

Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor:  
Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Detaillierte Untersuchungen zur in-vivo-Analyse von ROS-vermittelten  
Effekten der Gefäßdegeneration

Dissertation

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

vorgelegt von  
Maximilian Günter Luik  
2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: PD Dr. med. Stephan Sixt

*Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:*

Minol J-P, Reinsch I, Luik M, Leferink A, Barth M, Assmann A, Lichtenberg A, Akhyari P

Focal induction of ROS-release to trigger local vascular degeneration.

PloS one. 2017;12(6):e0179342

## *Vorausgegangene Arbeiten und Eigenanteil*

Die Versuche dieser Arbeit waren Teil einer gemeinsamen Arbeit der Arbeitsgruppe um Dr. med. Jan Philipp Minol. Die Tierversuche wurden von Dr. med. Jan-Philipp Minol durchgeführt. Eine vorausgegangene Promotionsarbeit „Lokale Gefäßdegeneration durch reaktive Sauerstoffspezies - Die fokale Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies im Tiermodell“ von Dr. med. Isabella Reinsch, 2018, untersuchte bereits grundlegend morphologische Veränderungen der infrarenalen Aorta infolge des Einflusses reaktiver Sauerstoffspezies. Im Gegensatz dazu sollen in der vorliegenden Arbeit detaillierte Untersuchungen mögliche Kausalmechanismen klären.

Die Bildaufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie wurden von A. Leferink, Abteilung für Geweberegeneration, MIRA Institut, Universität Twente, Enschede, Niederlande durchgeführt. Alle weiteren hier dargestellten Analysen und Untersuchungen wurden von mir selbstständig erstellt.

## Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung degenerativer Gefäßerkrankungen. Die meisten *in-vivo* Modelle hierzu nutzen enzymatische oder ernährungsbedingte Mechanismen und haben oftmals systemische Nebenwirkungen, die eine isolierte Betrachtung der ROS-Effekte erschweren. In dieser Arbeit wurde *in-vivo* durch eine photodynamische Reaktion (PDR) unter der Verwendung von Bengalrot und Laserstrahlung fokal eine ROS-vermittelte degenerative Gefäßläsion erzeugt. Ziel dieser Arbeit war eine detaillierte Analyse dieser Läsion hinsichtlich möglicher Wirkmechanismen.

Männliche Wistar-Ratten erhielten eine Injektion mit Bengalrotlösung (40 mg/kg Körpergewicht). Anschließend wurde die Bauchorta nach einer medianen Laparotomie für 60 Minuten mit grünem Laser (543 nm; cw; 1 mW) bestrahlt (ROS-Gruppe). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten nur die Laserbestrahlung ohne Bengalrot-Injektion. Bengalrot allein hat kaum systemische Wirkungen, in Kombination mit einem Laser der Wellenlänge 543 nm wird hingegen eine photodynamische Reaktion induziert, bei der sich reaktive Sauerstoffspezies, vor allem Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) und Superoxid-Anionen ( $\text{O}_2^-$ ), bilden. Eine Woche vor der Intervention bis zum Zeitpunkt  $t = 28$  Tage nach dieser wurden die Tiere mit einer pro-degenerativen Diät aus 1,5 % Dikalziumphosphat, 2 % Cholesterin und 300.000 IU/kg Vitamin D gefüttert. Untersucht wurden die Aorten nach 0, 2, 4, 8, 28 und 56 Tagen ( $n = 5$ ). Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde die intimale Gefäßoberfläche des bestrahlten Gefäßabschnittes untersucht. Weiterhin erfolgten immunhistochemische Untersuchungen, um den Umfang des oxidativen Stresses (3-Nitrotyrosin), des oxidativen DNA-Schadens (8-Oxoguanin) sowie der Apoptose (Caspase 3) zu bestimmen.

In der ROS-Gruppe bildete sich unmittelbar ( $t = 0$ ) ein Thrombus, der in der Rasterelektronenmikroskopie nachweisbar war und sich spätestens nach acht Tagen aufgelöst hatte. Gleichzeitig ließ sich an Tag 0 die höchste Konzentration des oxidativen Stress-Surrogats 3-Nitrotyrosin messen und an Tag 2 der größte Umfang an oxidativ erzeugten DNA-Schäden. An Tag 56 zeigte die Gefäßwand der ROS-Gruppe in der Rasterelektronenmikroskopie eine deutliche Verdickung mit intakter Endothelschicht. Die anderen Analysen zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen. Zu keinem Zeitpunkt kam es zu einer gesteigerten Apoptose.

Die Anwendung von Bengalrot und Laser erzeugt über Metabolite des oxidativen Stresses eine fokale Gefäßdegeneration. Diese weist sowohl in ihrer Entstehung auf molekularer Ebene als auch in ihrer Morphologie atherosklerose-ähnliche Merkmale auf. Allerdings finden sich auch Unterschiede zur Atherosklerose, wie der fehlende Nachweis von Apoptose und das Fehlen eines Lipidkerns. In Zukunft könnte das Modell genutzt werden, um ohne systemische Nebenwirkungen Gefäßläsionen zu erzeugen und anschließend Konzepte zur Therapie von Gefäßdegenerationen zu testen.

## Summary

Reactive oxygen species (ROS) play a central role in the development of degenerative vascular diseases. Most known *in-vivo* models use enzymatic or diet-related mechanisms and often have unwanted systemic side effects, that make it difficult to assess ROS effects on its own. In this study, a degenerative vascular lesion was focally created *in vivo* by a photodynamic reaction, using rose bengal and laser radiation. The aim of this work was a detailed analysis of the lesion regarding its mechanism of action.

Male Wistar rats received an injection with rose bengal solution (40 mg / kg body weight). Afterwards the abdominal aorta was irradiated with a green laser (543 nm; cw; 1 mW) for 60 minutes after a median laparotomy (ROS group). The animals of the control group received only the laser irradiation without rose bengal injection. Rose bengal alone has hardly any systemic effects, but in combination with a laser with a wavelength of 543 nm a photodynamic reaction is started in which reactive oxygen species, especially singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) and superoxide anions ( $\text{O}_2^-$ ), are formed. One week before the intervention until  $t = 28\text{d}$  after, the animals were fed a pro-degenerative diet of 1.5% dicalcium phosphate, 2% cholesterol and 300.000 IU / kg vitamin D in addition to the standard chow. Specimens of the aorta were examined after 0, 2, 4, 8, 28 and 56 days ( $n = 5$ ). The intimal vessel surface of the irradiated vessel segment was examined using scanning electron microscopy. Immunohistochemical examinations were carried out to determine the extent of oxidative stress (3-nitrotyrosine), oxidative DNA damage (8-oxoguanine) and apoptosis (caspase 3).

In the ROS group a thrombus formed immediately ( $t = 0$ ) which was detectable by scanning electron microscopy and which had resolved after eight days at the latest. At the same time, the highest concentration of the oxidative stress surrogate 3-nitrotyrosine was measured on day 0 and the greatest amount of oxidative DNA damage was measured on day 2. On day 56, the vessel wall of the ROS group showed a significant thickening in the scanning electron microscopy with intact endothelial layer. The other measurements did not show any noticeable differences between the groups. At no point did apoptosis increase.

The use of rose bengal and laser generates focal vascular degeneration via metabolites of oxidative stress. This has atherosclerosis-like characteristics both in its formation at the molecular level and in its morphology. However, there are also differences to atherosclerosis, such as the lack of evidence of apoptosis and the lack of a lipid core. In the

future, this model could be used to create vascular lesions without systemic side effects and to test therapeutic concepts against vascular degeneration.



# Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| °C                | Grad Celsius                                |
| µm                | Mikrometer                                  |
| A                 | Adenin                                      |
| <i>AHA</i>        | <i>American Heart Association</i>           |
| AK                | Antikörper                                  |
| <i>Aqua dest.</i> | <i>Aqua destillata</i>                      |
| ARDS              | <i>Acute respiratory distress syndrome</i>  |
| Art.-Nr.          | Artikelnummer                               |
| BSA               | Bovines Serumalbumin                        |
| C                 | Cytosin                                     |
| d                 | <i>Day</i>                                  |
| DAB               | 3,3'-Diaminobenzidin                        |
| DAPI              | 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid |
| G                 | Guanin                                      |
| g                 | Gramm                                       |
| HMDS              | Hexamethyldisilazan                         |
| IFN               | Interferon-                                 |
| IU                | <i>international unit</i>                   |
| kg                | Kilogramm                                   |
| kV                | Kilovolt                                    |
| l                 | Liter                                       |
| M                 | Mol   |
| mg                | Milligramm                                  |
| ml                | Milliliter                                  |
| mm <sup>2</sup>   | Quadratmillimeter                           |
| mmol              | Millimol                                    |
| mW                | Milliwatt                                   |
| nm                | Nanometer                                   |
| OGG1              | 8-Oxoguanin Glykosylase 1                   |
| p                 | p-Wert                                      |
| PARP-1            | Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1              |
| PBS               | <i>Phosphate buffered saline</i>            |
| PTP               | <i>Permeability-Transition-Pores</i>        |
| PDR               | Photodynamische Reaktion                    |
| REM               | Rasterelektronenmikroskopie                 |

|            |                                  |
|------------|----------------------------------|
| <b>ROS</b> | <i>Reactive oxygen species</i>   |
| <b>T</b>   | Thymin                           |
| <b>t</b>   | Zeitfaktor                       |
| <b>TBS</b> | <i>Tris-buffered Saline</i>      |
| <b>TNF</b> | Tumornekrosefaktor               |
| <b>UK</b>  | <i>United Kingdom</i>            |
| <b>USA</b> | <i>United States of America</i>  |
| <b>vWF</b> | Von-Willebrand-Faktor            |
| <b>WHO</b> | <i>World Health Organization</i> |

# Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Zusammenfassung .....                                       | I   |
| Summary .....   | III |
| Abkürzungsverzeichnis .....                                 | V   |
| Inhaltsverzeichnis .....                                    | VII |
| 1 Einleitung .....  | 1   |
| 1.1 Degenerative Gefäßerkrankungen und Atherosklerose ..... | 1   |
| 1.2 Oxidativer Stress .....                                 | 4   |
| 1.3 Die photodynamische Reaktion .....                      | 5   |
| 1.4 Ziel dieser Arbeit.....                                 | 6   |
| 2 Material und Methoden .....                               | 8   |
| 2.1 Material.....   | 8   |
| 2.2 Tiere und Diät .....                                    | 11  |
| 2.3 Intervention und Induktion von ROS per PDR.....         | 12  |
| 2.4 Explantation und Aufbereitung.....                      | 12  |
| 2.5 Rasterelektronenmikroskopie.....                        | 13  |
| 2.6 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie.....              | 14  |
| 2.7 Auswertung und Quantifizierung .....                    | 16  |
| 3 Ergebnisse .....  | 18  |
| 3.1 Rasterelektronenmikroskopie.....                        | 18  |
| 3.2 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie.....              | 19  |
| 4 Diskussion .....  | 24  |
| 4.1 Überblick über die Ergebnisse .....                     | 24  |
| 4.2 Rasterelektronenmikroskopie.....                        | 25  |
| 4.3 3-Nitrotyrosin.....                                     | 26  |
| 4.4 8-Oxoguanin .....                                       | 31  |
| 4.5 Caspase 3 .....   | 35  |
| 4.6 Schlussfolgerungen .....                                | 43  |
| 5 Literatur- und Quellenverzeichnis .....                   | 44  |

Danksagung.....52

# 1 Einleitung

## 1.1 Degenerative Gefäßerkrankungen und Atherosklerose

### *Epidemiologie*

Im Jahr 2016 starben laut *World Health Organisation* (WHO) 17,9 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen, zu denen Herzinfarkte und ischämische Hirninfarkte zählen. Degenerative Gefäßerkrankungen sind mit einem Anteil von 31% weltweit die häufigste Todesursache (WHO, 2017). Als Risikofaktoren nennt die American Heart Association unter anderem Tabakrauchen, Bewegungsmangel, ungesunde Ernährung, Fettleibigkeit, hohe Blutfettwerte und arterielle Hypertonie. Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika erleiden jährlich circa 795.000 Menschen einen ischämischen Hirninfarkt und alle vier Minuten stirbt durchschnittlich ein Mensch an dessen Folgen. Die Prävalenz von Herzinfarkten lag in den USA 2013 bei 1.184 pro 100.000 Einwohner (Benjamin et al., 2017).

Um das Auftreten von Spätfolgen degenerativer Gefäßerkrankungen wie der Atherosklerose zu senken, spielen Prävention und frühzeitige Therapie eine wichtige Rolle. Ein besseres Verständnis der genauen molekularen Mechanismen der Entstehung degenerativer Gefäßerkrankungen könnte zu einer besseren Therapierbarkeit in der Frühphase beitragen.

### *Atherosklerose*

Eine gesunde Arterie besteht aus drei Schichten, die das Lumen konzentrisch umschließen: Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia. Die einzelnen Schichten sind durch elastische Schichten voneinander abgegrenzt. Das Endothel stellt die luminale Oberfläche dar und gehört zur schmalen Tunica Intima, die im gesunden Zustand sonst nur aus der Basallamina und der Lamina elastica, welche die Grenze zur Tunica media darstellt, besteht.

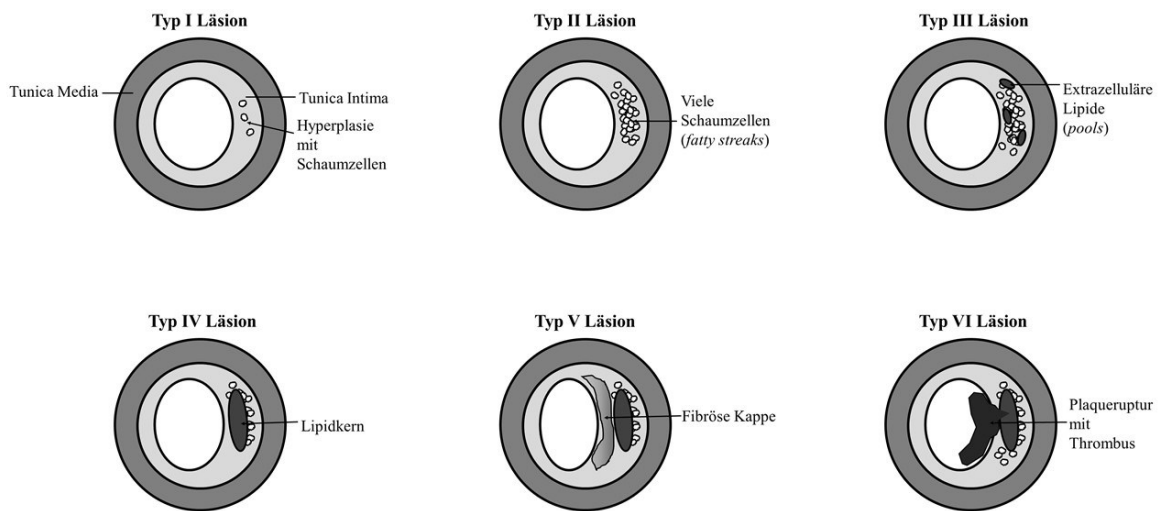
Die Atherosklerose ist eine degenerative Erkrankung der arteriellen Gefäße und führt zu charakteristischen Veränderungen in der Gefäßwand. Insgesamt unterscheidet das klassische Modell der Atherosklerose von Stary et al. aus dem Jahr 1995 sechs verschiedene Läsionstypen. Die Atherosklerose beginnt mit einer Typ-I-Läsion und kann unter bestimmten Bedingungen bis zur Typ-V oder Typ-VI-Läsion fortschreiten (Stary et al.,

1995). Bis heute wird über die genauen Entstehungsmechanismen degenerativer Gefäßerkrankungen wie der Atherosklerose diskutiert. Ross et al. formulierten die *Response-to-injury* Hypothese. Ihr zufolge ist der initiale Schritt der Gefäßdegeneration die Verletzung eines Gefäßes und die anschließende Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Tunica Media in die Intima (Ross and Glomset, 1976).

Sary et al. belegten, dass eine atherosklerotische Läsion jedoch hauptsächlich durch die initiale Einlagerung von Lipoproteinen aus dem Blutplasma in die Gefäßintima und die darauffolgenden Zellreaktionen entsteht. Eine solche Einlagerung von Lipoproteinen wird Typ I Läsion oder initiale Läsion genannt. Durch die weitere Akkumulation von Lipoproteinen, vor allem von Cholesterin, kann die Läsion wachsen. Aktivierte oder verletzte Endothelzellen locken über Adhäsionsmoleküle Leukozyten an, welche in die Intima einwandern und gemeinsam mit ausgeschütteten Wachstumsfaktoren für eine Verbreiterung der Tunica intima sorgen (Sary et al., 1994). Hauptsächlich wird das Fortschreiten der Gefäßdegeneration durch mechanische Kräfte bestimmt, vor allem durch geringe Scherkräfte. Die großen Einflussfaktoren der fortschreitenden Gefäßdegeneration sind Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie und Bluthochdruck.

In weiteren Stadien lagern sich extrazelluläre Lipidtröpfchen zwischen den in die Intima eingewanderten glatten Muskelzellen ein und akkumulieren zu einem Lipidkern, welcher auch *Atherom* (altgriechisch für Weizengrütze) genannt wird und Verkalkungen aufweisen kann. Die Verdickung der Gefäßwand durch das Atherom führt vor allem zu einem exzentrischen, stenosierenden Wachstum des Gefäßes und stellt eine fortgeschrittene Atherosklerose dar. Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen können jederzeit einreißen und zu einem lokalen Hämatom oder zur Bildung eines Thrombus führen (Sary et al., 1995). Wichtige Ursachen für die Progression fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen sind die Makrophageninfiltration und eine ungenügende Beseitigung apoptotischer Zellreste, welche die Umwandlung von Lipidkernen zu nekrotischen Kernen mit langfristiger Verkalkung begünstigen (Otsuka et al., 2015).

Insbesondere fortgeschrittene Gefäßläsionen sind für die schwerwiegenden Folgen degenerativer Gefäßerkrankungen, wie Angina Pectoris oder Herzinfarkt, verantwortlich (Davies and Thomas, 1985).



**Abbildung 1 Klassifikation und Darstellung atherosklerotischer Läsionen** (modifiziert nach (Stary et al., 1994, Stary et al., 1995))

### ***Oxidative Modifikation***

Stocker et al. zeigten, dass atherosklerotische Läsionen in erster Linie durch oxidative Modifikation von Proteinen und Lipiden im Rahmen von erhöhtem oxidativem Stress entstehen (Stocker and Keaney, 2004). Dabei stellt insbesondere die Oxidation von LDL-Cholesterin einen entscheidenden Schritt der Gefäßdegeneration dar (Denicola et al., 2002). Oxidiertes LDL-Cholesterin besitzt eine veränderte Struktur und stimuliert über Scavenger-Rezeptoren Makrophagen. Diese phagozytieren das oxidierte LDL und werden zu Schaumzellen. Auch andere Fette und Lipoproteine werden durch oxidativen Stress verändert und verursachen eine antikörpergesteuerte Immunreaktion, welche die Gefäßdegeneration fördert (Stocker and Keaney, 2004). Hierbei steht die Transmigration von Leukozyten in den subendothelialen Raum in engem Zusammenhang mit der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies (RNS), welche die Oxidation von Proteinen oder Lipiden vermitteln (Thomson, 2015). Anschließend schreitet die Gefäßdegeneration unter dem schädigenden Einfluss von oxidativem Stress voran.

## 1.2 Oxidativer Stress

Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde entscheidend von Helmut Sies geprägt (Sies, 2015). Er definierte oxidativen Stress als ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Vorgängen des Metabolismus mit einem Überwiegen der oxidativen Vorgänge und potentiell schädlichen Folgen (Sies, 1997). In weiteren Studien wurde auch nitrosativer Stress als Teil oxidativer Prozesse belegt. Nitrosativer Stress ist durch einen Anstieg S-nitrosierter Verbindungen und den gleichzeitigen Abfall intrazellulärer Thiolhaltiger Proteine charakterisiert (Wink et al., 1997). Oxidativer und nitrosativer Stress gehen in der Regel von freien Radikalen aus. Radikale sind Moleküle, welche mindestens ein ungepaartes Elektron enthalten. Dazu zählen unter anderem das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ), das Hydroxylradikal ( $^*OH$ ), Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ). Wenn zwei Radikale miteinander reagieren, bilden sie eine kovalente Bindung und ein nicht-radikales Produkt. Beispielsweise reagiert innerhalb der Blutgefäße das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ) mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) (Stocker and Keaney, 2004). Peroxynitrit ist kein Radikal, spielt aber eine große Rolle in oxidativen Vorgängen (Sies, 1997, Ferrer-Sueta et al., 2018). Reagieren freie Radikale hingegen mit nicht-radikalen Molekülen wie Proteinen oder Antioxidantien, spalten sie ein Wasserstoffatom ab und es entstehen neue Radikale. In der Folge kann eine oxidative Kaskade in Gang gesetzt werden, bei der sich immer neue Radikale bilden und zelluläre Strukturen schädigen (Stocker and Keaney, 2004).

Die Ursache für die Entstehung oxidativen Stresses liegt im aeroben Stoffwechsel des Menschen. Bei der Verwendung von Sauerstoff für überlebenswichtige biochemische Reaktionen wie die Zellatmung fallen reaktive Nebenprodukte, sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), an. Typische reaktive Sauerstoffspezies sind neben Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) die freien Radikale Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ) und Hydroxylradikal ( $^*OH$ ) (Radi, 2018). Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) fallen im Rahmen oxidativer Vorgänge, beispielsweise während der Zellatmung im Rahmen des mitochondrialen Elektronenflusses, aber auch in Endothelzellen oder in aktivierten Leukozyten an (Salvemini et al., 2006).

Unter physiologischen Bedingungen ist ihr Anteil äußerst gering und die manganabhängige Superoxid-Dismutase (MnSOD) katalysiert als Abwehrmechanismus den Abbau der Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Murphy, 2009). Im Rahmen einer akuten oder chronischen Entzündung kann jedoch eine größere Menge an Superoxid-



Anionen und Wasserstoffperoxid entstehen und oxidative Schäden an den Mitochondrien verursachen oder Proteine modifizieren (Salvemini et al., 2006).

In Blutgefäßen werden Superoxid-Anionen jedoch nicht in erster Linie von Dismutasen abgebaut. Endothelzellen setzen Stickstoffmonoxid frei, welches mit Superoxid-Anionen zu Peroxynitrit reagiert. Peroxynitrit ist kein freies Radikal aber dennoch ein potentes Oxidans (Beckman and Koppenol, 1996) und kann auch ohne Beteiligung von Superoxid-Anionen durch Reaktion von Molekülen des Gasaustausches entstehen. Molekularer Sauerstoff reduziert Stickstoffmonoxid (NO) in Hämoglobin oder Cytochrom c<sup>2+</sup> und es entstehen Nitroxyl-Anionen (NO<sup>-</sup>). Diese reagieren mit molekularem Sauerstoff zu Peroxynitrit (Kirsch and de Groot, 2002). Peroxynitrit durchschreitet die Zellmembran und oxidiert anschließend im Zytosol nicht nur Enzyme, zum Beispiel Superoxid-Dismutasen, sondern auch Lipide, Proteine und DNA-Bausteine (Denicola et al., 2002, Denicola et al., 1998, Ischiropoulos et al., 1992a, Radi, 2018). Dabei entstehen Modifikationen wie 3-Nitrotyrosin und 8-Oxoguanin, welche unter bestimmten Bedingungen als Peroxynitrit-Fußabdruck angesehen werden können (Beckman and Koppenol, 1996, Radi, 2018). Peroxynitrit kann über die Schädigung von Mitochondrien sogar die Apoptose einleiten und den Zelltod von Kardiomyozyten verursachen (Levrant et al., 2006).

Der direkte Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies ist häufig mit hohem technischem Aufwand verbunden und aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeiten der Moleküle nur schwer möglich. Das Superoxid-Anion ist mit einer biologischen Halbwertszeit von 5 Sekunden zu kurzlebig, um als Parameter für den oxidativen Stress im Gewebe zuverlässig nutzbar zu sein (Marklund, 1976). Peroxynitrit eignet sich mit einer biologischen Halbwertszeit von weniger als 10 Millisekunden ebenso wenig als zuverlässiger Parameter (Ferrer-Sueta and Radi, 2009, Radi, 2018). Proteinmodifikationen wie 3-Nitrotyrosin und oxidierte DNA-Bausteine wie 8-Oxoguanin sind Folgeprodukte des Überschusses von reaktiven Sauerstoffspezies. Der Nachweis dieser Modifikationen stellt einen indirekten Nachweis von oxidativem Stress dar (Beckman and Koppenol, 1996, Jena and Mishra, 2007).

### **1.3 Die photodynamische Reaktion**

Bengalrot wurde 1882 von Robert Gnehm als Wollfärbemittel in Verbindung mit Fluorescein entdeckt. Im Laufe des 20. Jahrhunderts fand Bengalrot auch in der Augenheilkunde

Verwendung, unter anderem zur Bekämpfung von Pneumokokkeninfektionen des Auges. Bis heute wird es genutzt, um Ulzerationen der Kornea sichtbar zu machen (Alexander, 2010).

In den 1980er-Jahren wurde Bengalrot zunehmend genutzt, um in Kombination mit Laserbestrahlung einen fokalen Gefäßverschluss durch Thrombose zu erzeugen (Watson et al., 1985). Dabei hat Bengalrot alleine kaum systemische Nebenwirkungen (Wilson and Hatchell, 1991). Erst durch Laserbestrahlung mit einer Wellenlänge von 543 nm wird eine photodynamische Reaktion (PDR) in Gang gesetzt. Bengalrot absorbiert die Photonen des Lasers und erzeugt reaktive Sauerstoffspezies, hauptsächlich Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) und Superoxid-Anionen ( $\text{O}_2^-$ ) (Saniabadi et al., 1995, Inamo et al., 1996). Diese reaktiven Sauerstoffspezies verursachen eine Endothelschädigung sowie die Aktivierung der Blutplättchen und fördern somit die Bildung eines Thrombus (Kikuchi et al., 1998). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde Bengalrot in der Vergangenheit hauptsächlich zur Erzeugung fokaler Gefäßverschlüsse oder zur kurzfristigen Untersuchung bereits vorhandener degenerativer Gefäßläsionen angewandt (Eitzman et al., 2000, Westrick et al., 2007). Die PDR ermöglicht allerdings auch eine isolierte Anwendung von oxidativem Stress *in vivo*. Die freigesetzten Superoxid-Anionen reagieren im Blutgefäß mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) (Beckman et al., 1990). Peroxynitrit oxidiert als zentrales Zwischenprodukt des oxidativen Stresses Proteine und Fette und hat das Potenzial, eine Gefäßdegeneration in Gang zu setzen (Beckman and Koppenol, 1996). Der Vorteil ist, dass sich mit dieser Methode langfristige Folgen des oxidativen Stresses weitgehend ohne unerwünschte systemische Nebenwirkungen untersuchen lassen.

In diesem Modell wurde Bengalrot in Kombination mit Laserstrahlung genutzt, um im Rattenmodell *in vivo* eine fokale ROS-Exposition zu erzeugen. Die hieraus hervorgegangene Läsion wurde morphologisch und auf molekularer Ebene auf typische Folgen des oxidativen Stresses untersucht.

## **1.4 Ziel dieser Arbeit**

Oxidativer Stress spielt eine tragende Rolle in der Entstehung degenerativer Gefäßerkrankungen wie der Atherosklerose (Stocker and Keaney, 2004). Allerdings ist nach wie vor umstritten, inwiefern oxidativer Stress allein für den Beginn der Gefäßdegeneration

verantwortlich gemacht werden kann. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Entstehung von Gefäßdegenerationen könnte dazu beitragen, diese Prozesse bereits in der Frühphase zu erkennen und zu therapieren, um somit ein Fortschreiten zu verhindern. In dieser Arbeit wurde *in-vivo* unter der Verwendung einer photodynamischen Reaktion fokal eine degenerative Gefäßläsion erzeugt. In einer vorangegangenen Arbeit konnte in demselben Versuchsmodell konventionell-histologisch die Entstehung einer degenerativen Gefäßläsion nachgewiesen werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die erzeugte Läsion morphologisch und insbesondere auf molekularer Ebene hinsichtlich stattgefundenener Vorgänge zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### *Tiere und Diät*

|  |  |
|--|--|
| Diät Zusatz t(-7d) - t(28d) Cholesterin 2%             | Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest   |
| Diät Zusatz t(-7d) - t(28d)<br>Dikalziumphosphat 1,5%  | Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest   |
| Diät Zusatz t(-7d) - t(28d) Vitamin D<br>300.000 IU/kg | Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest   |
| Ratten, männlich, Wistar, 200g-250g                    | Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-<br>Universität Düsseldorf, Deutschland,<br>84-02.04.2011.A3 |
| Rattenfutter   | Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, R/M-<br>H:V1534-0  |

#### *Intervention und Präparation*

|   |  |
|---|--|
| Bengalrot   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,<br>Art.-Nr.: 3162.1        |
| Buprenorphin  | Animalcare Limited, Großbritannien, Art.-<br>Nr.: 401045.00.00 |
| Carprofen   | Norbrook, Nordirland, Art.-Nr.: 6191-91K                       |
| Chirurgisches Nahtmaterial, 8-0 Prolene,<br>monofil, nicht absorbierbar | Ethicon, Norderstedt   |
| Isofluran 2%-2,5%   | Piramal healthcare, UK   |
| Ketamin   | Pfizer, Deutschland, Art.-Nr.: 3151811                         |
| Laser 543nm cw, 1mW   | Roithner, Wien   |
| Xylazin   | Bayer, Deutschland, Art.-Nr.: 1320422                          |

#### *Immunhistologie und Rasterelektronenmikroskopie*

|   |   |
|---|---|
| Aceton  | Merck KGaA, Darmstadt,<br>Art.-Nr.: 1.00014 |
| Antikörper, primär, Caspase-3 aus dem<br>Kaninchen      | Abcam, Cambridge UK, Art.-Nr.: ab2302       |
| Antikörper, primär, 3-Nitrotyrosin, aus<br>dem Menschen | Abcam, Cambridge UK, Art.-Nr.:<br>ab110282  |

|  |   |
|--|---|
| Antikörper, primär, 8-Hydroxyguanosin, monoklonal aus der Maus [15A3]  | Abcam, Cambridge UK, Art.-Nr.: ab62623                        |
| Antikörper, sekundär, Ziege gegen Kaninchen IgG, Alexa488              | Invitrogen, Carlsbad, USA, Art.-Nr.: A-11008                  |
| Antikörper, sekundär, Ziege gegen Kaninchen IgG, Alexa546              | Invitrogen, Carlsbad, USA, Art.-Nr.: A-11010                  |
| Antikörper, sekundär, Ziege gegen Kaninchen, Vectastain Elite ABC Kit, | Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA, Art.-Nr.: PK-6101 |
| Aqua destillata., Ecotainer  | Braun, Melsungen, Art.-Nr.: 0082479E                          |
| Bovines Serum Albumin  | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.: A9418         |
| Dako Pen   | Dako, Glostrup, Dänemark, Art.-Nr.: S2002                     |
| Eindeckmedium Vectashield mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)       | Vector Laboratories, Burlingame, USA, Art.-Nr.: 6335,1        |
| Einschlussmittel Roti Histokitt  | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.: T160.1           |
| Ethanol 70%, 96%, 100%   | Zentralapotheke, Universitätsklinikum Düsseldorf              |
| Formaldehyd 37%, Rotipuran   | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.: 4979.2           |
| Formaldehyd 4%, Roti Histofix  | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.: P087.3           |
| Glutaraldehyd  | Polyscience, Warrington, PA, USA, Art.-Nr.: 01909             |
| Kaliumjodid  | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.: 8491.3           |
| Kaliumchlorid  | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.: HN02.3           |
| Kaliumhydrogenphosphat   | Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.: 3904.1           |
| KP-CryoCompound  | Klinipath, Duiven, Art.-Nr.: VWRK1620-C                       |
| Natriumcarbonat  | Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.: 1.06392                      |
| Natriumchlorid   | Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.: 1.05404                      |
| Natriumhydrogenphosphat  | VWR International, Leuven, Belgien, Art.-Nr.: 28013.264       |
| Natriumthiosulfat  | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.: 72049         |
| Paraformaldehyd  | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.: P6148         |
| PBS  | Gibco by life technologies, Darmstadt, Art.-Nr.: 14190-094    |
| Salzsäure rauchend 37%   | Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.: 1.00317                      |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat   | Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.: 1.06448                      |

|                      |  |
|----------------------|--|
| Triton X             | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,<br>Art.-Nr.: T9284 |
| Tween 20, Calbiochem | Merck KGaA, Darmstadt,<br>Art.-Nr.: 655205               |

### ***Geräte und Verbrauchsmaterialien***

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Cryotom                   | Leica, Wetzlar, Leica CM 1950                      |
| Durchlichtmikroskop       | Leica Microsystems, Wetzlar,<br>Leica DM 2000      |
| Fluoreszenzlampe          | Leica, Wetzlar, DFC425 C                           |
| Kathodenzerstäuber        | Cressington, Watford, UK, 108                      |
| Kryostat                  | Leica Biosystem, Wetzlar, Deutschland,<br>CM 1950  |
| Leuchtstoffröhre          | Osram, München, 30Watt, cool wight                 |
| Magnetrührer, Rotilabo    | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,<br>MH15        |
| Mikroskopkamera           | Leica, Wetzlar, DFC 425C                           |
| Rasterelektronenmikroskop | XL 30 ESEM-FEG, Philips, Eindhoven,<br>Niederlande |
| Waage                     | Sartorius, Göttingen, BP 110 S                     |
| Wärmeschrank              | Heraeus Instruments GmbH, Hanau, UT<br>20          |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Deckgläser 24x60mm                | Engelbrecht GmbH, Edermünde,<br>Art.-Nr.: k12460             |
| Einbetttschälchen Kunststoff      | Medite GmbH, Burgdorf,<br>Art.-Nr.: 31051717                 |
| Filter Tip, 10µl XL, graduated    | Starlab International GmbH, Hamburg,<br>Art.-Nr.: S1120-3810 |
| Filter Tip, 1000µl XL, graduated  | Starlab International GmbH, Hamburg,<br>Art.-Nr.: S1122-1830 |
| Filter Tip, 20µl, bevelled        | Starlab International GmbH, Hamburg,<br>Art.-Nr.: S1120-1810 |
| Filter Tip, 200µl, graduated      | Starlab International GmbH, Hamburg,<br>Art.-Nr.: S1120-8810 |
| Mikrotom-Klinge S-35pfm           | Feather LTD., Osaka,<br>Art.-Nr.: 02.075.00.000              |
| Mikrotube, 1,5ml                  | Biosigma S.r.l., Cona Italien,<br>Art.-Nr.: CL022            |
| Naturaltube, 0,2ml                | Sorenson, Utah, USA,<br>Art.-Nr.: 16950A                     |
| Nitra Tex Handschuhe, Micro Touch | Ansell, München,<br>Art.-Nr.: 700113                         |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Obejektträger SuperFrost Plus | R. Langenbrinck, Emmendingen,<br>Art.-Nr.: 03-0060 |
| Skalpell, steril, No.10pfm    | Feather, Osaka,<br>Art.-Nr.: 02.001.30.010         |

### **Software**

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| Image J                           | Freeware, NIH   |
| Microsoft Office Word 2016        | Microsoft Inc., Redmond, USA  |
| Microsoft Office Excel 2016       | Microsoft Inc., Redmond, USA  |
| Microsoft Office Power Point 2016 | Microsoft Inc., Redmond, USA  |
| Mikroskop Software                | Leica Microsystems, Wetzlar, LAS V3.8                                     |
| Paint                             | Microsoft Inc., Redmond, USA  |
| Prism5                            | Prism version 5 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA, |

## **2.2 Tiere und Diät**

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von 200-250g verwendet. Die Tierversuche wurden entsprechend dem Tierversuchsantrag und den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Das Aktenzeichen im Register des Landesamtes für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz lautet: 84.02.04.2011.A34. Die Tiere wurden mit Standard-Rattenfutter *ad libitum* gefüttert. Im Zeitraum von einer Woche vor, bis zum Zeitpunkt  $t = 28$  d nach der Bestrahlung der Aorta enthielt das Futter einen prodegenerativen Zusatz. Dieser setzte sich aus 1,5% Dikalzium-Phosphat, 2% Cholesterin und 300.000 IU/kg Vitamin D zusammen. Zu den Explantations-Zeitpunkten  $t = 0$ ,  $t = 8$  d,  $t = 28$  d,  $t = 56$  d wurde Blut von jeweils fünf Ratten entnommen, um den Effekt der prodegenerativen Diät zu bestimmen. Als Kontrolle dienten Serumproben von weiteren fünf Ratten mit Standard-Rattenfutter. In allen Fällen wurden Kalzium-, Phosphat-, Triglycerid- und Cholesterin-Gehalt des Blutes bestimmt.

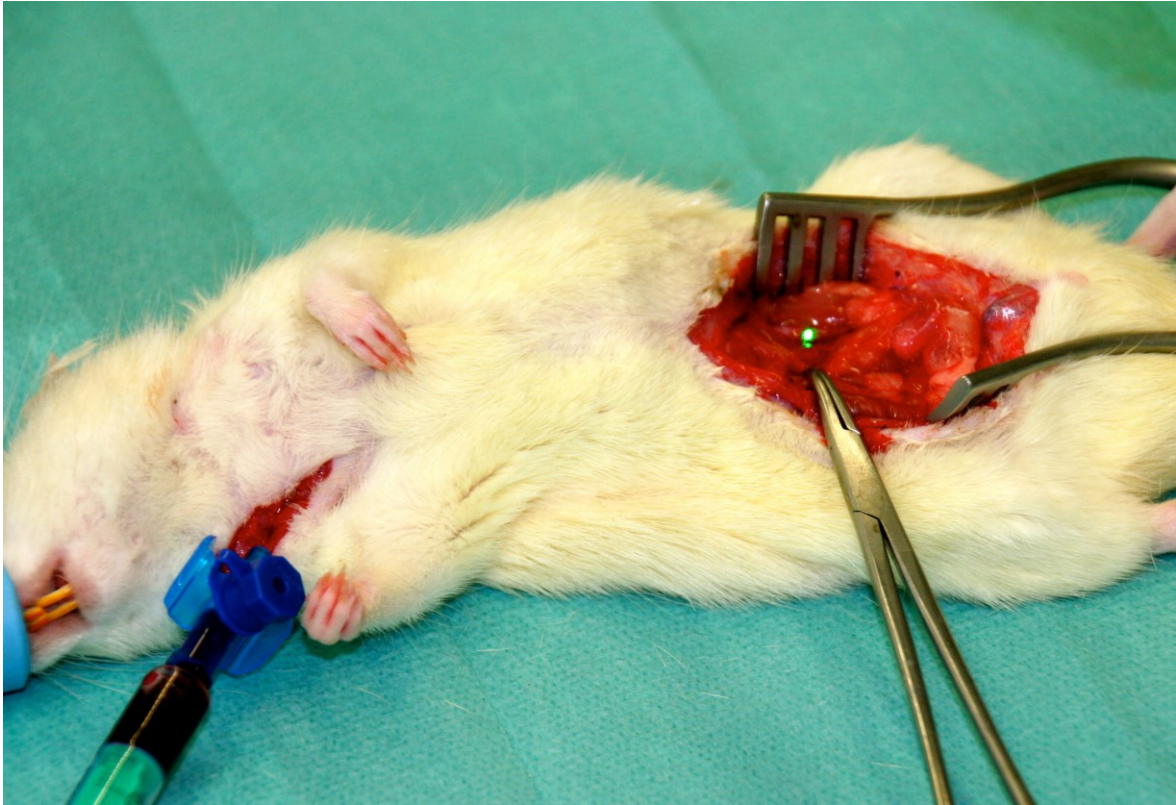
## 2.3 Intervention und Induktion von ROS per PDR

Die Ratten wurden mit Isofluran narkotisiert und mit 2-2,5 % Isofluran in der Atemluft beatmet. Orientierend wurde mit einer Doppler-Sonographie die Aorta abdominalis dargestellt. Über eine mediane Laparotomie und Seitverlagerung des Intestinums wurde die Aorta freipräpariert. Bei den Ratten der ROS-Gruppe wurde weiterhin die rechte Jugularvene freigelegt. Über diese wurde die Bengalrot-Lösung (40mg/kg Körpergewicht) verabreicht. Bei allen Ratten wurde die Aorta unterhalb der Nierenarterien für 60 Minuten kontinuierlich mit einem Laser (Wellenlänge: 543 nm, Leistung: 1 mW) bestrahlt. Die bestrahlte Stelle wurde mit einem Faden (8-0 Monofilament, nicht resorbierbar) markiert und das Abdomen und die Jugularvene verschlossen. Anschließend wurde der Blutfluss der Aorta mittels Doppler-Sonographie kontrolliert.

## 2.4 Explantation und Aufbereitung

Die Ratten der Gruppe  $t = 0$  wurden nach der Bestrahlung mit dem Laser unmittelbar euthanasiert. Die Tiere wurden ausgeblutet und das relevante Teilstück der Aorta explantiert. Das Aorten-Präparat wurde mit *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und von dorsal der Länge nach aufgespalten. Anschließend wurde das Präparat in KP-CryoCompound eingebettet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu Blöcken gefroren. Um auch längerfristige Effekte der Intervention überprüfen zu können, wurden verschiedene Explantationszeitpunkte gewählt:  $t = 0$ ,  $t = 2$  d,  $t = 4$  d,  $t = 8$  d,  $t = 28$  d,  $t = 56$  d. Jede Gruppe enthielt fünf Versuchstiere. Die ROS-Gruppe erhielt vor der Bestrahlung eine Injektion der Bengalrot-Lösung. Die Ratten der Kontrollgruppe erhielten nur die Bestrahlung ohne Bengalrot-Injektion. Zusätzlich gab es für die Rasterelektronenmikroskopie ROS-Gruppen und eine Kontrollgruppe von jeweils 3 Tieren mit den Explantationszeitpunkten  $t = 0$ ,  $t = 8$  d,  $t = 28$  d und  $t = 56$  d.





**Abbildung 2 Fotoaufnahme der Intervention:** Die Wistar-Ratte wurde narkotisiert und während der Intervention mit 2-2,5 % Isofluran in der Atemluft beatmet. Die Aorta wird nach einer medianen Laparotomie und Seitverlagerung des Intestinums unterhalb der Nierenarterien für 60 Minuten kontinuierlich mit einem Laser (Wellenlänge: 543 nm, Leistung: 1 mW) bestrahlt. Die Bengalrot-Lösung (40 mg/kg Körpergewicht) wird über die rechte Jugularvene verabreicht.

## 2.5 Rasterelektronenmikroskopie

Die Präparate wurden der Länge nach auf der der bestrahlten Region gegenüberliegenden Seite eröffnet und auf einer Platte fixiert. Anschließend wurden diese in gepuffertem Glutaraldehyd, einer Lösung aus 0,1 M Natrium-Kakodylat, 2,5 % Glutaraldehyd und 0,2 % Formalin über vier Stunden fixiert. Hiernach wurden die Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe über dreieinhalb Stunden getrocknet. Weiterhin wurden die Präparate in einer Lösung aus 50 % Hexamethyldisilazan (HMDS) und 50 % Ethanol (99 %) für fünf Minuten und anschließend in reinem HMDS für zehn Minuten inkubiert und über Nacht luftgetrocknet. So vorbereitet, wurden die Präparate mit einem Kathodenzerstäuber mit einer 20 nm Goldschicht überzogen. Mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 30 kV Aufnahmen der relevanten Gefäßabschnitte angefertigt.

## 2.6 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

Die Blöcke mit den Aortenpräparaten wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Kryostaten auf eine Dicke von  $7\ \mu\text{m}$  zugeschnitten. Auf die Objektträger für die immunhistochemische Untersuchung wurden zwei Gefrierschnitte aufgetragen - der eine als zu untersuchende Probe und der andere als direkte Negativkontrolle. In allen Untersuchungen mit Antikörpern wurden weiterhin Objektträger mit Positivkontrollen mitgeführt.

### *3-Nitrotyrosin (Immunfluoreszenz)*

Die Schnitte wurden in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Ethanol für 20 Minuten fixiert und danach dreimal für je eine Minute in PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte mit 0,25 % Triton-X in PBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Danach erfolgten drei weitere Waschungen in PBS für je eine Minute. Die Blockierung wurde mit 5 % Bovinem Serum Albumin (BSA) und 0,1 % Tween 20 in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss wurden die Schnitte dreimal in 0,1 % Tween 20, gelöst in PBS, für je eine Minute gewaschen. Als primärer Antikörper diente ein Anti-3-Nitrotyrosin-Antikörper im Verhältnis 1:100 in PBS mit 1 % Bovinem Serum Albumin und 0,1 % Tween 20. Die Schnitte auf dem Objektträger wurden mit einem DAKO-Pen umkreist und ein Tropfen von  $100\ \mu\text{l}$  der Antikörper-Lösung darauf pipettiert. Die Objektträger wurden mit der Antikörperlösung auf den Schnitten über eineinhalb Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Objektträger dreimal für je fünf Minuten in PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Alle folgenden Schritte erfolgten in Dunkelheit. Als Sekundärantikörper diente Alexa 546 im Verhältnis 1:200 in PBS. Die Sekundärantikörperlösung wurde als Tropfen von  $100\ \mu\text{l}$  auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen und mit dem Eindeckmedium DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) eingedeckt, das 4',6-Diamidin-2-phenylindole zur Kernfärbung enthielt. Die so durchgeführte Färbung lässt positive Antikörpersignale rot fluoreszieren, DAPI lässt die Zellkerne blau fluoreszieren.

### ***8-Oxoguanin (Immunfluoreszenz)***

Die Schnitte wurden in 3 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,6) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und danach zweimal in *tris-buffered saline* (TBS) mit 0,025 % Triton-X-100 für jeweils fünf Minuten gewaschen. Die Blockierung erfolgte mittels 10 % *normal serum* und 1 % BSA in TBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Als primärer Antikörper diente ein Anti-8-Hydroxyguanosin-Antikörper in TBS mit 1 % BSA. Die Schnitte auf dem Objektträger wurden mit einem DAKO-Pen umkreist und ein Tropfen von 100 µl der Antikörper-Lösung wurde darauf pipettiert. Die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in TBS mit 0,025 % Triton-X-100 gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Der sekundäre Antikörper Alexa 546 wurde im Verhältnis 1:200 in TBS mit 1 % BSA gemischt. Die Sekundärantikörperlösung wurde als Tropfen von 100 µl auf die Schnitte pipettiert. Anschließend wurden die Schnitte mit der Sekundärantikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal in TBS gewaschen und mit DAPI eingedeckt. Die so durchgeführte Färbung lässt positive Antikörpersignale rot fluoreszieren und die Zellkerne blau.

### ***Caspase 3 (Immunhistochemie)***

Die Schnitte wurden in 3 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,6) über 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend zweimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Es folgte eine Blockierung mit 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol über 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte zweimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Es folgte eine Blockierung mit 5 % *normal-serum* in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Als primärer Antikörper diente ein Caspase 3-Antikörper im Verhältnis 1:10 in PBS. Die Schnitte wurden auf dem Objektträger mit einem DAKO-Pen umkreist und ein Tropfen von 100 µl der Antikörper-Lösung wurde darauf pipettiert. Die Inkubation erfolgte über 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper-Komplex diente ein System aus einem biotinylierten Sekundärantikörper, in PBS und 5% *normal serum* gelöst. Dabei wurden Tropfen von 100 µl der Sekundärantikörperlösung auf die Präparate pipettiert. Die Schnitte wurden mit der Sekundärantikörperlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten zwei fünfminütige Waschschrte in PBS. Es folgte eine

Behandlung der Schnitte mit einer Lösung aus Avidin H und biotinylierter Peroxidase H für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Schnitte zweimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun. Die verwendete Peroxidase färbt positive Antikörpersignale braun. Die Hämalaun-Färbung färbt Zellkerne blau.

## 2.7 Auswertung und Quantifizierung

### *Quantifizierung*

Alle immunhistologischen Präparate wurden mit einem Leica DM 2000 Durchlichtmikroskop, die Immunfluoreszenzpräparate zusätzlich mit einer DFC425 Fluoreszenzlampe betrachtet und beurteilt. Fotoaufnahmen der Präparate wurden in 50-facher und 200-facher Vergrößerung mittels einer Leica DFC 425C Kamera sowie der Software *Leica Microsystems LAS V3.8* angefertigt. Die Auswertung erfolgte über die Software *Image J*.

Die Immunfluoreszenz-Färbungen 8-Oxoguanin und 3-Nitrotyrosin wurden semi-quantitativ beurteilt. Die Aufnahmen des Antikörpersignals wurden mittels *Image J* in Graustufen (32-bit) transformiert. Der relevante Gefäßabschnitt wurde von Hand als *region of interest* (ROI) markiert und anschließend der mittlere Grauwert des markierten Gebietes ermittelt. Der somit errechnete mittlere Grauwert wurde als Zahlenwert für das Antikörpersignal tabellarisch in *Microsoft Excel* notiert. Zusätzlich wurden die Aufnahmen optisch auf das Verteilungsmuster des Antikörpersignals untersucht.

Die Auswertung der Caspase 3-Färbung erfolgte histomorphologisch. Hierbei wurde einerseits die Signalintensität des Antikörpersignals in vier Stufen beurteilt: 0 = kein Signal, 1 = schwaches Signal, 2 = mäßiges Signal, 3 = starkes Signal. Andererseits wurde die generelle Morphologie des Gefäßes in der Hämalaun-Färbung untersucht. Dabei wurde insbesondere auf Verdickungen der Gefäßwand und Veränderungen der Kernverteilung und Kernstruktur geachtet.

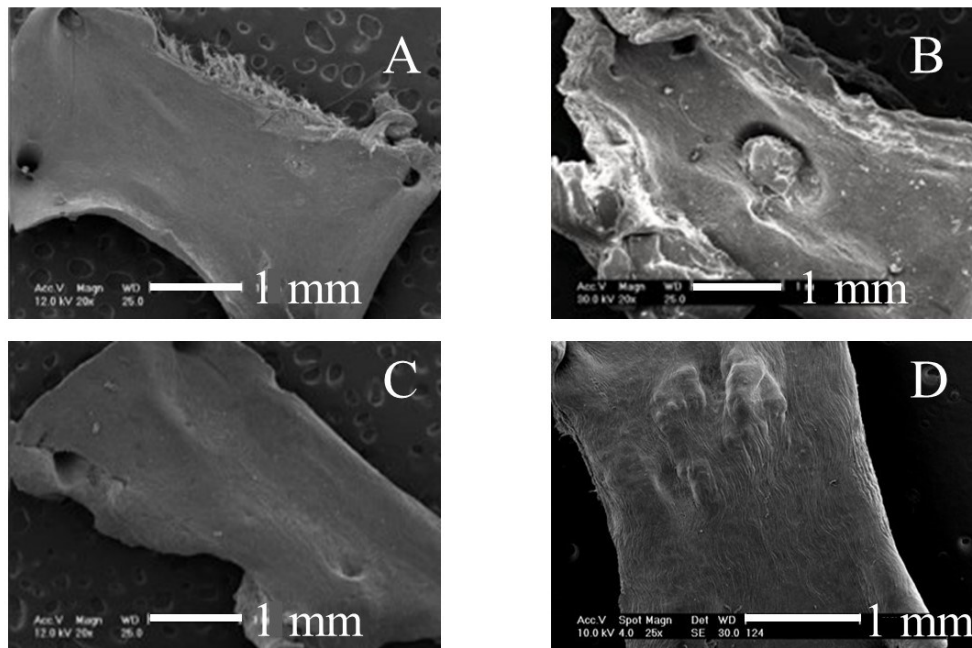
## *Statistik*

Die Analyse der Daten erfolgte mit den Programmen *Microsoft Office Excel 2016* (*Microsoft, Seattle, WA, USA*) und *Graphpad Prism5* (*Prism5, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA*). Alle Diagramme und Tabellen wurden mit diesen Programmen erstellt. Ferner wurden die Ergebnisse in den Gruppen mittels *One-way-Anova* und Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen und auf Signifikanz untersucht. Hierbei wurden Werte von  $p < 0,05$  als signifikant erachtet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Weder zum Zeitpunkt  $t = 0$  noch zu einem anderen Zeitpunkt ließen sich in der Rasterelektronenmikroskopie Schäden des Gefäßendothels erkennen (Abbildung 2, A). Jedoch zeigten alle Proben der ROS-Gruppe in der bestrahlten Region einen Thrombus bei  $t = 0$  (B). In der Kontrollgruppe bildete sich zu keinem Zeitpunkt ein Thrombus. Der Thrombus der ROS-Gruppe löste sich spätestens bis zum Zeitpunkt  $t = 28$  d auf (C). Zum Zeitpunkt  $t = 56$  d zeigten alle Proben der ROS-Gruppe eine prominente subendotheliale Wandverdickung (D). In den Proben der Kontrollgruppe ließ sich zu keinem Zeitpunkt eine Wandverdickung beobachten.

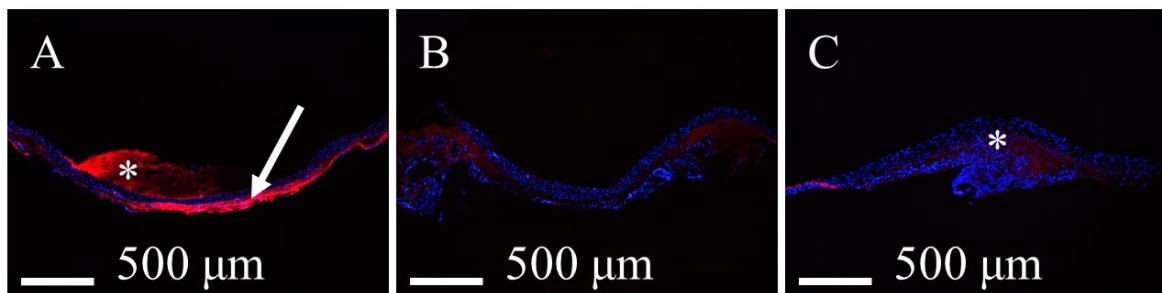


**Abbildung 3 Analyse der endoluminalen Oberfläche in der REM:** Zum Zeitpunkt  $t = 0$  ist die Endotheloberfläche der Kontrollgruppe intakt (A); In der ROS-Gruppe zeigt sich zu demselben Zeitpunkt ein fokaler Thrombus (B), der sich bis zum Zeitpunkt  $t = 28$  d zurückgebildet hat (C); in der ROS-Gruppe findet sich bei  $t = 56$  d eine subendotheliale Wandverdickung (D); Rasterelektronenmikroskopie; Maßstabsleiste = 1 mm; aus (Minol et al., 2017).

## 3.2 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

### 3-Nitrotyrosin

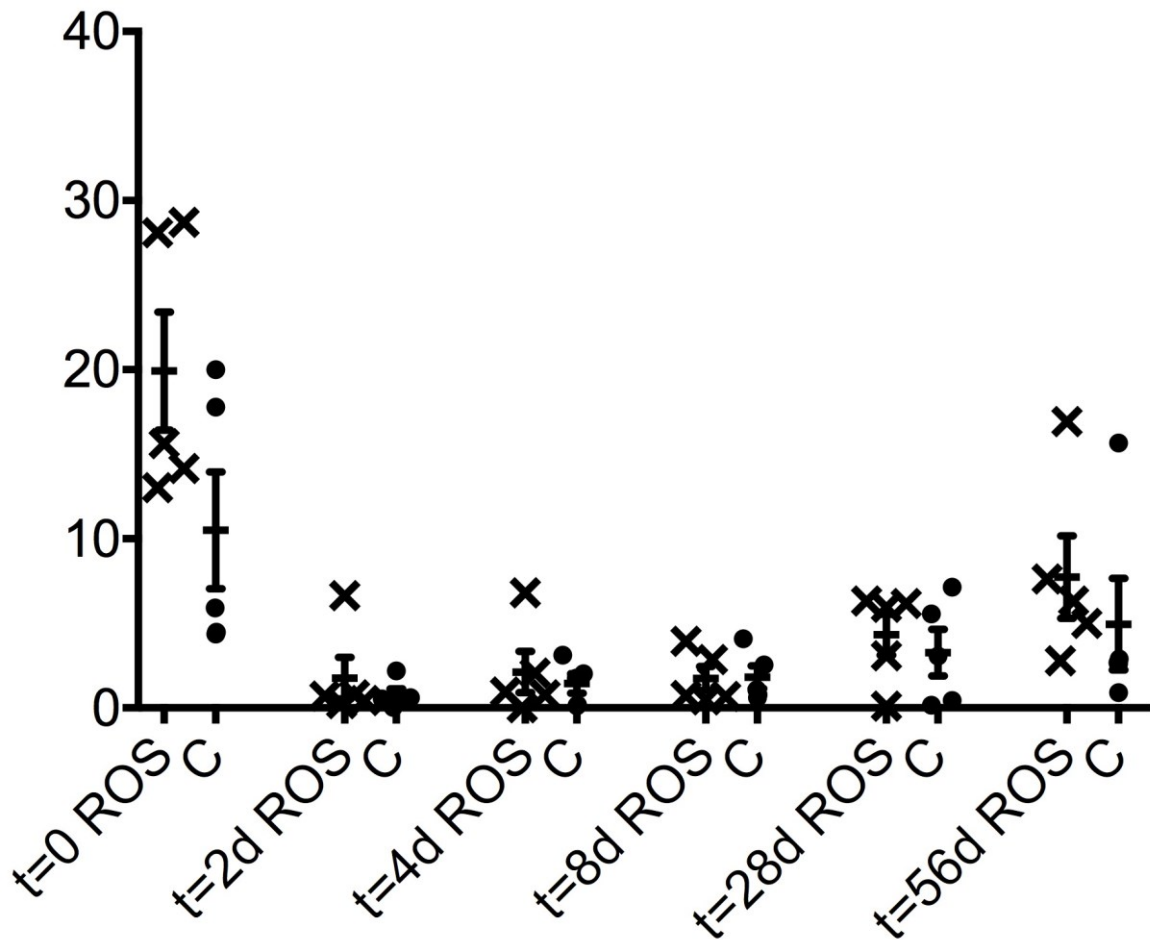
Die Höchstwerte des Antikörpersignals zeigten sich sowohl in der ROS-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt  $t = 0$  mit dem Maximum in der ROS-Gruppe (Diagramm 1). Dabei liegt der Wert der ROS-Gruppe im Mittel über jenem der Kontrollgruppe, allerdings ohne Signifikanz (Abbildung 3, A & B). Das Antikörpersignal war hauptsächlich in der Tunica media und der Tunica adventitia des bestrahlten Areals lokalisiert. Auffällig war außerdem ein deutliches Signal innerhalb des Thrombus, der sich nur in der ROS-Gruppe gebildet hatte (Abbildung 3, A).



**Abbildung 4 Indirekter Nachweis von ROS mittels 3-Nitrotyrosin:** Repräsentative Querschnitte zeigen ein deutliches 3-Nitrotyrosin-Signal zum Zeitpunkt  $t = 0$  (A) mit Fokus im Bereich der Tunica media und der Tunica adventitia (Pfeil); der Thrombus (Stern) zeigt ebenfalls ein deutliches Signal. Im Vergleich ist das Signal in der Kontrollgruppe bei  $t = 0$  schwächer (B); Bei  $t = 56$  d (C) zeigt sich in der ROS-Gruppe ebenfalls ein Signal, wenn auch schwächer als in A; bemerkenswert ist die Gefäßwandverdickung in C (Stern); 3-Nitrotyrosin (rot) mit DAPI Kernfärbung (blau), Maßstabsleiste =  $500\mu\text{m}$ .

In den nachfolgenden Proben beider Gruppen sank die Signalstärke ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ab (Diagramm 1). Bei  $t = 28$  d stieg das Antikörpersignal in beiden Gruppen wieder an und erreichte einen zweiten, geringeren Peak bei  $t = 56$  d, welcher im Mittel in der ROS-Gruppe höher war als in der Kontrollgruppe, jedoch ohne Signifikanz (Diagramm 1). In den Overlay-Aufnahmen der ROS-Gruppe zum Zeitpunkt  $t = 56$  d ließ sich eine Verdickung der Gefäßwand, insbesondere der Tunica media erkennen (Abbildung 3, C).

# 3-Nitrotyrosin

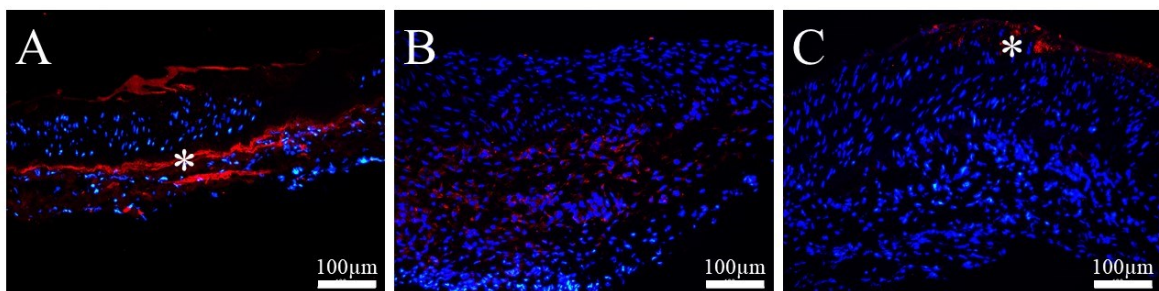


**Diagramm 1** Semiquantitative Auswertung des 3-Nitrotyrosin-Signals: Die höchsten Werte des 3-Nitrotyrosinsignals zeigen sich bei  $t = 0$  in beiden Gruppen mit dem Maximum in der ROS Gruppe (Kreuze). In beiden Gruppen sinkt das Signal ab mit einem zweiten Peak bei  $t = 56$  d in ROS-Gruppe und Kontrollgruppe (Punkte). Die unterschiedlichen Messwerte zwischen den Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied. (0 = absolute Dunkelheit, 255 = maximale Helligkeit; ROS = ROS-Gruppe; C = Kontrollgruppe; Abbildung aus (Minol et al., 2017))



## ***8-Oxoguanin***

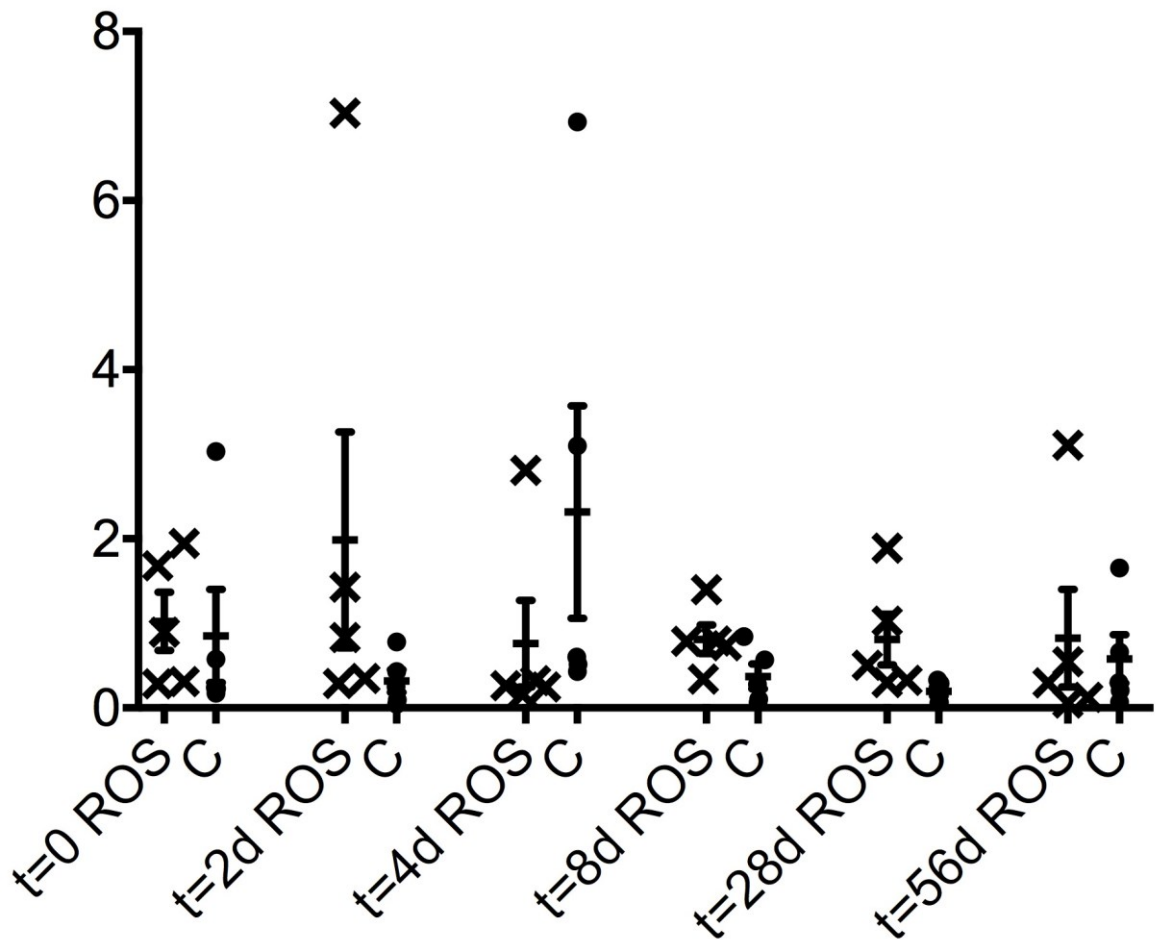
In der Immunfluoreszenz mit 8-Oxoguanin ließ sich, wie bei 3-Nitrotyrosin, ein Signalfokus im Bereich der Tunica media und der Tunica adventitia des bestrahlten Gebietes beobachten. Allerdings zeigte der Thrombus kein Antikörpersignal. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  war sowohl in den Proben der ROS-Gruppe als auch in den Proben der Kontrollgruppe ein schwaches bis mäßiges Signal messbar. Dieses steigerte sich in der ROS-Gruppe zum Zeitpunkt  $t = 2$  d auf ein Maximum, war jedoch im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht (Abbildung 4, A).



**Abbildung 5 Indirekter Nachweis von oxidativen DNA-Schäden mittels 8-Oxoguanin:** Repräsentative Querschnitte zeigen ein deutliches 8-Oxoguanin-Signal zum Zeitpunkt  $t = 0$  (A) mit Fokus im Bereich der Tunica media und der Tunica adventitia (Stern); Auch in der Kontrollgruppe ist bei  $t = 4$  d ein etwas schwächeres Signal erkennbar (B); Bei  $t = 56$  d (C) zeigt sich in der ROS-Gruppe nur noch ein schwaches Signal in der Tunica intima (Stern); 8-Oxoguanin (rot) mit DAPI Kernfärbung (blau); Maßstabsleiste = 100  $\mu\text{m}$ , 200-fache Vergrößerung.

Auch in der Kontrollgruppe war ein Peak zum Zeitpunkt  $t = 4$  d erkennbar (B). Danach sank die Signalstärke in allen nachfolgenden Proben auf eine schwache Intensität ab und war in der ROS-Gruppe im Mittel, abgesehen von  $t = 4$  d, nur geringgradig höher als in der Kontrollgruppe, teilweise mit schwachem Signal in der Tunica intima (C). Auch hier zeigten die Messungen keine Signifikanz (Diagramm 2).

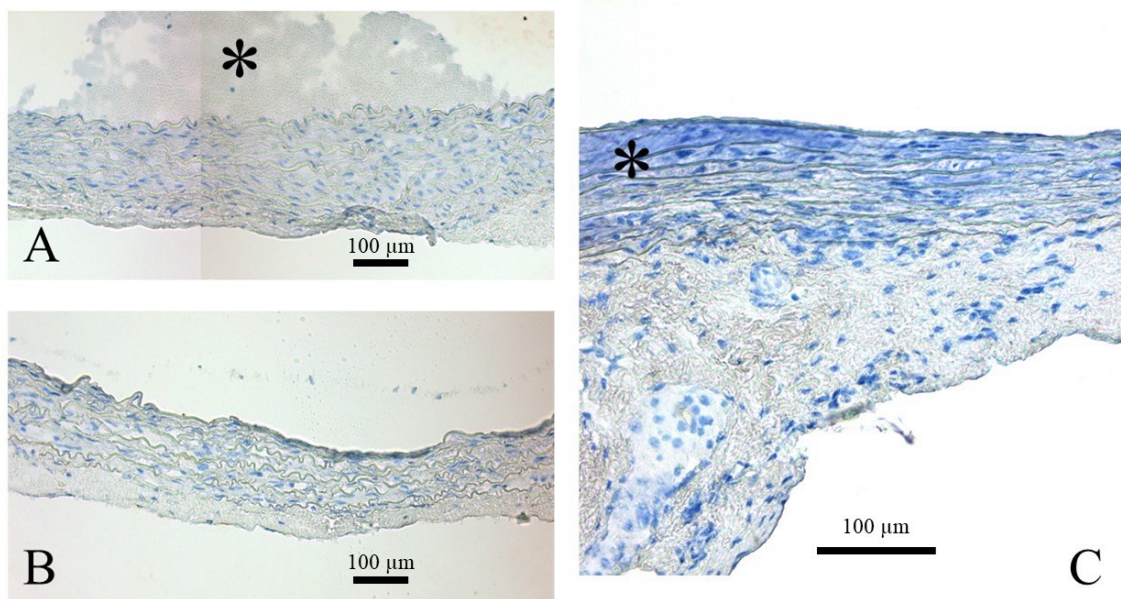
# 8-Oxoguanin



**Diagramm 2 Semiquantitative Auswertung des 8-Oxoguanin-Signals:** Das maximale 8-Oxoguanin-Signal zeigte sich in der ROS-Gruppe (Kreuze) zum Zeitpunkt  $t = 2$  d. Auch in der Kontrollgruppe (Punkte) war bei  $t = 4$  d ein starkes Signal messbar. Danach fand sich in beiden Gruppen nur ein schwaches Signal, welches in der ROS-Gruppe im Mittel höher war als in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten keine Signifikanz. (0 = absolute Dunkelheit, 255 = maximale Helligkeit); ROS = ROS-Gruppe; C = Kontrollgruppe

### **Caspase 3**

Die immunhistochemische Untersuchung auf Apoptose mittels Caspase 3 zeigte keine Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 5; A-C). Alle Proben zeigten kein Caspase-Signal und erhielten einen Score von 0. Die mitgeführten Positivkontrollen zeigten ein schwaches bis mäßiges Antikörpersignal. Histomorphologisch ließ sich in der Hämalaun-Färbung eine Verdickung der Gefäßwand in der ROS-Gruppe zum Zeitpunkt  $t = 56$  d erkennen. Dabei waren die Abstände zwischen den elastischen Lamellen der Tunica media stellenweise vergrößert und die Zellkerne teilweise vergrößert (Abbildung 5; C).



**Abbildung 6 Nachweis von Apoptose mittels Caspase 3:** Zu keinem Zeitpunkt ließ sich Apoptose nachweisen. In der ROS-Gruppe ist zum Zeitpunkt  $t = 0$  der Thrombus erkennbar (A, Stern); Sowohl in der ROS-Gruppe (A) als auch in der Kontrollgruppe (B) sieht man bei  $t = 0$  regelhaft angeordnete elastische Lamellen der Tunica media; Bei  $t = 56$  d ist die Architektur der elastischen Lamellen gestört (C, Stern) und die Zellkerne teilweise vergrößert. Caspase 3 (braunes Antikörpersignal) und Hämalaun-Kernfärbung (blau); Maßstabsleiste = 100  $\mu$ m, 200-fache Vergrößerung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Überblick über die Ergebnisse

In den letzten Jahrzehnten wurde die von Stocker et al. formulierte These, dass reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle in der Entstehung degenerativer Gefäßerkrankungen und thrombotischer Gefäßverschlüsse spielen, von zahlreichen weiteren Forschungsergebnissen gestützt (Stocker and Keane, 2004, Denicola et al., 2002, Leopold and Loscalzo, 2009, Thomson, 2015). Dabei stützt sich der Großteil der Versuchsmodelle auf systemisch erzeugten oxidativen Stress in Versuchstieren mit Gendefekten, wie beispielsweise eine Defizienz von Apolipoproteinen (Eitzman et al., 2000, Brennan et al., 2002, Parastatidis et al., 2007). Indes erschweren systemische Nebenwirkungen dieser Gendefekte eine isolierte Betrachtung der Auswirkungen oxidativen Stresses auf die Gefäßwand. Obwohl bekannt ist, dass die Photodynamische Reaktion von Bengalrot und Laserstrahlung fokal reaktive Sauerstoffspezies erzeugt (Saniabadi et al., 1995, Inamo et al., 1996), wurde diese Methode hauptsächlich zur Erzeugung thrombotischer Gefäßverschlüsse oder zur Untersuchung kurzfristiger Folgen des oxidativen Stresses genutzt (Eitzman et al., 2000, Perez et al., 2014). Der Fokus dieser Arbeiten lag auf der Schädigung des Endothels und der Tunica intima durch hohe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies und auf der Bildung einer Neointima innerhalb mehrerer Tage. Allerdings sind derart unphysiologisch hohe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies nur begrenzt dazu geeignet, die genauen Wirkmechanismen von ROS im chronischen Prozess der Gefäßdegeneration zu untersuchen.

Der Versuchsaufbau der hier vorliegenden Arbeit zielte einerseits darauf ab, kurzfristige Folgen des oxidativen Stresses, wie einen vollständigen thrombotischen Gefäßverschluss, zu vermeiden und andererseits langfristige Folgen des oxidativen Stresses für die gesamte Gefäßwand sichtbar zu machen. Mit den Entnahmezeitpunkten  $t = 0$  bis  $t = 8$  d wurden die kurzfristigen Effekte des oxidativen Stresses evaluiert. Die Entnahmezeitpunkte  $t = 28$  d und  $t = 56$  d dienten der Untersuchung der Gefäßwand auf langfristige Folgen reaktiver Sauerstoffspezies.

Die Rasterelektronenmikroskopie der Gefäßwand zum Zeitpunkt  $t = 0$  zeigte in der ROS-Gruppe zwar einen fokalen Thrombus, jedoch hatte sich kein vollständiger thrombotischer Gefäßverschluss gebildet. Zu keinem Zeitpunkt fand Apoptose statt. In der ROS-Gruppe

ließen sich zum Zeitpunkt  $t = 0$  und  $t = 2$  d gegenüber der Kontrollgruppe vermehrt 3-Nitrotyrosin und 8-Oxoguanin und somit größerer oxidativer Stress nachweisen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Langfristig bildete sich in der ROS-Gruppe eine Vorwölbung der Gefäßwand aus, welche in der Kontrollgruppe nicht vorhanden war.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde mittels photodynamischer Reaktion eine fokale Verdickung der Gefäßwand erzeugt und die molekularen Wirkmechanismen evaluiert. Die Messungen stützen die These, dass reaktive Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle in der Entstehung degenerativer Gefäßerkrankungen spielen. Im Vergleich mit dem von Stary et al. beschriebenen Modell der Atherogenese zeigen sich jedoch auch deutliche Unterschiede. Dies spricht dafür, dass kurzfristiger oxidativer Stress allein nicht ausreicht, um die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in Gang zu setzen (Stary et al., 1995).

## **4.2 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Rasterelektronenmikroskopie eignet sich, um die Struktur und Beschaffenheit von Oberflächen zu untersuchen. In dieser Arbeit konnten Erkenntnisse über die Morphologie der Gefäßoberfläche gewonnen und selbst kleinste Veränderungen der Endotheloberfläche erfasst werden. Zum einen ließ sich der Thrombus bei  $t = 0$  der bestrahlten Gefäßregion zuordnen, zum anderen ließ sich seine Auflösung verfolgen. Im Vergleich fiel in der Kontrollgruppe das Fehlen eines Thrombus aber auch die Darstellung einer intakten Endotheloberfläche auf. Die Rasterelektronenmikroskopie belegt hier Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen, die durch histologische Untersuchungen nicht darstellbar sind. Darüber hinaus belegen die Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie die Gefäßwandverdickung und ihre Vorwölbung in das Gefäßlumen. In der vorangegangenen Arbeit konnte keine hämodynamische Relevanz belegt werden.

Mittels Rasterelektronenmikroskopie lassen sich jedoch keine Aussagen zur Veränderung tiefer liegender Gewebsschichten treffen. So lässt sich anhand der Aufnahmen nicht beurteilen, in welcher Wandschicht die Verdickung in der ROS-Gruppe bei  $t = 56$  d stattgefunden hat. Um Einblicke in tiefere Gewebsschichten zu erhalten, wurden Immunhistochemie und Immunfluoreszenz durchgeführt.

## 4.3 3-Nitrotyrosin

Die Nitrierung von Tyrosin ist eine der typischen Reaktionen, die stattfinden, wenn ein Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies und insbesondere an Superoxid-Anionen besteht. Durch Oxidation wird eine Stickstoffgruppe kovalent mit einem Tyrosinrest eines Proteins zu 3-Nitrotyrosin verknüpft. Kovalente Bindungen sind sehr stabil, somit stellt 3-Nitrotyrosin eine längerfristige Modifikation des Proteins durch oxidativen Stress dar. Aufgrund der Langlebigkeit eignet sich 3-Nitrotyrosin zum indirekten Nachweis von oxidativem Stress (Ischiropoulos et al., 1992b). Grund für die Langlebigkeit von 3-Nitrotyrosin ist dessen Abbau, der hauptsächlich über die Proteindegradierung erfolgt (Grune et al., 1998).

3-Nitrotyrosin ist eine posttranslationale Proteinmodifikation, eine Modifikation an einem bereits synthetisierten Protein, die an einem Tyrosinrest innerhalb der Proteinstruktur erfolgt. Das Tyrosin wird hierbei von einer nitrierenden Substanz um eine Stickstoffgruppe ( $\text{NO}_2$ ) erweitert und 3-Nitrotyrosin entsteht. Dabei wird die Stickstoffgruppe in ortho-Position zur phenolischen Hydroxylgruppe angefügt. Nach der Nitrierungsreaktion bleibt das betroffene 3-Nitrotyrosin im Protein enthalten, wird also auch nicht durch unverändertes Tyrosin ausgetauscht (Abello et al., 2009).

Typischerweise entsteht 3-Nitrotyrosin durch eine Nitrierungs-Reaktion von Tyrosin mit einer nitrierenden Substanz wie Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Peroxynitrit setzt zuerst eine oxidative Reaktionskaskade in Gang, bei der schließlich 3-Nitrotyrosin entsteht. An dieser Peroxynitrit-abhängigen Nitrierungsreaktion sind häufig Superoxid-Dismutasen beteiligt, beispielsweise die Kupfer-, Zink-, Mangan- oder Eisen-abhängige Superoxid-Dismutase (Ischiropoulos et al., 1992b). Während der Nitrierungsreaktion bilden sich intermediäre Tyrosylradikale, strukturell Tyrosin-ähnliche, reaktionsfreudige Moleküle. Die Tyrosylradikale reagieren mit gleichzeitig entstandenen stickstoffhaltigen Nebenprodukten zu 3-Nitrotyrosin und Dityrosin (Ferrer-Sueta et al., 2018). Da der Anteil an 3-Nitrotyrosin unter physiologischen Bedingungen gegenüber anderen oxidativen Reaktionsprodukten wie Dityrosin überwiegt, eignet sich 3-Nitrotyrosin besser zum Nachweis von oxidativem Stress (Beckman et al., 1992, van der Vliet et al., 1995).

Auf zellulärer Ebene können oxidative Veränderungen wie 3-Nitrotyrosin gravierende Folgen haben. Sie verändern die Proteinstruktur und können sogar die Aktivität oder

Funktion des Proteins beeinflussen (Riordan and Vallee, 1972). Ein erhöhtes Vorkommen von 3-Nitrotyrosin wurde im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen nachgewiesen, unter anderem in der Lunge bei Sepsis, Pneumonie, ARDS (*acute respiratory distress syndrome*), aber auch im Herzen bei Myokarditis oder im zentralen Nervensystem im Neurofilament L bei amyotropher Lateralsklerose (Beckman and Koppenol, 1996). Auch kann die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten in Tyrosin-Kinasen durch 3-Nitrotyrosin verändert oder inaktiviert werden und somit die Signaltransduktion unterbrochen werden (Beckman et al., 1992).

Insbesondere bei kardiovaskulären oder periphere Gefäßerkrankungen kann die Tyrosin-Nitrierung in Proteinen schwerwiegende Folgen haben. Schmidt et al. wiesen nach, dass der Tyrosin-Rest 430 (Tyr430) in der Prostacyclinsynthase anfällig für eine Nitrierung durch Peroxynitrit ist. Die Nitrierung von Tyr430 zu 3-Nitrotyrosin führte dazu, dass das Protein seine Struktur änderte und sich um die Häm-bindende Stelle faltete und somit inaktiviert wurde (Schmidt et al., 2003). In der Folge wurde weniger Prostacyclin synthetisiert. Prostacyclin ist ein potenter Vasodilatator und ein Inhibitor der Plättchenfunktion. Eine verminderte Synthese führt folglich zum Gegenteil, nämlich zur Vasokonstriktion und gesteigerter Plättchenaggregation (de Leval et al., 2004). Gleichzeitig besteht ein verhältnismäßiges Überangebot an Thromboxan A<sub>2</sub>, dem „Gegenspieler“ von Prostacyclin, welches ein potenter Induktor der Plättchenaggregation ist und eine vasokonstriktorische Wirkung hat (Dogne et al., 2004). Die Inaktivierung der Prostacyclinsynthase führt in den betroffenen Gefäßabschnitten, auch bedingt durch das relative Übergewicht an Thromboxan A<sub>2</sub>, zu Gefäßspasmen und einer erhöhten Thrombogenese (Bachschmid et al., 2003, Grosser et al., 2006). In kleineren Blutgefäßen könnte dieser Mechanismus ursächlich für einen vollständigen Gefäßverschluss bei der Verwendung von Bengalrot mit Laserstrahlung sein (Eitzman et al., 2000).

Speziell im Zusammenhang mit degenerativen Gefäßerkrankungen spielt die Nitrierung von Tyrosinresten innerhalb von Proteinen eine wichtige Rolle. So können Proteine mit 3-Nitrotyrosin-Modifikation in atherosklerotischen Läsionen und dem Plasma von Patienten mit koronarer Herzkrankheit als Neoepitope dienen und eine Immunreaktion verursachen sowie die Bildung von Immunglobulinen begünstigen. Dies betrifft auch oxidierte Lipoproteine und Hitze-Schock-Proteine, welche zu einer gesteigerten Immunantwort führen (Thomson et al., 2012). Eine gesteigerte Immunreaktion im Bereich von Gefäßläsionen führt zu einer gesteigerten Rekrutierung von Leukozyten. Unter derartigen

entzündlichen Bedingungen kann eine Tyrosin-Nitrierung über die Myeloperoxidase (MPO) erfolgen. Dabei wird die MPO von aktivierten neutrophilen Granulozyten oder Monozyten freigesetzt und katalysiert unter Benutzung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Stickstoffdioxid ( $NO_2^-$ ) die Tyrosin-Nitrierung (Radi, 2018). Die Menge an 3-Nitrotyrosin in Gefäßläsionen repräsentiert somit *in-vivo* meistens eine Kombination aus oxidativem Stress und chronischer Entzündung (Thomson et al., 2012). Bei degenerativen Gefäßerkrankungen wurde dieser Zusammenhang zwischen dem Ausmaß an 3-Nitrotyrosin innerhalb bestimmter Proteine und der Schwere der Erkrankung nachgewiesen. Bei Analysen der Aortenwurzel von Mäusen korrelierte eine größere Menge 3-Nitrotyrosin in Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen sowie im Lipidkern mit einem gesteigerten Ausmaß der Gefäßdegeneration. Dabei fand sich 3-Nitrotyrosin sogar im Fibrinogen, welches in der Folge anfälliger für die Gerinnung war (Parastatidis et al., 2007).

Neuere Studien legen jedoch nahe, dass 3-Nitrotyrosin nicht immer ein spezifisches Produkt des oxidativen Stresses ist, sondern auch in Reaktionen ohne Peroxynitrit gebildet wird. Es kann durch Reaktion von Tyrosin mit Hypochloriger Säure ( $HClO$ ), mit in Zigarettenrauch enthaltenen Stickstoffdioxidradikalen ( $^*NO_2^-$ ) oder durch Reaktion mit der Myeloperoxidase (MPO) entstehen (van der Vliet et al., 1995, Stocker and Keaney, 2004, Pryor and Stone, 1993). Ein weiterer Pfad der Tyrosin-Nitrierung läuft katalysiert durch Häm-Peroxidasen ab und heißt deshalb Häm-Peroxidasen-*Pathway*. Auch andere Peroxidasen wie die eosinophile Peroxidase (EPO) sind dazu in der Lage, die Tyrosin-Nitrierung mit Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ) zu katalysieren (Radi, 2004, Brennan et al., 2002). Diese weiteren Nitrierungspfade beinhalten Reaktionen mit freien Radikalen wie dem Carbonat-Radikal ( $CO_3^{*-}$ ) oder mit Oxo-Metall-Komplexen. Die Radikale oxidieren Tyrosin zu Tyrosylradikalen und bilden über eine diffusionskontrollierte Reaktion mit Stickstoffdioxid-Radikalen letztlich 3-Nitrotyrosin (Huie, 1994, Pryor and Stone, 1993, Pryor and Lightsey, 1981, Thomas et al., 1968). Auch diese Peroxynitrit-unabhängigen Reaktionen von Tyrosin mit verschiedenen Peroxidasen tragen einen gewissen Teil zur Bildung von 3-Nitrotyrosin bei (Brennan et al., 2002). Folglich ist 3-Nitrotyrosin auch ein Marker für nitrosativen Stress und unter physiologischen Bedingungen nicht für oxidativen Stress spezifisch (Radi, 2004). In *in-vivo* Studien eignet sich 3-Nitrotyrosin somit nur bedingt zur Evaluation von oxidativem Stress. Insbesondere in Studien am Menschen lässt sich 3-Nitrotyrosin nicht als spezifischer Parameter für alleinigen oxidativen Stress anwenden, sondern steht auch für nitrosativen Stress.



Im Versuchsmodell dieser Arbeit war allerdings ein klarer Induktor des oxidativen Stresses vorhanden. Bengalrot liefert in Kombination mit Laserstrahlung hauptsächlich Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) und Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ), typische Moleküle des oxidativen Stresses (Inamo et al., 1996). Die Bildung von 3-Nitrotyrosin lief unter diesen Bedingungen über das Superoxid-Anion und Peroxynitrit ab und 3-Nitrotyrosin war folglich ein spezifisches Produkt des oxidativen Stresses.

Die 3-Nitrotyrosin-Höchstwerte fanden sich sowohl in der ROS-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt  $t = 0$  mit dem gruppenübergreifenden Maximum in der ROS-Gruppe. Der Fokus des Signals fand sich in der Tunica intima und der Tunica media des bestrahlten Gefäßareals. Da sich in der ROS-Gruppe im Mittel durchgängig höhere 3-Nitrotyrosinwerte als in der Kontrollgruppe fanden, lässt sich schlussfolgern, dass die Verwendung von Bengalrot mit Laserstrahlung ursächlich für diesen Überschuss war. Bengalrot liefert in Kombination mit Laserstrahlung überwiegend Singulett-Sauerstoff und Superoxidanionen (Lambert and Kochevar, 1996). Diese reaktiven Sauerstoffspezies verursachen oxidativen Stress und können Peroxynitrit bilden. Unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit ist die Bildung von 3-Nitrotyrosin als Beleg für oxidativen Stress mit Bildung von Peroxynitrit zu deuten (Radi, 2004). Auch der Thrombus wies immunhistochemisch ein verstärktes 3-Nitrotyrosin-Signal auf. Dieser Fund kann als eine Nitrierung von Fibrinogen interpretiert werden, welches in der Folge die Entstehung des Thrombus zusätzlich zu einem möglichen Endotheldefekt begünstigt haben könnte (Parastatidis et al., 2007, Inamo et al., 1996).

Bereits nach zwei Tagen, zum Zeitpunkt der nächsten Messung, sank das 3-Nitrotyrosinsignal auf ein ähnlich schwaches Niveau wie jenes der Kontrollgruppe ab. Die durchschnittliche Lebensdauer von Proteinen beträgt in Mäusen drei bis neun Tage (Price et al., 2010). Entweder wurden Proteine mit 3-Nitrotyrosin schneller abgebaut oder 3-Nitrotyrosin wurde durch einen anderen Mechanismus entfernt. In bestimmten Proteinen kann eine Tyrosin-Nitrierung gezielt beseitigt werden, ohne das betroffene Protein zu beschädigen. In den Versuchen von Irie et al. entfernte eine spezifische Denitrase die Nitrogruppe am Tyrosin-Rest des Histons H1.2, ohne dass das Protein degradiert wurde (Irie et al., 2003). Jedoch werten Salvemini et al. diese Denitrase in einer größeren Übersichtsarbeit als einen seltenen Mechanismus und nicht als generellen Prozess der 3-Nitrotyrosin-Entfernung (Salvemini et al., 2006). Die Folgerung, dass eine Denitrase für das starke Absinken des 3-Nitrotyrosin-Signals ab  $t = 2$  d ursächlich gewesen ist, ist äußerst

unwahrscheinlich. Als ursächlicher Prozess ist eine gesteigerte Degradierung von mit 3-Nitrotyrosin veränderten Proteinen unter dem Einfluss von Peroxynitrit zu werten, die von Grune et al. belegt wurde (Grune et al., 1998). In der hier vorliegenden Arbeit wurden diese Proteine, die bei  $t = 0$  ein 3-Nitrotyrosin-Signal zeigten, innerhalb von maximal zwei Tagen degradiert und nachfolgend kam es zu keiner erneuten Nitrierung.

Dennoch bleibt zu jedem Zeitpunkt der Messungen auch in der Kontrollgruppe 3-Nitrotyrosin in geringen Mengen nachweisbar. Obwohl kein Induktor oxidativen Stresses mehr vorlag, wurde in beiden Gruppen weiterhin 3-Nitrotyrosin gebildet. Eine Ursache der Basismenge an 3-Nitrotyrosin in beiden Gruppen könnte im Versuchsaufbau liegen. An den Tieren beider Gruppen wurde eine mediane Laparotomie unter Anästhesie durchgeführt. Große operative Eingriffe mit Anästhesie haben sowohl beim Menschen als auch bei Tieren eine gesteigerte immunologische Antwort zur Folge (Murphy and Shelley, 2018, Jacobi et al., 1998). Auf molekularer Ebene führen Entzündungen zur Entstehung von so großen Mengen an Superoxid, dass sie die Kapazität der endogenen Superoxid-Dismutasen übersteigen können (Salvemini et al., 2006). Dieser Überschuss an Superoxiden könnte zur Bildung von 3-Nitrotyrosin beigetragen haben.

Eine weitere Ursache könnte in der physiologischen Entstehung von 3-Nitrotyrosin liegen. Im Rahmen des Gasaustausches in kleinen Gefäßen entsteht Peroxynitrit durch die Reaktion von Nitroxyl-Anionen ( $\text{NO}^-$ ) mit molekularem Sauerstoff (Kirsch and de Groot, 2002). Peroxynitrit könnte in der Folge vor Ort 3-Nitrotyrosin erzeugen. Womöglich stammen die geringen Mengen 3-Nitrotyrosin zu späteren Zeitpunkten in beiden Gruppen von proteingebundenem 3-Nitrotyrosin, welches sich im Rahmen physiologischer Prozesse gebildet hat. Dies würde auch den geringen Anstieg des 3-Nitrotyrosinsignals in beiden Gruppen zu einem zweiten, geringeren *peak* bei  $t = 56$  d erklären. Zwar war dieser *peak* im Mittel in der ROS-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe, jedoch zeigte sich keine Signifikanz. Es wäre denkbar, dass Reparaturmechanismen wie die Reduktion von Tyrosylradikalen durch Glutathion sowie ein gesteigerter Abbau von 3-Nitrotyrosin noch größere Mengen an 3-Nitrotyrosin abfedern konnten (Radi, 2004).

Im Vergleich der in dieser Arbeit erzeugten Läsion mit der Atherosklerose fallen deutliche Unterschiede auf. Sowohl in atherosklerotischen Läsionen selbst als auch im Blutplasma von Patienten mit Atherosklerose ist 3-Nitrotyrosin signifikant erhöht (Beckmann et al., 1994, Shishehbor et al., 2003). Auch das Absinken der 3-Nitrotyrosinwerte im Verlauf passt nicht zur typischen Atherosklerose, bei der konstant 3-Nitrotyrosin gebildet wird (Parastatidis et

al., 2007). Dennoch kann auch eine geringere Menge an 3-Nitrotyrosin, wie bei  $t = 0$ , schädigenden Einfluss auf das Gefäß haben und somit ursächlich für eine Degeneration sein. So beträgt die absolute Menge an 3-Nitrotyrosin am Ort einer Entzündung höchstens fünf 3-Nitrotyrosinmodifikationen von 10000 Tyrosin-Resten (Radi, 2004). Bereits eine einzige Tyrosin-Nitrierung kann die Funktion des gesamten Proteins beeinträchtigen. In der manganabhängigen Superoxid-Dismutase führt die Nitrierung von Tyrosinrest-34 (Tyr34) zu ihrer Inaktivierung (Yamakura et al., 1998). Dies hat eine Anhäufung von Superoxid-Anionen mit oxidativen Schäden zur Folge. In den Versuchen dieser Arbeit erfolgte keine ausgeprägte Inaktivierung der Superoxid-Dismutase, da sonst auch zu späteren Zeitpunkten mehr 3-Nitrotyrosin als Folge des oxidativen Stresses gebildet worden wäre.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Behandlung mit Bengalrot und Laserstrahlung überwiegend akuten oxidativen Stress verursachte. Sämtliche kurzfristigen und langfristigen degenerativen Folgen in der ROS-Gruppe wurden folglich vor allem durch die akute oxidative Stresswirkung verursacht.

#### **4.4 8-Oxoguanin**

Oxidativer Stress führt nicht nur in Proteinen oder in den Mitochondrien zu Modifikationen. Auch im Zellkern führt die Oxidation von DNA-Bausteinen, beispielsweise von Guanin zu 8-Oxoguanin, zu DNA-Veränderungen oder sogar zu Strangbrüchen (Salgo et al., 1995, Kennedy et al., 1997, Szabo et al., 1996a). Wie bei der Oxidation von Proteinen erfolgt die Oxidation von DNA-Bausteinen meistens über Peroxynitrit. Peroxynitrit kann nachgewiesenermaßen Membranen durchschreiten und so in den Zellkern gelangen (Denicola et al., 1998). Dort erfolgt die Oxidation durch Peroxynitrit grundsätzlich an allen Nukleotiden, jedoch bevorzugt an Guanin-Resten (Inoue and Kawanishi, 1995). Dabei führt die Oxidation von Guanin durch Peroxynitrit zu zwei Hauptoxidationsprodukten, nämlich 2,5-Diamino-4H-Imidazol-4-On (Iz) und 8-Oxoguanin. Unter physiologischen Bedingungen wird jedoch deutlich mehr 8-Oxoguanin gebildet (Douki and Cadet, 1996, Kennedy et al., 1997, Szabo and Ohshima, 1997). Dementsprechend ist 8-Oxoguanin ein Surrogat für die Exposition von DNA mit Peroxynitrit. Grundsätzlich führen größere Mengen an Peroxynitrit, also ein höherer oxidativer Stress, auch zu einer vermehrten Bildung von 8-Oxoguanin. Eine besonders hohe Peroxynitrit-Konzentration führt aber

paradoxerweise wieder zu geringeren Mengen von 8-Oxoguanin, da dieses anfällig für weitere Oxidationsschritte ist (Uppu et al., 1996).

Neben Peroxynitrit sind drei weitere Induktoren für die Bildung von 8-Oxoguanin bekannt: Gammastrahlung, Eisen(II)-EDTA und Kupfer(II) (Kennedy et al., 1997). Unter physiologischen Bedingungen trägt jedoch vor allem Peroxynitrit und somit oxidativer Stress zur 8-Oxoguanin-Bildung bei (Spencer et al., 1996, Inoue and Kawanishi, 1995, Fiala et al., 1996). So ähnlich, wie 3-Nitrotyrosin die Funktion von Proteinen einschränkt, kann 8-Oxoguanin schwerwiegende Folgen für die Intaktheit des DNA-Stranges haben (Kennedy et al., 1997). Endogen produziertes Peroxynitrit führt in immunstimulierten Makrophagen zu DNA-Einzelstrangbrüchen (Zingarelli et al., 1996). Dabei führen geringe Peroxynitrit-Konzentrationen eher zu Einzelstrangbrüchen, wohingegen hohe Peroxynitrit-Konzentrationen vermehrt zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen (Yermilov et al., 1996, Epe et al., 1996, Groves and Marla, 1995). Dass 8-Oxoguanin in der Entstehung dieser DNA-Strangbrüche eine kritische Rolle spielt, lässt sich auch an den Ergebnissen von Hyun et al. ableiten. Sie wiesen nach, dass Zellen, die 8-Oxoguanin nicht über einen Reparaturmechanismus aus der DNA entfernen konnten, in den Zelltod übergingen (Hyun et al., 2003).

Gleichzeitig hat freies 8-Oxoguanin, welches nicht in die DNA eingebaut ist, eine Schutzfunktion. Es fungiert als Puffer und verhindert die Oxidation anderer DNA-Bausteine. Dabei kann es sowohl im Blut zirkulieren als auch mit dem Urin ausgeschieden werden (Kim et al., 2004). Klinisch wird diese Eigenschaft genutzt, um Gefäßläsionen in Zusammenhang mit Diabetes zu erkennen oder um bei Hämodialysepatienten das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion zu bestimmen. Hierbei korreliert ein erhöhter 8-Oxoguanin-Wert im Blut mit beschleunigter Atherosklerose und einer erhöhten Mortalität (Mahat et al., 2018, Kaya et al., 2012). Auch eine erhöhte Menge an 8-Oxoguanin im Urin korreliert mit dem Ausmaß der Atherosklerose (Wu et al., 2004, Kaya et al., 2012).

Die Kombination von Bengalrot mit Laserstrahlung erzeugt oxidativen Stress über Peroxynitrit als Zwischenprodukt. Peroxynitrit oxidiert im Zellkern bevorzugt Guanin-Reste innerhalb der DNA zu 8-Oxoguanin (Inoue and Kawanishi, 1995). Das gemessene 8-Oxoguaninsignal ist somit als indirekter Beweis für oxidativen Stress an der DNA zu werten. In der vorliegenden Arbeit ließ sich zum Zeitpunkt  $t = 2$  d die höchste Konzentration von 8-Oxoguanin messen. Zu diesem Zeitpunkt hat folglich die größte Menge an Peroxynitrit auf die DNA gewirkt. In den nachfolgenden Proben war das Signal deutlich schwächer als zum

Zeitpunkt  $t = 2$  d und es bestand zwischen den beiden Untersuchungsgruppen kein eindeutiger Unterschied im 8-Oxoguaninsignal. Die Anwendung von Bengalrot mit Laserstrahlung führte also auch auf DNA-Ebene, wie bei 3-Nitrotyrosin, hauptsächlich kurzfristig zu oxidativem Stress und unterschied sich langfristig nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Selbst zum Zeitpunkt des Maximums von 8-Oxoguanin in der ROS-Gruppe war die 8-Oxoguaninmenge lediglich gering bis mäßig hoch, denn eine große Menge an Peroxynitrit hätte DNA-Doppelstrangbrüche mit Zelltod zur Folge gehabt (Yermilov et al., 1996, Epe et al., 1996, Groves and Marla, 1995). Histologisch fanden sich jedoch keine typischen Merkmale der Nekrose (Nikoletopoulou et al., 2013). Diese Messung lässt vermuten, dass keine ausgeprägte DNA-Schädigung mit Doppelstrangbrüchen stattgefunden hat. Dazu passt, dass auch in der konventionellen Histologie der vorangegangenen Arbeit keine Nekrose in der Gefäßwand nachweisbar war (Minol et al., 2017). Dennoch könnte es zu DNA-Einzelstrangbrüchen und darauffolgend zu anderen Formen des Zelltodes gekommen sein.

Die Messungen von 3-Nitrotyrosin zeigen vor allem zum Zeitpunkt  $t = 0$  ein erhöhtes Maß an oxidativem Stress in der ROS-Gruppe. Bei  $t = 2$  d ist das 8-Oxoguaninsignal in der ROS-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nur mäßig und nicht signifikant erhöht. Ein Grund für das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes könnte eine besondere Eigenschaft von 8-Oxoguanin sein. Eine kurzfristige Exposition von DNA mit großen Peroxynitritmengen führt paradoxerweise nicht zu mehr 8-Oxoguanin als geringere Peroxynitritmengen. Uppu et al. zeigten, dass 8-Oxoguanin empfänglicher als Guanin für weitere Oxidationen durch Peroxynitrit ist und deshalb bereits gebildetes 8-Oxoguanin anstelle von Guanin bevorzugt zu Oxalsäure oxidiert wird (Uppu et al., 1996). Auch in den Versuchen dieser Arbeit war der oxidative Stress in der ROS-Gruppe nur von kurzer Dauer. Womöglich wurde neu gebildetes 8-Oxoguanin zu Oxalsäure weiter oxidiert und verhinderte so eine größer ausgeprägte 8-Oxoguaninbildung (Uppu et al., 1996). Der fehlende signifikante Unterschied zur Kontrollgruppe schließt also nicht zwangsläufig oxidative DNA-Schäden aus. Für diese Hypothese sprechen auch die Ergebnisse von Kennedy et al., die bei steigenden Peroxynitrit-Mengen eine Reduktion von 8-Oxoguanin nachwiesen. Hierbei führte mehr Peroxynitrit zu einer Ringspaltung von 8-Oxoguanin und somit zu seinem Abbau (Kennedy et al., 1997).

Eine weitere Ursache für die fehlende Signifikanz der Messungen dieser Arbeit könnte ein zelleigener Reparaturmechanismus sein. Die 8-Oxoguanin Glykosylase 1 (OGG1) entfernt

8-Oxoguanin aus der DNA (Hyun et al., 2003, Chung et al., 1991, Tchou et al., 1991, Radicella et al., 1997). Das gelöste, also freie 8-Oxoguanin ist mit Peroxynitrit reaktionsfreudiger als die verbleibenden Nukleoside innerhalb der DNA und schützt diese somit vor Oxidation (Uppu et al., 1996, Niles et al., 2006). Dennoch schützt auch dieser Reparaturmechanismus die DNA nur begrenzt vor Schäden. Wird freies 8-Oxoguanin weiter oxidiert, entsteht Oxalsäure. Im Zellkern verursacht Oxalsäure vor allem Guanin (G) zu Thymin (T) und Guanin zu Cytosin (C) Transversionen und besitzt mutagenes Potenzial (Duarte et al., 2001). In den Versuchen von Juedes et al. wurde eine 9-fach erhöhte Mutationshäufigkeit der DNA unter Peroxynitrit-Einfluss gemessen, hauptsächlich in Form von G:C zu A:T Transversionen sowie G:C zu C:G Transversionen (Juedes and Wogan, 1996). DNA-Veränderungen in so großem Ausmaß führen jedoch auch vermehrt zum Zelltod.

Abschließend stellt sich die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit gemessene Menge an 8-Oxoguanin überhaupt DNA-Schäden verursacht haben könnte. Radi et al. wiesen nach, dass geringe Mengen Peroxynitrit von den Enzymen Cytochrom-c-Oxidase, Glutathion, Ubichinol sowie NADH abgefedert werden können. Geringer oxidativer Stress richtet somit allenfalls geringen DNA-Schaden an und ist reparabel. Großer oxidativer Stress in kurzer Zeit oder konstanter mäßig hoher oxidativer Stress über einen längeren Zeitraum oxidiert funktionell relevante Proteine wie Superoxid-Dismutasen oder die Aconitase und inaktiviert diese. Auch die Inaktivierung des Elektronen-Transports und von ATPasen sowie eine Depletion von Glutathion sind die Folge großer Peroxynitritmengen. Der oxidative Stress überwiegt gegenüber den Reparaturmechanismen und startet eine Kaskade von Schädigungen. Diese Kaskade führt zur Öffnung von *Permeability-Transition-Pores* (PTPs) in der inneren Mitochondrienmembran und somit zum Zelltod durch Apoptose. Gleichzeitig verursachen große Peroxynitritmengen über die Aktivierung von Caspasen den Zelltod (Zhuang and Simon, 2000, Radi et al., 2002a, Radi et al., 2002b). Der Nachweis von gesteigertem Zelltod würde somit auch einen ausgeprägten oxidativen DNA-Schaden durch Peroxynitrit belegen.

## 4.5 Caspase 3

Sobald das Ausmaß des DNA-Schadens durch Strangbrüche zu groß ist, gehen Zellen in den Zelltod über. Dabei wird zwischen dem programmierten Zelltod, Apoptose genannt, und dem abrupten Zelltod, Nekrose genannt, unterschieden. Die Apoptose ist charakterisiert durch die Loslösung einzelner Zellen aus dem Zellverband und eine darauf folgende Kondensation der Zellbestandteile zu vielen kleinen Apoptosekörperchen (Kerr et al., 1972). Die Nekrose ist eine eher ungeordnete Form des Zelltodes mit Anschwellen der Zelle, Ruptur der Plasmamembran und anschließender Lyse in den Extrazellulärraum (Nikoletopoulou et al., 2013).

Oxidativer Stress kann einerseits über DNA-Strangbrüche und andererseits auf direktem Wege den Zelltod verursachen. Ein wichtiges Molekül ist auch hier Peroxynitrit. Geringe Peroxynitrit-Konzentrationen führen eher zum apoptotischen Zelltod und hohe Konzentrationen eher zu Nekrose (Islam et al., 2015). Ursache für die DNA-Strangbrüche ist häufig die Bildung von 8-Oxoguanin (Yermilov et al., 1996). Dabei haben vor allem DNA-Doppelstrangbrüche den Zelltod durch Apoptose oder Nekrose zur Folge (Roos and Kaina, 2006, Shacka et al., 2006). Doch Peroxynitrit kann auch ohne Beteiligung von 8-Oxoguanin zu DNA-Einzelstrangbrüchen führen (Szabo and Ohshima, 1997, Salgo et al., 1995, Szabo et al., 1996a). Der Peroxynitrit-Überschuss bewirkt die Phosphorylierung von p38, der MAP-Kinase JNK (c-Jun-N-terminale Kinase) und die Translokation der phosphorylierten, also aktivierten, JNK in die Mitochondrien. Dies führt zu einem Ausstrom von Cytochrom C sowie zu einer Aktivierung der Caspasen 9 und 3 und letztlich zur Apoptose (Shacka et al., 2006).

Generell läuft die Apoptose durch oxidativen Stress unter der Beteiligung der Caspasen 2, 3, 8 und 9 ab (Zhuang and Simon, 2000, Li et al., 1999). Doch auch unabhängig von oxidativem Stress münden alle Apoptose-Signalwege in eine Aktivierung von Caspase 3 als gemeinsamen Endpunkt (Shacka et al., 2006). Ein Nachweis von Caspase 3 lässt direkte Schlussfolgerungen auf das Ausmaß der stattgefundenen Apoptose zu.

In der vorliegenden Arbeit fand sich in keiner der Proben beider Gruppen ein Caspase 3-Signal. Die mitgeführte Positivkontrolle zeigte das erwartete positive Signal. Da Apoptose immer über die Aktivierung von Caspase 3 abläuft, lässt der fehlende Nachweis von Caspase-Aktivität in den Versuchen schlussfolgern, dass kein Zelluntergang durch Apoptose

stattgefunden hat (Shacka et al., 2006). Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass in der REM keine Endothelschäden zu sehen waren. In der Hämalaun-Färbung der Caspase-Immunhistochemie fanden sich keine kondensierten Zellen mit Apoptosekörperchen oder anderweitige Hinweise auf Zelluntergang (Kerr et al., 1972). Auch waren keine Nekrosezonen und keine nennenswerte inflammatorische Antwort zu sehen, die auf eine stattgefundene Nekrose hingedeutet hätten (Zong and Thompson, 2006). Die DAPI-Kernfärbung im Rahmen der Immunfluoreszenz von 3-Nitrotyrosin und 8-Oxoguanin zeigte intakte, regelmäßig verteilte Kerne in der bestrahlten Region sowie in den benachbarten Gefäßarealen. Diese Resultate werden durch die Ergebnisse der vorangegangenen Arbeit mit Fokus auf die histologische Morphologie gestützt (Minol et al., 2017).

Angesichts des Negativ-Ergebnisses für Caspase 3 stellt sich die Frage, ob Apoptose unabhängig von der untersuchten Aktivierung der Caspase 3 stattgefunden haben könnte. Es gibt zwei Hauptpfade der Apoptose, den intrinsischen und den extrinsischen Pfad. Die intrinsische Apoptose geht von den Mitochondrien aus. Die Translokation von Cytochrom C in das Zytosol führt über eine initiale Hochregulierung von Bak, Bcl-2 und Bcl-xl innerhalb der Mitochondrien zum Einbau der *Permeability transition pore* (PTP) in die innere mitochondrielle Membran und darauffolgend zum Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials. Dies hat ein osmotisches Anschwellen der Mitochondrien und letzten Endes die Ruptur selbiger zur Folge (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Die Überexpression von Cytochrom C im Zytosol fördert die Aktivierung von Caspasen und führt somit zum Zelltod. Aber eine alleinige Cytochrom C-Induktion ist für die Apoptose-Aktivierung nicht ausreichend. Erst das gemeinsame Auftreten von Entkoppelung der mitochondrialen Atmungskette, Verlust des Membranpotenzials und Cytochrom C-Ausschüttung mündet in die Apoptose (Chandra et al., 2002).

Hierbei fungiert Cytochrom C als Aktivator von Caspase 9 und Caspase 9 aktiviert über die Ausbildung von Apoptosomen die ausführende Caspase 3 (Rodriguez and Lazebnik, 1999). Es folgen Chromatin-Kondensation, nukleosomale DNA-Fragmentierung sowie der Zerfall der Kernmembran und die Ausbildung von Apoptose-Körperchen (Wang, 2001, Kerr et al., 1972). Schließlich kann die untergegangene Zelle phagozytiert werden. Dabei verursacht der Zelltod keine Entzündungsreaktion oder Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Majno and Joris, 1995).

Peroxyinitrit und hoher oxidativer Stress können durch reaktive Sauerstoffspezies den Einbau von *Permeability transition pores* (PTP) herbeiführen. So führen sie zur Freisetzung von



Cytochrom C und anderer Proteine in den intermembranären Raum und starten die Apoptose über den intrinsischen Pfad, wie oben geschildert (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Der Peroxynitrit-vermittelte, durch oxidativen Stress verursachte apoptotische Zelltod läuft, wie die anderen Pfade der Apoptose über die Aktivierung der Caspasen 9, 8 und 3 ab (Szabo et al., 2007, Shacka et al., 2006, Zhuang and Simon, 2000).

Die Apoptose kann neben dem intrinsischen auch über den extrinsischen Pfad herbeigeführt werden. Dieser wird über die Bindung spezifischer Liganden wie FAS-Ligand (FASL) an *Death receptors* wie FAS oder Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) in der Zellmembran initiiert. Die Bindung löst einen Zusammenschluss der *Death receptors* zu Polymeren aus und aktiviert über Zwischenschritte erst Caspase 8 und anschließend Caspase 3 (Nikoletopoulou et al., 2013). Zuletzt folgt die gemeinsame apoptotische Endstrecke mit Chromatin-Kondensierung und DNA-Fragmentierung.

Das negative Ergebnis der Caspase 3-Untersuchung zeigt also, dass im Versuch keine Apoptose, weder oxidativ bedingt über den intrinsischen Pfad noch extrinsisch über den Einbau von *death receptors* in die Zellmembran, stattgefunden hat. Im Sinne der oxidativ bedingten Atherogenese, wie sie von Stocker et al. beschrieben wird, wäre eine gesteigerte Apoptose-Aktivität aber auch die Nekrose glatter Muskelzellen in der ROS-Gruppe zu erwarten gewesen (Stocker and Keaney, 2004).

Da Zelltod durch Apoptose nicht nachweisbar war, stellt sich die Frage, ob es vermehrt zu Nekrose in der Gefäßwand gekommen ist und woran diese zu erkennen gewesen wäre. Es ist belegt, dass oxidativer Stress innerhalb der Zelle auch zu Nekrose führen kann (Los et al., 2002, Zong and Thompson, 2006). Nekrose hat in der konventionellen Histologie eine typische Morphologie. Sie ist charakterisiert durch das Anschwellen der Zelle und der Organellen, also des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien, der Ruptur der Plasmamembran und der Lyse der Zelle (Nikoletopoulou et al., 2013). Im Rahmen der oxidativ bedingten Nekrose werden p53 und PARP aktiviert (Zong and Thompson, 2006). Typischerweise folgt auf die Nekrose über die Ausschüttung von *high mobility group protein b1*, Adenin-Phosphat, Harnsäure und Hitze-Schock-Proteine eine Chemotaxis-vermittelte Entzündungsreaktion mit Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Zong and Thompson, 2006, Zeh and Lotze, 2005). Diese typische Morphologie wäre in der Hämalaun-Färbung erkennbar gewesen und hätte sich in der Immunfluoreszenz in einem Verlust von Zellkern-Signalen geäußert. Eine ausgedehnte Nekrose hätte in der REM eine Veränderung der Gefäßwand verursacht, welche über die Ausbildung eines Thrombus

hinausgeht, zum Beispiel eine Ulzeration. Diese Veränderungen ließen sich jedoch nicht belegen. Auch in der vorangegangenen Studie konnten konventionell-histologisch keine typischen Merkmale der Nekrose gefunden werden (Minol et al., 2017).

Neuere Forschungsergebnisse haben eine weitere Art des Zelltodes durch oxidativen Stress nachgewiesen, welche weder die typischen Merkmale der Nekrose noch der Apoptose aufweist. Somit könnte trotz des fehlenden Nachweises von Caspase 3 ein vermehrter oxidativ bedingter Zelluntergang stattgefunden haben, der nicht von den angewandten Methoden erfasst wurde. In Studien zur Untersuchung des von Peroxynitrit induzierten DNA-Schadens wurde eine reaktiv übersteigerte Aktivierung von Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) nachgewiesen (Szabo et al., 2007, Jagtap and Szabo, 2005). Die Überaktivierung von PARP-1 führte zum Zelltod über einen alternativen Pfad, der sich von der Apoptose und der Nekrose klar unterschied.

Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 ist ein im Zellkern lokalisiertes Enzym mit mehreren Funktionen (Zong and Thompson, 2006). Es spaltet unter anderem Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) zu Nikotinamid und ADP-Ribose und bildet aus mehreren ADP-Ribose-Molekülen anschließend Poly (ADP-Ribose) unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) (Sims et al., 1983). Außerdem ist es an der Reparatur von Basenexzisionen beteiligt, der *Base excision repair* (Menissier de Murcia et al., 2003). Eine weitere Funktion von PARP-1 ist es, DNA-Strangbrüche zu markieren (Krishnakumar and Kraus, 2010, Haince et al., 2008). Normalerweise wird PARP-1 durch DNA-Schäden aktiviert und bindet zur Reparatur an Einzelstrangbrüche oder Doppelstrangbrüche (Krishnakumar and Kraus, 2010). Dabei markiert PARP-1 DNA-Schäden, indem es ADP-Ribose-Moleküle im Bereich der DNA-Strangbrüche anbringt. In der Folge wird der MRN-Komplex, bestehend aus den Enzymen Mre11, Rad50 und Nbs1, an den Ort der Strangbrüche gelotst und repariert die DNA-Schäden (Haince et al., 2008). Die Wichtigkeit von PARP-1 in Zusammenhang mit der DNA-Synthese und -Reparatur zeigt sich darin, dass ein Knock-out von PARP-1 im Genom von Mäusen bereits in der Embryonalentwicklung tödlich ist (Menissier de Murcia et al., 2003).

Peroxynitrit und oxidativer Stress sind potente Induktoren der PARP-Aktivierung (Jagtap and Szabo, 2005, Szabo et al., 1996a, Zingarelli et al., 1996). Dabei führt eine Überaktivierung von PARP-1 zu einem gesteigerten Verbrauch von NAD<sup>+</sup> und ATP und letzten Endes aufgrund des ATP-Mangels zu Zeldysfunktion sowie zum Zelltod (Szabo and Dawson, 1998, Nicotera et al., 1998).

Speziell diese Überaktivierung von PARP-1 ist der Grund für den alternativen Zelltod, der von Harraz et al. als „Parthanatos“ (aus PAR: Poly (ADP-Ribose) und *Thanatos*: griechisch für Tod) benannt wurde (Harraz et al., 2008). Parthanatos ist weder Caspase-abhängig noch kommt es zu einem Anschwellen der Zelle, wie bei der Nekrose (Holler et al., 2000, Nikolettou et al., 2013). Typischerweise wird bei der Apoptose PARP-1 nach initialer Aktivierung von Caspasen gespalten und dadurch inaktiviert (Ivana Scovassi and Diederich, 2004). Bei dem Parthanatos hingegen erfolgt durch die gesteigerte Aktivierung von PARP-1 eine Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors aus den Mitochondrien in den Zellkern (Aredia and Scovassi, 2014, Eisemann and Pascal, 2020). Darauf folgt eine Verschiebung von Phosphatidylserin zur äußeren Plasmamembran, die Zerstörung des mitochondrialen Membranpotenzials, die Chromatin-Kondensation sowie die Fragmentierung der DNA (Islam et al., 2015, Eisemann and Pascal, 2020). Bei der Entscheidung, welchen Pfad die Zelle zum Untergang einschlägt, spielt neben der PARP-1-Aktivierung die vorhandene ATP-Menge innerhalb der Zelle eine entscheidende Rolle. Selbst der Prozess der Nekrose benötigt noch eine Restmenge an ATP. Wenn aber durch eine PARP1-Aktivierung sämtliches ATP aufgebraucht wurde, geht die Zelle in den Parthanatos über (Skulachev, 2006, Nicotera et al., 1998).

Es wurde gezeigt, dass in den Versuchen dieser Arbeit fokal oxidativer Stress vorhanden war und folglich ein Überschuss an Peroxynitrit gebildet wurde. Fraglich ist, ob dieser Peroxynitrit-Überschuss Parthanatos auslösen konnte. Für Parthanatos spricht einerseits, dass Peroxynitrit ein starker Induktor von PARP-1 ist, und dass initial in der ROS-Gruppe eine gesteigerte Menge an 3-Nitrotyrosin und 8-Oxoguanin als Zeichen gesteigerten oxidativen Stresses nachweisbar waren. Weiterhin schließt das Negativ-Ergebnis der Caspase 3-Färbung Apoptose, und somit auch die PARP-1-Inhibition infolge der Caspase-Aktivierung, aus (Ivana Scovassi and Diederich, 2004).

Allerdings spricht der nur mäßig erhöhte, nicht signifikante Messwert von 8-Oxoguanin gegen eine ausgeprägte DNA-Schädigung. Somit ist davon auszugehen, dass die Menge an DNA-Strangbrüchen allenfalls gering war und zum Zweck der DNA-Schadensreduktion nur eine geringe Aktivierung von PARP-1 erfolgt ist. Zwar könnte durch den initialen oxidativen Stress, welcher sich in dem initialen 3-Nitrotyrosin-*Peak* zum Zeitpunkt  $t = 0$  widerspiegelt, eine Aktivierung von PARP-1 durch Peroxynitrit erfolgt sein. Der Zelluntergang hätte sich aber in einer Strukturänderung der Gefäßwand und dem Verlust von Zellkernen manifestiert. Weder die Histologie der Antikörper-Untersuchungen noch die

Rasterelektronenmikroskopie zeigten solche Veränderungen der Gefäßwand. Auch in der vorangegangenen Arbeit ließen sich in der konventionellen Histologie zum Zeitpunkt des größten oxidativen Stresses und unmittelbar danach keine morphologischen Veränderungen der Gefäßwand belegen (Minol et al., 2017). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen somit in ihrer Gesamtheit gegen einen gesteigerten Zelltod durch Parthanatos.

In zukünftigen Versuchen ließe sich Parthanatos selbst in geringer Ausprägung immunhistochemisch nachweisen. Die PARP-1-Aktivierung stimuliert in glatten Muskelzellen die induzierbare Stickoxid-Synthase (iNOS) über Interferon gamma (Szabo et al., 1996b). Ein immunhistochemischer Nachweis einer gesteigerten iNOS-Aktivierung oder von erhöhtem Interferon gamma in glatten Muskelzellen könnte folglich als möglicher Surrogat-Parameter einer gesteigerten PARP-1-Aktivierung dienen.

Somit lassen sich sowohl stattgefundenene Apoptose als auch Nekrose und Parthanatos in den Versuchen ausschließen. In anderen Studien wurden im Rahmen der Photodynamischen Reaktion oftmals hitzeabsorbierende Filter eingesetzt, um thermische Schäden zu vermeiden (Kikuchi et al., 1998). Dabei blieb die Frage offen, ob die reine Laserbestrahlung ohne Bengalrot Zellschäden verursachen kann. Typische Folge einer Schädigung durch Laserbestrahlung ist die Apoptose (Barak et al., 2005). Auch operative Eingriffe können zu Entzündung und gesteigertem Zelltod führen (Jacobi et al., 1998, Murphy and Shelley, 2018). Da in den Versuchen der vorliegenden Arbeit keine Apoptose stattgefunden hat, lassen sich Zellschäden sowohl durch den operativen Eingriff als auch durch die fokale Laserbestrahlung ausschließen.

In den Versuchen dieser Arbeit wurde durch fokale Anwendung von reaktiven Sauerstoffspezies die Bildung eines Thrombus verursacht. Ob der Thrombus aufgrund eines Endotheldefektes entstanden ist, lässt sich nicht sicher sagen. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen der gemeinsamen Publikation könnte der oxidative Stress die Ursache der beobachteten endothelialen Dysfunktion beziehungsweise des Endotheldefektes gewesen sein (Minol et al., 2017). Dabei weisen der mäßig erhöhte 8-Oxoguaninwert und die fehlende Aktivierung von Caspase 3 eher auf eine Dysfunktion als auf einen Endotheldefekt mit Zelltod hin. Der hohe 3-Nitrotyrosinwert lässt sich als Beleg für die oxidative Modifikation von Proteinen der Gefäßwand deuten, welche zu einer Dysfunktion geführt hat. Dazu passt, dass sich auch im Thrombus, möglicherweise aufgrund einer oxidativen Modifikation des Fibrins, 3-Nitrotyrosin nachweisen ließ.

Mittelfristig bildete sich innerhalb von 56 Tagen eine Verdickung der Gefäßwand aus. Strukturelle Veränderungen waren vor allem in der Tunica media erkennbar. Die Abstände zwischen den elastischen Lamellen waren vergrößert und die Kerne teils ungeordnet, ähnlich wie bei degenerativen Gefäßerkrankungen. Keine dieser Veränderungen fand sich in der Kontrollgruppe. In den Versuchen der vorangegangenen Arbeit konnte in der Gefäßwandverdickung eine fokale Verkalkung und ein teilweiser Verlust der Expression von glattmuskulärem Aktin nachgewiesen werden. Die fokale Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies kann eine Differenzierung von glatten Muskelzellen zu einem osteogenen Phänotypen herbeiführen (Wang et al., 2015, Byon et al., 2008). In einer Studie von Byon et al. bildeten sich zusätzlich Verkalkungen ohne Nachweis von Apoptose aus (Byon et al., 2008). Dabei fungiert oxidativer Stress als Induktor von osteochondrogenen Schlüsselfaktoren, zum Beispiel von Transkriptionsfaktor Runx2. Diese Transkriptionsfaktoren regen einen Phänotypenswitch vom muskulären zum osteochondrogenen Phänotyp an (Byon et al., 2008). Glatte Muskelzellen regen über erhöhte Zellmigration, Sekretion von Matrixbestandteilen, osteochondrogene Differenzierung und Kalzifizierung die Entstehung einer atherosklerotischen Läsion an (Trion and van der Laarse, 2004, Naik et al., 2012). Es besteht große Ähnlichkeit zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und der beschriebenen Abfolge degenerativer Veränderungen.

Im Vergleich mit der Atherosklerose fallen jedoch deutliche Unterschiede auf. In dieser Studie bildete sich als Reaktion auf oxidativen Stress unmittelbar ein Thrombus, begleitet von oxidativer DNA-Schädigung. Die DNA-Schädigung war jedoch gering, da sie keine Apoptose zur Folge hatte. Bei der Atherosklerose wären kurzfristig vor allem ein Endotheldefekt mit Lipidperoxidation und Schaumzellbildung sowie Apoptose zu erwarten (Denicola et al., 2002, Stary et al., 1994).

Ein weiterer Unterschied zwischen der klassischen Atherosklerose und der Gefäßläsion in dieser Arbeit besteht bereits darin, dass lediglich über einen kurzen Zeitraum ein *peak* von oxidativem Stress erzeugt wurde, wohingegen die Atherosklerose durch chronische Wirkung zahlreicher Einflussfaktoren entsteht (Benjamin et al., 2017). Auch fand sich keine Transmigration von Leukozyten in den subendothelialen Raum der Tunica intima, welche bei der Atherosklerose zu erwarten wäre (Thomson, 2015).

Chronisch zeigte sich in dieser Studie eine Verdickung der Gefäßwand mit leichter Architekturstörung und Verkalkung. Es fand sich jedoch kein Atherom. Bei der Atherosklerose wären als chronische Merkmale vor allem eine konzentrische Verdickung

der Gefäßwand, ein Atherom mit fibröser Kappe und Verkalkungen zu erwarten (Stary et al., 1995).

Im Vergleich lässt sich feststellen, dass in der ROS-Gruppe eine fokale Gefäßläsion mit Merkmalen degenerativer Gefäßerkrankungen erzeugt wurde. Jedoch gibt es deutliche Unterschiede zu der Atherosklerose, wie das Fehlen des Lipidkerns, des Atheroms oder der fehlende DNA-Schaden mit Apoptose (Martinet et al., 2002).

## 4.6 Schlussfolgerungen

Die hier vorliegende Arbeit liefert gemeinsam mit den Versuchen der vorangegangenen Arbeit und der Publikation ein Tiermodell zur Analyse einer fokalen Degeneration der Aortenwand weitgehend ohne systemische Nebenwirkungen durch die gezielte Anwendung von reaktiven Sauerstoffspezies. Dabei fehlen der entstandenen Läsion typische Merkmale atherosklerotischer Läsionen. Die Versuche stützen die Hypothese, dass reaktive Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle in der Entstehung degenerativer Gefäßerkrankungen wie der Atherosklerose spielen. Gleichzeitig zeigen sie auch, dass kurzfristiger oxidativer Stress allein nicht ausreicht, um eine Gefäßdegeneration oder Atherogenese zu verursachen.

Im Vergleich sind degenerative Gefäßerkrankungen fast immer eine Folge chronischer Einflussfaktoren. Das hier geschilderte Modell verwendet hingegen einen kurzfristigen *peak* oxidativen Stresses von maximal einer Stunde Zeitdauer. Unter physiologischen Bedingungen wirkt oxidativer Stress über einen langen Zeitraum und nimmt multifaktoriell Einfluss auf die voranschreitende Degeneration von Gefäßen. Da sich kein gesteigerter Zelluntergang infolge des oxidativen Stresses nachweisen ließ, war die Intensität oder auch die Dauer der ROS-Induktion vermutlich zu gering.

Möglicherweise war auch der Beobachtungszeitraum zu kurz, um alle Langzeitfolgen zu erfassen, denn erst zum Zeitpunkt der letzten Explantation zeigte sich eine beginnende Langzeitfolge der ROS-Wirkung.

Der große Vorteil dieses Modells liegt in den geringen systemischen Nebenwirkungen. Weder der operative Eingriff noch die Laserbestrahlung verursachen nennenswerte Zellschäden und bieten die Möglichkeit, gesunde Gefäßabschnitte mit degenerierten Gefäßabschnitten zu vergleichen. In Zukunft lässt sich das Modell nutzen, um gezielt die Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies auf Strukturen des kardiovaskulären Systems zu erfassen.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ABELLO, N., KERSTJENS, H. A., POSTMA, D. S. & BISCHOFF, R. 2009. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J Proteome Res*, 8, 3222-38.
- ALEXANDER, W. 2010. American society of clinical oncology, 2010 annual meeting and rose bengal: from a wool dye to a cancer therapy. *P T*, 35, 469-78.
- AREDA, F. & SCOVASSI, A. I. 2014. Poly(ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochem Pharmacol*, 92, 157-63.
- BACHSCHMID, M., THURAU, S., ZOU, M. H. & ULLRICH, V. 2003. Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation. *FASEB J*, 17, 914-6.
- BARAK, A., GOLDKORN, T. & MORSE, L. S. 2005. Laser induces apoptosis and ceramide production in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 2587-91.
- BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. W., CHEN, J., MARSHALL, P. A. & FREEMAN, B. A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1620-4.
- BECKMAN, J. S., ISCHIROPOULOS, H., ZHU, L., VAN DER WOERD, M., SMITH, C., CHEN, J., HARRISON, J., MARTIN, J. C. & TSAI, M. 1992. Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*, 298, 438-45.
- BECKMAN, J. S. & KOPPENOL, W. H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-37.
- BECKMANN, J. S., YE, Y. Z., ANDERSON, P. G., CHEN, J., ACCAVITTI, M. A., TARPEY, M. M. & WHITE, C. R. 1994. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375, 81-8.
- BENJAMIN, E. J., BLAHA, M. J., CHIUVE, S. E., CUSHMAN, M., DAS, S. R., DEO, R., DE FERRANTI, S. D., FLOYD, J., FORNAGE, M., GILLESPIE, C., ISASI, C. R., JIMENEZ, M. C., JORDAN, L. C., JUDD, S. E., LACKLAND, D., LICHTMAN, J. H., LISABETH, L., LIU, S., LONGENECKER, C. T., MACKAY, R. H., MATSUSHITA, K., MOZAFFARIAN, D., MUSSOLINO, M. E., NASIR, K., NEUMAR, R. W., PALANIAPPAN, L., PANDEY, D. K., THIAGARAJAN, R. R., REEVES, M. J., RITCHEY, M., RODRIGUEZ, C. J., ROTH, G. A., ROSAMOND, W. D., SASSON, C., TOWFIGHI, A., TSAO, C. W., TURNER, M. B., VIRANI, S. S., VOEKS, J. H., WILLEY, J. Z., WILKINS, J. T., WU, J. H., ALGER, H. M., WONG, S. S., MUNTNER, P., AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS, C. & STROKE STATISTICS, S. 2017. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 135, e146-e603.
- BRENNAN, M. L., WU, W., FU, X., SHEN, Z., SONG, W., FROST, H., VADSETH, C., NARINE, L., LENKIEWICZ, E., BORCHERS, M. T., LUSIS, A. J., LEE, J. J., LEE, N. A., ABU-SOUD, H. M., ISCHIROPOULOS, H. & HAZEN, S. L. 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in



- vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem*, 277, 17415-27.
- BYON, C. H., JAVED, A., DAI, Q., KAPPES, J. C., CLEMENS, T. L., DARLEY-USMAR, V. M., MCDONALD, J. M. & CHEN, Y. 2008. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*, 283, 15319-27.
- CHANDRA, D., LIU, J. W. & TANG, D. G. 2002. Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis. *J Biol Chem*, 277, 50842-54.
- CHUNG, M. H., KIM, H. S., OHTSUKA, E., KASAI, H., YAMAMOTO, F. & NISHIMURA, S. 1991. An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA+. *Biochem Biophys Res Commun*, 178, 1472-8.
- DAVIES, M. J. & THOMAS, A. C. 1985. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*, 53, 363-73.
- DE LEVAL, X., HANSON, J., DAVID, J. L., MASEREEL, B., PIROTTE, B. & DOGNE, J. M. 2004. New developments on thromboxane and prostacyclin modulators part II: prostacyclin modulators. *Curr Med Chem*, 11, 1243-52.
- DENICOLA, A., BATTYANY, C., LISSI, E., FREEMAN, B. A., RUBBO, H. & RADI, R. 2002. Diffusion of nitric oxide into low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 277, 932-6.
- DENICOLA, A., SOUZA, J. M. & RADI, R. 1998. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3566-71.
- DOGNE, J. M., DE LEVAL, X., HANSON, J., FREDERICH, M., LAMBERMONT, B., GHUYSEN, A., CASINI, A., MASEREEL, B., RUAN, K. H., PIROTTE, B. & KOLH, P. 2004. New developments on thromboxane and prostacyclin modulators part I: thromboxane modulators. *Curr Med Chem*, 11, 1223-41.
- DOUKI, T. & CADET, J. 1996. Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free Radic Res*, 24, 369-80.
- DUARTE, V., GASPARUTTO, D., JAQUINOD, M., RAVANAT, J. & CADET, J. 2001. Repair and mutagenic potential of oxaluric acid, a major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine. *Chem Res Toxicol*, 14, 46-53.
- EISEMANN, T. & PASCAL, J. M. 2020. Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and the maintenance of genome integrity. *Cell Mol Life Sci*, 77, 19-33.
- EITZMAN, D. T., WESTRICK, R. J., XU, Z., TYSON, J. & GINSBURG, D. 2000. Hyperlipidemia promotes thrombosis after injury to atherosclerotic vessels in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1831-4.
- EPE, B., BALLMAIER, D., ROUSSYN, I., BRIVIBA, K. & SIES, H. 1996. DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res*, 24, 4105-10.
- FERRER-SUETA, G., CAMPOLO, N., TRUJILLO, M., BARTESAGHI, S., CARBALLAL, S., ROMERO, N., ALVAREZ, B. & RADI, R. 2018. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem Rev*, 118, 1338-1408.
- FERRER-SUETA, G. & RADI, R. 2009. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol*, 4, 161-77.
- FIALA, E. S., SODUM, R. S., BHATTACHARYA, M. & LI, H. 1996. (-)-Epigallocatechin gallate, a polyphenolic tea antioxidant, inhibits peroxynitrite-mediated formation of 8-oxodeoxyguanosine and 3-nitrotyrosine. *Experientia*, 52, 922-6.
- GROSSER, T., FRIES, S. & FITZGERALD, G. A. 2006. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest*, 116, 4-15.

- GROVES, J. T. & MARLA, S. S. 1995. Peroxynitrite-Induced DNA Strand Scission Mediated by a Manganese Porphyrin. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 9578-9579.
- GRUNE, T., BLASIG, I. E., SITTE, N., ROLOFF, B., HASELOFF, R. & DAVIES, K. J. 1998. Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J Biol Chem*, 273, 10857-62.
- HAINCE, J. F., MCDONALD, D., RODRIGUE, A., DERY, U., MASSON, J. Y., HENDZEL, M. J. & POIRIER, G. G. 2008. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem*, 283, 1197-208.
- HARRAZ, M. M., DAWSON, T. M. & DAWSON, V. L. 2008. Advances in neuronal cell death 2007. *Stroke*, 39, 286-8.
- HOLLER, N., ZARU, R., MICHEAU, O., THOME, M., ATTINGER, A., VALITUTTI, S., BODMER, J. L., SCHNEIDER, P., SEED, B. & TSCHOPP, J. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*, 1, 489-95.
- HUIE, R. E. 1994. The reaction kinetics of NO<sub>2</sub>(.). *Toxicology*, 89, 193-216.
- HYUN, J. W., JUNG, Y. C., KIM, H. S., CHOI, E. Y., KIM, J. E., YOON, B. H., YOON, S. H., LEE, Y. S., CHOI, J., YOU, H. J. & CHUNG, M. H. 2003. 8-hydroxydeoxyguanosine causes death of human leukemia cells deficient in 8-oxoguanine glycosylase 1 activity by inducing apoptosis. *Mol Cancer Res*, 1, 290-9.
- INAMO, J., BELOUGNE, E. & DOUTREMEPUICH, C. 1996. Importance of photo activation of rose bengal for platelet activation in experimental models of photochemically induced thrombosis. *Thromb Res*, 83, 229-35.
- INOUE, S. & KAWANISHI, S. 1995. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett*, 371, 86-8.
- IRIE, Y., SAEKI, M., KAMISAKI, Y., MARTIN, E. & MURAD, F. 2003. Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5634-9.
- ISCHIROPOULOS, H., ZHU, L. & BECKMAN, J. S. 1992a. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 298, 446-51.
- ISCHIROPOULOS, H., ZHU, L., CHEN, J., TSAI, M., MARTIN, J. C., SMITH, C. D. & BECKMAN, J. S. 1992b. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*, 298, 431-7.
- ISLAM, B. U., HABIB, S., AHMAD, P., ALLARAKHA, S., MOINUDDIN & ALI, A. 2015. Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP). *Indian J Clin Biochem*, 30, 368-85.
- IVANA SCOVASSI, A. & DIEDERICH, M. 2004. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol*, 68, 1041-7.
- JACOBI, C. A., ORDEMANN, J., ZIEREN, H. U., VOLK, H. D., BAUHOFER, A., HALLE, E. & MULLER, J. M. 1998. Increased systemic inflammation after laparotomy vs laparoscopy in an animal model of peritonitis. *Arch Surg*, 133, 258-62.
- JAGTAP, P. & SZABO, C. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 421-40.
- JENA, N. R. & MISHRA, P. C. 2007. Formation of 8-nitroguanine and 8-oxoguanine due to reactions of peroxynitrite with guanine. *J Comput Chem*, 28, 1321-35.
- JUEDES, M. J. & WOGAN, G. N. 1996. Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat Res*, 349, 51-61.

- KAYA, Y., ARI, E., DEMIR, H., SOYLEMEZ, N., CEBI, A., ALP, H., BAKAN, E., GECIT, I., ASICIOGLU, E. & BEYTUR, A. 2012. Accelerated atherosclerosis in haemodialysis patients; correlation of endothelial function with oxidative DNA damage. *Nephrol Dial Transplant*, 27, 1164-9.
- KENNEDY, L. J., MOORE, K., JR., CAULFIELD, J. L., TANNENBAUM, S. R. & DEDON, P. C. 1997. Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. *Chem Res Toxicol*, 10, 386-92.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KIKUCHI, S., UMEMURA, K., KONDO, K., SANIABADI, A. R. & NAKASHIMA, M. 1998. Photochemically induced endothelial injury in the mouse as a screening model for inhibitors of vascular intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1069-78.
- KIM, J. E., CHOI, S., YOO, J. A. & CHUNG, M. H. 2004. 8-Oxoguanine induces intramolecular DNA damage but free 8-oxoguanine protects intermolecular DNA from oxidative stress. *FEBS Lett*, 556, 104-10.
- KIRSCH, M. & DE GROOT, H. 2002. Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen. *J Biol Chem*, 277, 13379-88.
- KRISHNAKUMAR, R. & KRAUS, W. L. 2010. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell*, 39, 8-24.
- LAMBERT, C. R. & KOCHEVAR, I. E. 1996. Does Rose Bengal Triplet Generate Superoxide Anion? *Journal of the American Chemical Society*, 118, 3297-3298.
- LEOPOLD, J. A. & LOSCALZO, J. 2009. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 47, 1673-706.
- LEVRAND, S., VANNAY-BOUCHICHE, C., PESSE, B., PACHER, P., FEIHL, F., WAEBER, B. & LIAUDET, L. 2006. Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 41, 886-95.
- LI, A. E., ITO, H., ROVIRA, II, KIM, K. S., TAKEDA, K., YU, Z. Y., FERRANS, V. J. & FINKEL, T. 1999. A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res*, 85, 304-10.
- LOS, M., MOZOLUK, M., FERRARI, D., STEPCZYNSKA, A., STROH, C., RENZ, A., HERCEG, Z., WANG, Z. Q. & SCHULZE-OSTHOFF, K. 2002. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell*, 13, 978-88.
- MAHAT, R. K., SINGH, N., GUPTA, A. & RATHORE, V. 2018. Oxidative DNA Damage and Carotid Intima Media Thickness as Predictors of Cardiovascular Disease in Prediabetic Subjects. *J Cardiovasc Dev Dis*, 5.
- MAJNO, G. & JORIS, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146, 3-15.
- MARKLUND, S. 1976. Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 251, 7504-7.
- MARTINET, W., KNAAPEN, M. W., DE MEYER, G. R., HERMAN, A. G. & KOCKX, M. M. 2002. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 106, 927-32.
- MENISSIER DE MURCIA, J., RICOUL, M., TARTIER, L., NIEDERGANG, C., HUBER, A., DANTZER, F., SCHREIBER, V., AME, J. C., DIERICH, A., LEMEURE, M., SABATIER, L., CHAMBON, P. & DE MURCIA, G. 2003. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J*, 22, 2255-63.

- MINOL, J. P., REINSCH, I., LUIK, M., LEFERINK, A., BARTH, M., ASSMANN, A., LICHTENBERG, A. & AKHYARI, P. 2017. Focal induction of ROS-release to trigger local vascular degeneration. *PLoS One*, 12, e0179342.
- MURPHY, E. & SHELLEY, B. 2018. Response to: 'Postoperative pulmonary complications, pulmonary and systemic inflammatory responses after lung resection surgery with prolonged one-lung ventilation. Randomised controlled trial comparing intravenous and inhalational anaesthesia'. *Br J Anaesth*, 120, 411-412.
- MURPHY, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417, 1-13.
- NAIK, V., LEAF, E. M., HU, J. H., YANG, H. Y., NGUYEN, N. B., GIACHELLI, C. M. & SPEER, M. Y. 2012. Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovasc Res*, 94, 545-54.
- NEWMAYER, D. D. & FERGUSON-MILLER, S. 2003. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, 112, 481-90.
- NICOTERA, P., LEIST, M. & FERRANDO-MAY, E. 1998. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*, 102-103, 139-42.
- NIKOLETOPOULOU, V., MARKAKI, M., PALIKARAS, K. & TAVERNARAKIS, N. 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3448-3459.
- NILES, J. C., WISHNOK, J. S. & TANNENBAUM, S. R. 2006. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide*, 14, 109-21.
- OTSUKA, F., KRAMER, M. C., WOULDSTRA, P., YAHAGI, K., LADICH, E., FINN, A. V., DE WINTER, R. J., KOLODZIE, F. D., WIGHT, T. N., DAVIS, H. R., JONER, M. & VIRMANI, R. 2015. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis*, 241, 772-82.
- PARASTATIDIS, I., THOMSON, L., FRIES, D. M., MOORE, R. E., TOHYAMA, J., FU, X., HAZEN, S. L., HEIJNEN, H. F., DENNEHY, M. K., LIEBLER, D. C., RADER, D. J. & ISCHIROPOULOS, H. 2007. Increased protein nitration burden in the atherosclerotic lesions and plasma of apolipoprotein A-I deficient mice. *Circ Res*, 101, 368-76.
- PEREZ, P., ALARCON, M., FUENTES, E. & PALOMO, I. 2014. Thrombus formation induced by laser in a mouse model. *Exp Ther Med*, 8, 64-68.
- PRICE, J. C., GUAN, S., BURLINGAME, A., PRUSINER, S. B. & GHAEMMAGHAMI, S. 2010. Analysis of proteome dynamics in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14508-13.
- PRYOR, W. A. & LIGHTSEY, J. W. 1981. Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous Acid. *Science*, 214, 435-7.
- PRYOR, W. A. & STONE, K. 1993. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*, 686, 12-27; discussion 27-8.
- RADI, R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4003-8.
- RADI, R. 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 5839-5848.
- RADI, R., CASSINA, A. & HODARA, R. 2002a. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem*, 383, 401-9.

- RADI, R., CASSINA, A., HODARA, R., QUIJANO, C. & CASTRO, L. 2002b. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 33, 1451-64.
- RADICELLA, J. P., DHERIN, C., DESMAZE, C., FOX, M. S. & BOITEUX, S. 1997. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8010-5.
- RIORDAN, J. F. & VALLEE, B. L. 1972. [44] Nitration with tetranitromethane. *Methods Enzymol*, 25, 515-21.
- RODRIGUEZ, J. & LAZEBNIK, Y. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*, 13, 3179-84.
- ROOS, W. P. & KAINA, B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*, 12, 440-50.
- ROSS, R. & GLOMSET, J. A. 1976. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*, 295, 420-5.
- SALGO, M. G., BERMUDEZ, E., SQUADRITO, G. L. & PRYOR, W. A. 1995. Peroxynitrite causes DNA damage and oxidation of thiols in rat thymocytes [corrected]. *Arch Biochem Biophys*, 322, 500-5.
- SALVEMINI, D., DOYLE, T. M. & CUZZOCREA, S. 2006. Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem Soc Trans*, 34, 965-70.
- SANIABADI, A. R., UMEMURA, K., MATSUMOTO, N., SAKUMA, S. & NAKASHIMA, M. 1995. Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction. *Thromb Haemost*, 73, 868-72.
- SCHMIDT, P., YOUHNOVSKI, N., DAIBER, A., BALAN, A., ARSIC, M., BACHSCHMID, M., PRZYBYLSKI, M. & ULLRICH, V. 2003. Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *J Biol Chem*, 278, 12813-9.
- SHACKA, J. J., SAHAWNEH, M. A., GONZALEZ, J. D., YE, Y. Z., D'ALESSANDRO, T. L. & ESTEVEZ, A. G. 2006. Two distinct signaling pathways regulate peroxynitrite-induced apoptosis in PC12 cells. *Cell Death Differ*, 13, 1506-14.
- SHISHEHBOR, M. H., AVILES, R. J., BRENNAN, M. L., FU, X., GOORMASTIC, M., PEARCE, G. L., GOKCE, N., KEANEY, J. F., JR., PENN, M. S., SPRECHER, D. L., VITA, J. A. & HAZEN, S. L. 2003. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA*, 289, 1675-80.
- SIES, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82, 291-5.
- SIES, H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 4, 180-3.
- SIMS, J. L., BERGER, S. J. & BERGER, N. A. 1983. Poly(ADP-ribose) Polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis. *Biochemistry*, 22, 5188-94.
- SKULACHEV, V. P. 2006. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*, 11, 473-85.
- SPENCER, J. P., WONG, J., JENNER, A., ARUOMA, O. I., CROSS, C. E. & HALLIWELL, B. 1996. Base modification and strand breakage in isolated calf thymus DNA and in DNA from human skin epidermal keratinocytes exposed to peroxynitrite or 3-morpholinopyridone. *Chem Res Toxicol*, 9, 1152-8.
- STARY, H. C., CHANDLER, A. B., DINSMORE, R. E., FUSTER, V., GLAGOV, S., INSULL, W., JR., ROSENFELD, M. E., SCHWARTZ, C. J., WAGNER, W. D. & WISSLER, R. W. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on

- Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 1512-31.
- STARY, H. C., CHANDLER, A. B., GLAGOV, S., GUYTON, J. R., INSULL, W., JR., ROSENFELD, M. E., SCHAFFER, S. A., SCHWARTZ, C. J., WAGNER, W. D. & WISSLER, R. W. 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89, 2462-78.
- STOCKER, R. & KEANEY, J. F., JR. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 84, 1381-478.
- SZABO, C. & DAWSON, V. L. 1998. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci*, 19, 287-98.
- SZABO, C., ISCHIROPOULOS, H. & RADI, R. 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 662-80.
- SZABO, C. & OHSHIMA, H. 1997. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide*, 1, 373-85.
- SZABO, C., ZINGARELLI, B., O'CONNOR, M. & SALZMAN, A. L. 1996a. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1753-8.
- SZABO, C., ZINGARELLI, B. & SALZMAN, A. L. 1996b. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res*, 78, 1051-63.
- TCHOU, J., KASAI, H., SHIBUTANI, S., CHUNG, M. H., LAVAL, J., GROLLMAN, A. P. & NISHIMURA, S. 1991. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4690-4.
- THOMAS, H. V., MUELLER, P. K. & LYMAN, R. L. 1968. Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, 159, 532-4.
- THOMSON, L. 2015. 3-nitrotyrosine modified proteins in atherosclerosis. *Dis Markers*, 2015, 708282.
- THOMSON, L., TENOPOULOU, M., LIGHTFOOT, R., TSIKA, E., PARASTATIDIS, I., MARTINEZ, M., GRECO, T. M., DOULIAS, P. T., WU, Y., TANG, W. H., HAZEN, S. L. & ISCHIROPOULOS, H. 2012. Immunoglobulins against tyrosine-nitrated epitopes in coronary artery disease. *Circulation*, 126, 2392-401.
- TRION, A. & VAN DER LAARSE, A. 2004. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *Am Heart J*, 147, 808-14.
- UPPU, R. M., CUETO, R., SQUADRITO, G. L., SALGO, M. G. & PRYOR, W. A. 1996. Competitive reactions of peroxynitrite with 2'-deoxyguanosine and 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG): relevance to the formation of 8-oxodG in DNA exposed to peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*, 21, 407-11.
- VAN DER VLIET, A., EISERICH, J. P., O'NEILL, C. A., HALLIWELL, B. & CROSS, C. E. 1995. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch Biochem Biophys*, 319, 341-9.
- WANG, G., JACQUET, L., KARAMARITI, E. & XU, Q. 2015. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol*, 593, 3013-30.
- WANG, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15, 2922-33.
- WATSON, B. D., DIETRICH, W. D., BUSTO, R., WACHTEL, M. S. & GINSBERG, M. D. 1985. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 17, 497-504.
- WESTRICK, R. J., WINN, M. E. & EITZMAN, D. T. 2007. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2079-93.

- WHO. 2017. *Cardiovascular Diseases (Fact Sheet)* [Online]. World Health Organisation. Available: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [Accessed 01.07. 2020].
- WILSON, C. A. & HATCHELL, D. L. 1991. Photodynamic retinal vascular thrombosis. Rate and duration of vascular occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32, 2357-65.
- WINK, D. A., COOK, J. A., KIM, S. Y., VODOVOTZ, Y., PACELLI, R., KRISHNA, M. C., RUSSO, A., MITCHELL, J. B., JOURD'HEUIL, D., MILES, A. M. & GRISHAM, M. B. 1997. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem*, 272, 11147-51.
- WU, L. L., CHIOU, C. C., CHANG, P. Y. & WU, J. T. 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*, 339, 1-9.
- YAMAKURA, F., TAKA, H., FUJIMURA, T. & MURAYAMA, K. 1998. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem*, 273, 14085-9.
- YERMILOV, V., YOSHIE, Y., RUBIO, J. & OHSHIMA, H. 1996. Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by peroxynitrite. *FEBS Lett*, 399, 67-70.
- ZEH, H. J., 3RD & LOTZE, M. T. 2005. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother*, 28, 1-9.
- ZHUANG, S. & SIMON, G. 2000. Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C341-51.
- ZINGARELLI, B., O'CONNOR, M., WONG, H., SALZMAN, A. L. & SZABO, C. 1996. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 156, 350-8.
- ZONG, W. X. & THOMPSON, C. B. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, 20, 1-15.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lichtenberg danken. Weiterhin gilt mein Dank meinen Betreuern Dr. med. Jan-Philipp Minol und Prof. Dr. med. Akhyari, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank richte ich an meine Familie, die mich immer wieder motiviert und angespornt hat. Zuletzt gilt mein größter Dank Antonia Spraul, die niemals müde wurde, mir aufzuzeigen, wie nah ich am Ziel war und wie lohnend es ist, unermüdlich weiterzuarbeiten.