Allen FB, Seltzer JL, Parker FB Jr, Markowitz AH: Arterial and venous dilation by nitroprusside and nitroglycerin-is there a difference? *Anesth-Analg.* 61(3): 256-60; 1982.
76. **Gimbrone** MA Jr: Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 82(2): p722-6; 1999.
77. **Gimbrone** MA Jr: Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 155(1): p1-5; 1999.
78. **Giroux** LM, Davignon J, Naruszewicz M: Simvastatin inhibits the oxidation of low-density lipoproteins by activated human monocyte-derived macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1165(3): p335-8; 1993.
79. **Glassman** AH, Shapiro PA: Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry* 155(1): p4-11; 1998.
80. **Goldbourt** U, Neufeld HN: Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* , 6(4): p357-77; 1986.
81. **Gordon** DJ, Rifkind BM: High-density lipoprotein-the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 321(19): p1311-6; 1989.
82. **Grainger** DJ, Kemp PR, Liu AC, et al.: Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature* 370(6489): p460-2; 1994.
83. **Gross** DR: Animal models in cardiovascular research. Chp. 1 in: *Quantitative cardiovascular studies, clinical and research applications of engineering principles.* Ed. by Hwang, N.H.C., Gross, D.R., Patel, D.J. University Park Press; 1979.
84. **Gu** L, Okada Y, Clinton SK et al.: Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2(2): 275-81; 1998.
85. **Gumbleton** M, Benet LZ: Pharmacological activity of the dinitrate metabolites of nitroglycerin following their oral administration to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 191: 211-213; 1991.
86. **Haddad** IY, Crow JP, Hu P, Ye Y, Beckman J, Matalon S: Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. Department of Pediatrics, University of Alabama, Birmingham 35233-6810. *Am J Physiol* 267(3 Pt 1): L242-9; 1994.
87. **Haefeli** WE, Srivastava N, Kelsey KT, Wiencke JK, Hoffman BB, Blaschke TF: Glutathion S-transferase m polymorphism does not explain variation in nitroglycerin responsiveness. *Clin Pharmacol Ther* 53: 463-468; 1993.
88. **Hafner** D, Heinen E, Noack E: Mathematical analysis of concentration-response-relationships. *Arzeim Forsch* 27: 1871-1872; 1977.
89. **Harrison** DG: The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation* 87(5): 1461-7; 1993.
90. **Harrison** DG: Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100(9): 2153-7; 1997.
91. **Hayashi** T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G: Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(23): 11259-63; 1992.
92. **Hess** H, Mietaschk A, Deichsel G: Drug-induced inhibition of platelet function delays progression of peripheral occlusive arterial disease. *Lancet* 1: 415-419; 1985.
93. **Hill** KE, Hunt-Jr RW, Jones R, Hoover RL, Burk, RF.: Metabolism of nitroglycerin by smooth muscle cells. Involvement of glutathion and glutathion S-transferase. *Biochem Pharmacol* 43: 561-566; 1992.
94. **Holzmann** S: Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. *J Cyclic Nucleotide Res* 8(6), 409-19; 1982.
95. **Hu** H, Pierce GN, Zhong G: The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest* 103(5): 747-53; 1999.
96. **Hüsgen** B, Noack E, Kojda G: Comparison of the vasorelaxing effect of different nitrovasodilators in conductive arterial and venous blood vessels. *Agents Actions Suppl (Switzerland)* 45: p183-7; 1995.
97. **Ignarro** LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter, CA.: Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide. *J Pharmacol exp Ther* 218: 739-749; 1981.
98. **Ignarro** LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 84: 9265-9269; 1987.
99. **Ignatowski** AC: Influence of animal food on the organism of rabbits. *Invest. Imper. Voenomed Akad St. Petersburg* 16: 154-173; 1908.
100. **Imhof** PR, Ott B, Frankhauser P, Chu LC, Hodler J: Difference in nitroglycerin dose-response in the venous and arterial beds. *Eur J Clin Pharmacol* 18(6), 455-60; 1980.

101. **Jayakody** RL, Senaratne MP, Thomson AB, Kappagoda CT: Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Can J Physiol Pharmacol* 63(9): 1206-9; 1985.
102. **Jayo** JM, Schwenke DC, Clarkson TB: Atherosclerotic Research. The biology of the laboratory rabbit, second edition. Academic Press: 367-380; 1994.
103. **Jialal** I, Grundy SM: Effect of combined supplementation with alpha-tocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation. *Circulation* 88(6): 2780-6; 1993.
104. **Kaley** G, Wolin MS, Messina EJ: Endothelium derived relaxing factor in the microcirculation. *Blood vessels* 23: 81; 1986.
105. **Kannel** WB: Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspective from the Framingham Study. *Am Heart J* 114(2): 413-9; 1987.
106. **Kawamoto** JH, Brien JF, Marks GS et al.: A comparative study of glyceryl trinitrate biotransformation and glyceryl trinitrate induced relaxation in bovine pulmonary artery and vein. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 1146-1150; 1987.
107. **Kelm** M, Feelisch M, Spahr R et al.: Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 154(1): p236-44; 1988.
108. **Khan** MT, Furchgott RF: Additional evidence that endothelium derived relaxing factor is nitric oxide. *Pharmacology*, edited by Rand MJ and Raper C. Amsterdam: Elsevier: 341-344; 1987.
109. **Knowles** JW, Reddick RL, Jennette JC et al.: Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J. Clin. Invest.* 105(4): p451-8; 2000.
110. **Kockx** MM, Herman AG: Apoptosis in atherogenesis: implications for plaque destabilization. *Eur Heart J* 19 Suppl G: pG23-8; 1998.
111. **Kockx** MM, Knaapen MW: The role of apoptosis in vascular disease. *J. Pathol.* 190(3): p267-80; 2000.
112. **Kockx** MM, Herman AG: Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* 45(3): p736-46; 2000.
113. **Kojda** G, Klaus W, Werner G, Fricke U: Reduced responses of nitrendipine in PGF_{2α}-precontracted porcine isolated arteries after pretreatment with methylene blue. *Basic Res Cardiol* 85, 461-466; 1990.
114. **Kojda** G, Behne M, Noack E: Attenuation of nitrate activity and tolerance by intact endothelium. *J Vasc Res* 29: 151; 1992.
115. **Kojda** G, Beck JK, Noack E: Nitrate action on tolerance in porcine vena cordis magna, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 346 (Suppl.): R34; 1992.
116. **Kojda** G, Klaus W, Werner G, Fricke U: Intervascular and stimulus selectivity of nitrendipine and related derivatives in KCl and prostaglandin F_{2α} precontracted porcine arteries. *Br J Pharmacol* 106: 85-90; 1992.
117. **Kojda** G, Meyer W, Noack E: Changes in intracellular free thiols and disulphides induced by nitrovasodilators and endothelium in porcine coronary arteries. *Naunyn-Schmiedbergs Arch Pharmacol* 347: R 62; 1993.
118. **Kojda** G, Beck JK, Meyer W, Noack E: Nitrovasodilator-induced relaxation and tolerance development in porcine vena cordis magna: dependence on intact endothelium. *Br J Pharmacol* 112: 533-540; 1994.
119. **Kojda** G, Stein D, Kottenberg E, Schnaith EM, Noack E: In vivo effects of pentaerythritol-tetranitrate and isosorbide-5-mononitrate on the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 5, 763-73; 1995.
120. **Kojda** G: Vasoprotektive, inotrope und hämodynamische Wirkungen von Stickstoffmonoxid. *Steinkopff, Darmstadt*, 84-85; 95-99; 1997.
121. **Kojda** G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Shesely EG, Smithies O, Harrison DG: Disruption of the eNOS gene causes hypersensitivity of mouse aorta to vasoconstrictors and glyceryl trinitrate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: R41; 1997.
122. **Kojda** G, Patzner M, Hacker A, Noack E: Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate: a novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. *Molec Pharmacol* 53: 547-554; 1998.
123. **Kojda** G, Hacker A, Noack E: Effects of nonintermittent treatment of rabbits with pentaerythritol tetranitrate on vascular reactivity and superoxide production. *Eur J Pharmacol* 355(1): 23-31; 1998.
124. **Kojda** G, Hüsken B, Hacker A, Perings D, Schnaith EM, Kottenberg E, Noack E: Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in experimental atherosclerosis is dependent on gender. *Cardiovasc Res* 37(3): p738-47; 1998.
125. **Kolodgie** FD, Virmani R, Rice HE, Mernger WJ: Vascular reactivity during the progression of atheroscl. plaque. A study in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ R* 66: 1112-1126; 1990.
126. **Kowaluk** EA, Seth P, Fung HL: Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J-Pharmacol-Exp-Ther.*, 262(3): 916-22; 1992.

127. **Kronenberg F**, Kronenberg MF, Kiechl S et al.: Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 100(11): 1154-60; 1999.
128. **Ku DD**, Caulfield JB, Kirklin JK: Endothelium-dependent responses on human coronary blood vessels. In *Endothelial Regulation of Vascular Tone*. Ryan, U.S. & Rubanyi, G.M. pp. 197-223. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1992.
129. **Kugiyama K**, Ota Y, Takazoe K et al.: Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100(12): 1280-4; 1999.
130. **Kurz S**, Hink U, Nickenig G, Borthayre AB, Harrison DG, Münzel T: Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in nitrate tolerance. *Circulation* 99(24): 3181-7; 1999.
131. **Levy D**, Wilson PW, Anderson KM et al.: Stratifying the patient at risk from coronary disease: new insights from the Framingham Heart Study. *Am Heart J* 119(3 Pt 2): p712-7; discussion 717; 1990.
132. **Lichtlen P.R**: Wirkungsmechanismus der Nitrate, Stand 1988. *Z. Kardiol.* 78: Suppl. 2: 3-10; 1989.
133. **Linz W**, Wiemer G, Scholkens BA: ACE-inhibition induces NO-formation in cultured bovine endothelial cells and protects isolated ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 24(8): 909-19; 1992.
134. **Lippert H**: In *Lehrbuch Anatomie 2. Aufl.*; S. 39-42; Urban und Schwarzenberg; 1990.
135. **Liu MW**, Roubin GS, Robinson KA, Black AJR, Hearn JA, Siegel RJ, King SB: Trepidil in preventing restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 81: 1089-1093; 1990.
136. **Lopes-Virella MFP**, Stone P, Ellis S, Coldwell JA: Cholesterol determination in high density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 23: 882-884; 1977.
137. **Ludmer PL**, Selwyn AP, Shook TL et al.: Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315(17): 1046-51; 1986.
138. **Luft FC**: Molecular genetics of human hypertension. *J. Hypertens.* 16(12 Pt 2): 1871-81; 1998.
139. **Lüscher TF**, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von-Segesser L, Yang ZH, Turina M, Gradel E, Weber E et al.: Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 319(8), 462-7; 1988.
140. **Lüscher TF**, Yang ZH, Diederich D, Buhler FR: Endothelium-derived vasoactive substances: potential role in hypertension, atherosclerosis, and vascular occlusion. *J-Cardiov-Pharma*, 14 Suppl 6, 63-9; 1989.
141. **Lusis AJ**, Weinreb A, Drake TA: In *Textbook of Cardiovascular Medicine* (ed. Topol, E.J.): 2389-2413 (Lippincott-Raven, Philadelphia); 1998.
142. **Lusis AJ**: Atherosclerosis. *Nature* 407(6801): 233-41; 2000.
143. **MacKenzie JE**, Parratt JR: Comparative effects of glyceryl trinitrate on venous and arterial smooth muscle in vitro: relevance to antianginal activity. *Br J Pharmacol* 29: 155-160; 1977.
144. **Mayer B**, Schmidt K, Humbert P, Bohme E: Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem-Biophys-Res-Commun* 164(2): 678-85; 1989.
145. **McGill HC**: The geographic pathologie of atherosclerosis. Baltimore, Williams and Wilkins; 1968.
146. **Moncada S**, Rees DD, Schulz R, Palmer RMJ: Developement and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 88: 2166-2170; 1991.
147. **Moncada S**, Marletta MA, Hibbs JB, Higgs EA: The biology of nitric oxide. I. Physiological and clinical aspects. London: Portland Press Proceedings; 1992.
148. **Moncada S**, Higgs A: Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993.
149. **Mügge A**, Elwell JH, Peterson TG, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG: Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ res* 69: 1293-1300; 1991.
150. **Muikku O**, Hynynen M, Salmenperä M, Heinonen J: Vasodilator properties of nitroglycerin and isosorbide dinitrate during cardiopulmonary bypass. *British J Anaesth* 68: 376-380; 1992.
151. **Münzel T**, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG: Evidence for enhanced vascular superoxide anion producing in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 95: 187-194; 1995.
152. **Münzel T**, Giaid A, Kurz S, Steward DJ, Harrison DG: Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(11):5244-8; 1995.
153. **Münzel T**, Kurz S, Heitzer T, Harrison DG: New insights into mechanisms underlying nitrate tolerance. *Am J Cardiol* 77(13):24C-30C; 1996.
154. **Münzel T**, Harrison DG: Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *J Mol Med* 75(11-12): 891-900; 1997.

155. **Murad F**, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H: Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv-Cyclic-Nucleotide-Res.*, 9: 145-58; 1978.
156. **Murad F**: Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J. clin. Invest.* 78:1; 1986.
157. **Murrel W**: Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1: 80-81, 113-115, 151-152, 225-227; 1879.
158. **Myers RH**, Kiely DK, Cupples LA et al.: Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. *Am. Heart J* 120(4): 963-9; 1990.
159. **Nägle U**, Hägele EO, Sauer G, Wiedermann E, Wahlefeld W, Gruber W: Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem* 22: 165-174; 1984.
160. **Nakajima H**, Nosaka K: A comarison of the effects of diltiazem and nitroglycerin on the norepinephrine-induced contractions in the isolated femoral artery and vein. *Jpn J Pharmacol* 33: 1282-1285; 1983.
161. **Naruse K**, Shimizu K, Muramatsu M, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T: Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arterioscler-Thromb* 14(5): 746-52; 1994.
162. **Nathan L**, Chaudhuri G: Estrogens and atherosclerosis. *A Rev Pharmacol Toxicol* 37: 477-515; 1997.
163. **Needleman, O.**, Johnson, EM.: Mechanism of tolerance developement to organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* 184: 709-715; 1973.
164. **Negoro N**, Kanayama Y, Haraguchi M et al.: Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J Clin Invest* 95(3): 1140-50; 1995.
165. **Noack E**: Mechanisms of nitrate tolerance. Influence of the metabolic activation pathways. *Z. Kardiol.* 79 (Supp.3): 51-55; 1990.
166. **Noack E**, Feelisch M: Molecular mechanism of nitrovasodilator bioactivation. In: Drexler, H., Zeiher, A.M., Bassenge, E., Just, H. eds. *Endothelial mechanism of vasomotor control*. Darmstadt, F.R.G: Steinkopff Verlag: 37-50; 1991.
167. **Noack E**, Kojda G: Pentaerythryltetranitrat. Gesichertes und Neues zur Pharmakologie eines Langzeitnitrats. Darmstadt, F.R.G.: Steinkopff Verlag; 1993.
168. **Ohara Y**, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J-Clin-Invest.*, 91(6), 2546-51; 1993.
169. **Packer M**, Kessler PD, Gottlieb SS, Lee WH, Kukin ML, Medina N, Yushak M: Does neurohormonal activation contribute to the developement of nitrate tolerance in patiens with chronic heart failure? *Circulation* 78 (suppl. II): 11-27; 1988.
170. **Palmer RMJ**, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526; 1987.
171. **Palmer RMJ**, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666; 1988.
172. **Rapoport RM**, Murad F: Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ-Res* 3: 352-7; 1983.
173. **Rapoport RM**, Draznin MB, Murad F: Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, 306(5939): 174-6, 1983.
174. **Rezakovic D**, Rutishauser W, Pavicic L, Popadic M. Bloch A, Imhoff EW: Different hemodynamic actions of trinitroglycerin and isosorbide dinitrate in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal* 4: 718-723; 1983.
175. **Richmond W**: Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its applikation to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 19: 1350-1356; 1973.
176. **Riedel M**, Rafflenbeul W, Lichtlen P: Ovarian sex steroids and atherosclerosis. *Clin-Investig* 71(5): 406-12, 1993.
177. **Rimm EB**, Stampfer MJ, Ascherio A et al.: Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 328(20): 1450-6; 1993.
178. **Rösen R**, König E, Klaus W: Different sensitivities of arteries and veins to glyceryl trinitrate-induced relaxation and tolerance: An "in vitro" study on isolated vessels in rabbits. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 285: 226-237; 1987.
179. **Roth HJ**, Fenner H: *Arzeistoffe. Struktur-Bioreaktivität-Wirkungsbezogene Eigenschaften*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1-790; 1988.

180. **Ross R:** The pathogenesis of atherosclerosis. In: The heart disease, A textbook of cardiovascular medicine 4th-ed. Braunwald EW, Saunders B, Company Philadelphia; 1992.
181. **Ross R:** The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993.
182. **Ross R:** Atherosclerosis -An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340: 115-126, 1999.
183. **Rubany GM, Vanhoutte PM:** Hypoxia releases vasoconstrictor substance (S) from the coronary endothelium. *Circulation* 70, (Suppl. II-122), Abstract 485; 1984.
184. **Rubany GM, Romero JC, Vanhoutte PM:** Flow induced release of endothelium derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 250: H1145-H1149; 1986.
185. **Schmidt K, Klatt P, Mayer B:** Hypercholesterolemia is associated with a reduced response of smooth muscle guanylyl cyclase to nitrovasodilators. *Arterioscler Thromb* 13: 1159-1163; 1993.
186. **Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK et al.:** CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 156(1): 7-14; 2000.
187. **Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P:** Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(13): 7458-63; 2000.
188. **Schröder H, Schrör K:** Inhibitions of cytochrome P-450 reduce cGMP stimulation by glyceryl trinitrate in LLC-PK1 kidney epithelial cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342: 616-618; 1990.
189. **Schröder H, Hinz B:** Stimulation of cyclic GMP synthesis by pentaerythrityl tetranitrate and its metabolites in LLC-PK₁ cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 357 4: R47; 1998.
190. **Schrör K:** Prostaglandine und Endothelzellen. *Z. Kardiol.* 74 (Suppl. 7): 93-97; 1985.
191. **Schrör K, Braun M:** Platelets as a source of vasoactive mediators. *Stroke* 21 (Suppl. IV): 32-35; 1990.
192. **Schultz G, Böhme E:** Guanylate cyclase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU, ed), Verlag Chemie, Weinheim Germany: 379-389; 1984.
193. **Sellke FW, Myers PR, Bates JN, et al.:** Influence of vessel size on the sensitivity of porcine coronary microvessels to nitroglycerin. *Am J Physiol* 258: H515-H520; 1990.
194. **Shibata S, Satake N, Takagi T, Kerfoot F, Suh TK:** Relaxing effect of nicorandil (N-2-{hydroxyethyl}-nicotinamide nitrate), a new antiangina agent, on isolated vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 99: 219-226; 1984.
195. **Shirasaki Y, Su C:** Endothelium removal augments vasodilation by sodium nitroprusside and sodium nitrite. *Eur J Pharmacol* 114: 93-96; 1985.
196. **Smith JD, Trogan E, Ginsberg M et al.:** Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92(18): 8264-8; 1995.
197. **Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J:** Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258(5090): 1898-902; 1992.
198. **Stary HC:** Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis (Suppl. I)* 9: I19-I32; 1989.
199. **Steinberg D, Witztum JL** in *Molecular Basis of Cardiovascular Disease* (ed. Chien KR) 458-475 (Saunders, Philadelphia); 1999.
200. **Stiefel A, Kreye VA:** On the hemodynamic differences between sodium nitroprusside, nitroglycerin and isosorbide nitrates. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacol.* 325: 270-274; 1984.
201. **Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M et al.:** A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386(6622): 292-6; 1997.
202. **Sytkowski PA, Kannel WB, D'Agostino RB:** Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* 322(23): 1635-41; 1990.
203. **Tadjkarimi S, O'Neil GS, Luu TN et al.:** Comparison of cyclic GMP in human internal mammary artery and saphenous vein: Implications for coronary artery bypass graft patency. *Cardiovasc Res* 26: 297-300; 1992.
204. **Tagawa H, Tomoike H, Nakamura M:** Putative mechanisms of impairment of endothelium-dependent relaxation of the aorta with atheromatous plaque in heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ Res* 68: 330-337; 1991.
205. **Thom SM, Hughes AD, Martin G, Sever PS:** The role of endothelium in the control of venous tone: studies on isolated human veins. *Clin Physiol* 73: 547-552; 1987.
206. **Thulesius O, Ugaily-Thulesius L, Neglen P, et al.:** The role of the endothelium in the control of venous tone: studies on isolated human veins. *Clin Physiol* 8(4): 359-66; 1988.
207. **Torfgård KE, Ahlner J, Axelsson KL, et al.:** Relaxation of bovine mesenteric arteries by glyceryl trinitrate and other stimulators of soluble guanylate cyclase. Evidence for different mechanisms of action. *Pharmacol. Toxicol.* 67: 216-221; 1990.
208. **Torfgård KE:** Glyceryl Trinitrate Distribution and the 'Remarkable Tolerance'. Linköping University Medical Dissertations No. 358, Linköping: 1-68; 1992.

209. **Torfgård** KE, Ahlner J: Mechanisms of Action of nitrates. *Cardiova. Drugs & Ther.* 8: 701-717; 1994.
210. **Toyoda** J, Hisayama T, Takayanagi I: Nitro compounds (isosorbide dinitrate, 5-isosorbide mononitrate and glyceryl trinitrate) on femoral vein and femoral artery. *General Pharmacology* 17: 89-91; 1986.
211. **Toyoda** J, Hisayama T, Takayanagi I: Effects of nitro compounds, isosorbide dinitrate, 5-isosorbide mononitrate and glyceryl trinitrate on Ca-uptake into Ca-stores and Ca-release from Ca-stores in rabbit isolated femoral veins and femoral arteries. *Gen-Pharmacol* 18(1): 95-7, 1987.
212. **Tricot** O, Mallat Z, Heymes C, et al.: Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 101(21): 2450-3; 2000.
213. **Tsutsumi** S, Tsuji K, Ogawa K, Ito T, Satake T: Effect of dietary salt and cholesterol loading on vascular adrenergic receptors. *Blood-Vessels* 5: 209-16; 1988.
214. **Vanhoutte** PM, Miller VM: Heterogeneity of endothelium-dependent responses in mammalian blood vessels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7: 12-13; 1985.
215. **Verbeuren** TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL, Van-Hove CE, Coene MC, Herman AG: Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* 58(4): 552-64, 1986.
216. **Verbeuren** TJ, Jordaens FH, Van-Hove CE, Van-Hoydonck AE, Herman AG: Release and vascular activity of endothelium-derived relaxing factor in atherosclerotic rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 191(2): 173-84; 1990.
217. **Wang** BY, Singer, AH., Tsao, PS., Drexler, H., Kosek, J., Cooke, JP.: Dietary arginine prevents atherogenesis in the coronary artery of the hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol* 23(2): 452-8; 1994..
218. **Wang** BY, Ho HK, Lin PS et al.: Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation* 99(9): 1236-41; 1999.
219. **Watson** AD, Leitinger N, Navab M et al.: Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem* 272(21): 13597-607; 1997.
220. **White** CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, Tarpey MM: Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1044-1048; 1994.
221. **Williams** JK, Anthony MS, Honore EK, Herrington DM, Morgan DM, Register TC, Clarkson TB: Regression of atherosclerosis in female monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 827-836; 1995.
222. **Winbury** MM, Howe BB, Hefner MA: Effect of nitrates and other coronary dilators on large and small coronary vessels: an hypothesis for the mechanism of action of nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* 168(1): 70-95; 1969.
223. **Wissler** RW: Theories and new horizons in the pathogenesis of atherosclerosis and the mechanisms of clinical effects. *Arch Pathol Lab Med* 116: 1281-1291; 1992.
224. **Woditsch** I, Hohlfeld TH, Schrör K: Reduced endothelium-dependent relaxation in hypercholesteremic rabbits is not due to diminished formation of nitric oxide. In Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB, Jr, Higgs EA: *The biology of nitric oxide*. London, Portland press: 196-199; 1992.
225. **Zhang** CL, De la Lande IS, Stafford I, Horowitz JD: S-nitrosothiol modulation of tolerance to glyceryl trinitrate in bovine isolated coronary artery. *Eur J Pharmacol* 252(3): 299-304; 1994.

Publikationsverzeichnis

Kojda G, Hüsgen B, Hacker A, Perings D, Schnaith EM, Kottenberg E; Noack E: Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in experimental atherosclerosis is dependent on gender. *Cardiovasc Res* 37(3): p738-47; 1998.

Hüsgen B, Noack E, Kojda G: Comparison of the vasorelaxing effect of different nitrovasodilators in conductive arterial and venous blood vessels. *Agents Actions Suppl* (Switzerland) 45: p183-7; 1995.

Hüsgen B, Noack E, Kojda G: Different extent of preferential venous relaxation of various nitrovasodilators. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 350 (Suppl), R8, 1994.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern am Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit fertigzustellen.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem in der Zwischenzeit leider verstorbenen Herrn Prof. Dr. med E. Noack, Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung, sowie für die Bereitstellung der technischen Hilfsmittel.

Insbesondere bin ich Herrn PD Dr. rer. nat. G. Kojda, Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für sein unermüdliches Engagement während des experimentellen Teils der Dissertation sowie bei der Niederschrift zu größtem Dank verpflichtet.

Diese Studie wurde gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, SFB 242.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Björn Hüsgen

Geboren am 29.04.1969 in Münster/Westfalen

Schulausbildung

1975 bis 1979 Grundschule Düsseldorf-Knittkuhl

1979 bis 1988 Gymnasium Gerresheim Am Poth

Düsseldorf, 1988 Abitur daselbst

Bundeswehr

1988 bis 1989

Hochschulausbildung

1989 bis 1997 Studium der Humanmedizin an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1992 ärztliche Vorprüfung

1994 erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1996 zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1997 dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Dissertation

1993-1994 am Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

1994 Diavortrag auf dem internationalen Symposium

“*Mediators in the Cardiovascular System*” vom 2. bis 5. Juni

1994 auf Malta

1994 Poster auf der 6. Wintertagung der Deutschen

Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie
und Toxikologie vom 1. bis 3. Dezember 1994 in Hannover

1995 Veröffentlichung in “Agents and Actions Supplements”,
Vol. 45, Birkhäuser Verlag

1997 Veröffentlichung in Cardiovascular Research

01. Januar 1998 -

Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmakologie

12. Juni 1998

15. Juni 1998 -

Arzt im Praktikum am Augusta-Krankenhaus der Krankenhaus

14. Dezember 1999

Mörsenbroich-Rath GmbH Düsseldorf, Innere Medizin

27. Dezember 1999

Approbation als Arzt

15. Dezember 1999 -

Assistenzarzt am Augusta-Krankenhaus der Krankenhaus

31. Dezember 1999

Mörsenbroich-Rath GmbH Düsseldorf, Innere Medizin

01. Januar 2000-

Assistenzarzt am St.-Bernhard-Hospital, Bürgermeister-

30. Juni 2000

Schmelzing-Str. 90, 47475 Kamp-Lintfort

Seit 01. Juli 2000

Assistenzarzt am Augusta-Krankenhaus der Krankenhaus

Mörsenbroich-Rath GmbH Düsseldorf, Innere Medizin