

Aus dem Zentrum für Kardiologie, Kardiologie I,
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Der Endothelinrezeptorantagonist Macitentan
verbessert die Isosorbid-5-Mononitrat (ISMN) und
Isosorbiddinitrat (ISDN)-induzierte endotheliale
Dysfunktion, oxidativen Stress und vaskuläre
Inflammation**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Siyer Roohani
aus Gelsenkirchen
Mainz, 2020

Tag der Promotion:

27.11.2020

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	1
II. Abbildungsverzeichnis:	5
III. Tabellenverzeichnis	8
1. Einleitung / Ziel der Dissertation	9
2. Literaturdiskussion	11
2.1 Geschichtlicher Hintergrund organischer Nitrate.....	11
2.2 Wirkung und Anwendung organischer Nitrate	13
2.3 Bioaktivierung organischer Nitrate	16
2.4 Gefäßdysfunktion durch organische Nitrate.....	19
2.4.1 Nitrattoleranz	19
2.4.2 Endotheliale Dysfunktion	27
2.4.3 Oxidativer Stress.....	30
2.5 Das Endothelinsystem.....	32
2.5.1 Aufbau und Wirkungsweise	32
2.5.2 Der Endothelinrezeptorantagonist Macitentan	33
2.6 Zusammenhang zwischen dem Endothelinsystem und den Nebenwirkungen organischer Nitrate.....	34
3. Material und Methoden.....	36
3.1. Material:	36
3.1.1. Tiere:.....	36
3.1.2. Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe.....	36
3.1.3. Verbrauchsmaterialien	40
3.1.4. Häufig verwendete Puffer und Lösungen	41
3.1.5. Kits und Assays:	45
3.1.6. Antikörper.....	45
3.1.6.1. Primäre Antikörper	45
3.1.6.2. Sekundäre Antikörper	46
3.1.7. Geräte und Materialien	46
3.1.8. Software	49
3.2. Methoden	50
3.2.1. Versuchstiere.....	50
3.2.2. Aufbau und Funktionsweise der osmotischen Pumpen:	51
3.2.3. Menschliche Proben (Nebenstudie an isolierten Leukozyten):.....	53
3.2.3.1. Isolierung und Aktivierung von PMNs:	53
3.2.3.2. Durchführung der Granulozyten-abhängigen ROS und Superoxid	54
3.2.3.3. Die Detektion von ROS mithilfe der Chemilumineszenz	55
3.2.3.4. Die Detektion von ROS mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Dihydroethidium (DHE) in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	56
3.2.4. Zellkultur (Nebenstudie):.....	59
3.2.5. Organentnahme und Präparation der entnommenen Gewebe	60
3.2.6. Organbad und isometrische Spannungsmessungen.....	60

3.2.7. Elektronenspinresonanz (ESR) zur Messung des nitrosativen Stresses in Vollblutproben von Ratten	63
3.2.8. Messung der membranösen NADPH-Oxidase-Aktivität in Herzgewebe	65
3.2.9. Quantitative Reverse Transkriptase Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	67
3.2.10. Fluoreszenzmikroskopie mit Dihydroethidium (DHE)	73
3.2.11. Western-Blot und Dot-Blot	74
3.2.11.1. Probenvorbereitung	74
3.2.11.2. Proteinbestimmung nach Bradford	74
3.2.11.3. SDS-PAGE und Western-Blot	75
3.2.11.4. Dot-Blot	77
3.2.12. Immunhistochemische Darstellung von Endothelin-1.....	78
3.2.13. Statistische Auswertung	80
4. Ergebnisse	81
4.1. NADPH-Oxidase-Aktivität und inflammatorischer Phänotyp in isolierten Leukozyten	81
4.1.1. NADPH-Oxidase-Aktivität in kultivierten Makrophagen (RAW cells)	81
4.1.2. NOX-Aktivität in isolierten humanen PMNs	82
4.1.3. Interleukin-6 (IL-6) Expression in kultivierten Makrophagen (RAW264.7).....	84
4.2. In vivo Therapie mit ISDN in der Ratte	85
4.2.1. Endotheliale und vaskuläre Funktion und Dysfunktion: Isometrische Spannungsmessungen in Aortenringen von Ratten	85
4.2.2. Nachweis der erfolgreichen Verabreichung von ISDN über das Trinkwasser in der Ratte.....	87
4.3. In vivo Therapie mit ISMN oder ISDN in der Maus	87
4.3.1. Nachweis der erfolgreichen Verabreichung von ISMN oder ISDN über osmotische Pumpen in der Maus	87
4.3.2. Endotheliale und vaskuläre Funktion und Dysfunktion nach ISDN in vivo Therapie: Isometrische Spannungsmessungen in Aortenringen von Mäusen	88
4.3.3. Endotheliale und vaskuläre Funktion und Dysfunktion nach ISMN in vivo Therapie: Isometrische Spannungsmessungen in Aortenringen von Mäusen	90
4.4. Vaskulärer oxidativer Stress, Inflammation und Endothelin Signaltransduktion nach ISMN oder ISDN-Therapie in der Maus	91
4.4.1. Vaskulärer oxidativer Stress und Inflammation nach ISDN-Behandlung in der Maus.....	92
4.4.1.1. DHE Fluoreszenzmikroskopie und NOX-Expression (ISDN).....	92
4.4.1.2. Marker der Inflammation - MCP-1 und IL-6 mRNA-Expression (ISDN)	93
4.4.1.3. Endothelin Signaltransduktion nach ISDN Behandlung in der Maus	94
4.4.2. Vaskulärer oxidativer Stress und Inflammation nach ISMN-Behandlung in der Maus.....	95
4.4.2.1. DHE-Fluoreszenzmikroskopie, 3-NT-Konzentration und NOX-Aktivität	95
4.4.2.2. NOX- 2 Protein- und mRNA-Expression (ISMN)	97
4.4.2.2. Marker der Inflammation - F4/80, MCP-1 und CD11b Expression (ISMN)	98
4.4.2.3. Endothelin Signaltransduktion nach ISMN-Behandlung in der Maus.....	99
5. Diskussion	101
5.1. ISMN und Macitentan	103
5.1.1. Endothelfunktion (ISMN).....	103
5.1.2. Endothelin Signaltransduktion (ISMN)	105
5.1.3. Oxidativer Stress und Inflammation im Gefäßsystem und im Vollblut (ISMN)	106
5.2. ISDN und Macitentan	112
5.2.1. Endothelfunktion.....	112
5.2.1.1. Orale Gabe (Ratte, Pilotstudie).....	113

5.2.1.2. Subkutane Gabe (Maus)	114
5.2.2. Endothelin Signaltransduktion (ISDN)	115
5.2.3. Oxidativer Stress und Inflammation im Gefäßsystem und im Vollblut (ISDN)	116
6. Zusammenfassung.....	119
7. Quellenverzeichnis.....	122
8. Danksagung	131

I. Abkürzungsverzeichnis

1-2 GDN	1,2 Glyceryldinitrat
2-HE	2-Hydroxyethidium
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AUC	area under the curve, Fläche unter der Kurve
ANOVA	Analysis of Variance
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT-1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
BH4	Tetrahydrobiopterin
BNP	Brain natriuretic Peptide, natriuretisches Peptid Typ B
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium Kation
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL2	CC chemokine ligand 2
CCR2B	CC Rezeptor 2 B
CD11b	cluster of differentiation 11b
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CR-3	complement receptor type 3, Komplementrezeptor Typ 3
CT	threshold cycle
DAG	Diacylglycerol
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium, Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure

DTT	Dithiothreitol
ECE-1	endothelin-converting-enzyme 1, Endothelin-Konversions-Enzym 1,
ECL	enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenz
EDRF	Endothelium-derived relaxing Factor (alias Stickstoffmonoxid)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	endothelial progenitor cells, endotheliale Vorläuferzellen
ESR	Elektronenspinresonanz
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ETA Rezeptor	Endothelinrezeptor A
ETB Rezeptor	Endothelinrezeptor B
FDA	United States Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälberserum
FMD	Flow mediated dilation
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GTN	Glyceroltrinitrat
GTP	Guanosintriphosphat
HbNO	Nitrosyleisen-Hämoglobin
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICAM	Intercellular adhesion molecule, interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL-6	Interleukin-6
IP3	Inositol-1-4-5-trisphosphat
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbid-5-mononitrat

IU	international unit, Internationale Einheit
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-RNA
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1, CCL-1
MLC	myosin light chain, Myosin-leichte-Kette
MLCK	myosin light chain kinase, Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	myosin light chain phosphatase, Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase, Myosinphosphatase
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MW	Molecular Weight, Molekülmasse, Molekulargewicht
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n-DNA	nukleäre DNA
•NO	Stickstoffmonoxid
NOS	•NO-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphate-buffered saline with Tween-20, Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween-20
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDBu	Phorbol 12,13-dibutyrat
PDE	Phosphodiesterase-5
PETN	Pentaerythrityltetranitrat
PGF ₂ α	Prostaglandin F ₂ α
PGH ₂	Prostaglandin H ₂

PGI2	Prostaglandin I2, Prostazyklin
PGI-S	Prostazyklinsynthase
PIP2	Phosphatidylinositol- 4,5- bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PMN	Polymorphonuclear leucocytes, neutrophile Granulozyten
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction, Quantitative Reverse-Transkriptase Echtzeit-Polymerase- Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBC	red blood cells, Erythrozyten
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reactive nitrogen species, reaktive Stickstoffspezies
RONS	reactive oxygen and nitrogen species, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis, Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
sGC	soluble guanylyl cyclase, lösliche Guanylatzyklase
TBP	TATA-Box binding protein, TATA-Box-Binde-Protein
TBS	Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween-20, Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
TP	Thromboxan-Rezeptor
V1- Rezeptor	Vasopressin-Rezeptor

II. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 2-1	Ascanio Sobrero (1812-1888). Der Entdecker des Nitroglycerins. Abbildung aus (8).
Abbildung 2-2	Alfred Nobel (1833-1896), Chemiker, Erfinder und Unternehmer. Abbildung aus (9).
Abbildung 2-3	Nitrateffekte bei Angina Pectoris (engl. Chest Pain). Abbildung aus (21).
Abbildung 2-4	Enzymaktivität der mitochondrialen ALDH-2. Abbildung aus (26).
Abbildung 2-5	Tonusmodulation in der glatten Muskelzelle. Abbildung aus (35).
Abbildung 2-6	Molekulare Mechanismen der Nitrattoleranz. Abbildung aus (44).
Abbildung 2-7	Redoxregulation der Gefäßfunktion Abbildung aus (67).
Abbildung 3-1	Osmotische Pumpe (ALZET). Abbildung aus (94).
Abbildung 3-2	Isolierung der PMNs. Abbildung aus (97).
Abbildung 3-3	Entstehung des Chemilumineszenzsignals dargestellt am Wasserstoffatom. Abbildung aus (98).
Abbildung 3-4	Aufbau des Organbads. Abbildung aus (102).
Abbildung 3-5	Magnetischer und elektrischer Dipol. Abbildung aus (105).
Abbildung 3-6	Reaktion des Luzigenins. Abbildung aus (107).
Abbildung 3-7	Das PCR-Prinzip. Abbildung aus (111).
Abbildung 3-8	Prinzip der TaqMan Polymerase. Abbildung aus (114).
Abbildung 3-9	Die Ct-Methode in der Real-Time PCR. Abbildung aus (111).
Abbildung 3-10	Die Oxidation von DHE. Abbildung aus (116).
Abbildung 3-11	Aufbau des Dot-Blot Minifold 96 Wells Systems. Abbildungen aus (119) und (27).

Abbildung 3-12	Aufbau des ABC Systems zum immunhistochemischen Nachweis von Antigenen. Abbildung aus (121).
Abbildung 4-1	Oxidativer burst in Zellkulturen kultivierter RAW 264.7 cell Makrophagen.
Abbildung 4-2	Dot-Blot Analyse zum Nachweis von 3-Nitrotyrosin positiven Proteinen in Zellkulturen isolierter RAW 264.7 cell Makrophagen.
Abbildung 4-3	Superoxidsynthese und der Einfluss von Macitentan auf isolierte humane PMNs.
Abbildung 4-4	Dot-Blot Analyse zur Interleukin-6 Expression in Zellkulturen isolierter RAW 264.7 cell Makrophagen.
Abbildung 4-5	Isometrische Spannungsmessungen zum Einfluss von ISDN auf die Endothelfunktion (Ratte).
Abbildung 4-6	Messung des Nitrosyleisen-Hämoglobins im Vollblut von Ratten.
Abbildung 4-7	Messung des Nitrosyleisen-Hämoglobins im Vollblut von Mäusen.
Abbildung 4-8	Isometrische Spannungsmessungen zum Einfluss von ISDN auf die Endothelfunktion (Maus).
Abbildung 4-9	Isometrische Spannungsmessungen zum Einfluss von ISMN auf die Endothelfunktion (Maus).
Abbildung 4-10	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (A) zum Einfluss von ISDN und Macitentan auf den oxidativen Stress im Gefäßsystem und qRT-PCR (B) zur mRNA Expression von NOX-2 in Aortengewebe (ISDN).
Abbildung 4-11	qRT-PCR zur mRNA Expression von MCP-1 und IL-6 in Aortengewebe (ISDN).
Abbildung 4-12:	Immunhistochemie (A) zur Visualisierung der Endothelin-1 Expression in Paraffinschnitten des Aortengewebes (ISDN) und qRT-PCR (B) zur mRNA Expression von ECE-1 in Aortengewebe (ISDN).

- Abbildung 4-13 DHE Fluoreszenzmikroskopie (A) zur Untersuchung des oxidativen Stresses, Dot-Blot Analyse (B) zum Gehalt 3-Nitrotyrosin positiver Proteine und NADPH-Oxidase Aktivität (C) im Herzgewebe.
- Abbildung 4-14 Western-Blot Analyse (A) zur Protein- und qRT-PCR (B) zur mRNA Expression von NOX-2 in Aortengewebe (ISMN).
- Abbildung 4-15 Dot-Blot Analyse (A) zur Protein-Expression von F4/80 und qRT-PCR zur mRNA Expression von MCP-1 (B) und CD11b (C) in der Aorta.
- Abbildung 4-16 Western-Blot Analyse (A), Immunhistochemie (B) und qRT-PCR (C) zur Expression von ETB, Endothelin-1 und ECE-1 in Aortengewebe (ISMN).
- Abbildung 5-1 Pathophysiologische Mechanismen der ISMN induzierten endothelialen Dysfunktion Abbildung modifiziert von (34).
- Abbildung 5-2 Endotheliale Dysfunktion und organische Nitrate. Abbildung aus (21).
- Abbildung 6-1 Die ISMN/ISDN induzierte endotheliale Dysfunktion und die protektiven Mechanismen von Macitentan. Abbildung in Anlehnung an (176).

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1	Übersicht der häufig angewendeten organischen Nitrate
Tabelle 2-2	Hypothesen über die Entstehung der Nitrattoleranz.
Tabelle 3-1	Primäre Antikörper.
Tabelle 3-2	Sekundäre Antikörper.
Tabelle 3-3	Studienprotokoll.
Tabelle 3-4	Primerliste.

1. Einleitung / Ziel der Dissertation

Organische Nitrate sind bis heute ein integraler Bestandteil der leitliniengerechten Therapie von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK), die sich mit Brustschmerz im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms oder stabiler Angina pectoris vorstellen (1). Die KHK ist nach wie vor die häufigste Todesursache in den Industrienationen (2). Organische Nitrate führen über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) zur Vasodilatation von Koronargefäßen und venösen Kapazitätsgefäßen. Dadurch senken sie den venösen Rückstrom zum Herzen bzw. die enddiastolische Blutmenge im Ventrikel (die sog. „Vorlast“) und verbessern gleichzeitig die Sauer- und Nährstoffzufuhr zum Herzen durch Erweiterung der Koronargefäße. Außerdem verringern sie durch Dilatation den Widerstand der nachgeschalteten Gefäße wie Aorta und Truncus pulmonalis (die sog. „Nachlast“) (3).

Bei längerer Therapie mit organischen Nitraten kommt es jedoch zu einem bemerkenswerten klinischen Phänomen: der Toleranzentwicklung. Die gleiche Dosis zeigt weniger klinische Effekte, sodass nach Leitlinie intermittierend ca. 10-14h Pausen („Nitratpausen“) empfohlen werden (1). Dieses als Nitrattoleranz bezeichnete Phänomen ist in den letzten Jahrzehnten extensiv erforscht worden. Es konnte gezeigt werden, dass die längerfristige Therapie mit organischen Nitraten zu einer Verschlimmerung der Atherosklerose, einer Gefäßinflammation und einem dysfunktionalen Endothel führt, was letztlich das klinische Bild des Patienten aggraviert (4). Für diese Veränderungen werden reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) als Ursachen verantwortlich gemacht.

Mechanistisch scheint das Gewebshormon Endothelin-1 hier eine wichtige Rolle zu spielen. Das Peptidhormon Endothelin-1 wird in Endothelzellen synthetisiert und nach Prozessierung von mehreren Vorstufen als aktives Hormon freigesetzt. Es ist der potenteste Vasokonstriktor im Gefäßsystem (5). Endothelinrezeptorantagonisten werden bislang therapeutisch bei der pulmonalen Hypertonie eingesetzt (6). Unter der Therapie mit dem organischen Nitrat Isosorbid-5-mononitrat (ISMN) wurde eine erhöhte Expression und Aktivität von Endothelin-1 festgestellt (7).

Ziel dieser Arbeit ist es nun, den Zusammenhang zwischen organischen Nitraten und Endothelin-1 Antagonismus weiter zu erforschen. Am Tiermodell der Maus werden bei subkutaner Gabe der organischen Nitrate ISMN und Isosorbiddinitrat (ISDN) die Effekte auf vaskulären oxidativen Stress, Inflammation und Gefäßfunktion untersucht. Zur weiteren mechanistischen Untersuchung soll die Beeinflussung dieser Gefäßschäden durch den nicht spezifischen Endothelinrezeptorantagonisten Macitentan (oral verabreicht) untersucht werden. Es soll besonderes Augenmerk auf die Beeinflussung folgender Aspekte gelegt werden:

- Endothelfunktion und vaskuläre Funktion
- Oxidativer Stress im Herzgewebe und im Vollblut
- Vaskuläre Inflammation und Aktivität der NADPH-Oxidase (NOX)
- Expression und Aktivität des Endothelin Signalwegs

In einer Nebenstudie bei Ratten soll erstmalig die Bioaktivierung von ISDN zu bioverfügbarem •NO gemessen werden (als HbNO im Vollblut). Dafür wird ISDN in aufsteigenden Dosen oral verabreicht und zusätzlich die Gefäßfunktion gemessen. Außerdem wird in Zellkulturen isolierter muriner Makrophagen der Einfluss der organischen Nitrate Nitroglyzerin (Glyceroltrinitrat, GTN), ISMN und ISDN auf die ROS-Produktion, den oxidativen Stress und die Expression des inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 untersucht. Auch hier wird die Inhibition der ROS-Synthese durch Macitentan untersucht.

2. Literaturdiskussion

2.1 Geschichtlicher Hintergrund organischer Nitrate



Abbildung 2-1 Ascanio Sobrero (1812-1888)
Entdecker des Nitroglycerins. Abbildung aus (8).

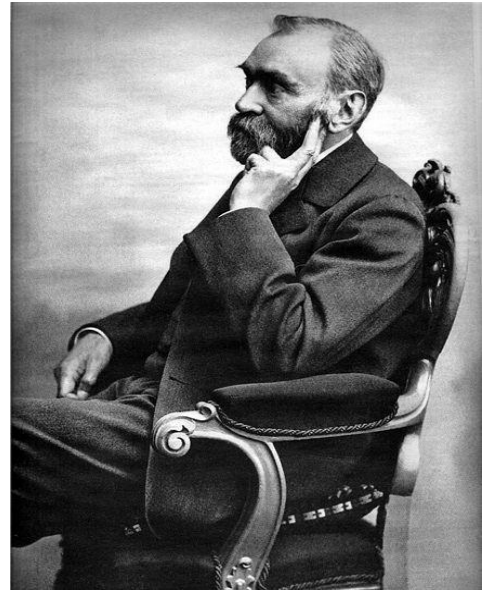


Abbildung 2-2 Alfred Nobel (1833-1896)
Chemiker, Erfinder und Unternehmer. Durch die Mischung mit Diatomeen-Erde gelang ihm 1866 die sichere Lagerung des Nitroglycerins in Form von Dynamit, was ihm später zu weltweitem Ruhm und Vermögen verhalf. Abbildung aus (9).

„Es klingt wie ein Scherz, den das Schicksal mit mir macht, dass man mir Nitroglycerin zum Einnehmen verordnet. Sie nennen es zwar Trinitrin, aber doch wohl nur, um die Apotheker und die Patienten nicht zu erschrecken.“ (10). Mit diesen Worten kommentierte der schwedische Chemiker und erfolgreiche Unternehmer Alfred Nobel (Abbildung 2-2) im Jahre 1896 die Verordnung von Nitroglycerin durch seine Ärzte zur Behandlung seiner akuten Angina Pectoris-Anfälle (11). Erstmals wurde das Nitroglycerin im Jahre 1847 von dem italienischen Chemiker Ascanio Sobrero (1812-1888, Abbildung 2-1) entdeckt, indem er Glycerol mit Salpetersäure versetzte. Das Produkt, ein Salpetersäureester, das nach der International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) chemisch korrekt als Glyceroltrinitrat bezeichnet wird, wurde durch Alfred Nobel (1833 -1896) weiterverarbeitet und nutzbar gemacht. Durch die Mischung mit porösen Silikaten aus Diatomeen-Erde (Kieselgur) gelang es Nobel 1866 das äußerst explosive Nitroglycerin zu Dynamit weiterzuentwickeln und mit dessen Vermarktung und Patentrecht weltweit ein Vermögen zu verdienen.

Schon zu Zeiten der Entdeckung des Nitroglyzerins hat es früh seinen Eingang in die medizinische Anwendung gefunden. So berichtete Sobrero von heftigen Kopfschmerzen bei Einnahme des Nitroglyzerins (11).

Angina Pectoris (*engl. Chest pain*) beschreibt den Symptomkomplex aus hinter der Brust liegendem Engegefühl und Druck bis hin zu Schmerzen, die in den linken Arm, den Kiefer und in den Rücken und Bauchraum ausstrahlen können. Häufig geht dies mit massiver Atemnot und Todesangst einher. Sie ist das Symptom einer Koronarinsuffizienz, also einer für den Sauerstoffbedarf des Herzens unzureichenden Versorgung mit Blut, und ist in den meisten Fällen als Symptom einer atherosklerotischen Veränderungen der Koronararterien zu verstehen (12). Die Angina Pectoris kann sowohl ein Leitsymptom für eine länger bestehende koronare Herzkrankheit (KHK) als auch für einen akuten Myokardinfarkt sein. Klinisch wird die instabile von der stabilen Angina Pectoris unterschieden.

Eine stabile Angina Pectoris ist das physische Korrelat einer chronischen Koronarinsuffizienz, einer koronaren Herzkrankheit. Nach Klassifikation der Canadian Cardiovascular Society (CCS) beschreibt eine stabile Angina Pectoris einen Brustschmerz, der nur unter stärkeren Anstrengungen wie Treppensteigen, Bergaufgehen oder bei psychischen Belastungen auftritt. In Ruhe bestehen keine Schmerzen (13). Dem entgegen steht die instabile Angina Pectoris. Sie definiert sich als eine neu aufgetretene Beschwerdesymptomatik in Ruhe bzw. als Beschwerdedauer in Ruhe > 20 Minuten oder als kürzlich neu aufgetretene moderate bis starke Angina Pectoris bei leichter Belastung oder als sogenannte Crescendo Angina. Eine Crescendo Angina ist eine vorher bestehende Angina, die schrittweise in kurzer Zeit an Intensität zugenommen hat und bei immer geringerer Belastung auftritt (14).

Die instabile Angina Pectoris deutet auf eine akute Myokardischämie hin und bedarf unmittelbarer diagnostischer und ggf. therapeutischer Maßnahmen. Zusammen mit dem Herzinfarkt mit Hebungen in der ST- Strecke im Elektrokardiogramm (EKG), dem sog. ST-Hebungsinfarkt (STEMI) und dem Herzinfarkt ohne Hebungen in der ST- Strecke, dem non-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI), werden sie als akutes Koronarsyndrom (ACS) zusammengefasst. Das ACS ist ein kardiologischer Notfall und wird idealerweise in speziellen Diagnostik- und Therapieeinheiten, den sogenannten Chest Pain Units (CPU), nach festgelegten, standardisierten Algorithmen behandelt (15).

Über mehr als ein Jahrhundert nach der Entdeckung von Nitroglyzerin war man sich des genauen Mechanismus der Symptomlinderung bei Angina Pectoris nicht bewusst. Der amerikanische Pharmakologe Robert Francis Furchgott (1916 - 2009) hatte in den 1980er Jahren durch Versuche mit Mäusearten den vom Endothel ausgehenden Botenstoff für die Gefäßrelaxation, „Endothelium-derived relaxing Factor“ (EDRF) entdeckt. Dieser wurde durch die Experimente der Pharmakologen Ferid Murad (*1936) und Louis Ignarro (*1941) in weiteren Versuchen als Stickstoffmonoxid identifiziert. Für ihre „Arbeiten über die Rolle von Stickstoffmonoxid als Signalmolekül im Herz-Kreislauf-System“ erhielten die drei Forscher im Jahre 1998 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (16-18). Die seit über 100 Jahren verwendeten „Nitrate“ wurden als Quelle der Stickstoffmonoxidfreisetzung („•NO-Donatoren“) entdeckt, weswegen bis heute diese •NO- freisetzenden Arzneimittel als Nitrovasodilatoren bezeichnet werden (11).

2.2 Wirkung und Anwendung organischer Nitrate

Aktuell existieren in Deutschland mindestens vier verschiedene organische Nitrate in der Therapie der Angina Pectoris und des Myokardinfarkts. Diese vier organischen Nitrate sind Nitroglyzerin (GTN), Pentaerythryltetranitrat (PETN), Isosorbid-5-mononitrat (ISMN) und Isosorbiddinitrat (ISDN). Die chemischen Strukturen der organischen Nitrate zeigen untereinander erhebliche Unterschiede. ISMN und ISDN haben einen bzw. zwei ONO_2 – Gruppen, die an den Isosorbid-Zuckerring gebunden sind. GTN hat drei ONO_2 -Gruppen, die an das Glyzeringerüst gebunden sind. PETN hat dagegen vier methylierte ONO_2 -Gruppen, gebunden an ein zentrales Kohlenstoffatom, das dem Molekül eine sphärische Struktur verleiht. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Strukturen variieren auch ihre Applikationsformen, Latenzzeiten bis zum Wirkeintritt und Wirkdauern (19) (siehe Tabelle 2-1).

Organische Nitrate werden auf verschiedenen Wegen metabolisiert. Der erste wichtige Schritt ist die sogenannte Bioaktivierung. Diese „Aktivierung“ beschreibt die enzymatische Umsetzung des Wirkstoffs in pharmakologisch wirksame Metaboliten. Die Bioaktivierung der organischen Nitrate erfolgt auf verschiedenen Wegen (siehe Abschnitt 2.3, „Bioaktivierung der organischen Nitrate“).

Wirkstoff	Applikationsform	Dosis (in mg)	Wirkungseintritt (in Minuten)	Wirkdauer (in Stunden)	Markenname
Nitroglyzerin	Spray	0,5	1	0,5	Nitrolingual®
	Weichkapsel	0,8	2-5	1-2	Nitronal®
	Pflaster	5-10	5-10	4-8	Minitran®
Pentaerythrityltetranitrat	Tablette	50-80	10-20	8-12	Pentalong®
Isosorbiddinitrat	Tablette	5-40	1-2	1	Isoket®
	Retardkapsel	20-120	10-30	8-12	Isoket retard®
					ISDN ratiopharm®
	Spray	5-20	10-20	4-6	Isoket Spray®
Isosorbid-5-mononitrat	Tablette	20-60	10-30	1-2	IS 5 mono- ratiopharm®

Tabelle 2-1 Übersicht der häufig angewendeten organischen Nitrate

Organische Nitrate sind bis heute ein fester Bestandteil der Akutbehandlung der Angina Pectoris im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms, sowie auch in der Behandlung des chronischen Koronarsyndroms und in den Leitlinien der European Society of Cardiology und der American Heart Association verankert (1, 15, 20). Je nach Darreichungsform und Latenzzeit bis zum Wirkeintritt werden die organischen Nitrate in verschiedenen klinischen Settings angewendet. Das als Spray sublingual verabreichte Nitroglyzerin (0,4mg) ist das am schnellsten verfügbare organische Nitrat und daher Mittel der ersten Wahl zur akuten Symptomlinderung einer Angina Pectoris, z.B. im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms. Es findet außerdem Anwendung in der Akuttherapie von Spasmen der Koronararterien („Prinzmetal-Angina“). Die Retardformen der organischen Nitrate, sog. langwirksame Nitrate („long-acting organic nitrates“) wie beispielsweise ISDN und ISMN Retardtabletten, aber auch Nitroglyzerinpflaster, werden zur Angina Pectoris Prophylaxe als Zweitlinientherapie verwendet, wenn Betablocker oder Kalziumkanalantagonisten kontraindiziert sind oder nicht ausreichend symptomlindernd wirken. Bei häufiger prophylaktischer Therapie mit langwirksamen organischen Nitraten müssen aufgrund der entstehenden Nitratoleranz (siehe Abschnitt 2.4.1: „Nitratoleranz“) Therapiepausen von ca. 10-14 Stunden eingelegt werden („Nitratpausen“). Zu den häufigsten Nebenwirkungen der

Therapie gehören Blutdruckabfall, Kopfschmerzen und eine vor allem kopfbetonte Rötung (sog. „Flush“) (1). Kontraindikationen zur Therapie mit lang- oder kurzwirksamen organischen Nitraten sind Begleittherapien mit Phosphodiesterase-5-Hemmern (Sildenafil, Tadalafil etc.), da diese über Hemmung des Abbaus von cGMP ebenfalls die Wirksamkeit der •NO/cGMP-Achse potenzieren und zu lebensbedrohlichen Blutdruckabfällen führen können (siehe Abschnitt 2.4.1: „Nitratoleranz“). Weitere Kontraindikationen sind eine hochgradige Aortenklappenstenose und eine hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie, da die starke Vorlastsenkung hier potenziell zum mangelnden effektiven Herzzeitvolumen führen kann. Dadurch können lebensbedrohliche Minderperfusionen anderer Organe, wie z.B. dem Gehirn entstehen.

Durch die Freisetzung von •NO bewirken organische Nitrate eine Vasodilatation von Koronargefäßen, venösen Kapazitätsgefäßen und den großen arteriellen Hauptschlagadern (Aorta und Truncus pulmonalis). Sie mindern damit die Vorlast des Herzens (venösen Rückstrom), die Nachlast des Herzens (Widerstandsdruck in Aorta und Truncus pulmonalis), verringern die Aggregation von Thrombozyten und erhöhen gleichzeitig die Blutversorgung des Herzmuskels (Siehe Abbildung 2-3). In der Akuttherapie hat das folgende Effekte auf das Herzkreislaufsystem zur Folge: Der venöse Rückstrom zum Herzen wird verringert, was letztlich die Wandspannung und Herzarbeit verringert. Dadurch sinkt der Sauerstoffbedarf. Außerdem wird durch die Dilatation der Koronargefäße das Sauerstoffangebot erhöht und die Thrombozytenaggregation im arteriellen System (siehe Abbildung 2-3) verringert (3). In der Akuttherapie wird dadurch einerseits der Sauerstoffbedarf durch verminderten Rückstrom und damit verminderte Herzwandspannung und Herzarbeit verringert und andererseits die Sauerstoffzufuhr erhöht und Gerinnselbildung (Thrombogenese) verhindert, was zur raschen Verbesserung der Ischämie führt und die damit einhergehende Angina Pectoris-Symptomatik vermindert (3).

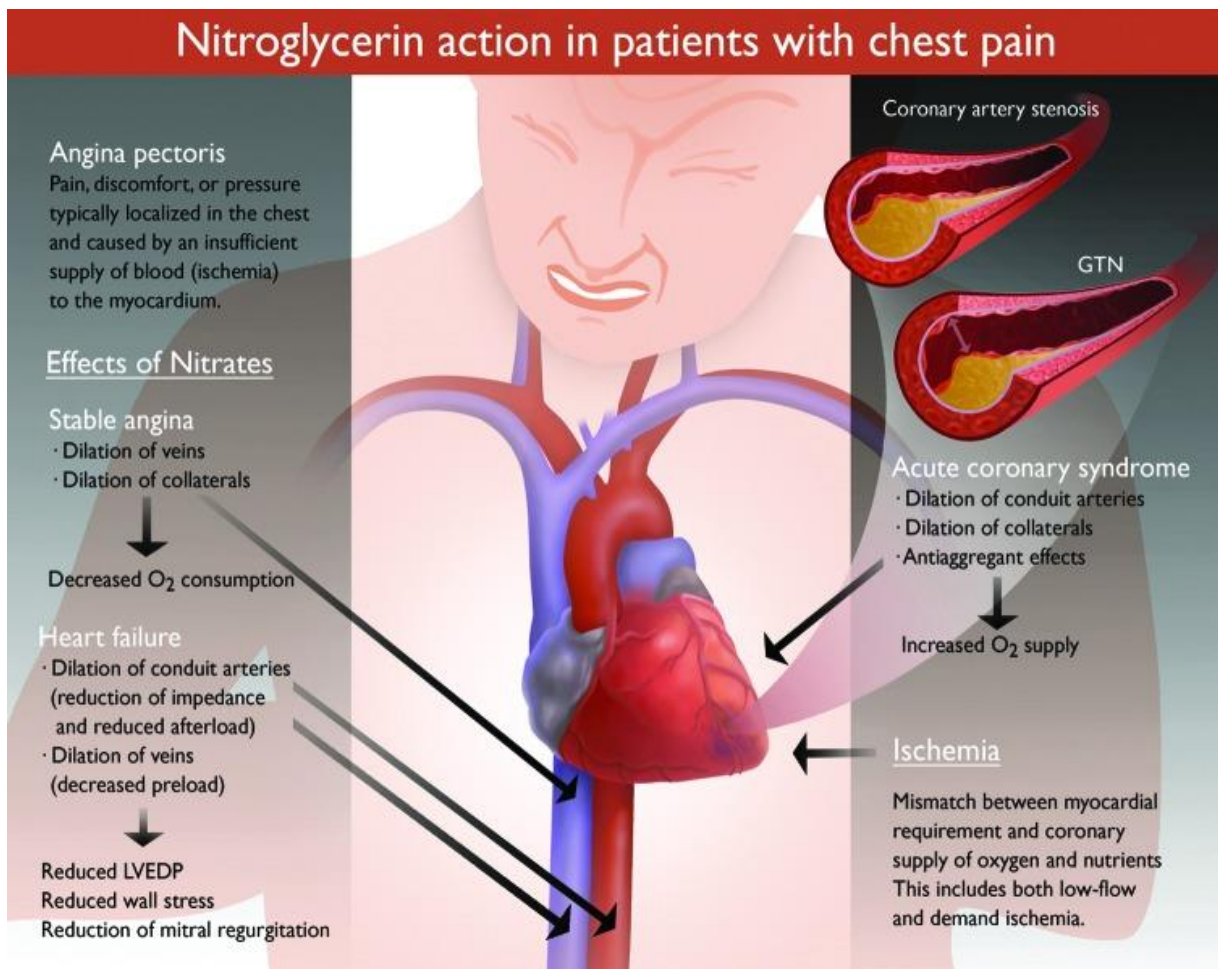


Abbildung 2-3 Nitrateffekte bei Angina Pectoris (engl. Chest Pain)

Das verringerte Sauerstoffangebot im Verhältnis zum Sauerstoffbedarf (Ischämie) des Herzmuskels wird mithilfe von organischen Nitraten durch mehrere Mechanismen kurzzeitig verbessert: Dilatation der vorgeschalteten venösen Kapazitätsgefäße (Vorlast des Herzens sinkt → Wandspannung sinkt → Sauerstoffverbrauch sinkt), Koronararteriendilatation (Sauerstoffversorgung des Herzmuskels wird erhöht), Dilatation nachgeschalteter elastischer Arterien wie Aorta und Truncus pulmonalis (Nachlastsenkung → weniger Herzmuskelkontraktion benötigt → weniger Sauerstoffverbrauch). Abbildung aus (21).

2.3 Bioaktivierung organischer Nitrate

Bevor es zur Freisetzung des •NO im Endothel kommen kann, müssen die organischen Nitrate im Sinne einer Prodrugmetabolisierung zunächst aktiviert werden. Dabei werden die Nitrate in zwei Gruppen, sog. *high potency* (GTN und PETN) und *low potency* (ISMN und ISDN), eingeteilt.

In klinisch relevanter Dosierung (<1µM) erfolgt die Aktivierung von GTN im *high potency pathway*, wohingegen bei suprapharmakologischer Dosierung (>1µM) eine Bioaktivierung durch den *low potency pathway* beschrieben wird (22). Die Bioaktivierung der *high potency* Nitrate erfolgt durch die mitochondriale Isoform der Aldehyddehydrogenase (ALDH-2), die 2002 erstmalig beschrieben wurde (23). Das Enzym ist in seiner Funktion ebenfalls für die Metabolisierung von Ethanol bzw.

von dessen Metabolit Acetaldehyd zu Acetat durch Oxidation bekannt (Dehydrogenaseaktivität). In der ostasiatischen Population ist eine Mutation des Gens für die ALDH-2 bekannt, welche durch die Akkumulation von Acetaldehyd zur sog. Flush-Symptomatik (generalisierte Rötung der Haut vor allem am Kopf-/Halsbereich) führt und die geringe Toleranz gegenüber Ethanol in dieser Population erklärt (24). Organische Nitrate sind Nitratester der Salpetersäure. Daher wurde anfangs bei der Entdeckung der ALDH-2 durch Chen et al. (23) postuliert, dass die Aktivierung der Nitrate lediglich durch eine Esteraseaktivität des Enzyms zu erklären sei. Die Produkte der Reaktion, 1,2- Glyceryldinitrat (1,2-GDN) und Nitrit, legen jedoch Nahe, dass zusätzlich eine Reaktion stattfindet, welche das Nitrat zu Nitrit unter Übertragung von 2 Elektronen reduziert. Als Elektronendonatoren dieser Reaktion wurden Thiolgruppen im aktiven Zentrum des Enzyms vermutet, die nach der Reaktion eine Disulfidbrücke bilden. Die Reaktion wird durch NAD^+ durch allosterische Effekte beschleunigt, da NAD^+ selbst nicht direkt an der Reaktion teilnimmt. Die Bildung der Disulfidbrücken ist durch thiolhaltige Reagenzien wie Dithiothreitol (DTT) oder 2-Mercaptoethanol wieder reversibel, wodurch die Reduktaseaktivität der ALDH-2 wieder aktiviert werden kann (22). Als natürliches Reduktionsagens im Mitochondrium wird die Liponsäure vermutet (25, 26).

Hemmend wirken unspezifische Inhibitoren (Disulfiram, Cyanamid, Chloralhydrat) und hohe Konzentrationen des Substrats Acetaldehyd. Sie alle bewirken im Tiermodell durch die Hemmung der ALDH-2 im unteren Teil der Signalkaskade von GTN eine Verringerung der cGMP Konzentration und damit eine Verringerung des vasodilatatorischen, blutdrucksenkenden Effektes von GTN (23, 27). Das entstandene Nitrit wird dann entweder durch Cytochrom C Oxidasen der mitochondrialen Atmungskette oder durch das saure Milieu im mitochondrialen Intermembranraum weiter zu $\bullet\text{NO}$ reduziert (28).

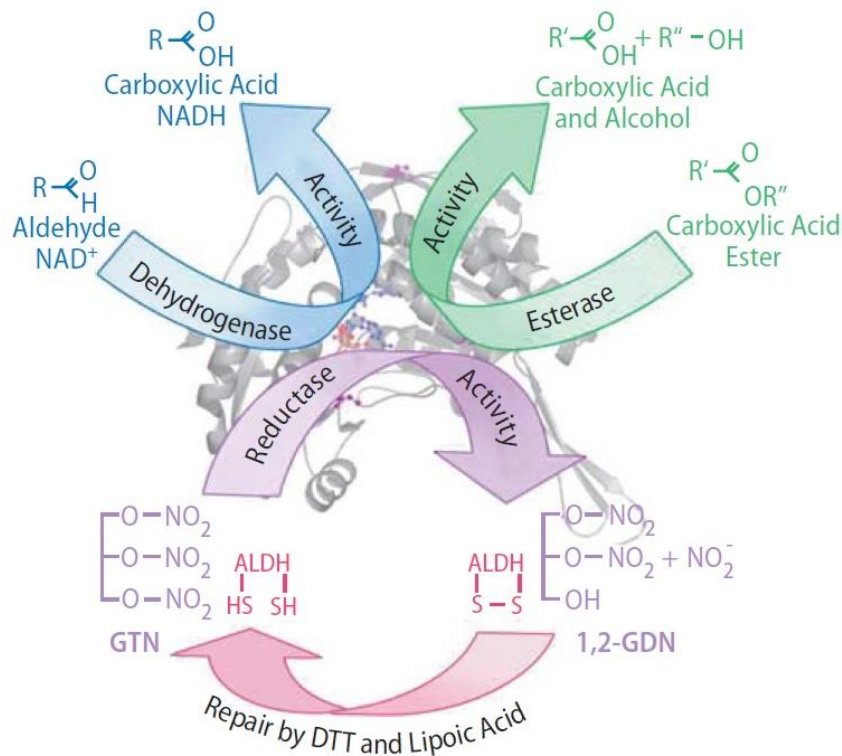


Abbildung 2-4 Die Enzymaktivität der mitochondrialen ALDH 2

Das Enzym katalysiert mithilfe von NAD^+ die Oxidation von Aldehyden wie Acetaldehyd zu Acetat (blau, Dehydrogenaseaktivität). Es spaltet Carbonsäureester ohne Cofaktoren zu Carbonsäuren und Alkoholen (grün, Esteraseaktivität). Weiterhin reduziert es organische Nitrate wie das GTN zu 1,2 GDN und Nitrit unter Übertragung von Elektronen durch thiohaltige Cysteinreste im aktiven Zentrum (lila, Reduktaseaktivität), welche durch thioltragende Reagenzien wie DTT und der mitochondrialen Liponsäure wiederhergestellt werden können (pink). Abbildung aus (26).

Zusammenfassend hat die ALDH-2 drei enzymatische Aktivitäten:

1. Die Dehydrogenaseaktivität, also die Oxidation von Aldehyden zu Carbonsäuren mit NAD^+ als Cofaktor z.B. in der Metabolisierung von Ethanol.
2. Die Cofaktor unabhängige Esteraseaktivität zur Hydrolyse von Carbonsäureestern (und vermutlich Ester anderer Säuren) in Carbonsäuren und Alkohol.
3. Die Reduktaseaktivität, mit der GTN zu 1,2-GDN und Nitrit gespalten wird. Die Elektronen stammen von thiohaltigen Cysteinresten am aktiven Zentrum des Enzyms, welche nach der Reaktion durch thiohaltige Substanzen wie DTT und der mitochondrialen Liponsäure wiederhergestellt werden können (29).

Über die Bioaktivierung der *low potency* Nitrate (ISMN und ISDN) ist weniger bekannt. Es ist jedoch bekannt, dass die Bioaktivierung unabhängig von der ALDH-2 (30) durch

die Cytochrom P450 Enzyme im glatten endoplasmatischen Retikulum abläuft und zur direkten Freisetzung von •NO (21, 31, 32) führt. Als ein weiteres aktivierendes Enzym für ISMN und ISDN ist die Xanthinoxidase beschrieben worden. Als Elektronendonator im Rahmen der Aktivierung fungieren sowohl Xanthin als auch NADH. Für Xanthin wurde jedoch eine höhere Enzymkinetik mit schnellerem Umsatz beobachtet als für NADH (33).

Da die Aktivierung von ISMN und ISDN unabhängig von der mitochondrialen ALDH-2 abläuft, ist der mitochondriale oxidative Stress im Rahmen der ISMN/ISDN induzierten Nitrattoleranz vernachlässigbar gering. Außerdem ist die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch ISMN unabhängig von dem *cross talk* zwischen dem Mitochondrium und der zellulären NOX (34).

In hohen, therapeutisch nicht relevanten Dosen ($>1 \mu\text{mol/L}$), wird das •NO in den *high potency* Nitraten (GTN und PETN) unter Bildung der jeweiligen Mononitrate (GMN und PEMN) freigesetzt, was in der Praxis am Organismus jedoch nicht von Relevanz ist.

2.4 Gefäßdysfunktion durch organische Nitrate

2.4.1 Nitrattoleranz

Auf den Gefäßtonus wirken verschiedenste Mediatoren ein, die sowohl konstriktorisch als auch dilatierend wirken können und anatomisch auf die glatte Muskulatur in der Tunica media der Gefäße einwirken. Es ist ein komplexes Zusammenspiel multipler Signalstoffe und Signalwege, dessen wichtigste Vertreter im Folgenden zusammengefasst werden sollen. Zu den kontrahierenden Mediatoren gehören Noradrenalin, Adrenalin, Angiotensin II, Arachidonsäurederivate wie Thromboxan A₂ (Prostaglandin A₂), Vasopressin (ADH, antidiuretisches Hormon) und Endothelin-1 (ET-1), das im Rahmen dieser Arbeit später im weiteren Detail beschrieben wird. Die wesentlichen Zielproteine der vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Signalkaskaden sind Myosin und Aktin, zwei kontraktile Proteine des glatten und quergestreiften Muskels, dessen Interaktion zur Verkürzung der Muskulatur und damit zur Kontraktion führt. Reguliert wird dies letztlich durch Phosphorylierungen durch die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) oder Dephosphorylierung durch die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) der regulatorischen Untereinheit des Myosins (35-37).

Die o.g. Mediatoren wirken über ihre jeweiligen Rezeptoren (v.a. α_1 Adrenozeptoren, Angiotensin II Rezeptor-Subtyp 1 (AT_1), Endothelinrezeptor A und B (ET_A und ET_B), Thromboxan Rezeptor (TP), Vasopressin Rezeptor 1 (V1-Rezeptor) und aktivieren eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade (siehe Abbildung 2-4). Diese Kaskade bewirkt G-Protein-vermittelt die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche aus Phosphatidylinositol- 4,5- bisphosphat (PIP_2) der Zellmembran Inositol-1-4-5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) freisetzt, die als sog. *second messenger* intrazellulär das Signal weitertragen (36) .

Ein weiterer gesicherter Mechanismus, der zur Kontraktion des Gefäßes beiträgt, ist die Aktivierung der Rho/Rho Kinase-Aktivität. Das G-Protein aktiviert die GTPase Rho, welches zur Superfamilie der Ras Proteine zählt. Aktives Rho aktiviert seinerseits die Rho-Kinase. Die Rho-Kinase phosphoryliert die regulatorische Untereinheit der MLCP, wodurch dessen Aktivität abnimmt (35, 38).

Das Resultat: Mit weniger Myosinphosphataseaktivität verbleiben mehr Myosinanteile phosphoryliert und damit wird die Kontraktion verlängert. Somit stellt die Rho-Kinase Signalkaskade eine Verstärkung der Kontraktion dar (siehe Abbildung 2-4). IP_3 bindet an entsprechende Rezeptoren am sarkoplasmatischen Retikulum, dem intrazellulären Calciumspeicher der glatten Muskelzelle, und führt zum Ausstrom von Calciumionen (Ca^{2+}) (28).

Die Calciumkonzentration von 10^{-7} mol/l in Ruhe steigt auf 10^{-5} mol/l an und bindet dann an das Regulatorprotein Calmodulin und formt den Calcium-Calmodulin Komplex. Dieser Komplex bindet an das Enzym Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK, myosin light chain kinase) welches zentral an der Interaktion zwischen Myosin und Aktin, den beiden kontraktile Funktionsproteinen der Muskulatur beteiligt ist. Der Enzymkomplex überträgt eine Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf die regulatorische Einheit des Myosins. Das phosphorylierte Myosin interagiert dann mit Aktin und führt zur Verkürzung des Muskels. Demnach ist das Endziel eines jeden gefäßkontrahierenden Mediators die MLCK zu aktivieren (35). Als Antagonist dieses Prozesses wirken vasodilatatorisch wirkende Mediatoren wie u.a. Dopamin, Prostaglandine wie das Prostazyklin (PGI_2) und Stickstoffmonoxid ($\bullet NO$). Ihr Endziel ist letztlich die Aktivierung der MLCP bzw. die Deaktivierung der MLCK. Alle o.g. Vasodilatoren, mit Ausnahme des $\bullet NO$, wirken als nicht membranängige Botenstoffe über membranassoziierte Rezeptoren, wie z.B. Dopamin D1 Rezeptoren, Prostazyklin Rezeptor IP aber auch der β_2 -Adrenozeptor, der bei Bindung von Adrenalin vasodilatatorisch wirkt. Das $\bullet NO$ stellt insofern eine Ausnahme dar, als dass

es sowohl an eine membrangebundene Guanylatzyklase (GC-A), an die auch natriuretische Peptide (ANP und BNP) binden, als auch durch seine hohe Membranpermeabilität an eine lösliche, intrazelluläre Guanylatzyklase (sGC) binden kann.

Die Bindung der o.g. nicht membranständigen Botenstoffe an membranständige Rezeptoren bewirkt über das G_s -Protein eine Aktivierung der Adenylatzyklase, welche aus ATP das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) synthetisiert.

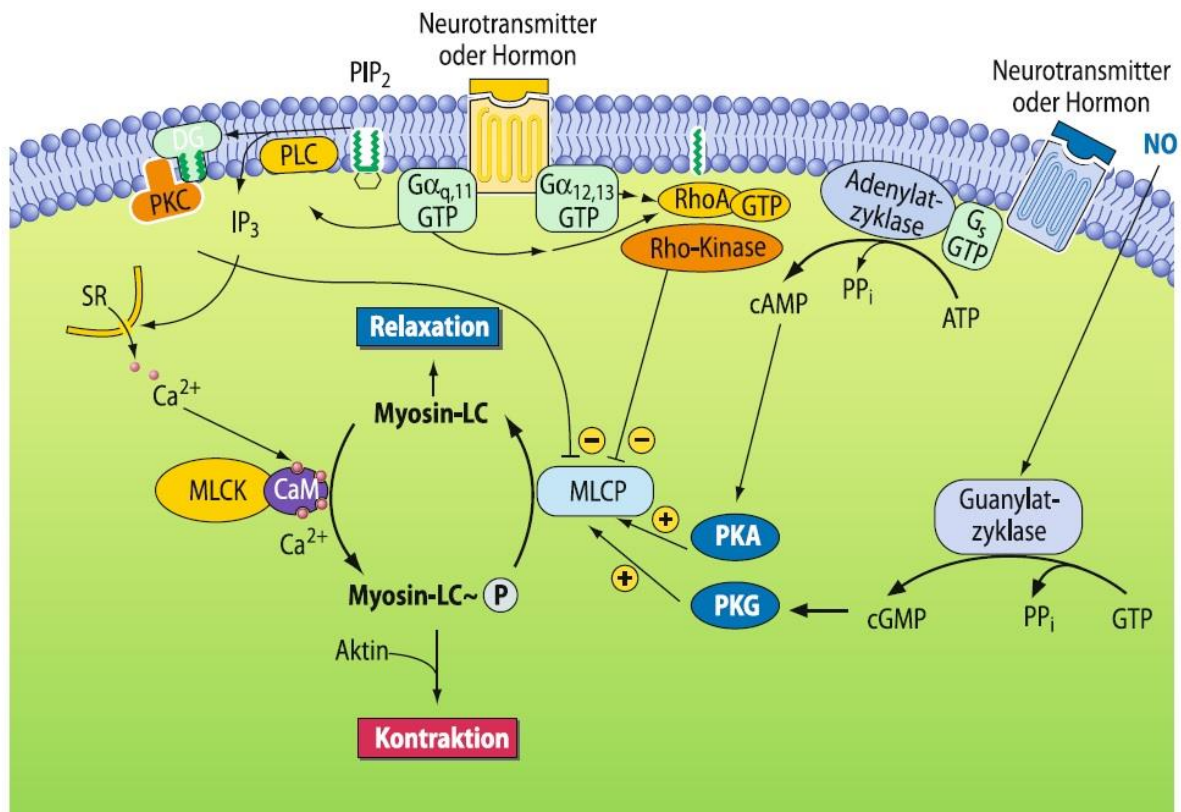


Abbildung 2-5 Tonusmodulation in der glatten Muskelzelle

Der Gefäßtonus wird erhöht, wenn erregende Agonisten Rezeptoren aktivieren, die an bestimmte G-Proteine koppeln, welche zur Aktivierung entweder der monomeren GTPase Rho oder der Phospholipase C führen. Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinosoldiphosphat (PIP₂) in IP₃ und Diacylglycerol (DAG), das die Proteinkinase C aktiviert, während Rho die Rho-Kinase aktiviert. Beide Proteinkinasen hemmen die MLCP, wodurch die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten des Myosins (Myosin-LC) und der Tonus der glatten Muskulatur zunehmen. Umgekehrt ist die Ca²⁺-Sensitivität erniedrigt, wenn extrazelluläre Signale durch Bindung an spezifische Rezeptoren das G-Protein G_s stimulieren. Dies führt zum Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels und Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits die MLCP aktiviert. Die MLCP wird auch durch die cGMP/Proteinkinase-G-Signalkaskade aktiviert. Die Bildung von cGMP aus GTP wird durch die •NO-aktivierte lösliche Guanylatzyklase katalysiert. Abbildung aus (35).

Dieser *second messenger* aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA). Die Proteinkinase A phosphoryliert intrazellulär mehrere Zielproteine wie die MLCP. Dadurch reichert sich dephosphoryliertes, nicht kontraktiles, Myosin intrazellulär an und führt zur Erschlaffung der glatten Muskulatur in der Tunica media der Blutgefäße und damit zur Dilatation des Gefäßes (35). Selbstverständlich sind weitaus mehr

Mediatoren des Gefäßtonus beschrieben worden (Histamin, Bradykinin, ADP u.v.m.), die aus Gründen der Übersicht und des Fokus der Arbeit nicht im weiteren Detail beschrieben werden.

Der Signalweg über den •NO eine Dilatation erzeugt ist über den •NO/cGMP Signalweg beschrieben (39), der im Endothel der Gefäße beginnt. Die Synthese von •NO im Endothel erfolgt durch das Enzym endotheliale •NO-Synthase (eNOS). In zwei Oxidationsschritten erfolgt der Elektronentransfer und unter Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin wird Stickstoffmonoxid freigesetzt. Als membrangängiges Molekül und Botenstoff diffundiert •NO vom Endothel in die lumenfernere Tunica media. Es bindet vornehmlich an „•NO Akzeptoren“, also Proteinen die entweder ein zweiwertiges Hämeisen (sGC, Hämoglobin, Myoglobin) oder ein Eisen-Schwefel Komplex (Komplexe der mitochondrialen Atmungskette) enthalten. Die in glatten Muskelzellen vorkommende sGC katalysiert nach Bindung des •NO an dessen Hämgruppe die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). cGMP aktiviert die Proteinkinase G. Wie auch die Proteinkinase A, aktiviert die Proteinkinase G die MLCP und führt dadurch zur Verringerung der Konzentration an phosphoryliertem Myosin und damit zur Vasodilatation (28, 39). Der Abbau des *second messengers* cGMP erfolgt durch das Enzym Phosphodiesterase. Die Wichtigkeit dieses Signalweges im Beitrag zur Vasodilatation wird durch den starken blutdrucksenkenden Effekt der selektiven Phosphodiesterase-5-Hemmer wie Sildenafil betont, die zur Therapie der erektilen Dysfunktion und pulmonalen Hypertonie verwendet werden (40, 41). Die klinische Anwendung von Nitraten im Rahmen eines Angina Pectoris Anfalles ist bei bekannter Einnahme von PDE-5 Hemmern aufgrund der großen Gefahr der Hypotonie kontraindiziert.

Einige Zeit nach der Entdeckung der organischen Nitrate im 19. Jahrhundert wurde festgestellt, dass die Wirkung der organischen Nitrate (GTN, ISMN und ISDN) mit der Zeit nachlässt. In Studien mit Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) zeigte sich dies durch eine abnehmende Laufzeit auf einem Laufband vor Eintritt der Angina Pectoris Symptomatik (42). Der hämodynamische Effekt ließ sich auch bei Herzinsuffizienzpatienten klinisch darstellen. Die Gabe von organischen Nitraten führte hier zu einer Abnahme des pulmonalarteriellen Verschlussdrucks (sog. Wedge Druck). Ist dieser Wert bei Herzinsuffizienz erhöht, deutet dies auf eine Volumenbelastung des linken Vorhofs und damit auf eine „Volumenüberladung“ des Herzens hin (43).

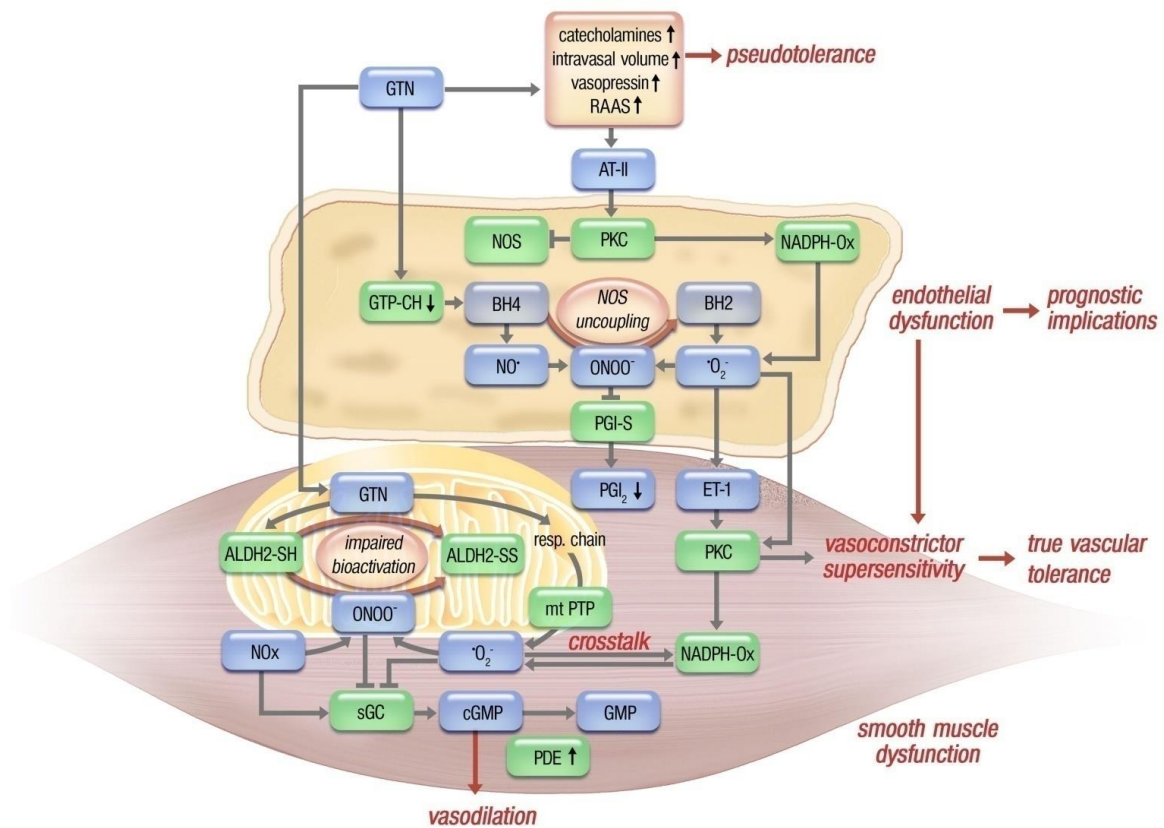


Abbildung 2-6 Molekulare Mechanismen der Nitrattoleranz

Die Toleranz gegenüber organischen Nitraten entsteht durch verschiedene Mechanismen. Die Pseudotoleranz beschreibt eine neurohormonale Gegenregulation nach Gabe von organischen Nitraten, die auf der Freisetzung von Katecholaminen, Vasopressin (ADH) und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) beruht. Zur echten, vaskulären, Nitrattoleranz kommt es über mehrere Mechanismen. Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Angiotensin II (ATII) erhöht die Aktivität der NADPH-Oxidase (NOX), welche daraufhin Superoxid generiert. Die PKC hemmt außerdem direkt die Aktivität der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). Superoxid und Stickstoffmonoxid reagieren zu Peroxynitrit. Peroxynitrit führt zur Oxidation des Cofaktors Tetrahydrobiopterin (BH₄). Dieser Verbrauch an BH₄ und die Inhibition der Neusynthese durch das Enzym GTP-Cyclohydrolase (GTPCH-I), welche durch das organische Nitrat Glyceroltrinitrat (GTN) gehemmt werden, führen zu einem Substratmangel an BH₄. Der Mangel an BH₄ bewirkt die Entkopplung und damit die Fehlfunktion der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS). Weiterhin verringert Peroxynitrit die Konzentration an dem gefäßerweiternden Prostazyklin (PGI₂) indem es die Prostazyklin-Synthase (PGI-S) hemmt. Erhöhte Konzentrationen an Superoxid verstärken über die Aktivierung des Endothelin-1 (ET-1) die PKC-Aktivität in der glattmuskulären Zelle im Gefäß. Dies führt zu einer erhöhten Sensitivität der glatten Muskulatur für Vasokonstriktoren wie AT-II, Adrenalin und Serotonin.

Die durch GTN erhöhte Konzentration an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) inaktivieren die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) durch Oxidation von Thiolresten, was eine verringerte Bioaktivierung der organischen Nitrate bewirkt. Die RONS inaktivieren außerdem die lösliche Guanylatzyklase (sGC), welche cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) synthetisiert. Der Abfall an cGMP führt zur verminderten Vasodilatation. Abbildung aus (44).

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz zeigte sich mit einem abnehmenden hämodynamischen Effekt im Sinne eines nachlassenden Abfalls des pulmonalarteriellen Verschlussdrucks (sog. Wedge Druck) ein Wert, der die Volumenbelastung des linken Vorhofs und damit die „Volumenüberladung“ des Herzens widerspiegelt (43). Dieses bekannte Phänomen hat dazu geführt, dass noch heute in aktuellen Leitlinien bei antianginöser Dauertherapie mit Nitraten

intermittierend Pausen vorgesehen sind („Nitratpausen“)(1), die den Effekt der Toleranz wieder aufheben können (45).

Es lässt sich eine sog. Pseudotoleranz von einer echten, vaskulären Toleranz unterscheiden.

Die Pseudotoleranz beschreibt eine neurohormonale Reaktion des Herz-Kreislaufsystems auf den Abfall des Blutdrucks und der Vorlast im Herzen. Der Abfall des Blutdrucks führt zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des Barorezeptorreflexes. Dies führt zur Freisetzung von Katecholaminen (Noradrenalin, Adrenalin), die über entsprechende Rezeptoren im Gefäßsystem den Blutdruck erhöhen. Weiterhin wird Angiotensin II gebildet, welches ebenfalls stark gefäßverengend und damit blutdrucksteigernd wirkt. Angiotensin II bewirkt darüber hinaus, dass vermehrt Flüssigkeit in das Gefäßsystem transportiert wird. Dies geschieht durch Freisetzung des antidiuretischen Hormons (ADH, Vasopressin), welches über entsprechende Rezeptoren in den Nieren vermehrt Flüssigkeit wiederaufnimmt (46, 47). Zusammenfassend werden also durch den Blutdruckabfall mehrere Mechanismen eingeleitet, die zu einer Gegenregulation mit Blutdruckerhöhung führen. Da dies im zeitlichen Zusammenhang mit Gabe des Nitrats geschieht, entsteht fälschlicherweise der Trugschluss, dass dies eine Toleranz des Gefäßsystems auf die organischen Nitrate sei. Es ist jedoch vielmehr eine direkte Gegenregulation gegen den Blutdruckabfall, der durch das Nitrat ausgelöst wurde. Studien belegen weiterhin, dass die Langzeittherapie mit Nitraten die Sensitivität der Rezeptoren für Vasokonstriktoren wie Adrenalin, Angiotensin II und Thromboxan zusätzlich erhöht werden (48).

Die echte Nitrattoleranz umfasst das Nichtansprechen des Gefäßsystems auf die Gabe von Nitraten unter der gleichzeitigen Abwesenheit der o.g. neurohormonalen Reaktionen der Pseudotoleranz. Die Forschung auf dem Gebiet der Nitrattoleranz hat in den letzten mehr als 30 Jahren verschiedene Theorien bezüglich dessen Mechanismus hervorgebracht, die allesamt an verschiedenen Stellen der Signalkaskade der Nitrate und •NO ansetzen (siehe Tabelle 2-1) (22).

Pseudotoleranz	Vaskuläre Toleranz
<ul style="list-style-type: none"> - Aktivierung des RAAS - Erhöhung der Katecholaminfreisetzung - Erhöhung der ADH- Freisetzung (Vasopressin) - Erhöhung des intravasalen Volumens 	<ul style="list-style-type: none"> - Eingeschränkte GTN-Biotransformation - Erhöhte vaskuläre Superoxidfreisetzung - Desensibilisierung der löslichen Guanylatzyklase - Erhöhung der Phosphodiesteraseaktivität - Erhöhte Sensibilität des Gefäßsystems für Vasokonstriktoren - Erhöhte Endothelinfreisetzung - Epigenetische Einflüsse

Tabelle 2-2: Hypothesen über die Entstehung der Nitrattoleranz

Die Therapie mit GTN erhöht die Superoxidproduktion im Gefäßsystem (49). Das entstandene Superoxid bewirkt u.a. die Bindung und das Abfangen des gewünschten •NO, indem es vor allem in Endothelzellen mit •NO zum hochreaktiven Peroxynitrit reagiert (50).

Weiterhin bewirkt die Langzeittherapie mit GTN eine Verringerung der GTN-Bioaktivierung, indem die gebildeten Radikale zur Oxidation von Thiolgruppen in der mitochondrialen ALDH-2 führen (51). In oxidierte Form wird die Reduktaseaktivität der ALDH-2 inaktiviert und damit auch die Bioaktivierung der organischen Nitrate unterbrochen. Das entstandene Superoxid fängt damit nicht nur •NO ab und macht es unwirksam, sondern formt gleichzeitig ein neues Reaktionsprodukt, Peroxynitrit, welches zusätzlich die Aktivierung des GTN inhibiert. Diese Hypothese wird durch den Beweis untermauert, dass im Mitochondrium wirksame Antioxidantien die GTN Toleranz zum Teil oder gänzlich aufgehoben haben (52) und im Tiermodell der heterozygote Knockout der Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD), die Superoxid zu Wasserstoffperoxid verstoffwechselt, die Effekte der Nitrattoleranz weiter verschlimmerten (53).

Die bei der Gabe von GTN entstehenden reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) bewirken außerdem eine Desensibilisierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch S-Nitrosylierung von Thiolgruppen an Cysteinresten des Proteins, welches eine verringerte cGMP-Konzentration und weiter flussabwärts der Signalkaskade eine verringerte Vasodilatation zur Folge hat. Da die sGC das Zielenzym von •NO und damit die gemeinsame Endstrecke aller •NO freisetzenden Nitrate ist, führt ihre Desensibilisierung durch GTN gleichzeitig zur Toleranz gegenüber anderen Nitraten (Kreuztoleranz). Die Toleranzentwicklung kann durch die gleichzeitige Gabe des Sulfhydrylgruppennonors N-Acetylcystein wieder aufgehoben werden, was die These der S-Nitrosylierung weiter unterstützt (54).

Eine weitere Hypothese der Nitrattoleranz ist die Sensibilisierung des Gefäßsystems für Vasokonstriktoren wie Angiotensin II, Adrenalin und Serotonin, die unter Therapie mit GTN beobachtet wird. Nach dreitägiger Therapie mit GTN zeigt sich eine erhöhte Expression des Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1 (AT-1) und eine erhöhte Sensibilität für Angiotensin II (55). Zusätzlich zeigt sich, dass dieses Phänomen mit einer Erhöhung der NADPH-Oxidase-Aktivität, ROS-Synthese und konsekutiv erhöhter Expression von Endothelin-1 und dessen Vorstufen einhergeht, die dann eine Erhöhung der Phospholipase C und Proteinkinase C zur Folge hat. (56-58). Die Proteinkinase C Kaskade führt daraufhin, wie oben beschrieben (siehe Abbildung 2-4), zur Vasokonstriktion und gleichzeitig auch zur weiteren Aktivierung der NADPH-Oxidase, wodurch der oxidative Stress in der glatten Muskelzelle potenziert wird.

Interessanterweise ließ sich bei der Gabe von ISMN, dem am häufigsten angewendeten oral verfügbaren Nitrat (34), ebenfalls eine erhöhte Expression von Endothelin-1, dessen Vorstufen Big- Endothelin und einen erhöhten oxidativen Stress verzeichnen, ein Phänomen, das im Rahmen dieser Arbeit weiter diskutiert wird (7).

Neuere Studien deuten zudem auf epigenetische Effekte der Therapie mit GTN hin. GTN bewirkt demnach bei Ersttherapie eine Acetylierung von Histonen, welche mit der DNA verknüpft sind. Diese DNA kodiert u.a. glattmuskuläre Proteine wie die leichten Myosinketten und das glattmuskuläre Aktin. Die Acetylierung von Lysinresten an Histonen erhöht deren negative Ladung und verringert damit die Interaktion mit der negativ geladenen DNA, was eine vermehrte Auflösung der DNA-Doppelhelix und damit eine erhöhte Transkription nach sich zieht (59). Die Histone zeigten unter Ersttherapie eine erhöhte Acetylierung und damit eine vermehrte Expression der o.g. Proteine, sowie eine verringerte Phosphorylierung. Dies führte zu einer Dilatation des

Gefäßes, die nach längerer Therapie und Toleranzentwicklung wieder aufgehoben wurde. Dieser Effekt ließ sich durch Gabe von Acetylaseinhibitoren wieder aufheben (60). Die Ergebnisse deuten auf mögliche neue Therapiestrategien bestehend aus kombinierter Gabe von Nitraten und Acetylaseinhibitoren hin.

2.4.2 Endotheliale Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion beschreibt einen Zustand in dem das Endothel nicht angemessen auf endogene und exogene Veränderungen des Gefäßtonus reagieren kann (28) . Klinisch ist sie mit dem sogenannten Acetylcholintest nachweisbar.

Beim Acetylcholintest wird im Rahmen einer koronaren Katheterintervention Acetylcholin direkt in die Koronararterien infundiert und dessen Fluss und Gefäßdurchmesser dargestellt. Acetylcholin bindet sowohl an Endothelzellen als auch an glatte Muskelzellen. Bei intakter Endothelfunktion führt die Bindung an endotheliale Acetylcholinrezeptoren über den *second messenger* Inositoltrisphosphat zur Freisetzung von •NO, welches lumenfern in die glatten Muskelzellen diffundiert und über den •NO/cGMP-Signalweg eine Vasodilatation auslöst. Physiologisch kontrahiert eine isolierte glatte Muskelzelle auf Gabe von Acetylcholin. Im Gefäßsystem, bei intakter Endothelfunktion überwiegt jedoch die durch die endotheliale •NO-Freisetzung induzierte Vasodilatation. Bei endothelialer Dysfunktion herrscht ein relativer Mangel an •NO, wodurch der Anteil der glattmuskulären Kontraktion überwiegt und das Gefäß sich verengt. Dieses Phänomen wird als paradoxe Vasokonstriktion bezeichnet, was einen pathologischen Befund darstellt. Dieser pathologische Befund ist prognostisch mit einer erhöhten Rate an sog. kardiovaskulären Events (Myokardinfarkt, Schlaganfall, instabile Angina Pectoris etc.) vergesellschaftet (61). Etablierte Risikofaktoren für eine endotheliale Dysfunktion sind Diabetes Mellitus (Typ I und II), Hypertonie, Rauchen und Hypercholesterinämie (62). Für die Dauertherapie mit GTN, ISMN und ISDN konnte die endotheliale Dysfunktion am Tiermodell und beim Menschen gezeigt werden (63-66).

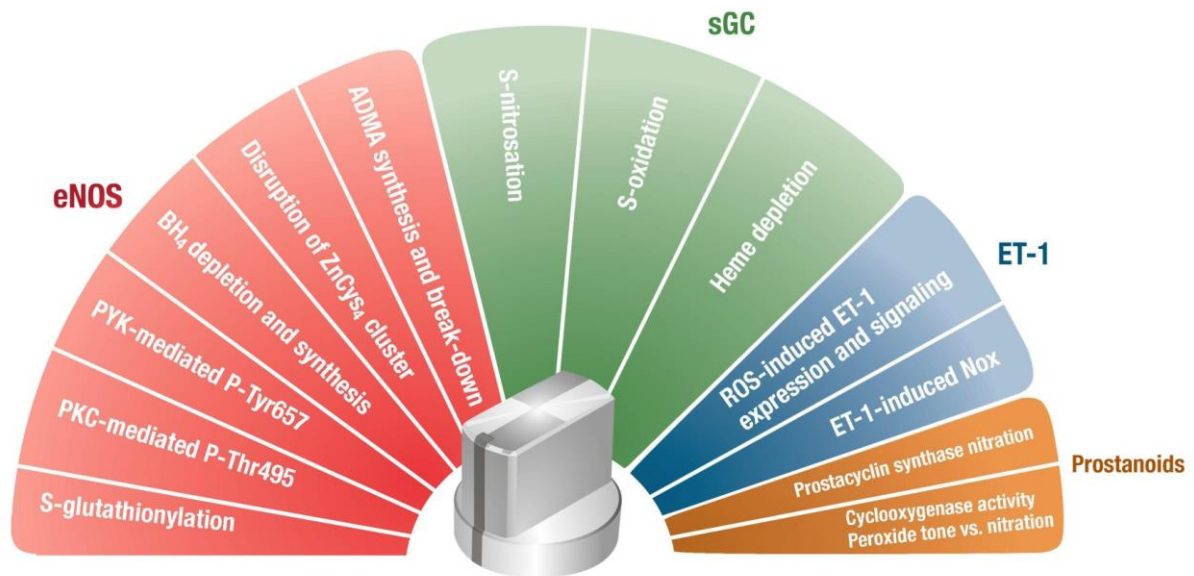


Abbildung 2-7 Die Redoxregulation des Gefäßfunktion

Die physiologische Gefäßfunktion wird durch verschiedene Mediatoren beeinflusst, die allesamt unter den Einfluss von Redoxregulationen stehen. Das An- und Abschalten dieser „Redoxschalter“ durch reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) führt zu einer vermehrten Vasokonstriktion oder Vasodilatation. Im Rahmen verschiedener Krankheitsentitäten können diese zentralen Regulatoren durch den Einfluss von ROS und RNS aktiviert und inaktiviert werden und damit die physiologische Gefäßfunktion beeinträchtigen. Als zentrales Enzym der Stickstoffmonoxidsynthese und wichtiger Regulationspunkt gilt die eNOS. Ihre Regulation erfolgt über verschiedene Mechanismen: Die S-Glutathionylierung von Thiogruppen, die Peroxynitrit abhängige Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und die Protein-Tyrosin-Kinase 2 abhängige Phosphorylierung von Tyrosindomänen der eNOS, die Oxidation und der Verbrauch des essentiellen Cofaktors Tetrahydrobiopterin, die Oxidation von Zink-Komplexe und der Auf- und Abbau des Asymmetrisches Dimethylargininn (ADMA) als Inhibitor der eNOS. Ein weiteres zentrales Enzym ist die lösliche Guanylatzyklase. Ihre Redoxregulation geschieht über die S-Nitrosylierung und Oxidation von Thiolgruppen an Cysteinresten des Proteins, sowie an dessen Hämgruppe. Endothelin-1 als potenter Vasokonstriktor, sowie die NADPH-Oxidase sind weitere zentrale Strukturen, die ebenfalls Redoxregulationen unterliegen. So führt eine vermehrte Synthese an reaktiven Sauerstoffspezies zur erhöhten Expression von Endothelin-1, welches wiederum die NADPH-Oxidase aktiviert und im Sinne eines selbstverstärkenden Mechanismus erneut zur erhöhten Synthese von ROS führt. Das letzte wichtige System mit Einfluss auf die Gefäßfunktion ist das Prostaglandinsystem und dessen Folgesubstanzen, die Prostanoiden. Das Schlüsselenzym der Prostaglandine, die Cyclooxygenase, wird durch niedrige Wasserstoffperoxidkonzentrationen aktiviert und durch Peroxynitrit induzierte Nitrierung inhibiert. Die Prostazyklinsynthase wird ebenfalls durch Peroxynitrit abhängige Nitrierung inhibiert. Die verschiedenen „Redoxschalter“ können im Rahmen von Erkrankungen einzeln an- und ausgeschaltet werden. Üblicherweise werden jedoch alle gleichzeitig aktiviert und man findet im Status der endothelialen Dysfunktion zeitgleich eine entkoppelte eNOS, eine desensibilisierte lösliche Guanylatzyklase, eine nitrierte Prostazyklinsynthase, eine erhöhte Cyclooxygenaseaktivität und eine erhöhte Expression von Endothelin-1. Abbildung aus (67).

Die endotheliale Dysfunktion im Rahmen der Therapie mit organischen Nitraten hängt u.a. mit der Entkopplung der eNOS zusammen. Die Erforschung der eNOS über die letzten Jahre hat zur Entdeckung vieler Regulationsmechanismen der eNOS-Aktivität beigetragen (22). Ein wichtiger Cofaktor in der physiologischen Funktion der eNOS ist Tetrahydrobiopterin (BH₄). Die de-novo-Synthese dieses Cofaktors durch das Enzym GTP-Cyclohydrolase I wird unter GTN Therapie verringert, indem GTN die Expression des Enzyms herunterreguliert (68). Das im Rahmen der Nitrattherapie entstehende Superoxid reagiert mit [•]NO zu Peroxynitrit, einem stark reaktiven und wichtigen Mediator der endothelialen Dysfunktion. Peroxynitrit führt zur Oxidation des eNOS-Cofaktors Tetrahydrobiopterin, wodurch der physiologische Elektronenfluss innerhalb des Enzyms nicht mehr gewährleistet ist und die Elektronen letztlich auf Sauerstoff übertragen werden, was zur Synthese von Superoxid führt (eNOS-Entkopplung) (69). Das vormals protektive Enzym kehrt sich durch den oxidativen Stress um und wird selbst zur Quelle von ROS (28).

Die Therapie mit GTN führt weiterhin zur Phosphorylierung (Tyrosin 657 und Threonin 495) und Dephosphorylierung (Serin 1177) von Aminosäureresten der eNOS, die zur Inaktivierung und letztlich Entkopplung der eNOS beitragen (22, 68, 70). Ein neuerer Regulationsmechanismus der eNOS beinhaltet die S-glutathionylierung von Thiolgruppen der eNOS, die ebenfalls im Rahmen der Nitrattherapie erhöht sind und zur Entkopplung der eNOS beitragen (71), was auch unter chronischer ISMN-Therapie nachgewiesen werden konnte (7).

All diese Mechanismen führen letztlich zu einer Verringerung des protektiven [•]NO durch Inhibition der eNOS-Aktivität, Abfangen des [•]NO durch Superoxid unter Synthese einer hochreaktiven neuen pro-oxidativen Spezies, dem Peroxynitrit, und zudem zu einer dysfunktionalen, entkoppelten eNOS, die zusätzlich zu einer weiteren ROS-Quelle wird.

Ein weiterer wichtiger Pathomechanismus im Rahmen der endothelialen Dysfunktion ist die Peroxynitrit bedingte Nitrierung von Tyrosinresten an der endothelialen Prostazyklinsynthase (PGI-S). Das 3-Nitrotyrosin ist als „Fußspur“ des Peroxynitrits etabliert und führt zur Inhibition der Prostazyklinsynthase und damit der Prostazyklin induzierten Vasodilatation (50, 72, 73). Die Vorstufe des Prostazyklin, auch als Prostaglandin I₂ bekannt, ist das Prostaglandin H₂ (PGH₂), welches wiederum mithilfe der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) aus Arachidonsäure synthetisiert wird. Die Inhibition der Prostazyklinsynthase führt über das erhöhte Angebot an Prostaglandin H₂ (PGH₂) über die Thromboxansynthase zur Synthese von Thromboxan

(Prostaglandin A₂, PGA₂, TxA₂), welches essentiell für die Vasokonstriktion und Blutgerinnung ist. Auch hier führt somit der oxidative Stress zur Umkehr eines vormals protektiv wirkenden Mechanismus (PGI induzierte Vasodilatation) in einen prothrombotisch wirkenden Zustand (TxA₂ induzierte Vasokonstriktion und Thrombogenese) (28).

2.4.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird definiert als das Ungleichgewicht zwischen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und antioxidativen Verteidigungsmechanismen, das durch oxidative Schäden in Biomolekülen zur Gewebeschädigung führen kann (74). Oxidativer Stress kann langfristig zum Zelltod (Apoptose und Nekrose) und zum Tod des Gesamtorganismus führen (28). Physiologische Schutzsysteme im Organismus stellen u.a. die Glutathionperoxidasen und die Superoxiddismutasen (zytosolisch (Cu/Zn-SOD, SOD1), mitochondrial (MnSOD, SOD2), extrazellulär (ecSOD, SOD3)) dar. Letztere bauen Superoxid zu Wasserstoffperoxid ab, was wiederum durch die ebenfalls protektiv wirkenden Katalasen entgiftet wird. Weitere wichtige Abwehrmechanismen sind das Thiol-Disulfid-System in Peroxiredoxinen oder Thioredoxinen, die unter Disulfidbrückenbildung zur Reduktion und Entgiftung der ROS führen. Weiterhin werden reaktive Sauerstoffspezies auch durch die antioxidativen Eigenschaften von Ascorbinsäure (Vitamin C) und das α -Tocopherol (Vitamin E) entgiftet. Die wichtigsten ROS und RNS im Organismus sind das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$), Stickstoffmonoxid, Superoxid und das aus $\cdot\text{NO}$ und Superoxid entstehende Peroxynitrit.

Das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) ist das reaktivste biologisch vorkommende Radikal und reagiert mit nahezu allen Biomolekülen im Organismus mit diffusionskontrollierter Reaktionsgeschwindigkeit (28). Diese hohe Reaktivität führt gleichzeitig zu einer geringen Spezifität der Reaktionspartner, was es zu einem weniger gefährlichen Radikal macht (es reagiert unter anderem mit Zuckermolekülen in physiologischen Puffern). Bei intaktem Spiegel an freiem Eisen und Kupfer, sowie ausgeglichenem Haushalt der Speicher- und Transportformen (Ferritin, Transferrin, Caeruloplasmin, Albumin) ist die Bildung von $\cdot\text{OH}$ pathophysiologisch gering. Hohe Konzentrationen werden vor allem bei toxischen Wirkungen bestimmter Medikamente, sowie

Bestrahlung bei Krebspatienten beobachtet und natürlich bei Eisenüberschuss wie bei Sichelzellanämie und Dialysepatienten.

Dem gegenüber ist Stickstoffmonoxid ein reaktionsträges Radikal mit hohem Wirkradius, guter Membrangängigkeit und hoher Spezifität für seine Zielmoleküle, was es zu einem guten Signalstoff macht. Hierbei ist insbesondere die Affinität zu Komplexbildungen mit zweiwertigem und dreiwertigem Eisen hervorzuheben. Damit dient es als Signalstoff wie beispielsweise bei der Aktivierung der sGC an der regulatorischen Fe (II) Porphyrin Domäne, aber übt auch zytotoxische Eigenschaften aus (Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette durch Komplexbildung mit der Cytochrom-c-Oxidase, einem Eisen-Schwefel-Cluster-Protein-Komplex) (75).

Von übergeordneter pathophysiologischer Wichtigkeit für das kardiovaskuläre System ist das Superoxidradikal und dessen Reaktion mit $\cdot\text{NO}$ zu Peroxynitrit. In jedem Organismus mit aerobem Stoffwechsel kommt es allgegenwärtig zur Entstehung von Superoxid, dem der Körper zusätzlich zum chemischen Zerfall mit Bildung superoxidabbauender Enzyme wie die o.g. SOD und Katalasen begegnet, was dessen Toxizität nochmals unterstreicht. Die drei wesentlichen ROS-Quellen des Organismus sind die NADPH-Oxidasen, die Xanthinoxidase und die mitochondriale Atmungskette. Ein bedeutender Faktor stellt hierbei auch die Immunabwehr aktivierter Leukozyten (Monozyten und neutrophile Granulozyten) dar. Sie sind mit Enzymen zur Bildung von $\cdot\text{NO}$, Superoxid und damit Peroxynitrit ausgestattet, die zur Abwehr von Fremdorganismen genutzt werden (76). Mikroorganismen wie Pilze und Bakterien können über Aktivierung der $\cdot\text{NO}$ -Synthase 2 (NOS-2, iNOS) eine generelle Vasodilatation mit katecholaminrefraktärer Hypotonie auslösen, wie sie im Rahmen des septischen Schocks vorzufinden ist. Weiterhin induzieren Endotoxine der Erreger die Aktivierung der leukozytären NADPH-Oxidase (NOX), die als NOX-2 in Zellen der Immunabwehr als auch im Gefäßsystem eine bedeutende Rolle spielt. Innerhalb kurzer Zeit kommt es zur Komplexbildung zytosolischer und membranärer Untereinheiten der NOX-2, somit zu deren Aktivierung und zur Synthese großer Mengen an Superoxid, die zur Abwehr des Fremdorganismus genutzt werden und als sogenannter *phagocyte oxidative burst* oder *respiratory burst* bezeichnet werden (28, 77).

2.5 Das Endothelinsystem

2.5.1 Aufbau und Wirkungsweise

Endotheline sind Peptidhormone aus 21 Aminosäuren, die von Endothelzellen synthetisiert werden. Sie wurden erstmalig im Jahre 1988 als Zellkulturüberstand von aortalen Endothelzellen aus Schweinen beschrieben (78). Es existieren drei verschiedene einander ähnliche Endothelinmoleküle, Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3), die auf drei verschiedenen Genen exprimiert werden. Ein viertes Endothelin ist in Mäusen und Ratten beschrieben worden und wurde nach molekulargenetischer Diagnostik als Gegenstück zum humanen Endothelin-2 identifiziert (5). Im kardiovaskulären System ist Endothelin-1 das wichtigste Endothelin. Es wird aus mehreren Vorstufen im Sinne einer proteolytischen Prozessierung der Peptidkette gebildet. Nach Zellstimulation wird das Präproendothelin exprimiert. Daraus entsteht das Proendothelin, auch bekannt als *Big Endothelin*, welches durch das endothelin-converting-enzyme 1 (ECE-1) zu Endothelin umgewandelt wird (36, 79).

Endothelin ist der potenteste Vasokonstriktor im Gefäßsystem und ist 10-mal wirksamer als Angiotensin II (5). Nach Freisetzung bindet das Endothelin bei Säugetieren an zwei verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Der ET_A Rezeptor wird in glatten Muskelzellen und peripherem Gewebe, nicht jedoch auf Endothelzellen exprimiert. Die Affinität ist für Endothelin-1 am größten, gefolgt von ET-2 und letztlich ET-3 mit der geringsten Affinität. Der ET_B Rezeptor wird in verschiedenen Geweben, inklusive glatten Muskelzellen und Endothelzellen exprimiert und hat eine in etwa gleiche Affinität zu allen Endothelinen. Nach Bindung des Liganden an die glatte Muskelzelle erfolgt die Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) Signalkaskade, die eine Erhöhung des intrazellulären Calciums und eine Kontraktion der Muskelzelle hervorruft. Eine Bindung an die endothelialen ET_B Rezeptoren führt zur Freisetzung von •NO und Prostazyklin und konsekutiv zur Vasodilatation, die jedoch von der vasokonstriktorischen Komponente überspielt wird.

2.5.2 Der Endothelinrezeptorantagonist Macitentan

Aktuell liegt die einzige klinische Strategie zur Inhibition des Endothelinsystems in der Blockade der Endothelinrezeptoren (80). Die drei zugelassenen Wirkstoffe Bosentan, Ambrisentan und Macitentan wurden für die Therapie der pulmonalen Hypertonie herausgegeben und sind in den Therapieleitlinien verankert (6). Bosentan wurde 2001 durch die Schweizer Pharmafirma Actelion auf den Markt gebracht und durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Im Jahre 2013 folgte die Herausgabe von Macitentan ebenfalls durch Actelion und kurz darauf dessen Zulassung durch die FDA (81). Macitentan und dessen Metabolit ACT-132577 sind nicht selektive Rezeptorantagonisten und blockieren somit die Bindung von Endothelin an den ET_A- und ET_B Rezeptor. Es wird oral verabreicht, erreicht seinen maximalen Plasmaspiegel ca. 8h nach Gabe, hat eine Halbwertszeit von 16h und dessen Metabolit von 48h, wird über die Leberabbauenzyme CYP 3A4 und CYP 2C19 metabolisiert und zu 50% über den Urin und zu 24% über den Stuhl ausgeschieden (82). Die groß angelegte klinische Phase-III-Studie SERAPHIN (Study with an Endothelin Receptor Antagonist in Pulmonary Arterial Hypertension to Improve Clinical Outcome) zeigte einen deutlichen Benefit von Macitentan gegenüber der Morbiditäts- und Moratalitätsrate bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie (83).

Macitentan zeigt eine langsamere Rezeptordissoziation, was zu der potenteren pharmakodynamischen Wirkung beiträgt (84). Häufige Nebenwirkungen der Endothelinrezeptorantagonisten sind erhöhte Lebertransaminase-Werte, periphere Ödeme und Anämien. Die ersten beiden Nebenwirkungen sind bei Macitentan deutlich geringer als bei Bosentan, während die Anämie bei beiden zu finden war (85). Eine von Actelion angelegte und in Auftrag gegebene präklinische Studie zeigte eine erhöhte Gewebegängigkeit und bessere Rezeptorbindungseigenschaften von Macitentan gegenüber Bosentan, weshalb ein deutlicher Effizienzvorteil von Macitentan gegenüber Bosentan postuliert wird (86).

2.6 Zusammenhang zwischen dem Endothelinsystem und den Nebenwirkungen organischer Nitrate

Erste Untersuchungen im Zusammenhang von GTN induzierter Nitrattoleranz und dem RAAS zeigen ebenfalls Einflüsse auf das Endothelinsystem. Es zeigten sich erhöhte Endothelin-1-Konzentrationen unter der Therapie mit organischen Nitraten und eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion und des oxidativen Stresses unter zusätzlicher Gabe von Bosentan (55).

Dieser Effekt ließ sich am Tiermodell mit ISMN behandelten Tieren reproduzieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Langzeittherapie mit ISMN zu einer deutlich erhöhten Expression von Endothelin-1 im Gewebe führt und die Aktivierung der vaskulären NOX, sowie die Entkopplung der eNOS durch Endothelin-1 mediiert wird. Die zusätzliche Therapie mit Bosentan führte zur signifikanten Verbesserung der gesamten Gefäßfunktion und zu einer Abnahme des oxidativen Stresses (7). Auch wenn die Ergebnisse ähnlich zu denen von GTN induzierter Nitrattoleranz und oxidativem Stress sind, bestehen einige wichtige Differenzen zwischen ISMN und GTN. ISMN wird nicht durch die mitochondriale ALDH-2 aktiviert, womit die ALDH-2 als mögliche ROS-Quelle im Rahmen der ISMN-Therapie entfällt. Weiterhin kommt es dadurch nicht zu dem sich selbst verstärkenden *cross talk* zwischen dem Mitochondrium und der zellulären NOX (22), der zur Aktivierung der NOX führen konnte. Demnach muss es ein unabhängiger Mechanismus sein, der unter ISMN-Therapie zur Aktivierung der NOX und damit zum oxidativem Stress führt (22). Der Zusammenhang zwischen organischen Nitraten und der ROS-Synthese in Vollblut deutet ebenfalls auf eine Verbindung zwischen organischen Nitraten und der Aktivität von Leukozyten hin (87). In weiteren Studien wurde eine erhöhte Aktivität der leukozytären NOX unter Therapie mit ISMN und GTN festgestellt, die gleichzeitig mit einer erhöhten Expression von Endothelin-1 einhergeht (7, 68).

Der erhöhte oxidative Stress und inflammatorische Phänotyp, der zeitgleich mit einer erhöhten Endothelin-1-Expression einhergeht, lässt sich am besten mit einer Endothelin-1 induzierten Erhöhung der NOX-Aktivität und der erhöhten Expression inflammatorischer Marker erklären, wie es in Tiermodellen leichter Hypertonie gezeigt wurde (88, 89). Andersherum konnte genauso gezeigt werden, dass der erhöhte oxidative Stress durch Superoxidsynthese der NOX zu einer vermehrten Expression von Endothelin-1 Vorstufen führt und funktionell zu einer erhöhten Sensibilität des Gefäßes für Endothelin-1 induzierte Vasokonstriktion beiträgt (58, 90, 91). Es zeigt

sich folglich ein sich verstärkender Teufelskreis aus oxidativem Stress (mediert durch die NOX) und Endothelinaktivität, die sich gegenseitig verstärken und zur Endotheldysfunktion führen. Weiterhin führt Endothelin-1 zu einer PKC-vermittelten eNOS-Entkopplung (92). Die PKC ist ebenfalls als Aktivator der NOX bekannt, was die Interaktion zwischen Endothelin-1 und NOX erneut betont. Die Aktivierbarkeit der PKC durch organische Nitrate und Endothelin-1 stellt weiterhin die Basis zur Erforschung neuer Signalwege und Therapiemöglichkeiten dar (56), da die PKC als weit verbreitetes Enzym in der *second messenger* Kaskade u.a. auch die Aktivität dendritischer Zellen reguliert, die als Bestandteile des adaptiven Immunsystems zur Prozessierung und Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen befähigt sind (93).

Die Datenlage bezüglich ISDN-Therapie gibt bisher sehr wenig über dessen Nebenwirkungen her. Es konnte bisher kein präklinischer Zusammenhang zwischen ISDN und endothelialer Dysfunktion gezeigt werden und ob dieser möglicherweise mit oxidativem Stress oder erhöhter Endothelinexpression einhergeht. Folglich stellt die zusätzliche Therapie mit nichtselektiven Endothelinrezeptorantagonisten eine vielversprechende Möglichkeit zur Prävention der Nebenwirkungen unter der Langzeittherapie mit organischen Nitraten wie GTN, ISMN und ISDN dar. An einem Tiermodell mit chronischer ISMN-Therapie soll der o.g. Zusammenhang zwischen Endothelin-1 und oxidativen Stress, erhöhter Inflammation und Endotheldysfunktion weiter untersucht werden und diese Aspekte erstmalig ebenfalls für ISDN betrachtet werden, indem der nichtspezifische Endothelinrezeptorantagonist Macitentan verwendet wird, der pharmakodynamisch eine längere Rezeptorbindung und pharmakokinetisch eine längere Halbwertszeit und bessere Gewebegängigkeit als sein Vorgänger Bosentan besitzt (84, 86) und in klinischen Studien deutlich weniger Nebenwirkungen zeigte.

3. Material und Methoden

3.1. Material:

3.1.1. Tiere:

Mäuse:

C57BL/6j (10-12 Wochen, 25-30g)

Hauseigener Tierstall der Universitätsmedizin
Mainz

Ratten:

Männliche Wistar Ratten
(8 Wochen, 350g)

Charles River Laboratories, Sulzfeld

3.1.2. Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe

Name

Hersteller und Firmensitz

2-Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich, Hamburg

2-Propanol (Isopropanol)

Aug. Hedinger GmbH, Karlsruhe

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

ABC Reagent

Vector, Burlingame, USA

Acrylamide-bis Solution 40% (3,3% C)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Acetylcholin Hydrochlorid

Sigma-Aldrich, Hamburg

ADP-Reagenz (200µM)

DiaSys Deutschland, Flacht

Agarose Elektrophorese Grad

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Acrylamide / Bis Solution 40%

BIORAD Laboratories GmbH, München

Albumin Fraktion V (BSA)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Alignment Beads

Molecular Probes, Eugene, USA

Ammoniumpersulfat (APS)

Sigma Aldrich, Hamburg

Aprotinin

Sigma Aldrich, Hamburg

Aqua dest. Braun

B. Braun AG, Melsungen

BenchMark™ Protein Ladder

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Bio-Rad DC Protein Assay
Reagent A

Bio-Rad, München, Deutschland

Bio-Rad DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Rad DC Protein Assay Reagent S	Bio-Rad, München, Deutschland
Braunol ® (Providon-Iod)	B. Braun AG, Melsungen
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Fluka & Riedel, Seelze
DAB Reagent	Vector, Burlingame, USA
Detection Solution 1 Peroxidase	Thermo Scientific, Rockford, USA
Detection Solution 2 Luminol	Thermo Scientific, Rockford, USA
D-Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dextran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dihydroethidium 95% (DHE)	Fluka & Riedel, Seelze
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid 99,5% (DMSO)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fluka & Riedel, Seelze
Direct PCR Lysis Reagent (Tail)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Dithiothreitol (DTT)	Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK
Dulbecco's modified Eagle's medium	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ethanol 70% / 100%	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis (aminoethylether)-	Sigma Aldrich, Hamburg
N,N,N,N'-Tetraacetat (EGTA) Fluo-Buffer	Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande
Fluo-Substrate	Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande
Glyceroltrinitrat (GTN), Nitroglycerin	G. Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glyzerin (wasserfrei)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hemoglobin from bovine blood	Sigma-Aldrich, Hamburg
Heparin-Natrium 2500	Ratiopharm GmbH, Ulm
Hepes (N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-	Sigma-Aldrich, Hamburg

(2-ethansulfonsäure) heminatiumsalz Histopaque 1077	Sigma-Aldrich, Hamburg
Isosorbide dinitrate (ISDN)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Isosorbide-5-mononitrate (ISMN)	LKT Laboratories, St. Paul, MN, USA
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
L-012 (8-Amino-5-Chloro-7- Phenylpyrido [3,4-d] pyridazin-1,4- (2H,3H) Dion-Natriumsalz)	Wako Chemicals, Osaka, Japan
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Macitentan <i>N</i> - [5-(4-Bromphenyl)-6-{2- [(5-brom-2-pyrimidinyl)oxy]ethoxy}- 4-pyrimidinyl]- <i>N'</i> -propylsulfamid	Actelion Pharmaceuticals Ltd., Allschwil, Switzerland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Medium 199, liquid, GIBCO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl), isotone Kochsalzlösung 0,9%	B. Braun AG, Melsungen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumorthovanadate	Sigma-Aldrich, Hamburg
Octylphenol Ethoxylate (Triton X-100)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Hamburg

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Hamburg
PDBu (phorbol 12,13-dibutyrate)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pierce ECL Western Blotting Substrate Belgien	Perbio Science BVBA, Erembodegem,
Ponceau S (0,1% in 5%-igem Eisessig)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Prostaglandin F _{2alpha}	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Prostazyklin (PGI ₂)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Protease Inhibitor Cocktail, EDTAfree COMPLETE	Roche, Mannheim
PRP-Reagent	Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande
RNAse free H ₂ O	Qiagen, Hilden
Roti®-Quant (Bradford)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Saccharose (Sucrose)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Thrombinreagenz	DiaSys Deutschland, Flacht
Tissue Tek®	Sakura, Staufen, Deutschland
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan-base (Tris-base)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan-HCl (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Hamburg

Alle weiteren hier nicht genannten Chemikalien oder Reagenzien wurden von Fluka, Sigma-Aldrich oder Merck KGaA erworben.

3.1.3. Verbrauchsmaterialien

<u>Name</u>	<u>Hersteller und Firmensitz</u>
6-Well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-Well Platte (U-bottom)	ThermoFisher
Alzet Mikroosmotische Pumpe 2001	ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, Canada
BD Microlance™ 3 (0,9x40mm)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Cellstar® PP-Test Tubes, 15/50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einwegskalpell Nr. 10	Feather Safety Razor, Osaka, Japan
Eppendorf-Pipettenspitzen 0,1-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Gazin® Tupfer aus Verbandmull	Lohmann & Rauscher, Neuwied
Gel Blotting Papier GB 002	Whatman GmbH, Dassel
Mini-Trans-Blot Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nitrozellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel
Nunc Lab Tek Chamber Slide	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Objektträger	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Optical Adhesive Covers (Deckglas)	Applied Biosystems, Foster City, USA
RAW 264.7 cell Makrophagen	LGC Standards, 46485 Wesel, Deutschland
S-Monovette® Li-Heparin	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Blutentnahmesystem (7,5ml Z-Gel)	
Citrat-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican® Injektionskanüle Gr.18, (0,45x25mm)	B. Braun AG, Melsungen
Sterile Flieskompressen	Fink & Walter GmbH, Merchweiler
Tissue-Tek® OCT Compound	Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien
Wundklammer Michel (7,5x1,75mm)	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen

3.1.4. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

10% Ammoniumpersulfat (APS)

APS	10	g
ad Aqua bidest.	100	ml

Homogenisierungs-Puffer (Hg-Puffer)

EDTA	20	mM
EGTA	3	mM
Saccharose	250	mM
Tris-HCl	20	mM
<i>pH</i>	7,5	

Homogenisierungs-Lösung (Hg-Lösung)

Hg-Puffer	10	ml
Protease Inhibitor Cocktail	100	µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail	100	µl
PMSF (0,1 M in Methanol)	50	µl
Triton X-100	100	µl
<i>pH</i>	7,5	

Krebs-Hepes-Puffer (KH)

CaCl ₂	2,5	mM
D-Glukose	11,1	mM
K ₂ HPO ₄	1,03	mM
KCl	4,69	mM
MgSO ₄	1,2	mM
Na-Hepes	20	mM
NaCl	99,01	mM
NaHCO ₃	25	mM
<i>pH</i>	7,4	

Krebs-Hepes-Inhibitoren-Puffer (KH-I)

Aprotinin (1,2 mg/ml)	100	µl
Leupeptin (5 mg/ml)	10	µl
Pepstatin (2,5 mg/ml)	40	µl
ad Krebs-Hepes-Puffer	100	ml
<i>pH</i>	7,4	

Lämmli-Puffer 3-fach*

Bromphenolblau (1% in aq. d.)	300	µl
Glyzerin	3000	µl
Tris-HCl (1M, pH 6,6)	1880	µl
Natriumdodezylsulfat SDS (20%)	3000	µl

*In 850 µl aliquotieren und vor Gebrauch mit jeweils 150 µl 2-Mercaptoethanol versetzen.

Lämmli-Puffer 1-fach

Lämmli-Puffer 3-fach	1	Teil
Hg-Puffer	2	Teile

Laufpuffer SDS-PAGE

Glycin	192	mM
SDS	3,5	mM
Tris-Base	25	mM
<i>pH</i>	7,6	

Organbadpuffer

CaCl ₂	1,87	mM
D-Glukose	11,1	mM
K ₂ HPO ₄	1,03	mM
KCl	4,69	mM
MgSO ₄	1,2	mM
NaCl	118,3	mM
NaHCO ₃	25	mM
<i>pH</i>	7,4	
<i>Temperatur</i>	37 °Celsius	

Sammelgel 4 % (v/v)

Acrylamid (40%)	1	ml
APS (10% w/w)	50	µl
SDS (10% w/w)	50	µl
TEMED	5	µl
Tris-HCl (0,5M, pH 6,6)	1,2	ml
ad Aqua bidest.	3,2	ml

<i>pH</i>	6,6	
Sammelgelpuffer SDS-PAGE		
Tris-HCl	1	M
<i>pH</i>	6,8	

Transferpuffer

Glycin	192	mM
Tris-Base	25	mM
ad Methanol (20% in Aqua bidest.)	1000 ml	

Trenngel 10 % (v/v)

Acrylamid (40%)	2,5	ml
APS (10% w/w)	100	μl
SDS (10% w/w)	100	μl
TEMED	10	μl
Tris-HCl (1,5M, pH 8,8)	2,5	ml
ad Aqua bidest.	4,8	ml
<i>pH</i>	8,8	

Tris-Mem-Puffer

Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free Complete	1	Tablette
Tris-Base	50	mM
ad Aqua bidest.	50	ml
pH	7,4	

Tyrode Puffer

NaCl	140	mM
KCl	2,7	mM
NaH ₂ PO ₄	0,42	mM
NaHCO ₃	12	mM
Glukose	5,5	mM
HEPES	5	mM
ddH ₂ O		

Waschpuffer PBS-T

NaCl	1,5	M
Na ₂ HPO ₄	200	mM
NaH ₂ PO ₄	40	mM
Tween-20	1	ml
Aqua bidest.	ad 1000	ml
pH	7,6	

Waschpuffer PBS-TT

Triton X-100	3	ml
ad Waschpuffer PBS-T	1000	ml
<i>pH</i>	7,6	

Waschpuffer TBS-T

NaCl	1,4	M
Tris-Base	20	mM
Tween-20	1	ml
Aqua bidest.	ad 1000	ml
pH	7,6	

Zellkultur Puffer

Dulbecco's modified Eagle's medium
(DMEM)
#21885-025

Fetales Kälberserum	10	%(v/v)
L-Glutamin	2	mM
Natriumpyruvat	1	mM
Penicillin	50	IU/ml
Streptomycin	50	µg/ml

3.1.5. Kits und Assays:

Bio-Rad Protein assay (Bradford)	Bio-Rad, München
CD11b (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) Reagent	Vector Laboratories, Burlingame, USA
ECE-1 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
ET _B (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
F4/80 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
IL-6 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
MCP-1 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
NOX-2 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
QuantiTect™ Probe RT-PCR kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Fibrous Tissue Minikit	Quiagen, Hilden
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Foster City, USA
TBP (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA

3.1.6. Antikörper

3.1.6.1. Primäre Antikörper

Antigen	Molekulargewicht	Puffer	Blockmedium	Host	Verdünnung	Hersteller
3-Nitrotyrosin (3-NT)	ubiquitär	PBS	5% MLK	Maus	1:1000	Millipore, Billerica, USA
β actin	42 kDa	TBS-T	3% BSA	Kaninchen	1:2500	Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA
ET_B	49 kDa	PBS-T	3% BSA	Kaninchen	1:5000	Abcam, Cambridge, MA, USA
F4/80	102 kDa	PBS	3% MLK	Ratte	1:250	eBioscience, San Diego, USA
IL-6	25 kDa	PBS-T	5% BSA	Kaninchen	1:5000	Abcam, Cambridge, MA, USA
NOX-2	58 kDa	TBS-T	3% BSA	Maus	1:500	BD Bioscience, CA, USA

Tabelle 3-1: Primäre Antikörper

Liste aller primären Antikörper, die bei dem Western- und Dot-Blot Verfahren zum Nachweis und der Quantifizierung von Antigenen genutzt wurden. Da 3-NT ein modifiziertes Protein ist, hat es in der Literatur kein klar definiertes Molekulargewicht. Abkürzungen: BSA = bovines Serumalbumin, MLK = Milchpulver

3.1.6.2. Sekundäre Antikörper

Antigen	Molekular - gewicht	Puffer	Blockmedium	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG	Blockmedien und Puffer sind identisch zu den im primären Antikörper verwendeten Blockmedien und Puffern.			Ziege	1:10000	Vector Lab., Burlingame, CA
Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen IgG				Ziege	1:10000	Vector Lab., Burlingame, CA
Peroxidase gekoppelter anti-Ratten IgG				Ziege	1:5000	Vector Lab., Burlingame, CA

Tabelle 3-2: Sekundäre Antikörper

Liste aller sekundären Antikörper, die bei dem Western- und Dot-Blot Verfahren zum Nachweis und der Quantifizierung von Antigenen genutzt wurden. Sie wurden in den Blockmedien und Puffern des jeweiligen Primärantikörpers gelöst.

3.1.7. Geräte und Materialien

<u>Name</u>	<u>Hersteller und Produktionsort</u>
Bridge Bioamplifier ETH 255	C.B. Sciences Inc., Dover, USA
Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Durchlichtmikroskop MZ 5400	A. Kruss Optronic GmbH, Hamburg
Federscheren	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinwaage ARJ 120-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Feinwaage LE225D	Sartorius AG, Göttingen
Festtemperaturdewar	Magnettech GmbH, Berlin
Filterpapier (Mini Trans- BlotR)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizplatte Leica	Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Homogenisator RW16 Basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
InnovaR CO2 Incubator Brutschrank	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Isometrische Transducer	Kent Scientific Corp., Torrington, USA
Isometrische Transducer	Radnoti LLC, Monrovia, USA
IVIS Spectrum Imaging System	PerkinElmer, Waltham, USA
Kaltlicht Lampe KL 1500 Electronic	Schott AG, Mainz

Kuhlplatte Leica	Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Magnetrührer	MR Heidolph Instruments, Schwabach
Micro 22R Typ 1110 , Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Microplate Reader MRX II Dynex UV/Vis Absorption	iLF Bioserve, Langenau
Mikroliter Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Mikropinzette	Stoss Medika, Wiesbaden
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskopfilter Typ ,9' BB450-490, FT510, LP515	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskopfilter Typ ,14' BB510-560, FT 580, LP 590	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskopkamera AxioCam MRm	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Milenia Kinetic EIA System	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Mini-PROTEAN®III SDS-PAGE System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-PROTEAN®III Trans-Blot® Module	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MiniScope MS400	Magnettech GmbH, Berlin
Mini Spin Plus 5435	Eppendorf AG, Hamburg
MinifoldR I System (Dot-Blot System)	Whatman GmbH, Dassel
Octal Bridge Amp ML228	ADInstruments, Sydney, Australien
Organbäder	Kent Scientific Corp., Torrington, USA
Organbäder	Radnoti LLC, Monrovia, USA
pH-Meter GPHR1400A	GHM Messtechnik GmbH, Greisinger
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Pipetman Gilson Inc., Middleton, USA
Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Powerlab 8/30 ML870	ADInstruments, Sydney, Australien
Powerlab 8sp	ADInstruments, Sydney, Australien
Präzisionsscheren	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Quecksilberdampf Kurzbogenlampe HBO 50	Osram, München
Rotofix 32 Typ 1205	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Sonopuls HD/GM 2070	Bandelin electronic GmbH & CO. KG, Berlin
Sonoplus Ultraschallnadel UW 2070	Bandelin electronic GmbH & CO. KG, Berlin
Test Tube Thermostat TCR 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Thermomixer Comfort MTP 5355	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat 2761	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Genie 2 G560E	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserstrahlpumpe	VWR International GmbH, Darmstadt
Western Blot Imager Chemicam HR 16	Intas Science Imaging, Göttingen
Hämatologieanalysator KX-21N	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt

HPLC:

Autosampler (AS2057)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Data Solution Controller (LCNetII/ ADC)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Fluoreszenz-Detektor (FP-920)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Pumpen (PU2080 Plus)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Säulenofen (CO2067)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
UV/VIS-Detektor (UV-2077)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Vakuum Degasser (DG2080-53)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt

3.1.8. Software

<u>Name und Funktion</u>	<u>Hersteller</u>
Adobe Photoshop CS2, Version 9.0.2 (Bildaufbereitung)	Adobe Systems GmbH, München
Axiovision Rel 4.3 (Mikroskopie)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
ChemiLux Imager CsX-1400 M (Dot Blot/ Western Blot Analyse)	Intas GmbH, Göttingen
Chrom Pass, HPLC Software	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Corel Draw X4 (ESR Messung und Auswertung)	Corel Corp., Ottawa, Kanada
Gel-Pro Analyzer™ 6.0 (Dot Blot /Western Blot Analyse)	Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA
GraphPad Prism 6.0d (Datenanalyse)	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Lab Chart (Datenanalyse Organbad)	ADInstruments, Sydney, Australien
Living Image® Software (Fluoreszenzaufnahmen)	PerkinElmer, Waltham, USA
MikroWin 2000 (Oxidativer Burst, Centro)	Mikrotek-Laborsysteme, Overath
Microsoft Office 2013 (Datenverarbeitung, Dokumentation)	Redmond, Washington, USA
Revelation 4.25 (Proteinbestimmung)	iLF Bioserve, Langenau

3.2. Methoden

3.2.1. Versuchstiere

Alle tierexperimentellen Versuche wurden in Übereinkunft mit der *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, verabschiedet durch die *National Institutes of Health*, Maryland, USA durchgeführt. Alle Versuchsprotokolle wurden zusätzlich von der Ethikkommission der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz geprüft und offiziell vom Landesuntersuchungsamt Koblenz (#23177-07/G 12-1-084 und G14-1-028) genehmigt. Alle Eingriffe, sowie Organ- und Gewebepräparationen wurden nach etablierten Standards für die ethische Behandlung von Tieren durchgeführt.

Zur Durchführung einer ISDN Pilotstudie wurden männliche, 350 Gramm schwere und 8 Wochen alte Wistar Ratten der Charles River Laboratorien (Sulzfeld, Deutschland) über einen Zeitraum von sieben Tagen unter Beimischung des Wirkstoffes in das Trinkwasser mit ISDN (0, 10, 25, oder 50 mg/kg/d) behandelt. Männliche C57BL/6j Mäuse (10-12 Wochen alt, 25-30 Gramm schwer) wurden vom hauseigenen Tierstall bereitgestellt. Während dieser Zeit wurden alle Tiere im Tierstall unter Standardbedingungen der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gehalten.

Aufgrund der fehlenden endothelialen Dysfunktion (Abbildung 4-5 a) bei der Pilotstudie an Ratten, bei denen das ISDN durch Beimischung in das Trinkwasser verabreicht wurde, wurde bei den Mäusen auf die bewährte Darreichung von ISMN und ISDN mithilfe von osmotischen Pumpen, die subkutan implantiert wurden, zurückgegriffen. Die Aufnahme der Wirkstoffe zeigte sich bei den Mäusen bei der ESR-Messung des HbNO durch ein deutliches Signal in der ISMN- und ISDN-Gruppe, was nach Erfahrungen in früheren Studien in Kontrollmäusen nicht zu beobachten ist (Abbildung 4-7).

Die Gabe von ISMN (75mg/kg/d) und ISDN (25mg/kg/d) an die Mäuse erfolgte über osmotische Minipumpen (Model 2007, ALZET, Cupertino, USA.), die in das subkutane Fettgewebe implantiert wurden (Abbildung 3-1). In den Kontrollgruppen wurde nur das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) über die Pumpen verabreicht.

3.2.2. Aufbau und Funktionsweise der osmotischen Pumpen:

Jede Pumpe hat eine voreingestellte Flussrate und garantiert eine kontinuierliche Freigabe des Wirkstoffes (hier: ISMN und ISDN) in das Gewebe, unabhängig von der chemischen Beschaffenheit des Wirkstoffes (Molekulargewicht, Ionisierung etc.). Die Pumpe ist wie folgt aufgebaut (Abbildung 3-1):

Im Inneren liegt das undurchlässige Reservoir für den Wirkstoff, welches über einen nadelgroßen Führungsgang mit der Spitze der Pumpe verbunden ist. Außen liegt eine semipermeable Membran, die für Wasser, aber nicht für Teilchen oder Stoffe aus der osmotischen Schicht durchlässig ist. Durch die osmotische Wirkung wird Flüssigkeit aus dem Gewebe durch die Membran in die osmotische Schicht gezogen. Dies bewirkt eine Ausdehnung und damit einen kontinuierlichen Druck, ähnlich dem Auspressen

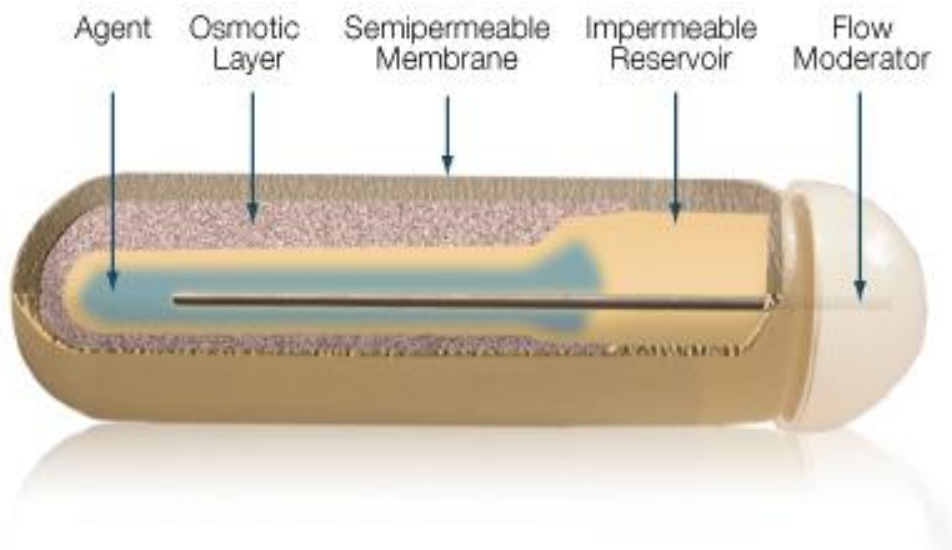


Abbildung 3-1 Osmotische Pumpe (ALZET)

Durch den gleichmäßigen Druck über die osmotische Schicht wird der Wirkstoff in einer kontinuierlichen Flussrate über den Führungsgang und die Spitze in das Gewebe abgegeben. Abbildung aus (94)

einer Tube, auf das innere Reservoir und den Wirkstoff. Dadurch wird der Wirkstoff kontinuierlich über den kleinen Führungskanal an die Spitze und in das Gewebe abgegeben. Die Beschaffenheit der osmotischen Schicht und der semipermeablen Membran entscheiden über den Druck auf das Reservoir und damit über die Flussrate (10, 95). Die Mäuse erhielten das Macitentan als Suspension in Olivenöl mittels täglicher, oraler Sondengabe von 30mg/kg/d.

Zur übersichtlichen Darstellung aller Gruppen und Behandlungen in den zwei tierexperimentellen Studien dient folgende Tabelle:

Gruppenbezeichnung	Tierart	Behandlung I ISMN (in mg/kg/d) via osmotischer Pumpe	Behandlung II ISDN (in mg/kg/d) via osmotischer Pumpe)	Behandlung III Macitentan in mg/kg/d via Sondengabe	Behandlung IV ISDN (in mg/kg/d) durch Gabe in Trinkwasser
Hauptstudie					
Kontrolle (B6)	Maus	-	-	-	-
ISMN	Maus	75	-	-	-
ISMN+Maci	Maus	75	-	30	
ISDN	Maus	-	25	-	-
ISDN+Maci	Maus	-	25	30	-
Pilotstudie					
Kontrolle (CTR)	Ratte	-	-	-	-
ISDN 10	Ratte	-	-	-	10
ISDN 25	Ratte	-	-	-	25
ISDN 50	Ratte	-	-	-	50

Tabelle 3-3 Studienprotokoll

Zur übersichtlichen Darstellung aller tierexperimentellen Gruppen und Behandlungen.

3.2.3. Menschliche Proben (Nebenstudie an isolierten Leukozyten):

Die Handhabung und Nutzung menschlichen Probematerials erfolgte in Übereinkunft mit der Deklaration von Helsinki (96). Es handelte sich um Überschussmaterial aus genehmigten Studien. Humane, neutrophile Granulozyten (PMNs) wurden unter Gabe aufsteigender Dosen von Macitentan bei gleichzeitiger Stimulierung der leukozytären NOX-2 untersucht. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte erklärt.

3.2.3.1. Isolierung und Aktivierung von PMNs:

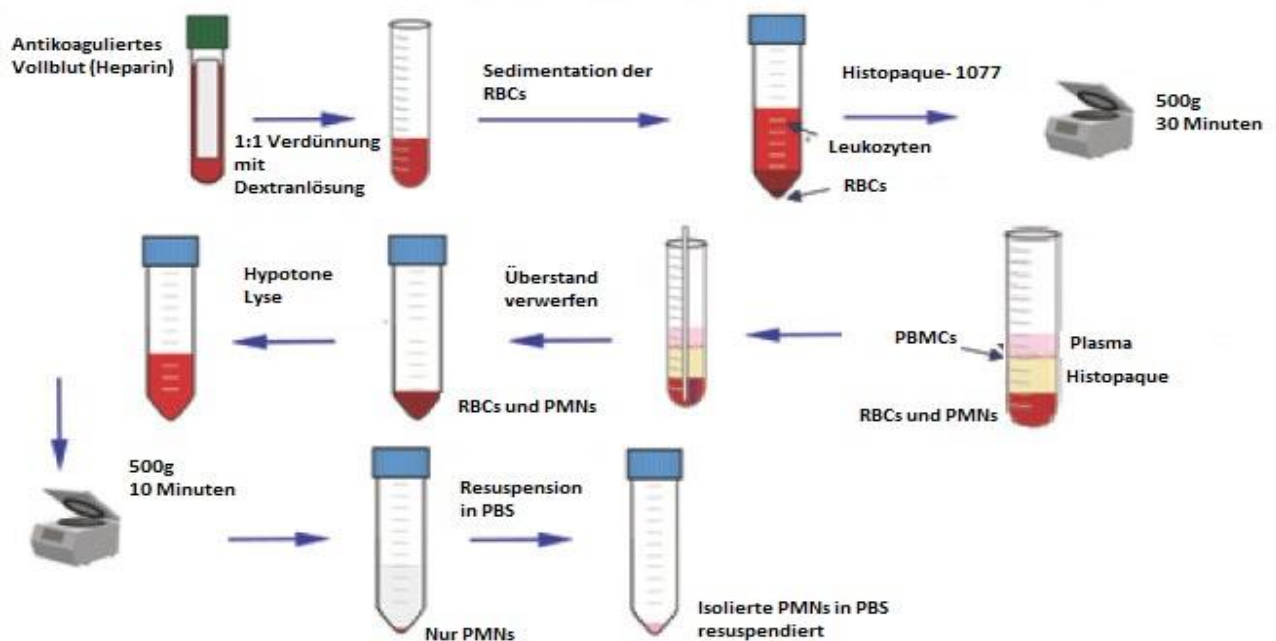


Abbildung 3-2 Isolierung der PMNs

Die Isolierung erfolgt in mehreren Teilschritten (siehe Text Abschnitt 3.2.3.1.). Nach der ersten Zentrifugation kommt es zur charakteristischen Phasenbildung. Die Schicht zwischen der Histopaque-1077 Lösung und Plasma wird als buffy coat bezeichnet und enthält periphere, mononukleäre Zellen (Makrophagen und Lymphozyten). Der untere Abschnitt enthält die zu isolierenden PMNs und RBCs. Abbildung aus (97).

Menschliche Vollblutproben gesunder Probanden wurden mithilfe der peripheren Venenpunktion am Arm mit einer Flügelkanüle („butterfly“) in heparinhaltige Monovetten (3 x 7,5 ml) überführt. Zur Sedimentation der Erythrozyten (RBCs) wurde zu den Vollblutproben das gleiche Volumen an Dextranlösung (Molekülmasse (MW): 485,000, Konzentration: 40 mg/ml PBS) hinzugegeben. Nach Sedimentation der Erythrozyten (RBCs) wurde der leukozytenreiche Überstand mit der Histopaque-1077-Lösung (Dichte: 1,077 g/ml, Sigma Aldrich) versetzt und für 30 Minuten zentrifugiert (500g, 20°C). Es bildet sich eine charakteristische Phasenbildung des Blutes (siehe rechts in Abbildung 3-2).

Der grüulich-durchsichtige Schleier zwischen dem Plasma und der Histopaque Lösung (sog. buffy coat) enthält Makrophagen und Lymphozyten, die als periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMC) bezeichnet werden. Im unteren Abschnitt befinden sich die zu isolierenden neutrophilen Granulozyten (PMNs) und wenige verbliebene Erythrozyten. Der Überstand wurde bis auf die untere Phase verworfen. Die RBCs wurden unter wiederholten Waschschrinen mit destilliertem Wasser durch hypotone Lyse entfernt, um die PMNs zu isolieren. Dazu wurde destilliertes Wasser hinzugegeben und die Lösung anschließend zentrifugiert (500g, 10min). Die verbleibenden PMNs wurden dann in PBS resuspendiert. Der Schritt mit destilliertem Wasser wurde so oft wiederholt, bis makroskopisch keine RBCs mehr zu sehen waren (üblicherweise 2-3-mal) und sich ein überwiegend weißes Pellet am Boden des Gefäßes absetzte, das der PMN Fraktion entspricht.

Die Reinheit und Konzentration der PMNs wurde mit einem automatischen Hämatologieanalysator KX-21N (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland) bestimmt. Der Anteil neutrophiler Granulozyten in der Lösung betrug typischerweise zwischen 80-90%. Die Konzentration wurde bestimmt und ggf. mit PBS verdünnt. Für die Chemilumineszenzmessungen wurde eine finale Konzentration von 10^4 PMNs/ml und für die Messungen an der HPLC mit DHE wurde eine finale Konzentration von 10^6 PMNs/ml verwendet.

3.2.3.2. Durchführung der Granulozyten-abhängigen ROS und Superoxid

Bildung mittels Chemilumineszenz und Fluoreszenz Farbstoffen

Die isolierten PMNs wurden in sechs Reihen á acht Wells á 200 μ l auf einer 96-well Platte aufgetragen.

Um die leukozytäre NOX der PMNs zu aktivieren, wurden bis auf die Negativkontrolle alle anderen Reihen der Platte mit dem Phorbolsterderivat Phorbol 12,13 dibutyrat (PDBu), einem direkten Aktivator der Proteinkinase C (PKC), in einer finalen Konzentration von 10 μ M versetzt. Da der Signalweg der PKC calciumabhängig ist und handelsübliche PBS-Lösungen kein Calcium enthalten, wurden die Versuche in PBS mit 1mM Calcium und Magnesium durchgeführt.

In aufsteigender finaler Konzentration von 0 zu 1 zu 10 zu 100 zu 1000 μ M wurde Macitentan jeweils in die zweite bis sechste Reihe hinzugegeben. Die erste Reihe diente als Basalwert und enthielt nur die PMNs, also weder PDBu noch Macitentan.

3.2.3.3. Die Detektion von ROS mithilfe der Chemilumineszenz

Das Messprinzip der Chemilumineszenz basiert auf Photonen, die bei einer chemischen Reaktion emittiert werden. In der chemischen Reaktion treten die Edukte zunächst in einen energetisch höheren Zwischenzustand ein. Daraufhin wird die Energie in Form elektromagnetischer Wellen abgegeben, sodass die Produkte erneut auf ein energetisch niedrigeres Niveau abfallen. Bezogen auf das Atommodell kommt es zur energetischen Anregung eines Elektrons auf ein höheres Orbital („*promotion*“), das beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Niveau Energie in Form von Photonen ausstrahlt (Abbildung 3-3). Die Wellenlänge des emittierten Lichtes hängt von der Menge der freiwerdenden Energie ab. Liegt die Wellenlänge dieses Lichtes im Bereich des sichtbaren Lichtes, so kann man den Farbumschlag sehen und mit dem Detektor eines Chemilumineszenzreaders messen (98).

Die Messung des entstehenden Superoxids erfolgte indirekt nach Umwandlung in Wasserstoffperoxid und dessen Reaktion mit den Peroxidasen in den PMNs auf Basis der *L-012 enhanced chemiluminescence* (ECL). Der verwendete Chemilumineszenzfarbstoff ist L-012, ein Derivat des Chemilumineszenzfarbstoffs Luminol, der zur allgemeinen Detektion von ROS dient. Bei Reaktion mit ROS emittiert L-012 Licht, das von dem Chemilumineszenz-Platereader detektiert wird. Die Konzentration des Farbstoffs L-012 betrug 100 µM. Die Messung erfolgte bei 37°C in einem Centro Platereader für Chemilumineszenz (Berthold Technology, Bad Wildbad, Deutschland) und wurde in der Einheit counts/s angegeben. Zur Auswertung des Chemilumineszenzsignals durch PDBu wurde der 20-Minuten-Wert der jeweiligen Gruppe herangezogen. In Vorstudien unserer Arbeitsgruppe konnten wir bereits zeigen, dass dies der optimale Zeitrahmen ist, in der die Chemilumineszenzkinetik für PDBu nach 20-25 Minuten ein Maximum erreicht (76).

3.2.3.4. Die Detektion von ROS mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Dihydroethidium (DHE) in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

DHE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 355nm blaues Licht (420nm) emittiert. Tritt DHE mit ROS in Kontakt wird es zu 2-hydroxyethidium (2-HE) und Ethidium oxidiert. Das 2-HE wiederum emittiert rotes Licht der Wellenlänge (605nm), wenn es mit Licht der Wellenlänge 518nm angeregt wird (99). Diese anerkannte Methode hat man sich sowohl bei der Darstellung von ROS in fluoreszenzmikroskopischen Bildern als auch in der Messung mittels HPLC zu Nutzen gemacht.

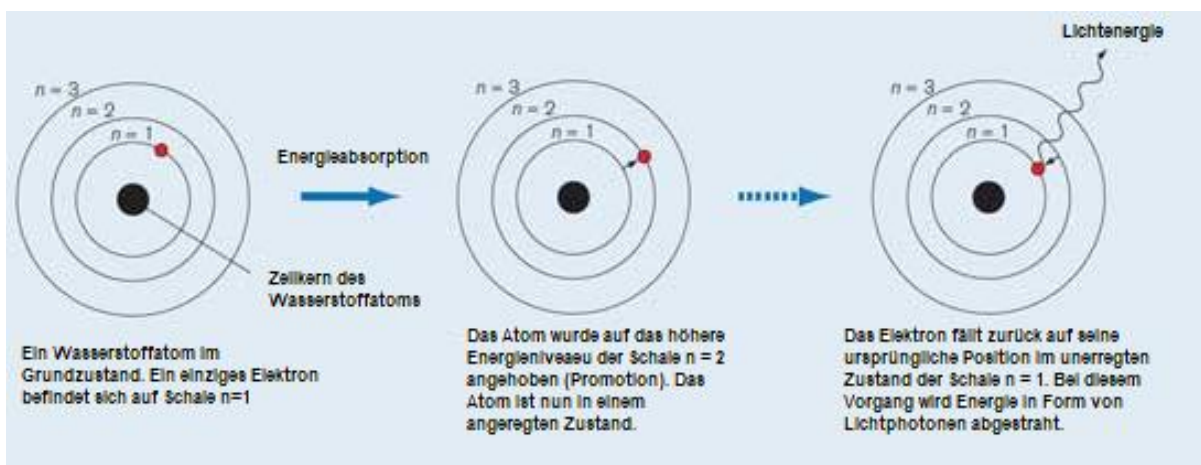


Abbildung 3-3: Die Entstehung des Chemilumineszenzsignals dargestellt am Wasserstoffatom

Das Proton ist im Kern, das Elektron kreist im ersten Orbital ($n=1$) um den Kern. Durch die chemische Reaktion der Edukte wird Energie frei. Diese Energie wird durch das Elektron aufgenommen und führt zu dessen Anhebung auf ein höheres Energieniveau, dem zweiten Orbital ($n=2$, Promotion), es ist angeregt. Ohne weitere Energieabsorption fällt das Elektron zurück auf das niedrige Energieniveau, dem ersten Orbital ($n=1$). Dabei strahlt es Energie in Form von Licht (Photonen) ab, welche vom Chemilumineszenzdetektor gemessen werden. Je nach Wellenlänge (ca. 400 – 750nm) ist das Licht auch mit dem bloßen Auge sichtbar. Abbildung modifiziert aus (98).

Die HPLC ist ein spezifisches chemisches Analyseverfahren, das die in flüssigen Proben enthaltenen Stoffe nach ihrer Polarität, auftrennen kann und ihre Konzentrationen anhand ihrem Fluoreszenzverhalten und ihrer UV-Lichtabsorption quantifizieren kann. Sie ermöglicht eine sehr genaue Identifikation verschiedener Bestandteile in komplexen Lösungen.

Die HPLC ist ein geschlossenes System, in dem kontinuierlich ein individuell einstellbares Laufmittel in einem einstellbaren Druckniveau fließt (100). Es besteht aus mehreren in Reihe geschalteten Bestandteilen:

Zwei Pumpen, ein Entgaser, Kontrolleinheiten, Autosampler und Mixer, die für die Homogenität und Zusammensetzung des flüssigen Milieus und der Hinzugabe von Proben in das System verantwortlich sind. Das Herzstück stellt die Säule dar, auf der die eigentliche Trennung der Substanzen erfolgt. Die anschließenden UV- und Fluoreszenzdetektoren sind von Bedeutung für die Detektion und Quantifizierung der verschiedenen Stoffe.

Vereinfacht ausgedrückt durchläuft die hinzugegebene Probe folgende Schritte: Ein gesuchter Stoff „X“ wird in das System gegeben. Zunächst gelangt dieser durch eine sogenannte Vorsäule, die als Filter für das System schädigende Stoffe zurückhalten soll, auf die Hauptsäule. Je nach Polarität des Stoffes wird dieser länger oder kürzer mit der Säule (der sog. stationären Phase) interagieren. Ist die chemische Zusammensetzung der feinen Gelpartikel der Säule unpolar, wird sie länger mit unpolaren Substanzen interagieren und andersherum. Das Verwenden einer unpolaren Säule wird als Umkehrphasenchromatographie (*reverse phase chromatography*, RP-HPLC) bezeichnet und ist die am häufigsten verwendete Form der HPLC-Analyse, da sie mit wässrigen Lösungsmitteln betrieben werden kann, wie sie für biologische Proben verwendet werden. Die Säule enthält Silikat (SiO_2)-haltige Partikel, deren Si-OH-Gruppen mit langkettigen Kohlenwasserstoffresten verbunden sind und damit unpolar werden. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Retentionszeit ist die Porengröße der feinen Gelpartikel der Säule. Dementsprechend wird der Stoff früher oder später aus der Säule austreten (eluiert) und mit den nachgeschalteten UV- und Fluoreszenzdetektoren messbar. Die mobile Phase stellt das im System zirkulierende Laufmittel dar. Dessen Zusammensetzung und Polarität kann ebenfalls reguliert werden, indem prozentual mehr oder weniger polare oder unpolare Laufmittel verwendet werden. Unter standardisierten Bedingungen können mit der Säule (stationäre Phase), sowie dem Laufmittel (mobile Phase) reproduzierbare Retentionszeiten für einzelne Stoffe ermittelt werden. Diese Retentionszeit stellt bereits eine erste Eigenschaft des gesuchten Stoffes dar und hilft, diesen genauer zu identifizieren (100).

Im nächsten Schritt werden die Fluoreszenzeigenschaften (Wellenlängen der Extinktion und Emission) und die UV-Absorption (Wellenlänge des Absorptionsmaximums) des Stoffes getestet und geben weitere Informationen über die untersuchte Substanz. Ist der Stoff bekannt und es wird nur dessen Konzentration gesucht, so werden vorher Standards definierter Konzentrationen desselben Stoffes

gemessen. Die Detektoren liefern ein kontinuierliches elektrisches Signal an die Software, dessen zeitlicher Verlauf als Chromatogramm bezeichnet wird, wobei die gesuchten Substanzen ein höheres elektrisches Signal induzieren und dadurch Ausschläge, sogenannte Peaks generieren. Die Peaks in der Messkurve der Fluoreszenz bzw. UV-Detektion werden quantifiziert, indem die Fläche unter der Kurve (AUC, *area under the curve*) gemessen wird. Die Konzentration des gesuchten Stoffes „X“ wird dann aus dem Verhältnis der Größe der AUC des gesuchten Stoffes im Verhältnis zur Größe der AUC für die bekannte Konzentration des Standards gemessen.

Somit dienen die Säule (stationäre Phase) und das Laufmittel (mobile Phase) der Bestimmung der Retentionszeit, die nachgeschalteten Fluoreszenz- und UV-Detektoren den jeweiligen Charakteristiken des Stoffes und die Standardkurve der Bestimmung der genauen Konzentration.

Im durchgeführten Experiment mit PMNs und DHE als Fluoreszenzfarbstoff wurde dies wie folgt durchgeführt:

Die PMNs ($10^6/\text{ml}$) wurden mit $10\ \mu\text{M}$ PDBu und $50\ \mu\text{M}$ DHE für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. $50\ \mu\text{l}$ des zellfreien Überstands wurde durch die Spritze des vollautomatischen Autosamplers (AS-2057 plus, Marke: Jasco (Groß-Umstadt)) in das System überführt. Die verwendete Säule (C_{18} - Nucleosil 100-3, Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)) ist unpolar im Sinne einer RP-HPLC. Das Laufmittel (mobile Phase) bestand aus 50mM Citratpuffer, pH 2,2 (Lösungsmittel A), die die polare Komponente darstellte, und als organische, unpolare Komponente diente Acetonitril mit 10% Wasser-Anteil (Lösungsmittel B).

Der prozentuale Anteil der Acetonitrillösung war zeitabhängig wie folgt:

0 min, 40%; 7 min, 45%; 8–12 min, 100%; 13 min, 40%.

Die Flussrate betrug $1\text{ml}/\text{min}$. Das Edukt DHE wurde durch dessen Absorptionsmaximum von 355nm detektiert, wohingegen die Produkte 2-HE und Ethidium durch ihr Fluoreszenzverhalten (Ex. 480nm /Em. 580nm) gemessen wurden. Als Standard wurde eine 2-HE-Lösung bekannter Konzentration verwendet. Im Versuch wurde die ROS-Produktion mit $10\ \mu\text{M}$ PDBu stimuliert und Macitentan in aufsteigenden Dosen von 0, 1, 100 und $1000\ \mu\text{M}$ in jeweils eine Probengruppe hinzugefügt und inkubiert. Als Basalwert wurde in einer Gruppe weder PDBu noch Macitentan hinzugegeben. Die Auswertung erfolgte mithilfe der produkteigenen

Software Chrom Pass (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt). Für jede Gruppe wurde die AUC relativ zur AUC der Standardkurve angegeben.

3.2.4. Zellkultur (Nebenstudie):

Um den Einfluss von GTN, ISMN und ISDN auf Leukozyten zu untersuchen, wurden Zellkulturen von RAW 264.7 cell Makrophagen (LGC Standards, 46485 Wesel, Deutschland) aus der gewöhnlichen Hausmaus (*Mus Musculus*) verwendet. Unter einer sterilen Werkbank (*Laminar flow cabinet*) wurden die Zellen unter strikter Einhaltung steriler Bedingungen für die Arbeit mit Zellkulturen kultiviert und behandelt. Als Zellmedium wurde das *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM-NM, #21885-025). Die Zellkultur wurde mit Unterstützung von Frau Angelica Karpi (MTA) durchgeführt.

Glutamin ist elementarer Bestandteil des Zellmetabolismus und als Stickstoffdonor u.a. in der DNA-Synthese und der Proteinbiosynthese von hoher Bedeutung. Insbesondere in schnell proliferierenden Zellen muss es deshalb in hohen Konzentrationen vorhanden sein. Im Säugetierorganismus gilt Glutamin als nicht-essentielle Aminosäure, da es in der Leber und Niere aus Glutamat synthetisiert werden kann. Im Zellkulturmedium von Leukozyten fehlt diese Glutaminquelle jedoch, was Glutamin in dem Fall zur essentiellen Aminosäure macht (101). Deshalb muss Glutamin zur Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus hinzugefügt werden, was in der Zellkultur mithilfe des Zellkultursupplements GlutaMAX gemacht wurde. Als Zellkontaminationsprophylaxe wurden die Antibiotika Penicillin (50 IU/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank mit 10% CO₂ Konzentration begast. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 subkultiviert.

Für die Durchführung der Chemilumineszenzassays wurden die Zellen zunächst auf 96- oder 6- Wellplatten mit einer finalen Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/Well übertragen. Danach wurden diese mit aufsteigender Konzentration der Nitrate GTN (0,01 µM-100µM), ISMN (1-100µM) und ISDN (1-100µM) für 24h inkubiert. In jeder Versuchsreihe wurde die erste Gruppe als Basalwert lediglich mit dem Medium ohne Nitrate inkubiert. Der Chemilumineszenzassay erfolgte mit PDBu (10µM) als Stimulator und L-012 (100µM) als Chemilumineszenzfarbstoff in 1mM PBS + Ca/Mg Puffer.

Im Anschluss daran wurden die Zellen doppelt mit PBS gewaschen und nach komplettem Absaugen des PBS auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C

gelagert. Die Proben wurden zu einem späteren Zeitpunkt für die Dot-Blot Analyse für 3-Nitrotyrosin und Interleukin-6 genutzt (siehe Abschnitt 4.2.11.4.).

3.2.5. Organentnahme und Präparation der entnommenen Gewebe

Nach einer Behandlungswoche wurden die Ratten und Mäuse mit einer Überdosis des verdampfenden Narkotikums Isofluran getötet. Für die Organentnahme wurde zuerst ein von kranial nach kaudal verlaufender Mediansagittalschnitt gesetzt. Dann wurde die Muskulatur auf Höhe des Zwerchfells und das Zwerchfell selbst durchtrennt und damit Zugang zu Abdomen und Thorax ermöglicht. Am schlagenden Herzen wurde 200IU Heparin zur Antikoagulation mit einer feinen Injektionsnadel (20G) in den linken Ventrikel gespritzt. Maximal mögliche Mengen an Blut (ca. 10 ml bei den Ratten und ca. 1 ml bei den Mäusen) wurden daraufhin mit einer zweiten Spritze aus dem rechten Ventrikel entnommen und in Reaktionsgefäße überführt.

Um die trockene Ischämiezeit möglichst kurz zu halten, wurden alle vom Herz abgehenden Gefäße getrennt und das Herz in 4°C kalten Krebs-Hepes-Puffer (KH) überführt. Daraufhin wurde die Aorta freigelegt, in ihrem Verlauf bis in das Abdomen behutsam vom umliegenden Bindegewebe freipräpariert und ebenfalls in ein Gefäß mit 4°C kaltem KH überführt. Bei der weiteren Präparation im Labor wurde mit Hilfe einer sehr feinen chirurgischen Pinzette und Federschere das gesamte Gefäß von noch anhaftendem, überschüssigem perivaskulärem Bindegewebe befreit und anschließend mit einem Skalpell quer zur Verlaufsrichtung in die für die jeweiligen Versuche erforderlichen Segmente geschnitten.

3.2.6. Organbad und isometrische Spannungsmessungen

Nach der Entnahme der Aorta wird diese zunächst unter dem Mikroskop vom Bindegewebe befreit und anschließend werden aus ihr ca. 4mm lange Aortenringsegmente, welche den isometrischen Spannungsmessungen im Organbad dienen. Die Messungen wurden mit Unterstützung von Herrn J. Schreiner (MTA) bzw. Frau J. Rudolph (MTA) durchgeführt.

Das Organbad ist eine Vorrichtung, in der die isolierten Aortenringe in eine Halterung eingespannt werden und mithilfe feiner Transducer Änderungen in dessen Innendurchmesser (Kontraktion und Dilatation) gemessen werden können. Die Halterung besteht aus zwei dreieckigen Drähten, bei denen der eine den eingespannten Ring fixiert und der andere zusätzlich mit einem Transducer verbunden

ist, der bei Zug- oder Druckkräften feine Unterschiede registrieren und diese digitalisieren kann. Dieser Halteapparat ist umgeben von einem becherförmigen, gläsernen Wasserbad, das oben offen ist (Zugabe von Wirkstoffen) und unten einen Zufluss für einen auf 37°C erwärmten Krebs-Henseleit-Puffer (Organbadpuffer, 4.1.4) und ein Gasgemisch (95% O₂ und 5% CO₂) besitzt (Abbildung 3-4). Der Puffer und das Gasgemisch werden für die Nachahmung eines physiologischen Milieus benötigt. Die Messung wird als isometrisch bezeichnet, weil der Muskel (bzw. die ringförmige Muskelschicht der Aorta) an zwei Punkten fixiert wird und dieser dann kontrahieren soll.

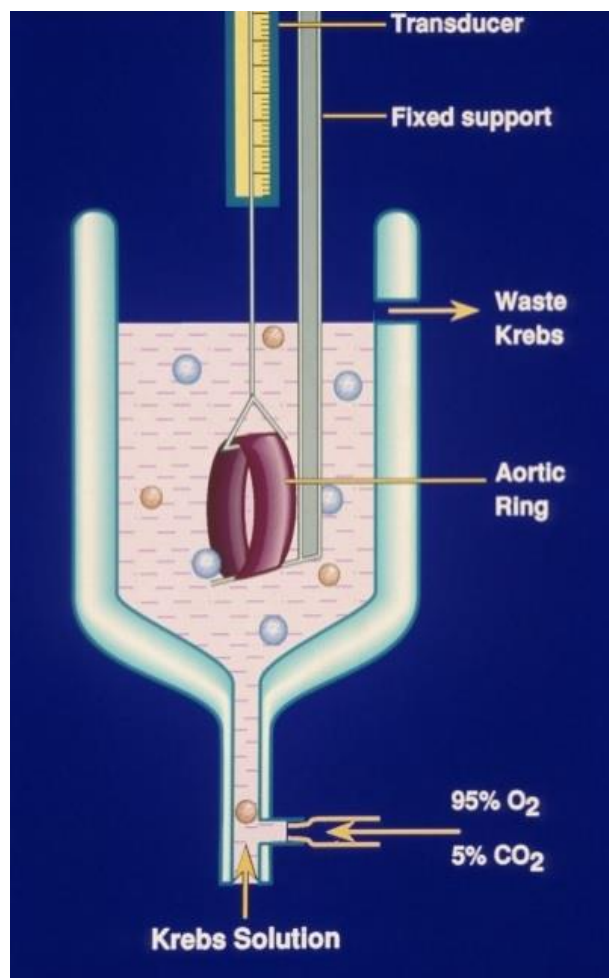


Abbildung 3-4 Aufbau des Organbads

Der Aortenring wird mithilfe von Drähten fixiert, wobei eines der Drähte mit einem Transducer verbunden ist, der die Unterschiede im Durchmesser aufzeichnet. Die Haltevorrichtung ist umgeben von einem möglichst physiologischen Umfeld bestehend aus einem oben offenen Glaszylinder und einer Zufuhr für den 37°C warmen Krebs-Henseleit-Puffer und dem Gasgemisch (95% O₂ und 5%CO₂). Abbildung aus (102).

Entgegen der isotonischen Kontraktion, wird bei der isometrischen der Muskel nicht verkürzt, sondern lediglich in einem fixen Punkt kontrahiert (103). Nach Einspannung des Aortenringes in das Organbad, wurde der Ring passiv in Abständen von jeweils 7 Minuten von 0,4 über 1,0, 1,6 und 2,3 auf 3,0 Gramm vorgespannt. Der zuletzt gemessene Wert wurde als Basalspannung definiert. Zum Test der Kontraktilität wurde in aufsteigenden Konzentrationen Kaliumchlorid (KCl, bis 80mM) in das Bad gegeben. Bei adäquater Konstriktion des Gefäßes wurde das KCl ausgewaschen bis die Spannung wieder auf den Basalwert zurückgekommen ist.

Daraufhin wurde bei Ratten der vasokonstriktorisch wirkende α_1 -Adrenozeptoragonist Phenylephrin (0,5-1 μ M) und bei Mäusen Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (2-4 μ M) hinzugegeben, bis der Aortendurchmesser auf einem stabilen Plateau von 50-60% der vormals durch KCl bestimmten Maximalkontraktion vorkontrahiert wurde. Als initiales Screening zum Test der allgemeinen endothelialen Funktion wurde der natürliche Agonist Acetylcholin in aufsteigenden Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-5} M in das Organbad hinzugegeben. Bei intaktem Endothel bindet Acetylcholin an membranständige muskarinerge M_3 -Rezeptoren im Endothel und führt über den G_q -gekoppelten Signalweg u.a. zur Erhöhung von Diacylglycerin und daraufhin zur Erhöhung von Inositoltrisphosphat (IP_3). IP_3 induziert über Bindung an das glatte endoplasmatische Retikulum die intrazelluläre Freisetzung von Calcium, welches daraufhin die eNOS zur Freisetzung von •NO aus L-Arginin stimuliert. Das membrangängige •NO diffundiert vom Endothel in die glatten Muskelzellen und bewirkt dort eine Vasodilatation. Gleichzeitig bindet Acetylcholin auch an muskarinerge M_3 -Rezeptoren in glatten Muskelzellen und führt dort zu einer Calcium-vermittelten Vasokonstriktion (IP_3 -abhängige Aktivierung der Myosin-Leichtkettenkinase, welche die leichte Myosinkette phosphoryliert und damit eine Bindung zu Aktin herstellt und die Kontraktion einleitet) (36). Bei intaktem Endothel überwiegt die endotheliale •NO-Freisetzung und führt so zur Vasodilatation. Bei der endothelialen Dysfunktion setzt das Endothel auf den Reiz mit Acetylcholin nicht adäquat •NO frei. Dies hat zur Folge, dass in den glatten Muskelzellen eine Acetylcholin-induzierte Kontraktion der endothelialen Dilatation entgegenwirkt und sich das Gefäß weniger entspannt, ggf. sogar kontrahiert. Dieses Phänomen wird als paradoxe Vasokonstriktion bezeichnet (siehe Abschnitt 2.4.2.) (28). Bei Messungen mit den endothelunabhängigen organischen Nitraten GTN, ISMN und ISDN anstelle des Acetylcholins wurden diese ebenfalls in aufsteigenden Konzentrationen (GTN: 10^{-9} bis 10^{-5} M; ISMN: 10^{-7} bis 10^{-2} M und ISDN: 10^{-9} bis 10^{-3} M) hinzugegeben und der

Unterschied im Aortendurchmesser registriert. Zwischen den Messungen wurde der Ring mehrfach gespült und für jede Messung erneut mit Phenylephrin bzw. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ vorkontrahiert. Die Endothelin-1 abhängige Vasokonstriktion wurde ohne Vorkontraktion aus dem komplett relaxierten Gefäß gemessen.

3.2.7. Elektronenspinresonanz (ESR) zur Messung des nitrosativen Stresses in Vollblutproben von Ratten

Die in der Pilotstudie mit ISDN behandelten Ratten erhielten diesen Wirkstoff über Beimischung in das Trinkwasser. Um nachzuweisen, dass das Nitrat effektiv im Organismus aufgenommen wurde, wurden Messungen mit der Elektronenspinresonanz-Technik (ESR) durchgeführt.

Die Elektronenspinresonanz ist eine komplexe physikalische Messmethode mit deren Hilfe Stoffe mit permanentem magnetischem Dipolmoment detektiert werden können (Abbildung 3-5). Ein permanentes magnetisches Dipolmoment entsteht beim Spin ungepaarter Elektronen (104). Es ist eine vektoriell (in eine Richtung) wirkende magnetische Kraft, die durch den Spin von Elektronen entsteht. Der Spin eines ungepaarten Elektrons kann -1 oder +1 betragen. Normalerweise sind diese Spinzustände entartet, d.h. energiegleich. Wird das Molekül jedoch in ein Magnetfeld eingebracht, so kommt es zu einer Aufspaltung der Energieniveaus für die Spinzustände parallel oder antiparallel zum Magnetfeld (Zeeman-Effekt). Um diese Aufspaltung der Energieniveaus für die Spinzustände wieder aufzuheben muss eine exakt der Energiedifferenz der im Magnetfeld aufgespaltenen Energieniveaus für parallelen und antiparallelen Spinzustand entsprechende Energiemenge zugeführt werden, die als Resonanzenergie bezeichnet wird und durch eine Mikrowellenquelle zugeführt wird.

Die Therapie mit ISDN stellt einen Zustand von nitrosativem Stress dar und führt zur Bindung des $\bullet\text{NO}$ an das zweiwertige Hämeisen des Hämoglobins unter Synthese von Nitrosyleisen-Hämoglobin (HbNO), welches anhand eines charakteristischen Triplettsignals im ESR-Spektrum nachgewiesen werden kann. Der Nachweis von HbNO im Vollblut beweist somit die Präsenz von nitrosativem Stress durch die ISDN-Therapie und damit die erfolgreiche Aufnahme des Nitrates, sowie dessen Freisetzung von $\bullet\text{NO}$ in den Organismus.

Die bei der Organentnahme aus dem Herz direkt entzogene, heparinisierte Blutprobe wird direkt zur ESR-Messung verwendet. Die Blutprobe wird zunächst mit der Spritze

in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dann wird das gefrorene Blut aus der Spritze gepresst und liegt als ca. 3 cm langer Zylinder vor. Diese Probe wird rasch in einen gläsernen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Messkolben (Dewar) des ESR-Spektrometers MiniScope MS400 überführt und mit langen Wattestäbchen fixiert, ehe es schmelzen kann.

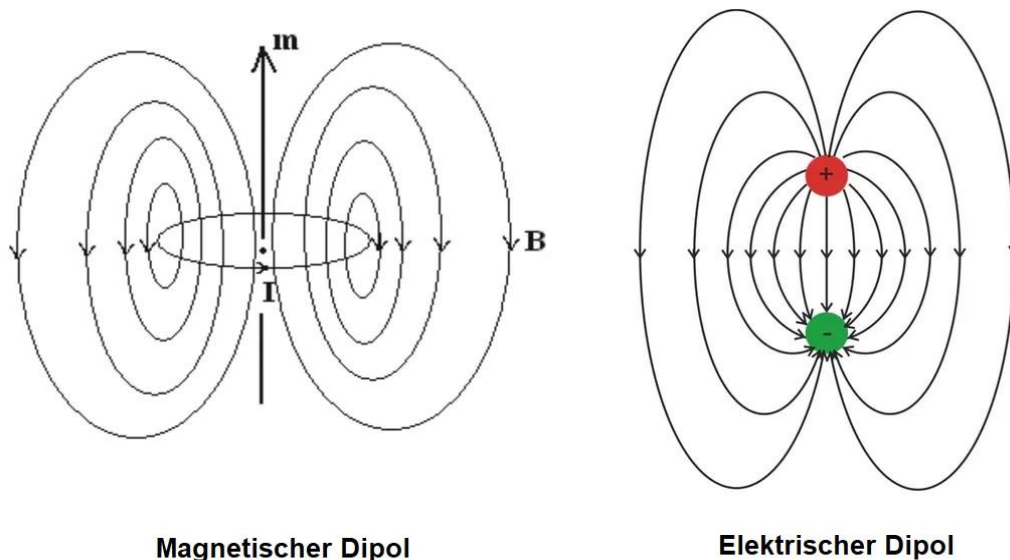


Abbildung 3-5 Magnetischer und Elektrischer Dipol

Der Spin des Elektrons (I) führt zur Entstehung eines Dipols mit den gekennzeichneten Feldlinien und Flussdichten (B), analog der Konfiguration eines elektrischen Dipols. Je stärker die magnetische Kraft in diesem Feld, desto stärker ist das aus ihr resultierende magnetische Dipolmoment (m). Er ist die rechtwinklig zu den Feldlinien verlaufende, vektorielle Kraft. Abbildung aus (105).

Die Einstellungen am ESR- Spektrometer sind wie folgt:

10mW microwave power, Amplitudenmodulation: 7000mG, Modulationsfrequenz: 100 kHz, 3300G center field, 300G sweep width, 60 s sweep time. Es wurden jeweils drei Scans durchgeführt.

Die Maße der charakteristischen Tripletstruktur bei einem positiven Test gibt Aufschluss über die Konzentration des HbNO über die Intensität des Signals (von der Spitze bis zu einem Tiefpunkt) und wird am Computer mit dem Programm Corel Draw X4 ausgemessen.

3.2.8. Messung der membranösen NADPH-Oxidase-Aktivität in Herzgewebe

Zur Beurteilung der NADPH-Oxidase (NOX)-Aktivität in Herzgewebe wurde erneut ein Chemilumineszenzassay verwendet. Der verwendete Farbstoff ist Luzigenin (finale Konzentration 5 $\mu\text{mol/L}$, Abbildung 3-6). Im Gegensatz zu L-012, das unspezifisch verschiedene ROS wie Peroxynitrit und Superoxid detektiert, reagiert Luzigenin ausschließlich mit Superoxid zu einem Dioxetan-Intermediat, der unter Abstrahlung von Photonen zum Acridon-Derivat zerfällt (106, 107). Luzigenin war vormals in der Kritik selbst ROS zu generieren (redox-cycling). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses redox-cycling konzentrationsabhängig und bei der hier verwendeten Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ minimal bis nicht beobachtet werden kann (108).

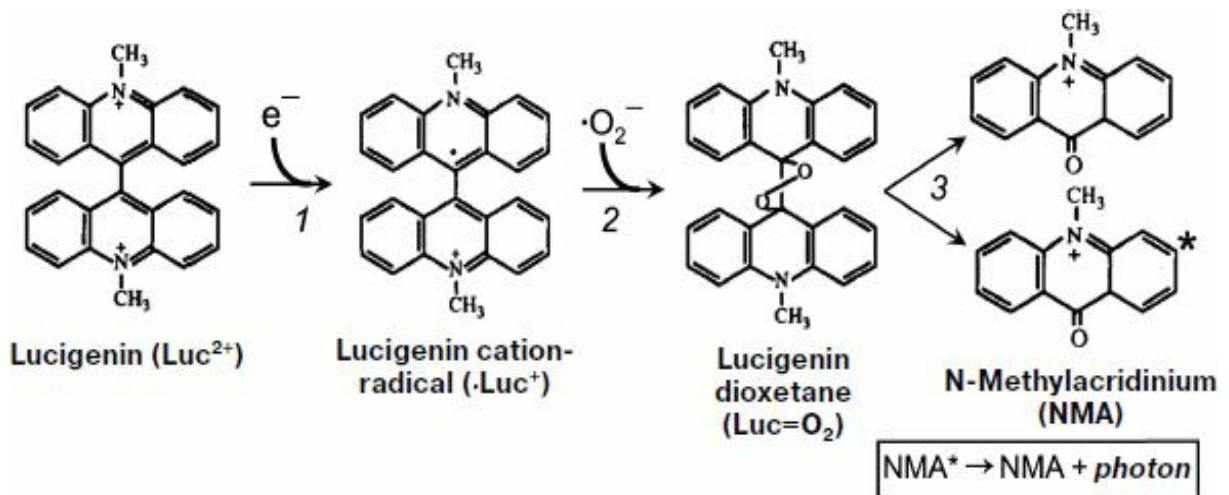


Abbildung 3-6 Reaktion des Luzigenins

Luzigenin wird zunächst mit einem Elektron zum kationischen Luzigeninradikal (Luc^+) reduziert. Luc^+ reagiert mit Superoxid zum instabilen Dioxetanintermediat, das in zwei Acridonderivate zerfällt. Eines dieser Acridonderivate (N-Methylacridinium) befindet sich im angeregten Zustand und emittiert daraufhin Licht, das mit dem Chemilumineszenzassay detektiert werden kann. Abbildung aus (107).

Zunächst wurde das Herzgewebe mit einem Skalpell zerkleinert und in ein Glasgefäß mit Tris-DTT Puffer gelegt. Die Öffnung dieses länglichen Glasgefäßes wurde in einen länglichen Glaskolben eingeführt und unter kontinuierlicher Rotation des Kolbens homogenisiert. Daraufhin folgten mehrere Zentrifugationsschritte zur Isolation der Membranfraktion:

1. Zentrifugationsschritt:

- 10 min, 2000g, 4°C
- Es bildete sich ein dreiphasiges Gemisch im Eppendorfgefäß. Die zwei oberen Phasen wurden in ein neues Gefäß überführt und in den folgenden Zentrifugationsschritt gebracht.

2. Zentrifugationsschritt:

- 20 min, 20050g, 4°C
- Der Überstand des zweiphasigen Gemisches wurde unter Einhaltung einer „Sicherheitsdistanz“ zur unteren Phase entnommen und in ein Plastikvial für Ultrazentrifugen pipettiert.

3. Zentrifugationsschritt:

- 60 min, 100000g, 4°C
- Der Überstand wird komplett verworfen. Das Pellet (= Membranfraktion) wird in Tris Mem Puffer (4.1.4) vorsichtig resuspendiert.

Um sicherzustellen, dass in allen Gruppen die gleiche Konzentration an Proteinen besteht, wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Sie beruht auf zwei Reaktionsschritten. Der erste Schritt, die Biuretreaktion, beruht auf dem Farbumschlag (nach violett), den der Komplex aus Peptidbindungen in wässrig alkalischer Lösung bei Zugabe von zweiwertigen Kupfer Ionen (Cu^{2+}) macht (109). Der Name Biuret stammt von dem gleichen Farbumschlag, der beim Mischen von Kupfer-(II)-Ionen mit dem organischen Carbonsäureamid Biuret entsteht. Der erste Umschlag ist sehr unspezifisch, da auch andere Restgruppen wie Tyrosinreste das Kupfer Ion komplexieren und den Farbumschlag erzeugen können. Ein weiterer Nachteil ist die limitierte Nachweisgrenze im Bereich von 1 bis 10µg Protein pro Milliliter. Aus diesem Grund wird in einer zweiten Teilreaktion das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren) durch den Biuretkomplex reduziert. Der intensive blaue Farbumschlag wird photometrisch (700 nm) gemessen und korreliert linear mit der Proteinkonzentration der Probe (110).

Um Varianzen in der Proteinbestimmung statistisch zu reduzieren, wurde eine Vierfachbestimmung einer jeden Probe gemacht. Die Herzproteinproben wurden

zunächst im Verhältnis 1:10 mit 0,1% SDS verdünnt (90µl Probe und 10µl 0,1% SDS). Als Nullwertbestimmung wurde statt der Probe 10µl des Tris Mem Puffers verwendet. Zur Bestimmung einer Standard-Kurve wurden aufsteigende Konzentrationen an BSA in die einzelnen Wells pipettiert. Die Proben wurden dann für 10 min bei 37°C unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler inkubiert. Währenddessen wurde 30 µl des Protein Assay Reagent S zu 1500µl des Protein Reagent A (Volumenverhältnis 1:50) gegeben. Jede der Gruppen bestand nun aus vier Proben. In bereitgestellten Glasküvetten wurde jeweils 25µl der Probe (bei Nullwertbestimmung 25µl Tris Mem Puffer) mit 125µl des Reagenz A+S Lösung und 1000µl der Reagenz B (37°C) zusammengeführt und mit einem Glasspatel verrührt. Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Photometer auf die Wellenlänge 700 nm eingestellt und die Konzentration basierend auf einer früher erstellten Eichkurve mit BSA berechnet. Die gemessenen Konzentrationen aus den vier Proben pro Gruppe wurden gemittelt. Die Konzentrationen aller Gruppen wurde durch Verdünnung mit Tris Mem Puffer an die an der geringsten konzentrierten Gruppe angepasst. Die finale Zielkonzentration in der Messung für alle Gruppen sollte 0,2 mg/ml Protein sein.

Zur Initiierung der ROS-Synthese durch die membranöse NOX wurden final in 500µl PBS 5µM Luzigenin (Chemilumineszenzfarbstoff), 200µM NADPH (Substrat), sowie 0,2 mg/ml Membranproteinfraktion hinzugegeben. Das Vial wurde nach kurzem manuellem Schwenken sofort in einen Luminometer überführt. Alle 30 Sekunden über insgesamt 5 Minuten (10 Messpunkte) wurde der Wert in der Einheit counts/min bestimmt. Es wurde immer jeweils der 5 Minuten Wert für die finale Statistik genutzt.

3.2.9. Quantitative Reverse Transkriptase Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die im Zustand der Inflammation in der Aorta exprimierten Proteine werden durch Ribosomen über eine mRNA kodiert, die mithilfe der qRT-PCR nachgewiesen werden kann. Ziel des Verfahrens ist es, die mRNA zu vervielfältigen und so zu quantifizieren, dass zwischen den Gruppen eine Aussage über das Maß der Expression dieses Proteins gemacht werden kann. Dabei wird die RNA in einem ersten Schritt in DNA (genauer: komplementäre DNA, *cDNA*) umgeschrieben (111). Dies wird durch das Enzym Reverse Transkriptase ermöglicht. Im nächsten Schritt erfolgt eine klassische Polymerase-Kettenreaktion, bei der die DNA als Vorlage genutzt wird (*template DNA*), um sie zu vervielfältigen. Dazu dienen Primer, kurze komplementäre Nukleinsäuren, die die Basensequenz des gesuchten Proteins haben und damit die zu

vervielfältigende DNA binden. Weiterhin werden DNA-Polymerasen benötigt, die die einzelnen Nukleotidbasen komplementär zum vorliegenden Strang einbauen und so den neuen Strang bilden. Die am häufigsten verwendete ist die Taq Polymerase, ein Enzym, das aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde, welches in warmen Quellen und Geysiren lebt und deshalb mit sehr hitzestabilen Enzymen ausgestattet ist, die man sich bei der PCR zu Nutzen macht (112). Die PCR läuft stereotyp in wiederkehrenden Zyklen ab und gliedert sich in die folgenden drei Schritte (Abbildung 3-7):

1. Schritt: Denaturierung der DNA (94°C)

Die *template DNA* wird erhitzt, der DNA-Doppelstrang trennt sich auf.

2. Schritt: Annealing (55°C)

Die Primer binden an die DNA-Stränge, sie „hybridisieren“.

3. Schritt: Elongation (72°C)

Die Zweitstrangsynthese findet unter dem Temperaturoptimum für die Taq Polymerase statt.

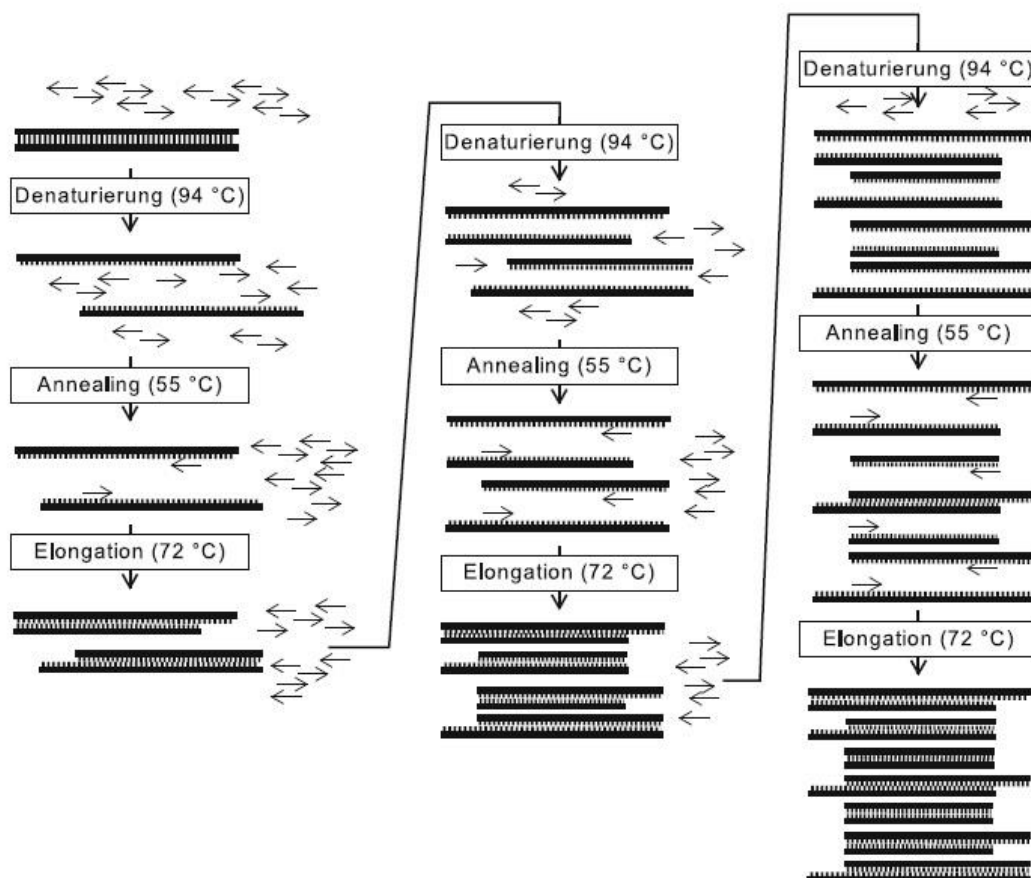


Abbildung 3-7: Das PCR-Prinzip

1. Denaturierung: Die Template-DNA wird auf 94 °C erhitzt, die beiden Stränge trennen sich.
2. Annealing: Die Temperatur wird gesenkt, die Primer hybridisieren an die DNA.
3. Elongation: Die Temperatur wird für die Zweitstrangsynthese auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht. Am Ende eines Zyklus ist die DNA-Menge (nahezu) verdoppelt worden. Abbildung aus (111).

Die Vermehrung des DNA-Materials kann während des PCR Prozesses in Echtzeit (*real-time*) quantifiziert (qPCR) werden. Das Prinzip basiert auf fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden, die während des Denaturierungsschritts spezifisch an die gesuchte DNA-Sequenz binden (TaqMan Sonde). Die Sonde hat am 5' Ende einen Fluoreszenzfarbstoff und am 3' Ende einen Quencher gebunden, der unter Ausgangsbedingungen jegliches Licht des Fluoreszenzfarbstoffs auslöscht. Dies basiert auf dem physikalischen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und beschreibt die Energieübertragung eines angeregten Farbstoffes (Donor) auf einen anderen Farbstoff (Akzeptor) ohne Emission von Licht, sondern lediglich über die elektrische Dipol-Dipol- Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor und ist dementsprechend von der räumlichen Distanz der beiden abhängig (113).

Während die Taq Polymerase den sondierten Strang synthetisiert kommt es dazu, dass die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase die Oligonukleotidsequenz, also die Bindung zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff und des Quenchers, durchtrennt. Der Farbstoff trennt sich räumlich vom Quencher, die Dipol-Dipol- Wechselwirkung zwischen Ihnen wird unterbunden und damit erlischt der FRET und der Fluoreszenzfarbstoff emittiert Licht (siehe Abbildung 3-8) (114). Da die Sonde hochspezifisch für die Sequenz ist und diese erst gespalten und damit aktiviert wird, wenn die Taq-Polymerase den Strang synthetisiert, gibt das Fluoreszenzsignal die Menge an replizierter DNA in Echtzeit und in einem linearen Verhältnis zur DNA Menge wieder.

Zum Ermitteln der ursprünglichen DNA-Menge und damit zur Expression des gesuchten Gens wird in einem Diagramm das Fluoreszenzsignal gegen die Anzahl der Zyklen eingetragen (Abbildung 3-9). Aufgrund des exponentiellen Anstiegs des Fluoreszenzsignals während eines bestimmten Zeitraums der PCR, wurden die Anzahl an Zyklen, nach denen das Fluoreszenzsignal gerade über dem des Hintergrundwerts liegt, als Ct-Wert (*threshold cycle*) definiert (siehe Abbildung 3-9 Mitte). Da der Anstieg vor Erreichen des Ct-Wertes aufgrund des Hintergrundsignales nicht gemessen werden kann, lässt sich von dem Ct-Wert nicht auf die ursprüngliche DNA-Menge zurückrechnen. Um dennoch auf die RNA-Menge zu schließen, gibt es zwei Methoden: Die absolute und die relative Ct-Methode. Bei der absoluten Methode wird mithilfe der Ct-Werte von Proben, deren ursprüngliche DNA-Menge bekannt war, eine logarithmische Standardkurve ermittelt (siehe Abbildung 3-9 unten) aus der sich die Menge der gesuchten RNA als absolute Anzahl herauslesen lässt (111).

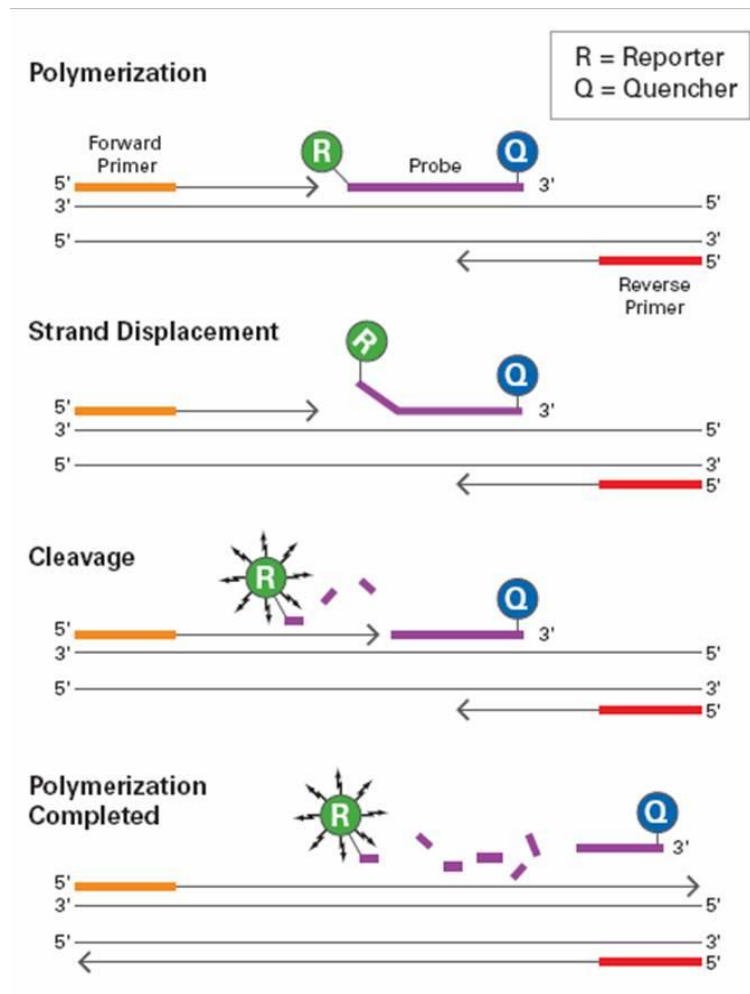


Abbildung 3-8: Prinzip der TaqMan Echtzeitpolymerase

Die fluoreszenz- und quenchertragende Oligonukleotidsonde bindet während der Denaturierungsphase an den DNA Einzelstrang. Während der DNA Polymerisation spaltet die 5'-3' Aktivität der Polymerase die Oligonukleotidbasen der Sonde. Der Fluoreszenzfarbstoff entfernt sich räumlich vom Quencher, sodass die Energieübertragung nicht mehr über Dipol-Dipol Wechselwirkungen geschieht (FRET). Der Fluoreszenzfarbstoff emittiert Licht, das in der Intensität proportional zur Menge der replizierten DNA ist. Aufgrund Ihrer schrittweise voranschreitenden Exonukleaseaktivität wurde die TaqMan Polymerase bei Entdeckung durch Applied Biosystems® in Anlehnung an das Computerspiel Pac-Man später TaqMan genannt (115). Abbildung aus (114).

In der von uns angewandten, relativen Ct-Methode wird der Ct-Wert eines in der Messung mitlaufenden ubiquitären Haushaltsgens wie z.B. des *TATA-Box binding protein (TBP)* im Verhältnis zum Ct Wert des gesuchten Gens gesetzt. Es wird demnach keine absolute Konzentration des Ursprungsgens ermittelt, sondern eine relativ zu einem konstant exprimierten Gen. Der ermittelte Wert wurde für das gesuchte Gen für die Kontrollgruppe als 100% gesetzt und für die anderen Gruppen eine dazu prozentual relative Expression.

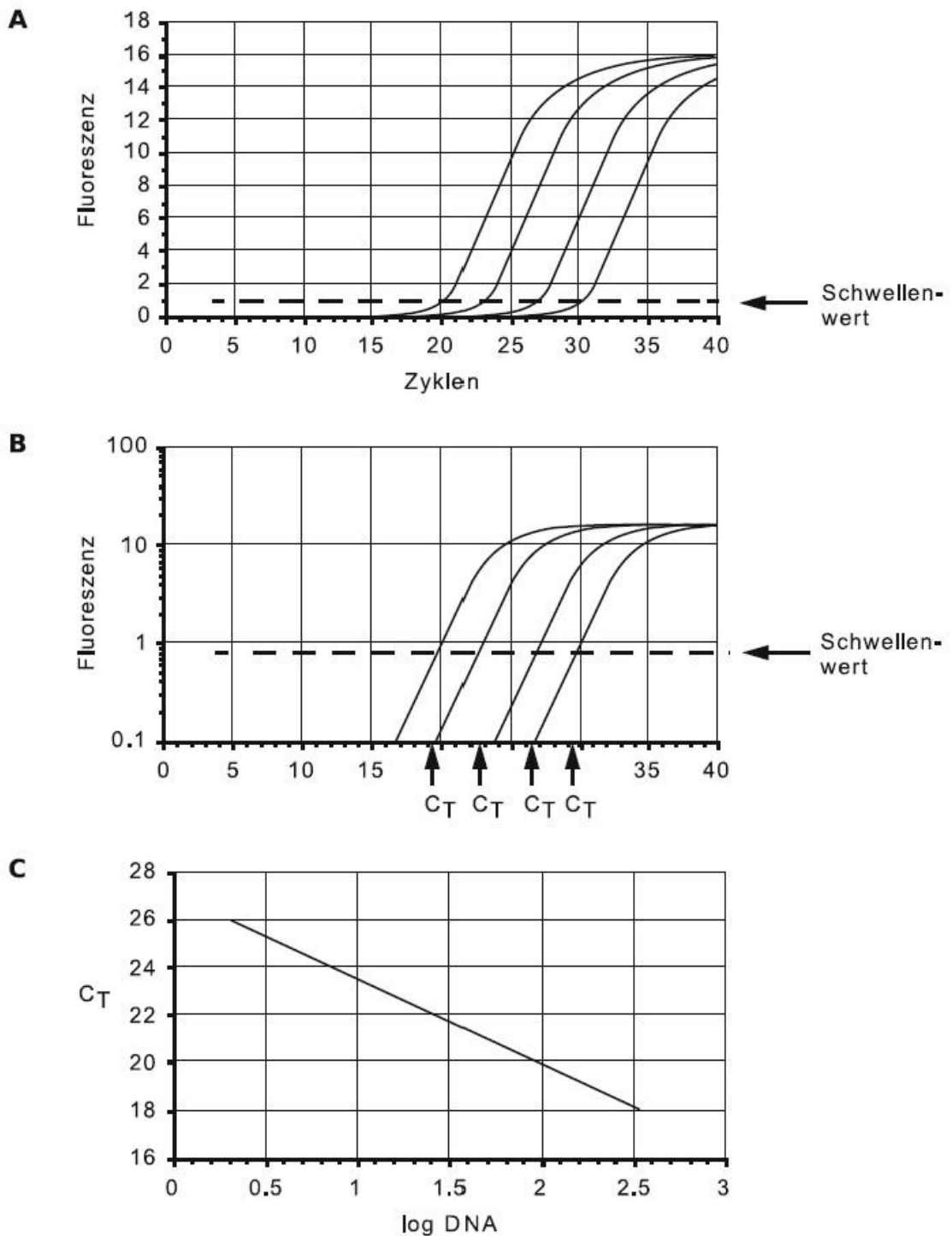


Abbildung 3-9 Die C_T -Methode in der Real-Time PCR

A Fluoreszenzkurven unterschiedlicher RNA Ausgangsmengen vier bekannter Gene während einer Real-Time PCR. **B** Gleiche Fluoreszenzkurven mit logarithmischem Maßstab. Die C_T -Werte werden in einem Bereich der Kurve ermittelt, in dem die Amplifikation noch exponentiell verläuft (gerader Bereich der Kurve). **C** Aus den C_T Werten und der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge wird eine logarithmische Standardkurve erstellt. Je größer der C_T -Wert desto mehr Zyklen hat es gedauert bis die DNA Menge über dem Hintergrundwert war und desto geringer war demnach die ursprüngliche DNA Menge. Abbildung aus (111).

Zu Beginn erfolgte eine Isolation der RNA aus dem Aortengewebe laut Protokoll des gewerblich erhältlichen RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland): Im ersten Schritt wird die Zellstruktur (Plasmamembranen der Organellen) und das Gewebe in einem Lysepuffer („RNA lysis Buffer“) zersetzt, anschließend im zweiten Schritt mechanisch mit dem „Qiagen Tissue Lyser“ homogenisiert und die mRNA aus dem Homogenat extrahiert. 50ng mRNA wurde für die qRT-PCR mit dem QuantiTect™ Probe RT-PCR kit (Qiagen) verwendet. Der TaqMan® Gene Expression Kit für das jeweilige Gen wurde verwendet, um die Gene zu amplifizieren.

Die folgenden Primer mit ID-Nummer wurden verwendet:

CD11b	Mm00434471_g1
ECE-1	Mm01187104_m1
IL-6	Mm00446190_m1
MCP-1	Mm00441243_g1
NOX-2	Mm00432775_m1
TBP (Referenzgen)	Mm00446973_m1

Tabelle 3-4 Primerliste

Liste aller verwendeten Primer für die qRT-PCR mit den entsprechenden ID-Nummern.

Wie oben beschrieben, wurde die komparative Ct-Methode mit TBP als Referenzgen für die Auswertung herangezogen. Die Werte des gesuchten Gens wurden im Verhältnis zur Expression von TBP angegeben. Das errechnete Verhältnis des gesuchten Gens (Zielgen/TBP) wurde dann in der Kontrollgruppe als 100% gesetzt und die der jeweiligen anderen Gruppen als Verhältnis dazu.

3.2.10. Fluoreszenzmikroskopie mit Dihydroethidium (DHE)

Der Fluoreszenzfarbstoff DHE reagiert hochspezifisch mit Superoxid (28) und wird dabei zu 2-HE oxidiert (siehe auch 3.2.3.3). Als lipophile Substanz interkaliert das 2-HE in Zellen in die nukleäre DNA (n-DNA) und fluoresziert unter Anregung (DHE: 355 nm; 2-HE 518 nm) rot (2-HE) bzw. blau (DHE) (116).

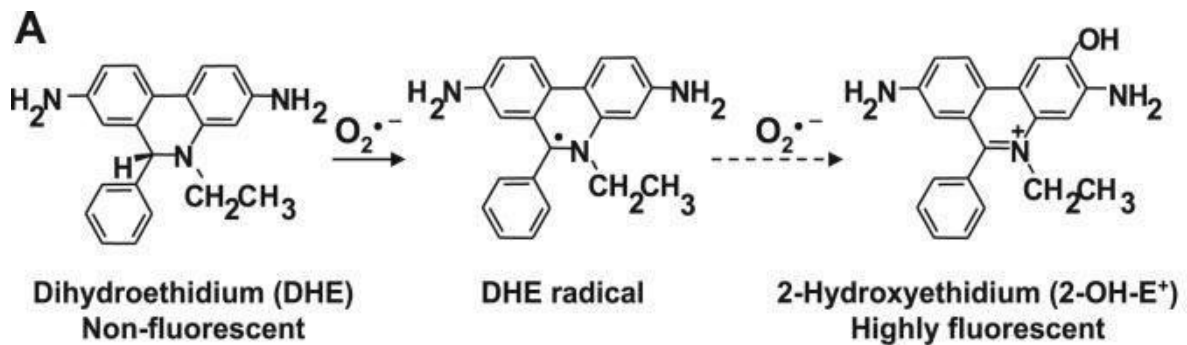


Abbildung 3-10: Die Oxidation von DHE

Die Oxidation von DHE durch Superoxid führt zur Bildung von 2-HE, das u.a. fluoreszenzmikroskopisch detektierbar ist. Abbildung aus (116).

Nachdem die Aorta entnommen und unter dem Mikroskop von Bindegewebe befreit wurde, wurden aus ihr ca. 4mm große Aortenringe geschnitten. Diese Ringe inkubierten zunächst für 10 Minuten in 37°C warmen Inhibitorenpufer (KREBS-Hepes Puffer) ehe sie in eine Aluminiumschale mit wasserlöslichen und kältestabilen Einbettmedium Tissue-Tek® OCT™ eingelegt wurden. Neben der kalten Thermostabilität lässt es sich bei der späteren Färbung restlos und damit artefaktfrei aus dem Gewebe entfernen. Die Aluminiumschale samt Gewebestück und Einbettmedium wurde dann in flüssigen Stickstoff getaucht, bis das Einbettmedium gefroren war. Die Aorten in den gefrorenen Blöcken wurden daraufhin quer zur Verlaufsrichtung mit einem Kryotom zu 8µm dünnen Ringen geschnitten und auf gekühlte Objektträger übertragen.

Zur Färbung mit DHE wird der Objektträger mit 1µM DHE-Lösung lichtverschlossen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Visualisierung erfolgte unter dem Zeiss Axiovert 40 CFL Auflicht-Mikroskop, das mit einer integrierten Fluoreszenzlampe die Farbstoffe im Gewebe anregte. Die eingebaute Kamera ermöglichte so Aufnahmen von im Gewebe gebildeten ROS. Danach wurden die Bilder digital mit dem Bearbeitungsprogramm Adobe Photoshop und densitometrisch mithilfe der Gel-Pro Analyzer Software am Computer ausgewertet.

3.2.11. Western-Blot und Dot-Blot

3.2.11.1. Probenvorbereitung

Nachdem die Aorta des Tieres entnommen wurde, wurde sie in einer Schale mit KH-Puffer auf Eis gekühlt und dabei behutsam unter dem Mikroskop von Bindegewebe und Fett befreit und mit Puffer vorsichtig durchgespült. Dann erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 37 °C in KH- inkl. eines Inhibitorenpuffers (KH-I, 3.1.4) bestehend aus Aprotinin, Pepstatin und Leupeptin, die den Abbau durch zelleigene Proteasen hemmen. Nach der Inkubation wurde der Puffer von der Aorta kurz auf Zellstoff abgetropft, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, dann rasch in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert. Zur Vorbereitung der Herzen wurden diese nach Entnahme ebenfalls in Schälchen mit KH-Puffer längs angeschnitten, das Blut auf Zellstoff abgetropft, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Stücke in vorgekühlten Eppendorfgefäßen überführt und bei -80°C gelagert.

Die gefrorenen Gewebestücke wurden in einem Mörsergefäß mit flüssigem Stickstoff pulverisiert bevor das Pulver im Volumenverhältnis 1:1 mit 4°C kalter Hg-Lösung (3.1.4) resuspendiert wurde. Der Puffer enthält u.a. Protease- und Phosphataseinhibitoren und das nicht ionische Tensid Triton-X 100, das als Detergens Membranproteine aus Zellen herauslöst, ohne diese zu denaturieren. Darauf folgte ein 60-minütiger Lyseprozess bei 4 °C und eine anschließende Zentrifugation mit 10000g, um die Proteinbestandteile vom übrigen Zelldentritus zu trennen.

3.2.11.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Bindet Coomassie Brilliant Blue G 250 an Proteine so verschiebt sich deren Absorptionsmaximum von 465 nm (rot) einer Lösung auf 595 nm (blau). Diese Absorptionzunahme wird photometrisch bestimmt und gibt Aufschluss über den Proteingehalt der Lösung (117).

Die Proben wurden im Verhältnis 1:200 in destilliertem Wasser vorverdünnt und von jeder Probe jeweils 80µl in 4 Wells einer 96 Well Platte pipettiert (Vierfachbestimmung). Zum Erstellen der Standardkurve wurden aufsteigende Konzentrationen (1 bis 50 ng/µl) BSA (Bovines Serumalbumin) in die ersten 3 Reihen der Platte pipettiert. Das Coomassie Brilliant Blue G 250 (Roti®-Quant, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde im Verhältnis 1:5 in destilliertem Wasser vorverdünnt ehe dann davon jeweils 200 µl in die Wells hinzupipettiert wurden. Das photometrische

Signal wurde mithilfe des Microplate Reader MRX II Dynex gemessen und anhand der BSA-Standardkurve die Proteinkonzentrationen mit der Software Revelation 4.25 berechnet.

Bei Aufbereitung der Proben für das Western-Blot Verfahren wurden diese anschließend mit 3-fach konzentriertem Tris-Glycin-Puffer (Lämmli-Puffer, 3.1.4) im Volumenverhältnis von 2:1 versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert.

3.2.11.3. SDS-PAGE und Western-Blot

Die Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit dem Mini-PROTEAN®III SDS-PAGE System der Firma Bio-Rad durchgeführt. In der Gelelektrophorese wandern die durch die Denaturierung mit Lämmli-Puffer mit SDS beladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode und werden durch einen Molekularsiebeffekt in der Polyacrylamidmatrix des Gels ihrer Molekulargröße nach aufgetrennt (118).

Um bei der Gelelektrophorese und im anschließenden Blotting Verfahren eine gleiche Konzentration innerhalb der Gruppen zu erreichen, wurden diese, entsprechend der im Bradford Verfahren ermittelten Konzentrationen, mit 1-fach Lämmli Puffer einander angeglichen und direkt vor dem Auftrag auf das Gel erneut für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. 20µg Protein von den zu untersuchenden Proben wurden in die Probentaschen des Gels gegeben. Die anschließende Elektrophorese wurde bei 130V für 2-3 Stunden (abhängig von der Größe des gesuchten Proteins und der Konzentration der Polyacrylamidmatrix) durchgeführt. Ein in den äußeren Slots mitlaufender, farblich markierter Molekulargewichts-Größenstandards (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen), der sich unter der Elektrophorese ebenfalls auftrennt, verhalf bei der Abschätzung der Elektrophoresedauer.

Nach Beendigung der SDS-PAGE erfolgte der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe des Mini-PROTEAN®III Trans-Blot® Moduls der Firma Bio-Rad (Blotting). Über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld werden die Proteine aus dem Gel eluiert und auf eine Membran transferiert, wo sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der adsorbierenden Membran haften bleiben. Die ursprüngliche Auftrennung der Proteine bleibt dabei erhalten. Das Gel wurde dazu in einem Sandwich-Verfahren in eine Blottingkassette eingepackt, die aus einem ersten Schwamm, erstes Filterpapier, der Nitrozellulosemembran, dem Gel, zweites Filterpapier und zweiten Schwamm besteht. Alle diese Utensilien wurden zuvor in -20°C kalten Transferpuffer getaucht und die Sandwichkassette in eine Transferkammer gestellt, die mit Eis gefüllt ist. Bei einer

Stromstärke von 250 mA (BioRad PowerPac Basic Blotting Anlage als Stromquelle) wurde der Transfer für ca. 2,5h durchgeführt. Nachdem die Proteine auf der Membran geblottet waren, erfolgte die Färbung der Membran (5-10 min.) mit dem Farbstoff Ponceaurot, der reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet. Nun konnte die Membran unter Zuhilfenahme eines zusätzlich aufgetragenen, nicht farblich markierten Molekulargewichts-Größenstandard (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen) individuell nach der Größe des gesuchten Proteins zugeschnitten werden. Im nächsten Schritt folgte das Waschen und Entfärben der Membran mit dem Waschpuffer des jeweils als nächstes genutzten Primärantikörpers. Um eine falsche Bindung des Antikörpers an nicht mit Protein besetzten Bereichen der Membran zu verhindern, wurde die Membran für eine Stunde in BSA haltigem Blockierpuffer geblockt. Da der Antikörper das BSA nicht erkennt, reagiert er ausschließlich mit den zuvor im Gel aufgetrennten Proteinen auf der Membran, ohne an andere Bindungsstellen anzudocken. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C im Blockierpuffer mit hinzugegebenen Primärantikörper unter leichtem Schwenken inkubiert (für die Liste der verwendeten Antikörper und deren Verdünnung siehe Tabellen 3-1 und 3-2).

Nach viermaligem Waschen der Membran (à 5 Minuten) mit antikörperfreiem Waschpuffer, wurde erneut der Blockierpuffer mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper hinzugegeben und für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun befand sich auf der Membran ein Komplex aus gesuchtem Protein, Primär- und Sekundärantikörper inkl. gekoppelter Peroxidase (HRP), die bei Zugabe von ECL (*enhanced chemiluminescence*) Reagenz ein Chemilumineszenzsignal erzeugt, das mit einer Kamera in einer Dunkelkammer detektiert wurde. Die Auswertung erfolgte am Computer mit der Software ChemiLux Imager und die densitometrische Messung mit der Software Gel-Pro Analyzer 6.0. Die damit ermittelten Werte der einzelnen Gruppen wurden anhand der ebenfalls gemessenen Ladungskontrolle β -Actin normalisiert und anschließend untereinander statistisch ausgewertet.

3.2.11.4. Dot-Blot

Bei dem Dot-Blot-Verfahren wird das Proteingemisch nicht der Größe nach aufgeteilt, sondern komplett auf einen Punkt der Nitrozellulosemembran („dot“) aufgetragen („blot“) und in diesem Punkt mittels desselben Prinzips (Antikörper-vermittelte ECL Reaktion) für einen spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Aufbereitung bis einschließlich der Bradford Proteinbestimmung war identisch zur Western-Blot Methode und wurde auf $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Danach wurde das Proteingemisch nicht mit Lämmli Puffer versetzt, sondern nativ auf eine Membran in einem Dot-Blot Minifold 96 Wells System gegeben (Abbildung 3-11). Durch einen kontinuierlichen Sog unter der Membran wurden $100\mu\text{l}$ (entsprechen $40\mu\text{g}$ Protein) des Proteingemisches auf die Membran gegeben. Vor und nach dem Auftrag wurde die Membran mit $200\mu\text{l}$ PBS gespült. Danach wurde die Membran für 1 Stunde bei 60°C getrocknet, wodurch die Proteine auf der Membran fixiert wurden.

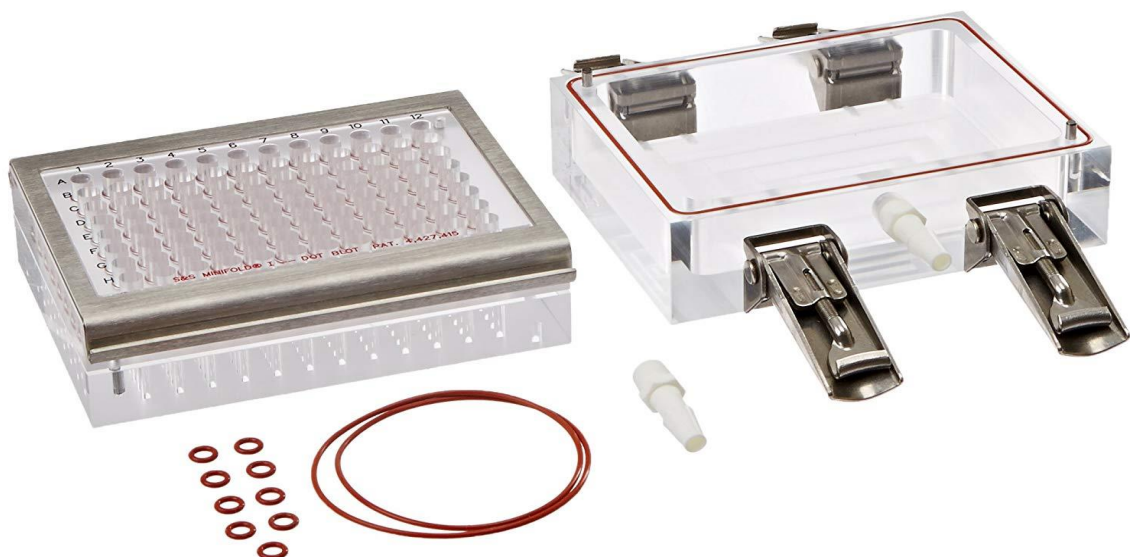
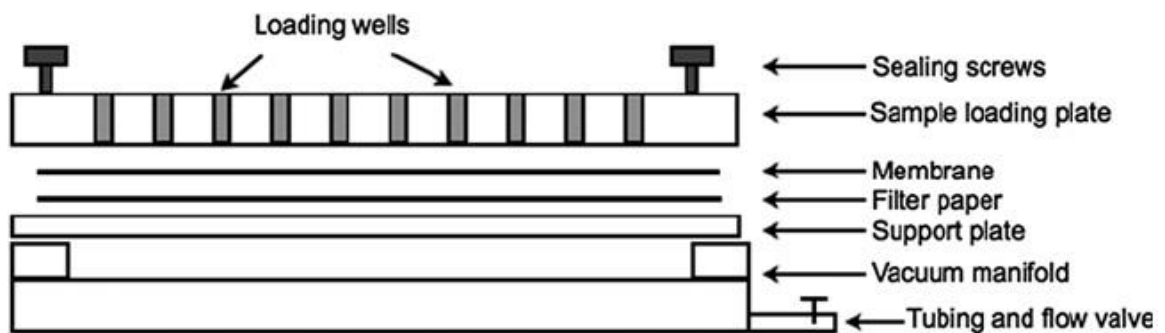


Abbildung 3-11 Aufbau des Dot-Blot Minifold 96 Wells Systems

Die Membran wird unter einer 96 Well Probenladungsplatte und über einem Filter und einer Wanne fixiert. Die Wanne ist über einen Schlauch mit einem Motor verbunden, der kontinuierlichen Sog auf das System ausübt. Der Sog bewirkt, dass alle flüssigen Bestandteile entfernt werden, sodass lediglich die Proteine auf der Membran haften bleiben. Abbildung oben aus (119) und unten aus (27).

Die darauffolgenden Schritte (Blocken der Membran, Inkubation der Antikörper, Bildaufnahme mittels ECL, Auswertung am Computer) wurden analog zur Beschreibung für das Western-Blot Verfahren durchgeführt (3.2.11.3).

3.2.12. Immunhistochemische Darstellung von Endothelin-1

Von Bindegewebe und Fett befreite Aortenringsegmente wurden zu Beginn in Paraformaldehyd (4%) fixiert, in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen entwässert und mit Xylol behandelt ehe sie in Paraffin eingebettet wurden. Nach der Einbettung wurden am Mikrotom 5µm dicke Schnitte angefertigt und die Präparate auf Objektträger übertragen. Bei 37°C wurden die Präparate für 2-3 Tage getrocknet. Zur Entparaffinierung wurden sie mit Xylol und absteigenden Alkoholkonzentrationen behandelt.

Der Nachweis des Endothelin-1 erfolgte in mehreren Schichten nach der Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode, Abbildung 3-12). Zuerst wurde der murine Primärantikörper für Endothelin-1 (Pierce #MA3-005: 1) in einer 1:200 Verdünnung auf die Gewebeprobe gegeben und für mindestens 60 Minuten inkubiert. Danach wurde für 20 Minuten ein Sekundärantikörper nach Anleitung des Herstellers (M.O.M. Kit, Vector Lab., Burlingame, USA) hinzugegeben, der spezifisch an das Fc-Teil des Primärantikörpers bindet und gleichzeitig an Biotin gebunden ist (biotinylierter Antikörper). Das ubiquitär vorkommende Vitamin Biotin (= Vitamin H) hat eine hohe Affinität zu Avidin, einem Glykoprotein, das in hohen Konzentrationen in Hühnereiweiß enthalten ist (120).

Als Nächstes wurde das ABC Reagenz (Vector Lab., Burlingame, USA) hinzugefügt. Das darin enthaltene Avidin bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers und ist gleichzeitig mit einer Peroxidase (HRP), gekoppelt.

Im finalen Schritt wurde das Präparat mit einem Substrat der Peroxidase, das Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) nach Anleitung des *peroxidase substrate Kits* (Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubiert. Die HRP oxidiert mithilfe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) das Substrat zu einem lichtmikroskopisch sichtbaren, braunen DAB-Präzipitat, das nicht wasserlöslich ist. Um den Abbau des H₂O₂ durch im Gewebe vorkommende Peroxidasen zu vermeiden, wurden die Präparate vor der Immunlokalisation mit H₂O₂ im Überschuss behandelt (120).

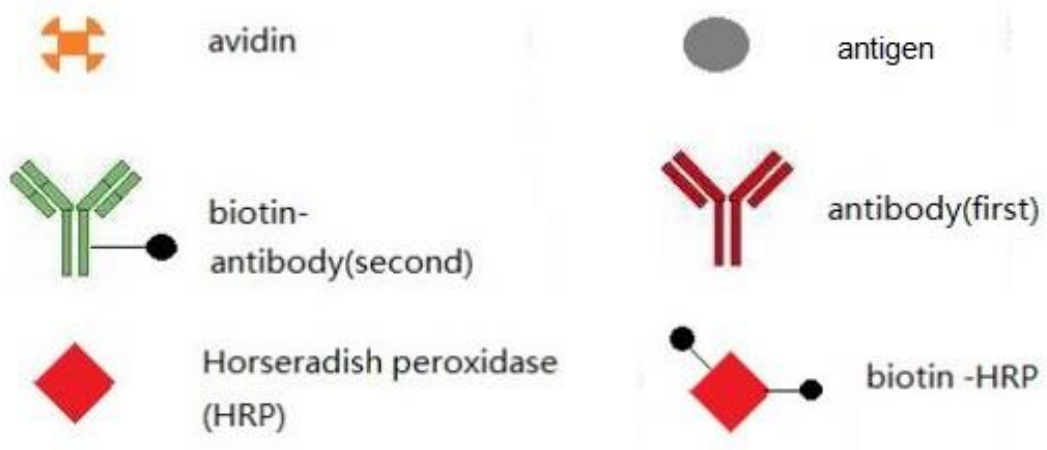
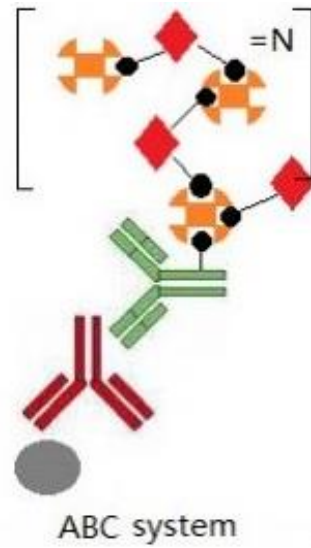


Abbildung 3-12 Aufbau des ABC Systems zum immunhistochemischen Nachweis von Antigenen

Der Primärantikörper bindet an das Antigen. Der biotynilierte Sekundärantikörper bindet daraufhin an das Fc Teil des Primärantikörpers. Das Avidin des ABC Reagenz (Avidin und Meerrettichperoxidase) bildet einen Komplex mit dem Biotin des sekundären Antikörpers. Bei Zugabe der Substrate H_2O_2 und DAB wird DAB durch die HRP oxidiert und ein braunes, nicht lösliches Präzipitat lagert sich im Gewebe ab und dient damit dem Nachweis des gesuchten Antigens. Abbildung aus (121).

3.2.13. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert (σ) \pm des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM, *standard error of the mean*) angegeben

($SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$, wobei n = Stichprobengröße bzw. Anzahl der Messergebnisse; σ = Mittelwert). Zum Vergleich der Potenz und Effizienz der im Organbad verwendeten Vasodilatoren wurde der Zwei-Wege-ANOVA (Analysis of Variance) mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Die Bonferroni-Korrektur erlaubt bei multiplen Tests das Signifikanzniveau anzupassen (adjustiertes Signifikanzniveau). Wenn z.B. ein einzelner Test, bei dem die Ergebnisse „positiv“ oder „negativ“ lauten, ein Signifikanzniveau von 5% hat ($p \leq 0,05$), dann liegt die Chance etwas fälschlicherweise für positiv zu halten, obwohl es in Wahrheit negativ ist (falsch positiv) bei 5% (sog. α -Fehler). Wird dieser Test mehrmals durchgeführt, wobei jedes Mal eine 5%-Chance auf den α -Fehler besteht, so steigt die Chance bei der großen Anzahl der Tests diesen Fehler häufiger zu machen an und die Güte des Tests sinkt. Um dieses Signifikanzniveau anzupassen, zu adjustieren, wird die Bonferroni-Korrektur verwendet. Sie besagt, dass das Signifikanzniveau p kleiner als 5% geteilt durch die Anzahl der Testrunden ist ($p < \frac{\alpha}{n}$). Dadurch wird das Signifikanzniveau an die Anzahl der Testrunden angepasst (mehr Tests erfordern höheres Signifikanzniveau) und die Rate an falsch positiven bzw. falsch negativen Tests wird reduziert (122).

Der Ein-Weg-ANOVA mit der Bonferroni-Korrektur wurde zum Vergleich aller übrigen Parameter verwendet. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. NADPH-Oxidase-Aktivität und inflammatorischer Phänotyp in isolierten Leukozyten

4.1.1. NADPH-Oxidase-Aktivität in kultivierten Makrophagen (RAW cells)

In kultivierten Makrophagen zeigten GTN, ISDN und ISMN einen Anstieg und Maximum des oxidativen burst bei geringen mikromolaren Konzentrationen der Nitrate (Abbildung 4-1). Suprapharmakologische Konzentrationen von ISMN und ISDN (100 μM) führten zu einem Abfall des oxidativen burst.

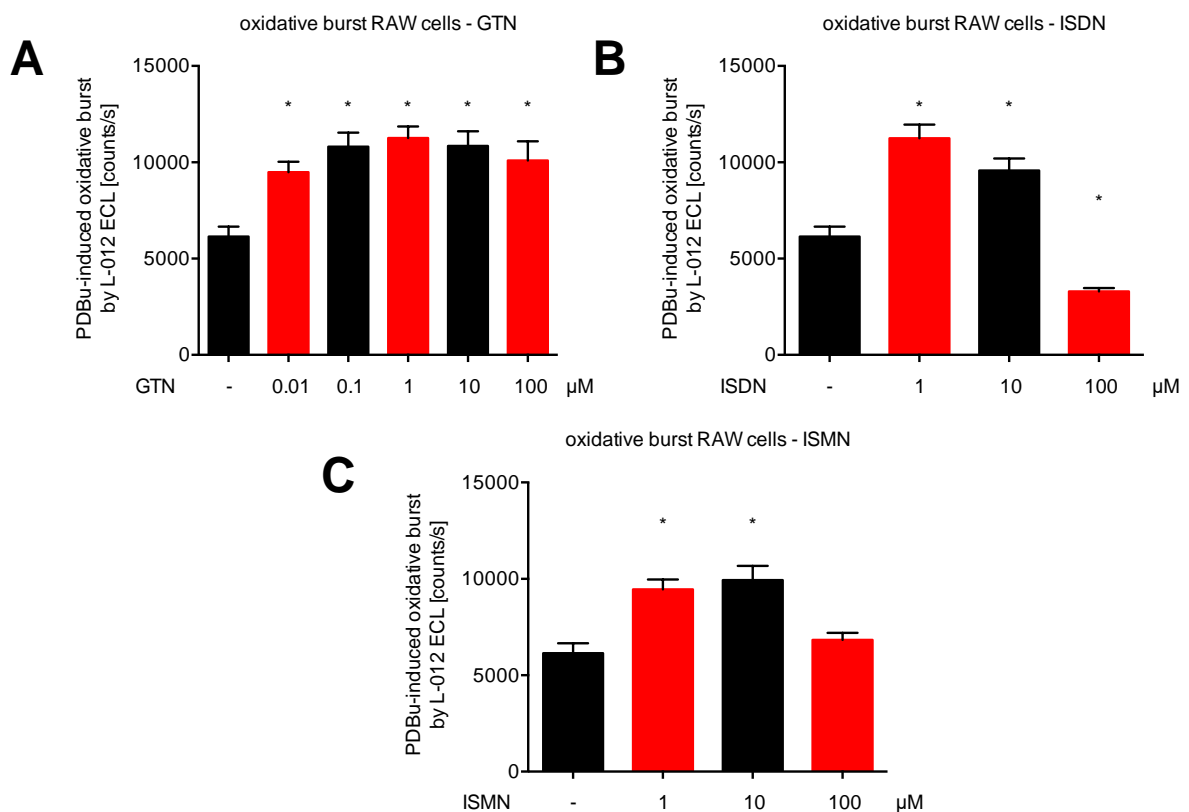


Abbildung 4-1: Oxidativer burst in Zellkulturen kultivierter RAW 264.7 cell Makrophagen

Die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies wurde mithilfe des Chemilumineszenzfarbstoffs L-012 und nach Stimulation mit dem PKC Aktivator PDBu über einen Chemilumineszenzassay gemessen. Die Zellen wurden in aufsteigenden Dosen mit den Nitraten GTN (A), ISMN (B) und ISDN (C) inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens 8 verschiedenen Wells $\times 1 \times 10^5$ Zellen pro Gruppe. *, $p < 0,05$ vs. Basal (-).

Dies ist am ehesten durch die schnelle Reaktion von Superoxid mit dem aus den Nitraten freigesetzten $\bullet\text{NO}$ zu Peroxynitrit zu erklären. Peroxynitrit-gebildete Radikale (die sonst mit L-012 reagieren würden) können mit dem überschüssigen $\bullet\text{NO}$ weiterreagieren (z.B. zu N_2O_3), was zu einer Unterdrückung („Quenching“) des Superoxid- und Peroxynitritsignals führt. Peroxynitrit als reaktive Stickstoffspezies führt

zur Nitrierung von Tyrosinresten an Proteinen. Der Nachweis dieser nitrierten Proteine mit Hilfe der Dot-Blot-Methode gilt somit als indirekter Nachweis von Peroxynitrit und damit als indirekter Nachweis von Superoxid und $\bullet\text{NO}$. Bei Behandlung mit GTN erhöhte sich dosisabhängig die Konzentration 3-Nitrotyrosin positiver Proteine, was die Hypothese der Bildung von Peroxynitrit und anderen Nitrierungs- und Nitrosylierungs-Spezies bei höheren Konzentrationen der organischen Nitrate unterstützt (Abbildung 4-2).

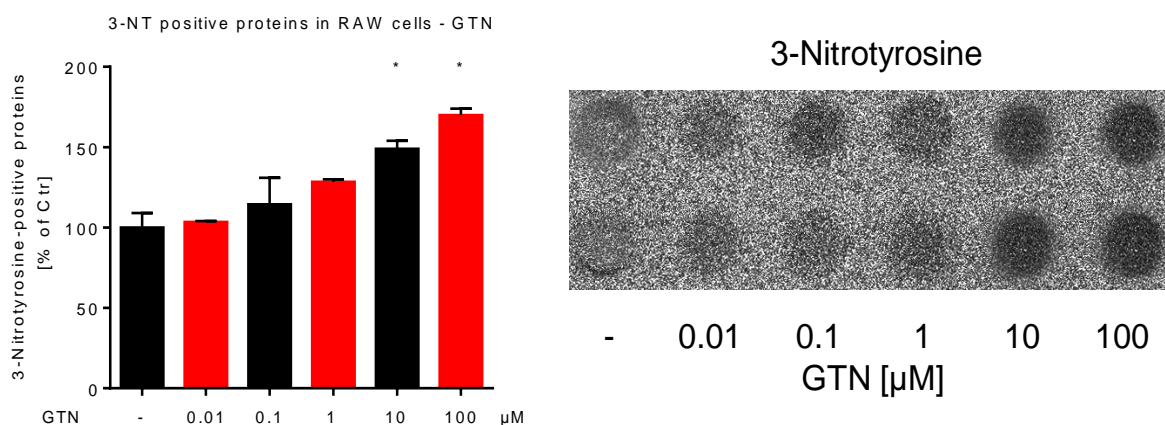


Abbildung 4-2 Dot-Blot Analyse zum Nachweis von 3-Nitrotyrosin positiven Proteinen in Zellkulturen isolierter RAW 264.7 cell Makrophagen

Das Protein aus Zellkulturen isolierter Makrophagen, die mit aufsteigenden Dosen GTN inkubiert wurden, wurde mithilfe eines spezifischen 3-NT Antikörpers in der Dot-Blot-Methode untersucht. Repräsentative Blots sind rechts neben dem Diagramm abgebildet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens 8 verschiedenen Wells \acute{a} 1×10^5 Zellen pro Gruppe. *, $p < 0,05$ vs. Basal (-).

4.1.2. NOX-Aktivität in isolierten humanen PMNs

Um den Einfluss des Endothelinrezeptorantagonisten Macitentan auf die NADPH-Oxidase-Aktivität zu untersuchen, wurden zudem neutrophile Granulozyten aus menschlichen Blutproben untersucht.

Bei Stimulation der NADPH-Oxidase mit $10 \mu\text{M}$ PDBu kam es zu einem deutlich gesteigerten oxidativen burst, der anhand der L-012 Chemilumineszenz als auch der Superoxid-spezifischen Detektion von 2-Hydroxyethidium mittels HPLC gemessen wurde. Aufsteigende Macitentankonzentrationen (0 – $1000 \mu\text{M}$) bewirkten einen stufenweisen Abfall des Chemilumineszenzsignals und auch der entstandenen Superoxidkonzentration, gemessen als 2-Hydroxyethidium (Abbildung 4-3 A-C).

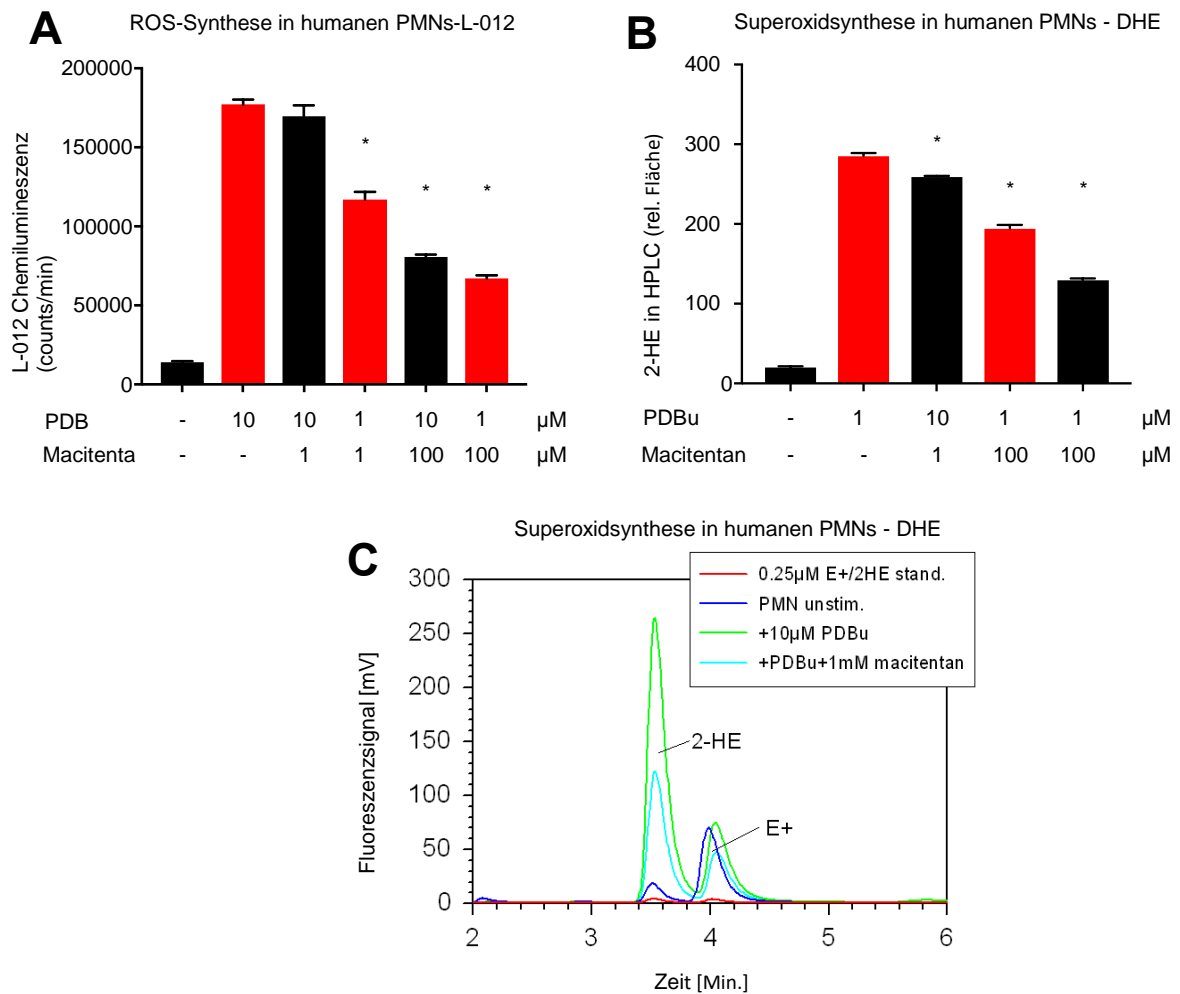


Abbildung 4-3 Superoxidsynthese und der Einfluss von Macitentan auf isolierte humane PMNs.

Die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies wurde mithilfe des Chemilumineszenzfarbstoffs L-012 nach Stimulation mit dem PKC Aktivator PDBu mittels eines Chemilumineszenzassays gemessen (A). Die Zellen wurden in aufsteigenden Konzentrationen mit Macitentan versetzt. Die Superoxidkonzentration wurde außerdem mittels Messung von 2-HE, dem Produkt aus dem Fluoreszenzfarbstoff DHE und Superoxid, über HPLC gemessen (B). Die Fläche unter der Kurve im repräsentativen Chromatogramm (C) mit dem Fluoreszenzsignal des DHE Produktes 2-HE wurde als relatives Verhältnis zu einer Standarddosis in Form eines Säulendiagramms angezeigt (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 8 (A) und 3 (B) unabhängigen Messungen. *, $p < 0,05$ vs. Basal (-).

4.1.3. Interleukin-6 (IL-6) Expression in kultivierten Makrophagen (RAW264.7)

Die Aktivierung von Entzündungsreaktionen durch die organischen Nitrate wurde anhand des Entzündungsmarkers IL-1 mittels Dot-Blot bestimmt. Unter Behandlung der isolierten Makrophagen mit GTN, ISDN und ISMN war in allen Gruppen für eine bestimmte Konzentration (0.1 μM für GTN und 1 μM für ISMN und ISDN) ein signifikanter Anstieg der IL-6 Expression, also ein Maximum, zu verzeichnen (Abbildung 4-4 A-C).

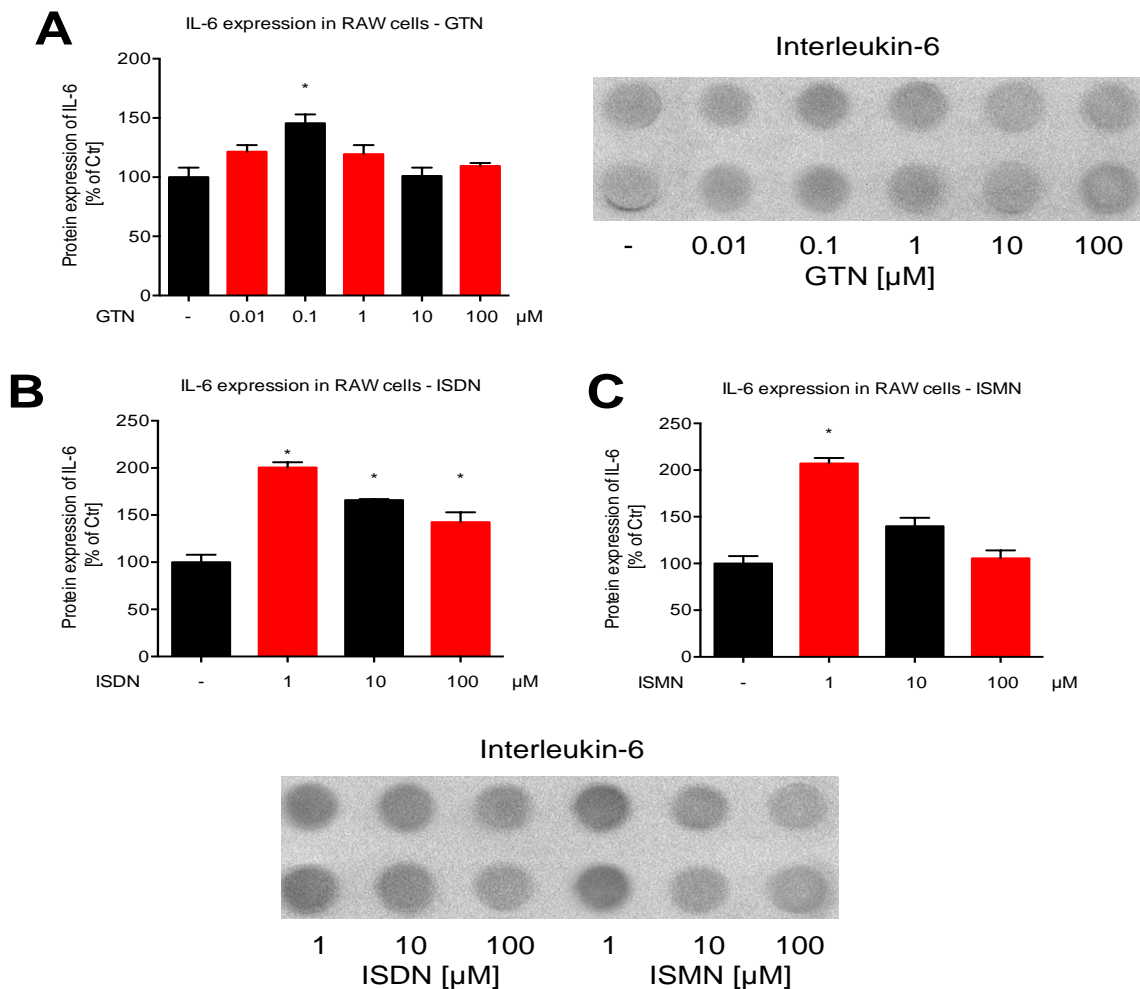


Abbildung 4-4 Dot-Blot Analyse zur Interleukin-6 Expression in Zellkulturen isolierter RAW 264.7 cell Makrophagen

Das Protein aus Zellkulturen isolierter Makrophagen, die mit aufsteigenden Dosen GTN (A), ISDN (B) und ISMN (C) inkubiert wurden, wurde mithilfe eines spezifischen IL-6 Antikörpers in der Dot-Blot-Methode untersucht. Repräsentative Blots sind neben (A), bzw. unter den Diagrammen (B,C) abgebildet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens 8 verschiedenen Wells $\times 10^5$ Zellen pro Gruppe. *, $p < 0,05$ vs. Basal (-).

4.2. In vivo Therapie mit ISDN in der Ratte

4.2.1. Endotheliale und vaskuläre Funktion und Dysfunktion: Isometrische Spannungsmessungen in Aortenringen von Ratten

Zur allgemeinen Beurteilung der Gefäßfunktion bezüglich der Relaxations- und Kontraktionsfähigkeit wurden ex vivo Studien mit isolierten Aortenringen im Organbad durchgeführt (isometrische Spannungsmessungen). Nach Zugabe von kontrahierenden und dilatierenden Mediatoren wurden die Unterschiede im Durchmesser detektiert und für jede Dosis die entsprechende prozentuale Relaxation (unter Gabe von Vasodilatoren) bzw. Konstriktion (unter Gabe von Vasokonstriktoren) graphisch dargestellt.

In einer Pilotstudie wurden erstmalig männlichen Wistar-Ratten mit aufsteigenden Dosen ISDN (10mg/dl, 25 mg/dl und 50 mg/dl, per oral im Trinkwasser) behandelt und die Gefäßfunktion mit den oben beschriebenen Spannungsmessungen ermittelt. Nach Zugabe des endothelabhängigen Vasodilatators Acetylcholin in den Organbadpuffer zeigte sich eine leichte Tendenz zur beeinträchtigten Relaxation in den ISDN-Gruppen, jedoch kein signifikanter Unterschied in der Dilatationsfähigkeit des Gefäßes und damit in der Endothelfunktion (Abbildung 4-5 A).

Bei der Zugabe von aufsteigenden Dosen ISDN in das Organbad zeigte sich jedoch in den mit hohen ISDN-Dosen vorbehandelten Gruppen (25 mg/kg/d und 50 mg/kg/d) und in zwei Messpunkten bei der niedrigdosierten Gruppe (10mg/kg/d) eine beeinträchtigte Relaxationsfähigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4-5 B), was auf eine leicht ausgeprägte Nitrattoleranz gegenüber ISDN hindeutet. In einer dritten Messung wurde der potente Vasokonstriktor Endothelin-1 (ET-1) in aufsteigenden Dosen hinzugegeben. Bei der mit hohen Dosen von ISDN vorbehandelten Gruppe (25mg/kg/d) wurde eine signifikant erhöhte Kontraktion gegenüber der Kontrollgruppe gemessen (Abbildung 4-5 C). Es zeigte sich eine erhöhte Sensibilität für den Vasokonstriktor Endothelin-1 unter ISDN-Therapie.

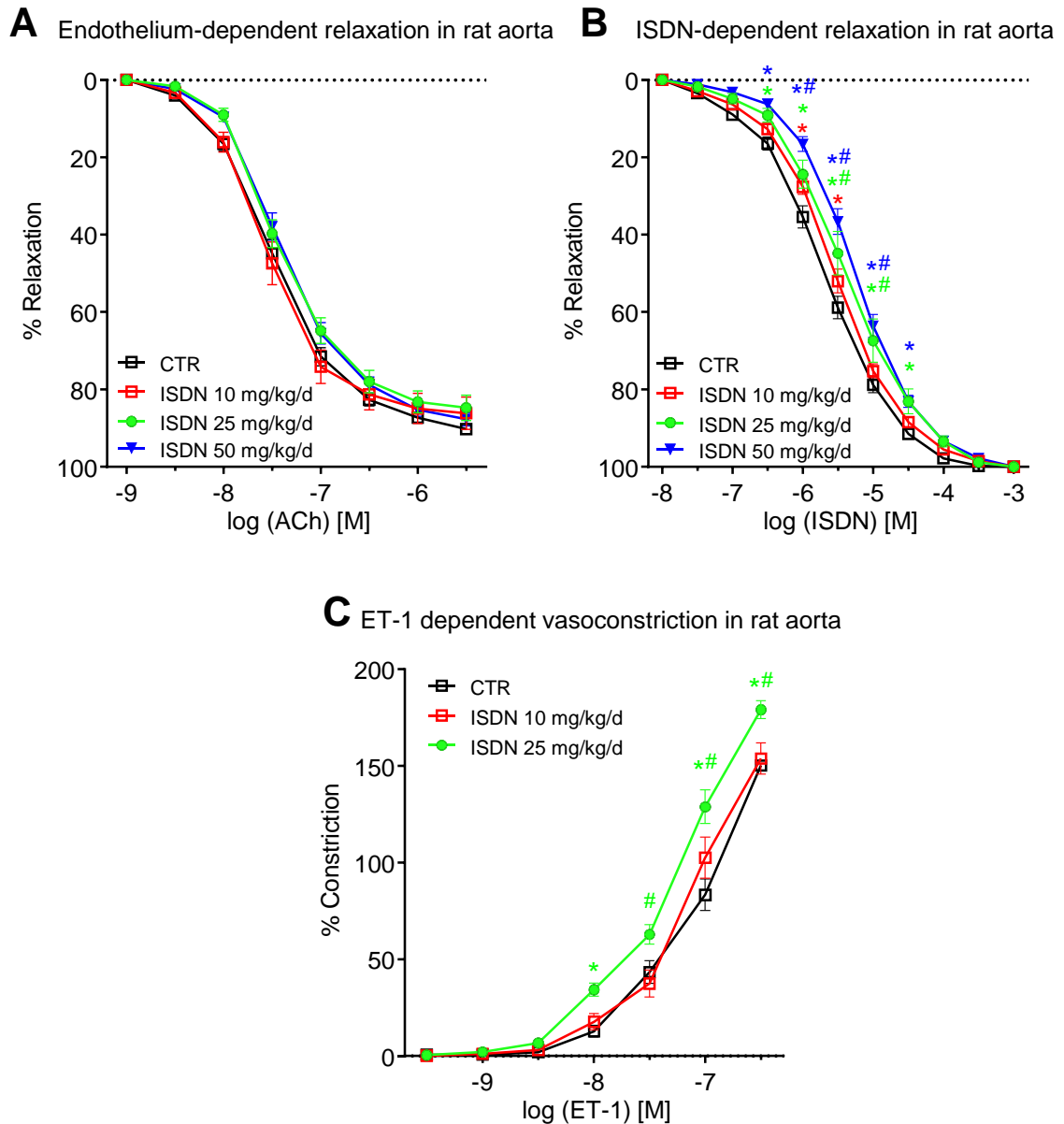


Abbildung 4-5 Isometrische Spannungsmessungen zum Einfluss von ISDN auf die Endothelfunktion (Ratte).

Die Gefäßfunktion wurde mithilfe isometrischer Spannungsmessungen im Organbad untersucht. Unter Gabe von aufsteigenden Dosen des natürlichen Agens Acetylcholin (ACh, A) und ISDN (B) wurde die Vasodilatation des Gefäßes gemessen. Eine Kontraktion wurde vorab mit Gabe von KCl und Phenylephrin induziert. Die Kontrollgruppe (CTR) wurde mit einem Placebo behandelt. Die Kontraktion unter Einfluss von aufsteigenden Dosen ET-1 wurde im vorab relaxierten Zustand der Gefäße gemessen (C). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 9-12 (A, B) und 6-8 (C) unabhängigen Messungen. *, $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollgruppe (CTR); #, $p < 0,05$ vs. ISDN 10 mg/kg/d.

4.2.2. Nachweis der erfolgreichen Verabreichung von ISDN über das Trinkwasser in der Ratte

Um nachzuweisen, dass die im Trinkwasser zugegebenen ISDN-Dosen effektiv in den Organismus der Ratte aufgenommen wurden, wurden Vollblutproben hinsichtlich der Konzentration von Nitrosyleisen-Hämoglobin (HbNO) mithilfe der Elektronenspinresonanz (ESR) untersucht. Die mit höheren Dosen (25mg/kg/d und 50mg/kg/d) behandelten Gruppen zeigten dosisabhängig signifikant erhöhte Konzentration an HbNO (Abbildung 4-6).

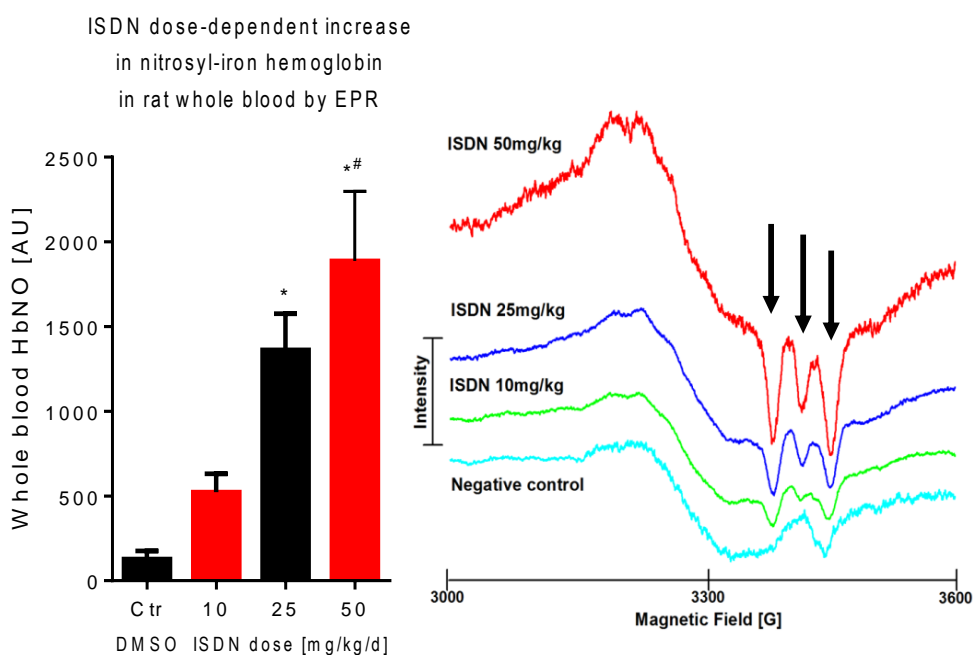


Abbildung 4-6 Messung des Nitrosyleisen-Hämoglobins im Vollblut von Ratten.

Mithilfe der ESR Methode wurden die Konzentrationen des Hb-NO im Vollblut der Ratten gemessen. Rechts angezeigt sind die Spektrumsanalysen mit den klassischen Triplettensignalen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 5-6 unabhängigen Messungen. *, $p < 0,05$ vs. DMSO Ctr; #, $p < 0,05$ vs. ISDN 10 mg/kg/d.

4.3. In vivo Therapie mit ISMN oder ISDN in der Maus

4.3.1. Nachweis der erfolgreichen Verabreichung von ISMN oder ISDN über osmotische Pumpen in der Maus

In Mäusen wurden das ISMN (75 mg/kg/d) und ISDN (25 mg/kg/d) mit subkutan einliegenden, osmotischen Pumpen verabreicht. Auch hier wurde die Aufnahme durch Messung der HbNO-Konzentrationen geprüft. Es zeigte sich in beiden Gruppen ein deutliches HbNO-Signal, welches in der ISMN-Gruppe fast doppelt so hoch war wie in

der ISDN-Gruppe (Abbildung 4-7). In beiden Gruppen wurde das Signal (für ISMN signifikant) unter zusätzlicher Macitentangabe um knapp die Hälfte reduziert.

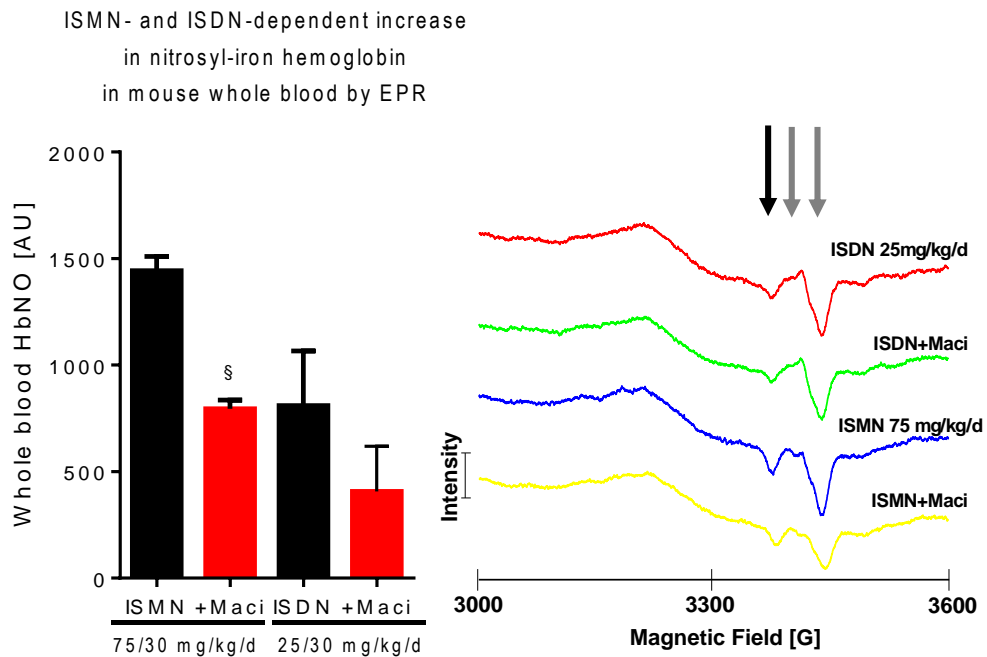


Abbildung 4-7 Messung des Nitrosyleisen-Hämoglobins im Vollblut von Mäusen.

Mithilfe der ESR Methode wurden die Konzentrationen des Hb-NO im Vollblut der Mäuse gemessen. Rechts angezeigt sind die Spektrumsanalysen mit den klassischen Triplettsignalen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3-4 unabhängigen Messungen. §, $<0,05$ vs. 75mg/kg/d ISMN.

4.3.2. Endotheliale und vaskuläre Funktion und Dysfunktion nach ISDN in vivo Therapie: Isometrische Spannungsmessungen in Aortenringen von Mäusen

Wiederum kam die bereits oben beschriebene Methode zur isometrischen Spannungsmessung zum Einsatz, um die Endothel- und Gefäßfunktion nach in vivo ISDN-Behandlung zu testen. In der mit ISDN behandelten Gruppe war eine signifikant geringere Relaxationsfähigkeit auf Gabe von Acetylcholin zu beobachten. Bei Acetylcholkonzentrationen von $10^{-6,5}$ M war die Relaxation in der ISDN-Gruppe bei circa 50%, wohingegen sie in der Kontrollgruppe bei ca. 65% lag. In der mit ISDN plus Macitentan behandelten Gruppe wurde ein Wert von ca. 60% und damit eine annähernd gleiche Relaxationsfähigkeit wie in der Kontrollgruppe erreicht (Abbildung 4-8 A). Macitentan führte folglich zur Normalisierung der ISDN induzierten endothelialen Dysfunktion.

Bei Durchführung der Relaxationsstudie mit ansteigenden Dosen von ISDN ergaben sich bei keiner der drei Gruppen Unterschiede in der prozentualen Relaxationsfähigkeit. Es zeigte sich keine Nitrattoleranz für ISDN (Abbildung 4-8 B). Ähnlich verhielt es sich bei Durchführung der Studie mit GTN. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede in der Relaxationsfähigkeit innerhalb der Gruppen und folglich keine Kreuztoleranz gegenüber GTN (Abbildung 4-8 C).

Die Gabe des Vasokonstriktors Prostaglandin $F_{2\alpha}$ zeigte in den einzelnen Gruppen keinen Unterschied in der prozentualen Konstriktion des Gefäßes im Organbad (nicht abgebildet).

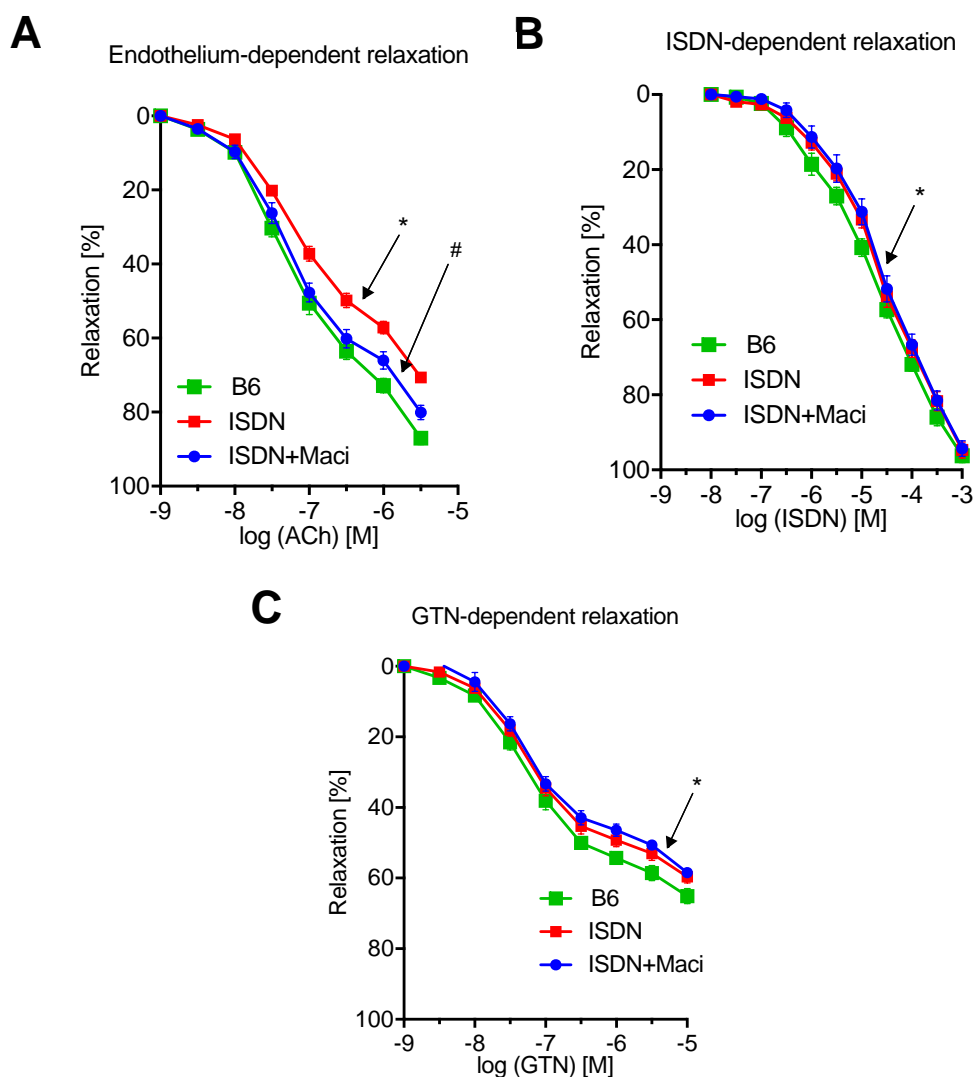


Abbildung 4-8 Isometrische Spannungsmessungen zum Einfluss von ISDN auf die Gefäßfunktion (Maus)

Die Gefäßfunktion wurde mithilfe isometrischer Spannungsmessungen im Organbad untersucht. Unter Gabe von aufsteigenden Dosen des natürlichen Agens Acetylcholin (A) und von ISDN (B) und GTN (C) wurde die Vasodilatation des Gefäßes gemessen. Vorab wurde eine Konstriktion mit Gabe von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ induziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von Aortenringen von 10-12 (A-C) Mäusen pro Gruppe. *, $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (B6); #, $p < 0,05$ vs. ISDN.

4.3.3. Endotheliale und vaskuläre Funktion und Dysfunktion nach ISMN in vivo Therapie: Isometrische Spannungsmessungen in Aortenringen von Mäusen

In der mit ISMN (75mg/kg/d) behandelten Gruppe war eine markante Beeinträchtigung der acetylcholinabhängigen Relaxation zu verzeichnen. Die Hinzugabe von Macitentan in der ISMN+Macitentan-Gruppe verbesserte die Relaxation deutlich. So wurde für ISMN eine Einbuße in der prozentualen Relaxationsfähigkeit von 20-30% gegenüber der Kontrollgruppe gemessen. Diese Differenz wurde durch Macitentangabe um mindestens die Hälfte vermindert (Abbildung 4-9A) und somit die

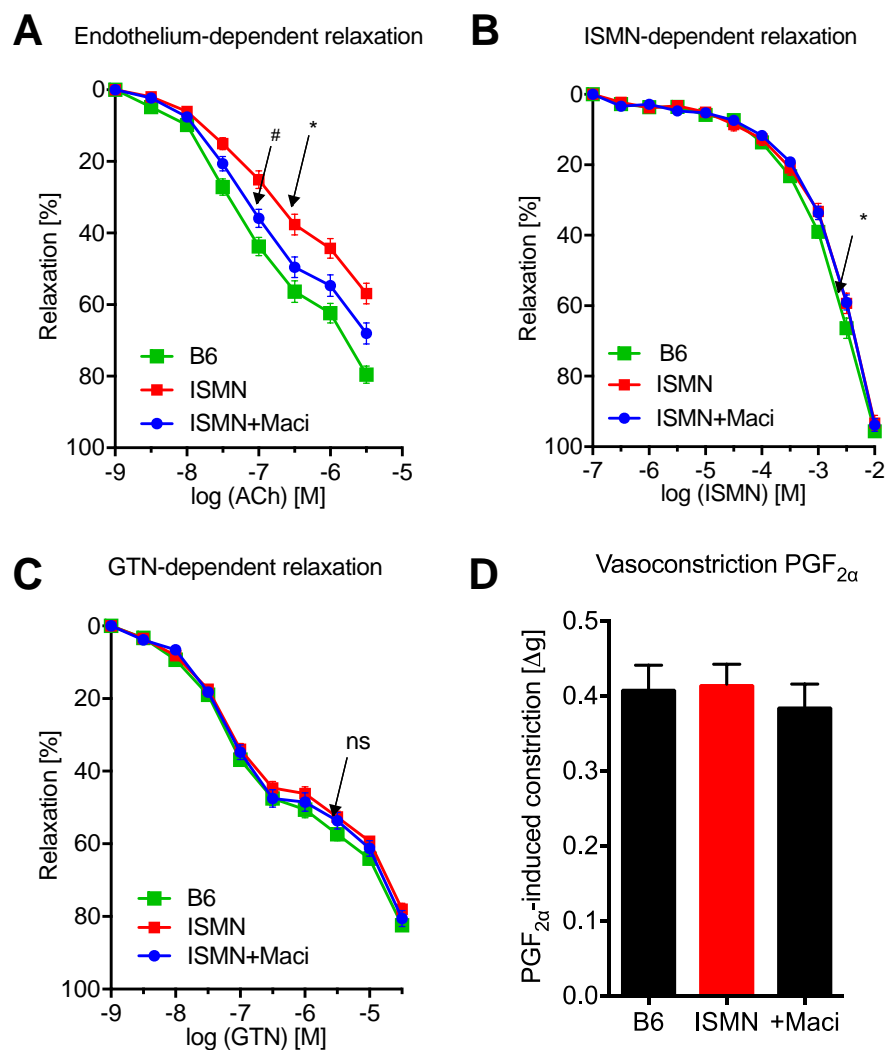


Abbildung 4-9 Isometrische Spannungsmessungen zum Einfluss von ISMN auf die Gefäßfunktion (Maus)

Die Gefäßfunktion wurde mithilfe isometrischer Spannungsmessungen im Organbad untersucht. Unter Gabe von aufsteigenden Dosen von Acetylcholin (A) und von ISMN (B) und GTN (C) wurde die Vasodilatation des Gefäßes gemessen. Vorab wurde eine Konstriktion mit Gabe von Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ induziert und diese als Diagramm abgebildet (D). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von Aortenringen von 15-21 (A), 12-16 (B), 13-19 (C) und 16-24 (D) Mäusen pro Gruppe. *, $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (B6); #, $p < 0,05$ vs. ISMN.

durch ISMN induzierte endotheliale Dysfunktion reduziert. In der ISMN abhängigen Relaxationsmessung wurden keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen und somit keine Toleranz gegen ISMN festgestellt. In allen drei Gruppen haben aufsteigende Dosen ISMN das gleiche Maß an Gefäßrelaxation gezeigt (Abbildung 4-9 B). Auch die Hinzugabe von GTN als •NO-Donor hat keine Differenzen in der Relaxationsfähigkeit der Gefäße gezeigt (Abbildung 4-9C). Es ließ sich folglich keine Kreuztoleranz gegenüber GTN aufzeigen. Die Behandlung mit ISMN oder ISMN+Macitentan hat keinen Unterschied bezüglich der Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) induzierten Vasokonstriktion gezeigt. Es gab demnach keine Anzeichen für eine Supersensitivität gegenüber Prostaglandin F_{2α} unter einer Therapie mit ISMN oder ISMN+Macitentan (Abbildung 4-9D).

4.4. Vaskulärer oxidativer Stress, Inflammation und Endothelin Signaltransduktion nach ISMN oder ISDN-Therapie in der Maus

Zur Beurteilung des oxidativen Stresses im Gewebe wurden diverse Studien an Herz- und Aortengewebe durchgeführt. Zur histologischen Darstellung wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Aorta mit DHE angefertigt. Immunhistochemisch wurde Endothelin-1 in Aorten nachgewiesen. Um den inflammatorischen Status des Gewebes genauer zu untersuchen, wurden mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) aus Aortengewebe die Expression wichtiger Inflammationsmarker wie NOX-2, MCP-1, IL-6 gemessen. Zudem wurden proteinbiochemisch mit Western-Blot und Dot-Blot Verfahren die Expression von 3-NT, NOX-2, ET_B-Rezeptor, sowie der Inflammationsmarker F4/80 gemessen. Entsprechend der Chemilumineszenzmessung zur Aktivität der leukozytären NADPH-Oxidase wurde auch die Aktivität der membranösen NADPH-Oxidase aus Herzgewebe gemessen. Hierzu wurden als Substrat NADPH und der superoxidspezifische Chemilumineszenzfarbstoff Lucigenin verwendet.

4.4.1. Vaskulärer oxidativer Stress und Inflammation nach ISDN-Behandlung in der Maus

4.4.1.1. DHE Fluoreszenzmikroskopie und NOX-Expression (ISDN)

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit DHE inkubierten Aortenschnitte zeigten annähernd eine Verdopplung der Signalintensität der Fluoreszenz in der ISDN-Gruppe als Indiz einer vermehrten ROS-Bildung unter organischer Nitrattherapie (Abbildung 4-10A). Die Ko-Behandlung mit Macitentan reduzierte das Signal um etwa 80% auf ein Niveau ca. 20% über dem der Kontrollgruppe. Es zeigte sich ein eindeutiger Anstieg im oxidativen Stress unter ISDN-Therapie, der durch Macitentangabe fast normalisiert wird.

In der über qRT-PCR gemessenen mRNA-Expression der NOX-2 ließ sich in der mit ISDN behandelten Gruppe kein signifikanter Anstieg verzeichnen. Die Therapie mit Macitentan bewirkte jedoch einen zur ISDN-Gruppe signifikanten Abfall um ca. 30% (Abbildung 4-10B).

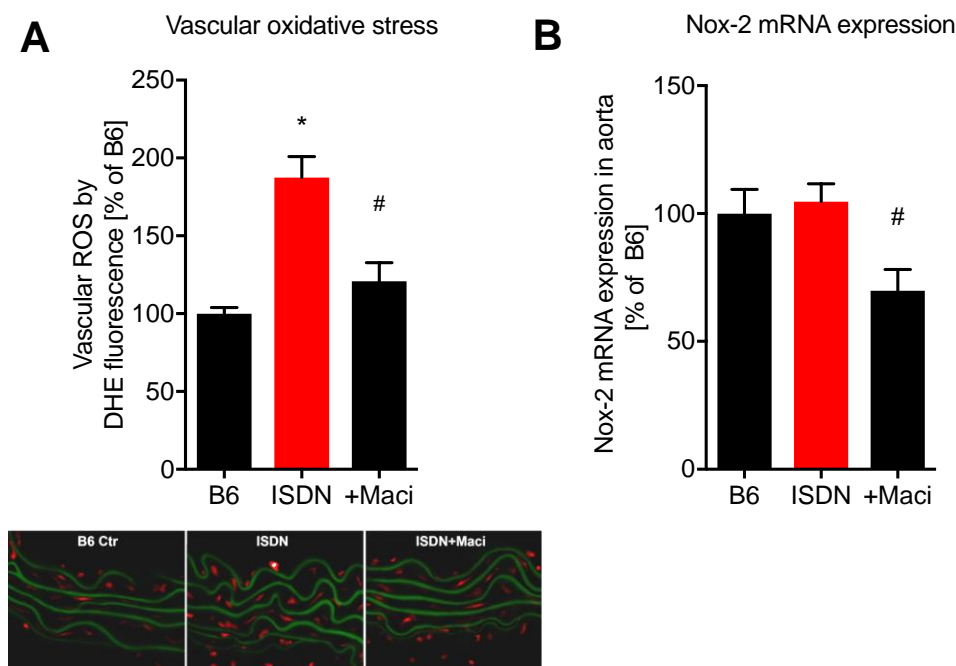


Abbildung 4-10 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zum Einfluss von ISDN und Macitentan auf den oxidativen Stress im Gefäßsystem und qRT-PCR zur mRNA Expression von NOX-2 in Aortengewebe (ISDN)

Die Kryoschnitte isolierter Aortensegmente wurden mit DHE versetzt und unter einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Das Diagramm gibt die densitometrisch ermittelten Intensitäten der ROS-spezifischen Fluoreszenz prozentual zum Signal der Kontrollgruppe (B6) an. Unter dem Diagramm abgebildet sind repräsentative Ausschnitte der Fluoreszenzfärbungen: rot = reaktive Sauerstoffspezies, grün = Autofluoreszenz der Laminae (A). Die mRNA Expression wurde mithilfe der qRT-PCR im Aortengewebe untersucht. Das Diagramm gibt prozentual das Verhältnis zur mRNA Expression der Kontrollgruppe (B6) an (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von Aortensegmenten von 12 Mäusen pro Gruppe (A) und 5 Mäusen pro Gruppe (B). *, $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (B6); #, $p < 0,05$ vs. ISDN.

4.4.1.2. Marker der Inflammation - MCP-1 und IL-6 mRNA-Expression (ISDN)

Die Expression der mRNA von MCP-1 ergab keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen, obgleich eine deutliche Tendenz nach oben in der ISDN-Gruppe, sowie der anschließende Abfall in der Macitentan-Gruppe sichtbar waren (Abbildung 4-11A). In der qRT-PCR wurde für das Zytokin IL-6 gegenüber der Kontrollgruppe in der ISDN-Gruppe eine sehr starke, um 120%, gesteigerte Expression gemessen, die statistisch signifikant war. In der Macitentan-Gruppe kam es zu einem signifikanten Abfall auf 90% des Wertes der Kontrollgruppe und somit zu einer kompletten Normalisierung (Abbildung 4-11B). Die erhöhte Aktivität der Phagozyten und der inflammatorische Phänotyp unter ISDN wird hier erstmalig deutlich aufgezeigt, wobei eine Endothelin-Rezeptorblockade zu einer kompletten Normalisierung dieses Phänotyps führt.

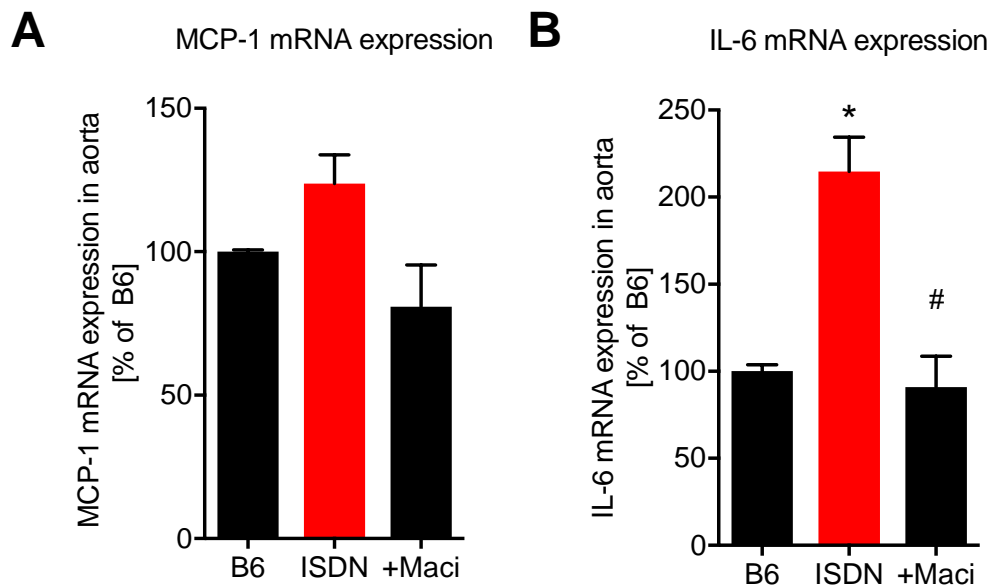


Abbildung 4-11: qRT-PCR zur mRNA Expression von MCP-1 (A) und IL-6 (B) in Aortengewebe (ISDN)

Die mRNA Expression wurde mithilfe der qRT-PCR im Aortengewebe untersucht. Das Diagramm gibt prozentual das Verhältnis zur mRNA Expression der Kontrollgruppe (B6) an. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Mäusen pro Gruppe (A,B). *, $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (B6); #, $p < 0,05$ vs. ISDN.

4.4.1.3. Endothelin Signaltransduktion nach ISDN Behandlung in der Maus

Die immunhistochemische Färbung für Endothelin-1 im Endothel isolierter Aorten zeigte eine leichte Erhöhung in der ISDN-Gruppe, die in der Macitentangruppe geringfügig abfiel (Abbildung 4-12A). In der qRT-PCR zeigte die ISDN-Gruppe eine nicht signifikante Erhöhung der ECE-1 mRNA-Expression. In der Macitentan-Gruppe kam es zu einer signifikanten Reduktion auf ca. 75% des Kontrollgruppenwertes (Abbildung 4-12B).

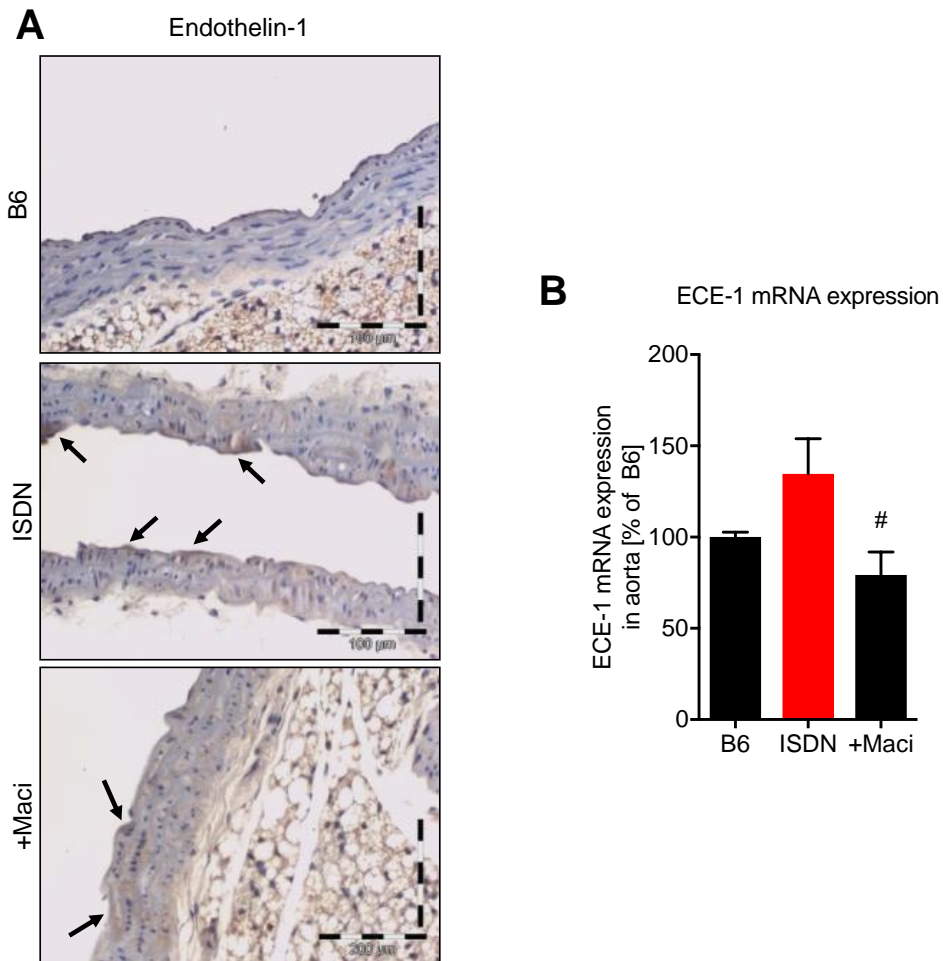


Abbildung 4-12: Immunhistochemie zur Visualisierung der Endothelin-1 Expression in Paraffinschnitten des Aortengewebes (ISDN) und qRT-PCR zur mRNA Expression von ECE-1 in Aortengewebe (ISDN)

ET-1 wurde mittels eines spezifischen Primärantikörpers immunhistochemisch nachgewiesen. Nach Bindung des enzymgekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte die Umsetzung des Substrats und Absetzen des braunen Produktpräzipitats im Gewebe. Abgebildet sind repräsentative Ausschnitte mit Pfeilen, die auf das lichtmikroskopisch visualisierte ET-1 im Aortengewebe deuten. Dargestellt ist eine Auswahl von insgesamt 4 unabhängigen Versuchen (A). Die mRNA Expression wurde mithilfe der qRT-PCR im Aortengewebe untersucht. Das Diagramm gibt prozentual das Verhältnis zur mRNA Expression der Kontrollgruppe (B6) an (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 8-9 Mäusen pro Gruppe. #, $p < 0,05$ vs. ISDN (B).

4.4.2. Vaskulärer oxidativer Stress und Inflammation nach ISMN-Behandlung in der Maus

4.4.2.1. DHE-Fluoreszenzmikroskopie, 3-NT-Konzentration und NOX-Aktivität

Die Anfärbung von Kryoschnitten der Aorta mit DHE, erlaubt DHE eine hochspezifische Detektion und topographische Zuordnung von Superoxid (28). Nach Inkubation der Gewebeproben Gewebeschnitte mit DHE werden diese unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt, fotografiert und die roten Farbtensitäten digital densitometrisch quantifiziert. In Aortenschnitten der mit ISMN behandelten Gruppe konnte gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante, ca. 2,5-fach erhöhte ROS-Bildung nachgewiesen werden. Dies konnte durch Hinzugabe von Macitentan in der dritten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe um ca. 20% auf ein 2-fach erhöhtes Niveau gesenkt werden (Abbildung 4-13A).

Zur Bestimmung der 3-NT positiven Proteine im Herzgewebe wurden Dot-Blot Analysen durchgeführt. In diesem proteinbiochemischen Assay wurde das Herzgewebe in mehreren Schritten homogenisiert, die Proteine isoliert und daraufhin im Dot-Blot Verfahren punktartig auf einer Nitrozellulosemembran fixiert. Anschließend wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper gegen 3-NT inkubiert. Nach Bindung des ersten Antikörpers erfolgte die Inkubation mit dem zweiten, Peroxidasegekoppelten Antikörper (HRP, *horse radish peroxidase*). Nach Inkubation mit ECL-Reagenz wurde die über die Peroxidase erzeugte Fluoreszenz in einer Dunkelkammer dokumentiert und anschließend densitometrisch quantifiziert.

In Herzproteinen zeigte sich in der ISMN-Gruppe eine signifikante, ca. 90%ige Erhöhung der 3-NT-Konzentration, welche durch eine Macitentan-Ko-Behandlung fast vollständig auf das Niveau der Kontrollgruppe zurückgeführt wurde (Abbildung 4-13B). Zur weiteren Untersuchung des Herzgewebes wurde in Herz-Membranfraktionen die Aktivität der membranösen NADPH-Oxidase NOX-2 mit dem Substrat NADPH, sowie dem Chemilumineszenzfarbstoff Lucigenin gemessen. Das Signal wurde mit einem Chemilumineszenzdetektor erfasst und in der Einheit counts/s quantifiziert. Die mit ISMN behandelte Gruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante, um ca. 20% erhöhte NADPH-Oxidase -Aktivität, die sich unter zusätzlicher Macitentantherapie fast auf das Niveau der Kontrollgruppe zurückbildete (Abbildung 4-13C).

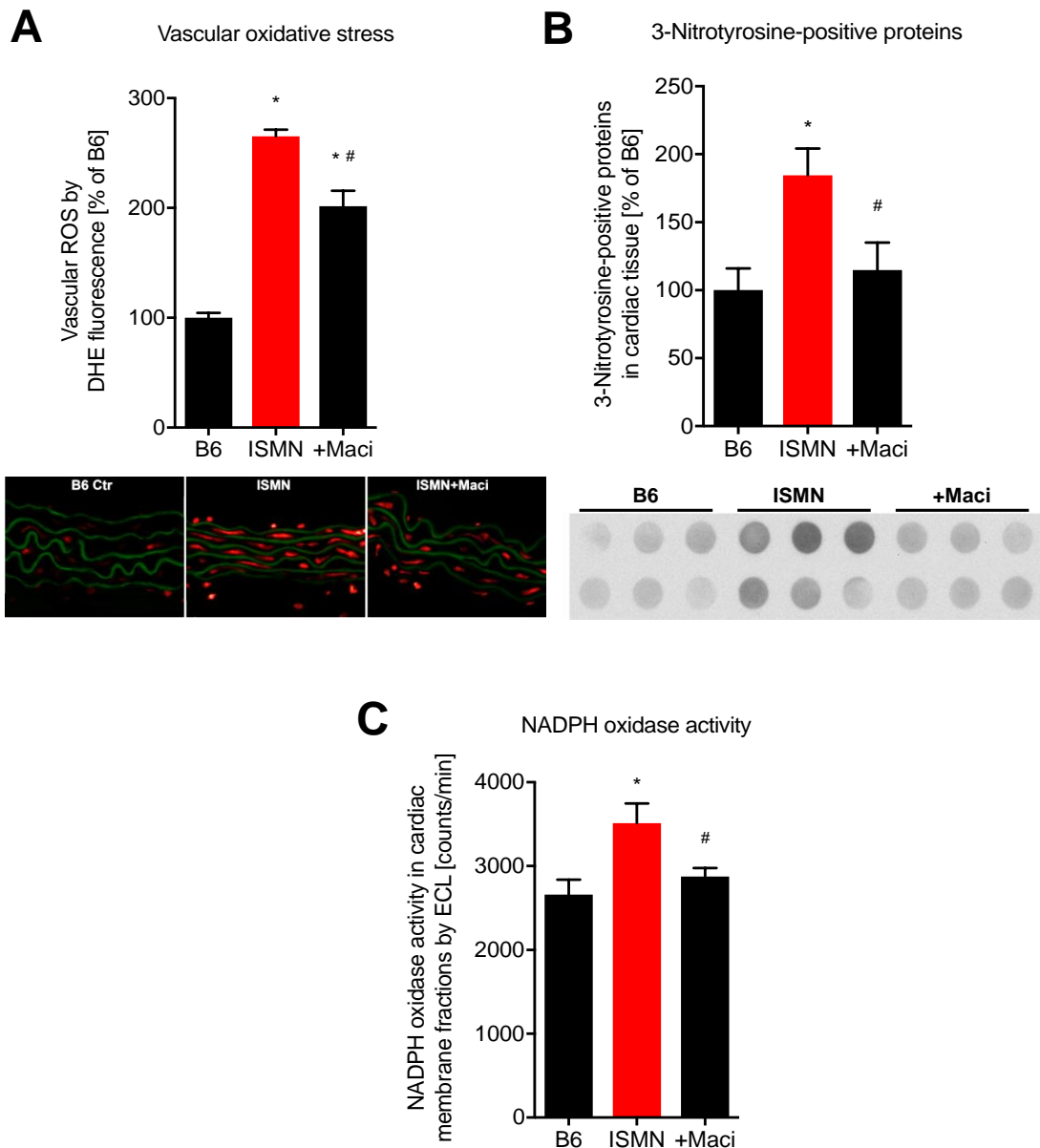


Abbildung 4-13 DHE Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung des oxidativen Stresses, Dot-Blot Analyse zum Gehalt 3-Nitrotyrosin positiver Proteine und NADPH-Oxidase Aktivität im Herzgewebe

Die Kryoschnitte isolierter Aortensegmente wurden mit DHE versetzt und unter einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Das Diagramm gibt die densitometrisch ermittelten Intensitäten der Fluoreszenzsignale prozentual zum Signal der Kontrollgruppe (B6) an. Unter dem Diagramm sind repräsentative Ausschnitte der Fluoreszenzfärbung abgebildet: rot = reaktive Sauerstoffspezies, grün = Autofluoreszenz der Laminae (A). Das Protein aus Herzgewebe wurde mithilfe eines spezifischen 3-NT Antikörpers im Dot-Blot untersucht. Repräsentative Blots sind unter dem Diagramm abgebildet (B). Die Superoxidproduktion wurde in Herzmembranen mithilfe des superoxidspezifischen Chemilumineszenzfarbstoffs Luzigenin und nach Gabe des Substrats NADPH mittels eines Chemilumineszenzassays gemessen (C). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens 6 Aortenringen (A), 8-9 (B) Herzen, und 5 gepoolten Proben von mindestens 15 Mäusen (C) pro Gruppe. *, $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (B6); #, $p < 0,05$ vs. ISMN.

4.4.2.2. NOX- 2 Protein- und mRNA-Expression (ISMN)

Um die erhöhte Aktivität der NOX im kardiovaskulären Gewebe weiter zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen zur Expression der NOX-2 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die NOX-2-Expression im Aortengewebe unter ISMN-Therapie signifikant anstieg. Die Zusatztherapie mit Macitentan erzeugte einen Abfall der Expression auf ein Niveau, das erstaunlicherweise der Hälfte des Kontrollgruppenniveaus entsprach (Abbildung 4-14A). Ein ähnlicher Trend ließ sich auch anhand von qRT-PCR Messungen in der mRNA-Expression der NOX-2 aus Aortengewebe erkennen. Obgleich der Anstieg in der ISMN-Gruppe nicht signifikant war, konnte dennoch ein zu beiden anderen Gruppen signifikanter Abfall in der Macitentangruppe nachgewiesen werden, der in etwa 60% des Wertes der Kontrollgruppe entsprach (Abbildung 4-14B).

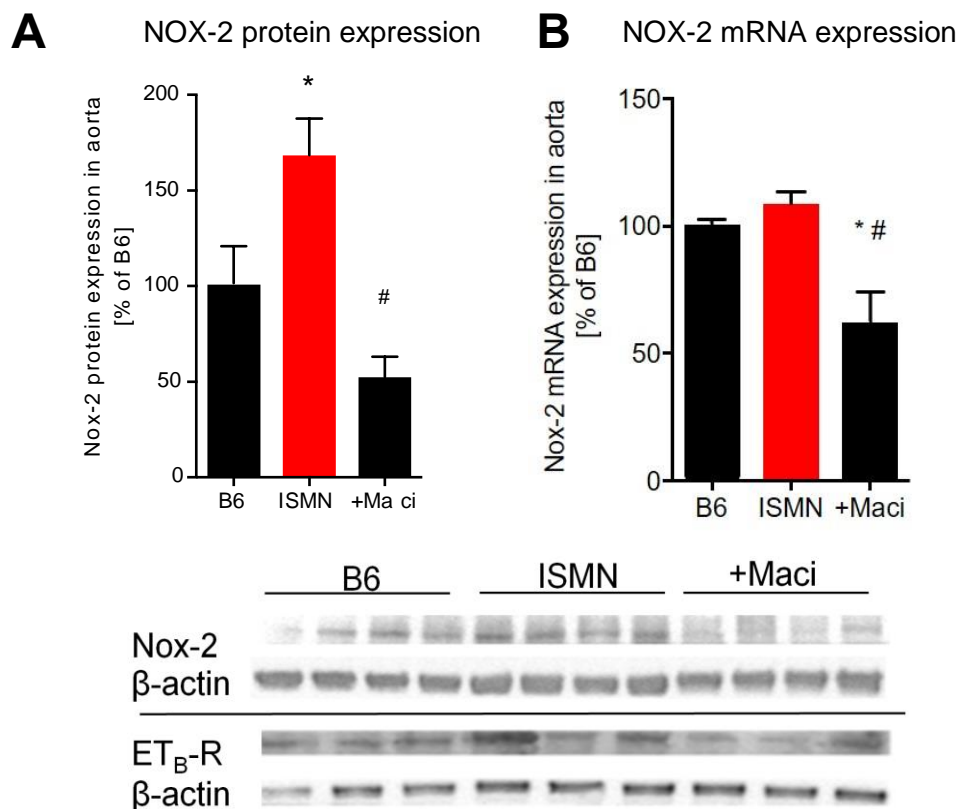


Abbildung 4-14: Western-Blot Analyse zur Protein- und qRT-PCR zur mRNA Expression von NOX-2 in Aortengewebe (ISMN)

Das Protein aus Herzgewebe wurde mithilfe eines spezifischen NOX-2 Antikörpers im Western-Blot untersucht. Repräsentative Blots inkl. β -Aktin Ladungskontrolle sind unter dem Diagramm abgebildet (A). Die mRNA Expression wurde mithilfe der qRT-PCR im Aortengewebe untersucht. Das Diagramm gibt prozentual das Verhältnis zur mRNA Expression der Kontrollgruppe (B6) an (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens 5-6 (A) und 9-10 (B) Mäusen pro Gruppe. *, $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (B6); #, $p < 0,05$ vs. ISMN.

4.4.2.2. Marker der Inflammation - F4/80, MCP-1 und CD11b Expression (ISMN)

Dot-Blot-Analysen zeigten, dass die Proteinexpression des Inflammationsmarkers F4/80, der in Mäusen als Marker für Zellen des Immunsystems wie beispielsweise Makrophagen gilt, in der mit ISMN behandelten Gruppe signifikant erhöht war (50% über der Kontrollgruppe). Die zusätzliche Therapie mit Macitentan bewirkte einen Abfall des F4/80 auf ein Niveau ca. 30% unter dem der Kontrollgruppe (Abbildung 4-15A). Dies unterstreicht den inflammatorischen Phänotyp unter ISMN-Therapie und den positiven Effekt von Macitentan.

Das Oberflächenmolekül von Leukozyten CD11b (*cluster of differentiation 11b*) ist u.a. essentiell bei der Adhäsion von aktivierten Leukozyten. Anhand von qRT-PCR Messungen der CD11b mRNA-Expression ließ sich in der mit ISMN behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ein Anstieg messen, der sich in der zusätzlich mit Macitentan behandelten Gruppe verringerte. Die Ergebnisse blieben statistisch nicht signifikant (Abbildung 4-15B).

MCP-1 (CCL2) ist ein Chemokin und bewirkt, dass Makrophagen und Monozyten in das Gewebe einwandern. Anhand von qRT-PCR Messungen der mRNA-Expression von MCP-1 ließ sich in der mit ISMN behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe eine starke Tendenz nach oben feststellen, die jedoch nicht signifikant war. Die Behandlung mit Macitentan führte zu einem signifikanten Abfall der MCP-1 mRNA-Expression auf ein Niveau, das circa 30% unter dem Niveau der Kontrollgruppe lag (Abbildung 4-15C). Erneut zeigt sich der antiinflammatorische Effekt Macitentans.

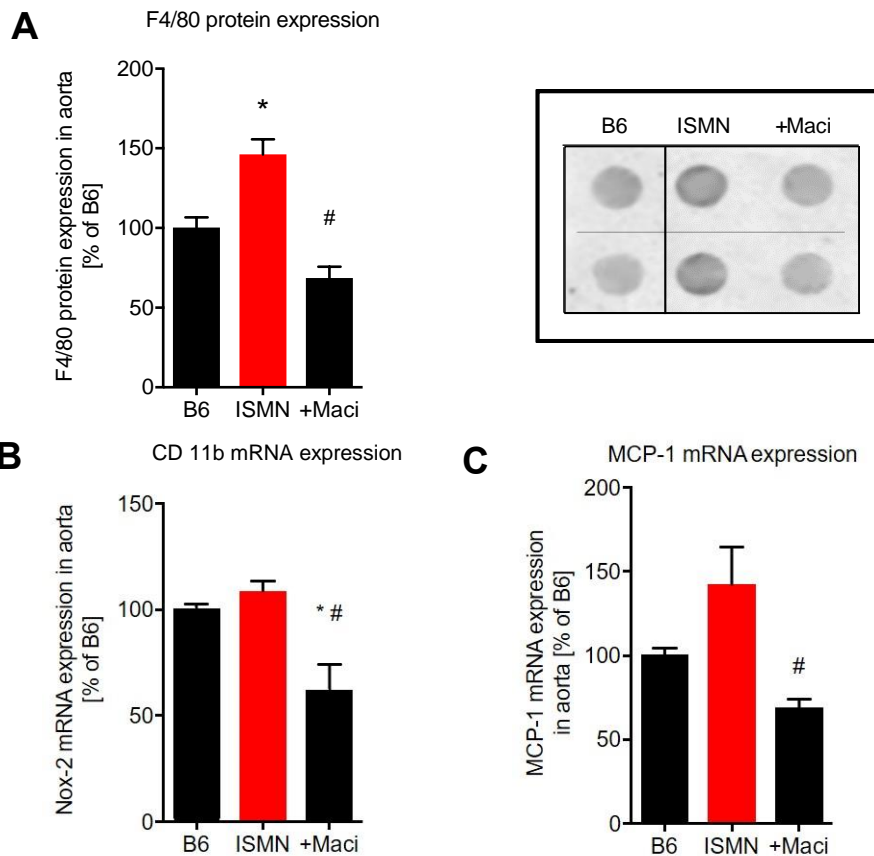


Abbildung 4-15 Dot-Blot Analyse zur Protein-Expression von F4/80 und qRT-PCR zur mRNA Expression von MCP-1 und CD11b in der Aorta

Das Protein aus Aorten wurde mithilfe eines spezifischen F4/80 Antikörpers im Dot-Blot untersucht. Repräsentative Blots sind rechts neben dem Diagramm abgebildet (A). Die mRNA Expression von CD11b (B) und MCP-1 (C) wurde mithilfe der qRT-PCR im Aortengewebe untersucht. Das Diagramm gibt prozentual das Verhältnis zur mRNA Expression der Kontrollgruppe (B6) an. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens 4-7 (A), 6-7 (B) und 8-9 (C) Mäusen pro Gruppe. *, $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (B6); #, $p < 0,05$ vs. ISMN.

4.4.2.3. Endothelin Signaltransduktion nach ISMN-Behandlung in der Maus

In der Prozedur des Peptidhormons Endothelin-1 wird das Vorgängermolekül, das Präproendothelin, in mehreren Schritten durch Endopeptidasen gespalten. Im letzten, essentiellen Schritt wird das unmittelbare Vorläufermolekül Big Endothelin-1 (Proendothelin) durch das endothelin converting enzyme-1 (ECE-1) in das aktivierte Endothelin-1 gespalten (123). Ein wichtiges Zielprotein im Zusammenhang des Endothelinmetabolismus ist der Endothelinrezeptor B (ET_B). In Western-Blot-Analysen konnten zwischen den verschiedenen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Protein-Expression von ET_B festgestellt werden (Abbildung 4-16A). Die immunhistochemische Darstellung von Endothelin-1 in Aortengewebe zeigte eine

deutlich erhöhte Expression in der mit ISMN behandelten Gruppe, die unter Macitentherapie teilweise zurückging (Abbildung 4-16B). Hinsichtlich der Expression an ECE-1 mRNA ergab sich innerhalb der Gruppen kein signifikanter Unterschied (Abbildung 4-16C).

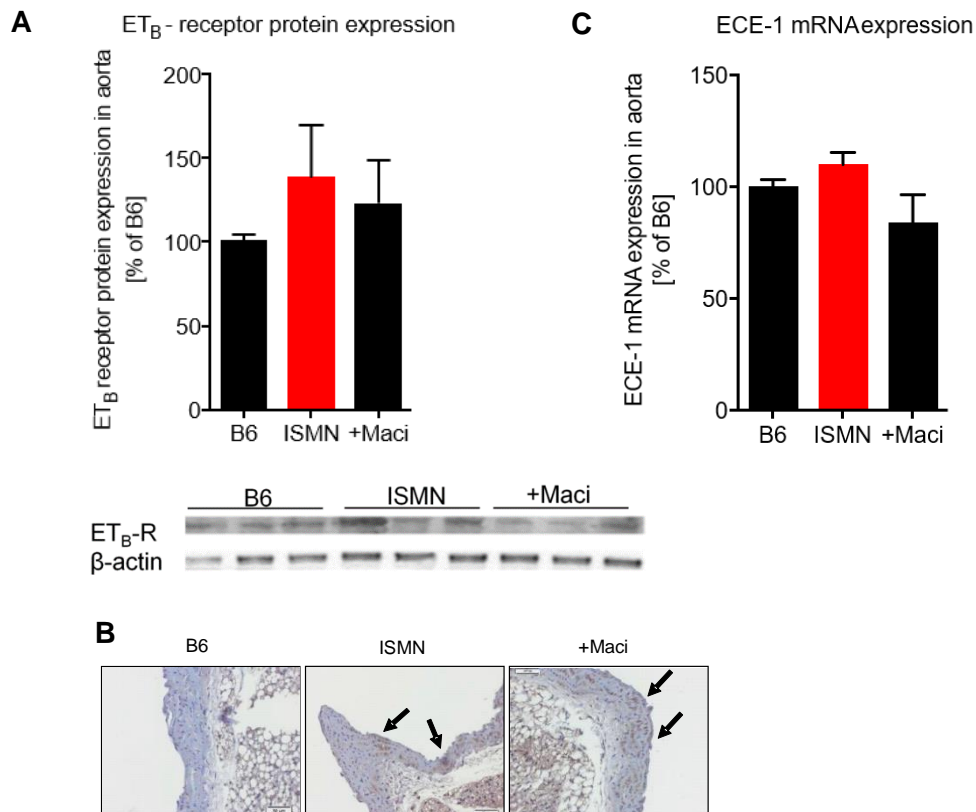


Abbildung 4-16: Western-Blot Analyse, qRT-PCR und Immunhistochemie zur Expression von ET_B, ECE-1 und Endothelin-1 in Aortengewebe (ISMN)

Das Protein aus Aortengewebe wurde mithilfe eines spezifischen ET_B Antikörpers im Western-Blot untersucht. Repräsentative Blots inkl. β -Aktin Ladungskontrolle sind unter dem Diagramm abgebildet (A). ET-1 wurde mittels eines spezifischen Primärantikörpers für ET-1 immunhistochemisch nachgewiesen. Nach Bindung des enzymgekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte die Umsetzung des Substrats und Absetzen des braunen Produktpräzipitäs im Gewebe. Abgebildet sind repräsentative Ausschnitte mit Pfeilen, die auf das lichtmikroskopisch visualisierte ET-1 im Aortengewebe deuten (B). Die mRNA Expression von ECE-1 wurde mithilfe der qRT-PCR im Aortengewebe untersucht. Das Diagramm gibt prozentual das Verhältnis zur mRNA Expression der Kontrollgruppe (B6) an (C). Dargestellt ist eine Auswahl von 4 unabhängigen Messungen (B) und Mittelwerte \pm SEM von 5-6 (A) und 3 (C) Mäusen pro Gruppe.

5. Diskussion

Die Entstehung der Nitrattoleranz unter der Therapie mit organischen Nitraten ist ein komplexer Vorgang, der sich auf mehreren Kompartimenten innerhalb der Zelle, sowie in anatomisch verschiedenen Bereichen des Gefäßsystems abspielt. Pathophysiologisch ist die treibende Kraft ein erhöhter oxidativer Stress durch vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der zu den Phänomenen der Endotheldysfunktion und vaskulären Inflammation beiträgt und sie vorantreibt. Schon früh hatte man im Rahmen von in vivo Studien mit Koronararterien vom Schwein eine Verringerung von Thiolresten unter der Therapie mit ISMN und GTN beobachtet. Die ROS führen hier zu einer Oxidation der Thiolreste und Entstehung von Disulfidbrückenbindungen. So zeigte sich die Konzentration von Disulfidbindungen im gleichen Maße erhöht. Nach mechanischer Entfernung des Endothels war dieser Verlust von Thiolresten unter GTN und ISMN-Therapie deutlich verringert (124). Das unterstreicht erneut die pathophysiologische Bedeutung des Endothels für den oxidativen Stress unter der Therapie mit GTN und ISMN. In vielen weiteren Studien wurde dieser Zusammenhang für das organische Nitrat GTN nachgewiesen und die einzelnen Mechanismen ausführlich diskutiert (21, 22, 34).

Die Datenlage bezüglich der negativen Auswirkungen von ISMN und insbesondere ISDN ist dagegen limitiert. Über die Pharmakokinetik von ISMN und ISDN ist bekannt, dass diese nicht über die mitochondriale ALDH-2 aktiviert werden, welche im Rahmen der GTN induzierten endothelialen Dysfunktion als eine weitere ROS-Quelle identifiziert wurde (23, 125). Der erste Verdacht eines Zusammenhangs zwischen ISMN-induzierter endothelialer Dysfunktion und oxidativem Stress konnte bestätigt werden, indem Antioxidantien wie Vitamin C zu einer kompletten Remission der Dysfunktion in menschlichen Probanden geführt haben (65).

Neuere Daten zeigten unter ISMN-Therapie eine signifikante Erhöhung der Endothelin-1 Konzentration, eine erhöhte NOX-2-Aktivität sowie eine Entkopplung der eNOS (7). Auch für GTN konnte ein erhöhter Metabolismus und eine erhöhte Aktivität des Endothelinsystems nachgewiesen werden (56, 126), die eingängig diskutiert wurde (22, 34). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Endothelin-1-Aktivität zur Aktivierung der NOX-2 beiträgt, damit den oxidativen Stress erhöht (88, 89) und andersherum der erhöhte oxidative Stress auch die Endothelinexpression steigert, womit die Endothelin-vermittelte Vasokonstriktion um ein Vielfaches potenziert wird (57, 58, 91). Weiterhin führte die Gabe von ISMN zu

einer erhöhten Aktivität der leukozytären NOX und legt damit einen inflammatorischen Phänotyp nahe, der ebenfalls zum oxidativen Stress beiträgt und im Rahmen der ISMN-Therapie entsteht (7). Ein Hauptanliegen dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang von ISMN und ISDN mit endothelialer Dysfunktion, oxidativen Stress und Inflammation darzustellen. Ferner sollen diese unerwünschten Nebenwirkungen durch das Antagonisieren des Endothelinrezeptors aufgehoben bzw. vermindert werden. Perspektivisch ist es das Ziel, basierend auf den Erkenntnissen aus dieser Arbeit, eine Kombinationstherapie aus ISMN oder ISDN mit Endothelinrezeptorantagonisten voranzutreiben bzw. zu ermöglichen. Dadurch könnte man bei der Therapie mit ISMN und ISDN die schädlichen Nebenwirkungen unterbinden und dem Patienten im klinischen Setting einen Morbiditäts- und Mortalitätsvorteil schaffen.

Als adäquater Wirkstoff wurde der nicht selektive Endothelinrezeptorantagonist Macitentan gewählt. Er ist in der Lage die Bindung des Gewebehormons Endothelin an seine Rezeptoren (ET_A und ET_B) zu unterdrücken und zeigt für die Therapie der pulmonalen Hypertonie einen deutlichen Morbiditäts- und Mortalitätsvorteil (83). Er zeichnet sich gegenüber seinem Vorgänger Bosentan durch eine verlängerte Rezeptorbindung, eine bessere Gewebegängigkeit und ein klinisch verbessertes Nebenwirkungsprofil aus (84-86).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erneut bestätigt werden, dass eine Behandlung mit ISMN und erstmalig auch ISDN zu einer endothelialen Dysfunktion, nicht jedoch zu einer Nitrattoleranz gegen sich selbst oder Kreuztoleranz gegen GTN führt. Die Gabe der Nitrate erhöhte den vaskulären oxidativen Stress über die Aktivierung der leukozytären NOX. Weiterhin kam es zu einer erhöhten Expression von Endothelin-1 in den Gefäßen und einem proinflammatorischen Phänotyp. Der nicht selektive Endothelinrezeptorantagonist Macitentan verbesserte die Endothelfunktion, den Status der Inflammation und verringerte den oxidativen Stress im Blut und im Gefäßsystem. Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist der erstmalige Beweis des Zusammenhangs zwischen ISDN-induzierter endothelialer Dysfunktion und erhöhter Endothelin-1-Expression, erhöhter Sensitivität gegenüber Endothelin-1-Signaltransduktion, vermehrtem oxidativem Stress und vaskulärer Inflammation im Tiermodell. Die ISDN-induzierte endotheliale Dysfunktion wurde bereits an menschlichen Probanden gezeigt, jedoch bisher ohne Nachweis eines Mechanismus (66). Im Folgenden soll detailliert auf die einzelnen o.g. Komponenten und die Effekte des Endothelinrezeptorantagonismus eingegangen werden.

5.1. ISMN und Macitentan

5.1.1. Endothelfunktion (ISMN)

Als Mediator zwischen dem Blutfluss und der angrenzenden Muskelschicht kommt dem Endothel eine zentrale Aufgabe in der Homöostase des Herz- Kreislauf- Systems zu. Es reguliert den Blutfluss, Thrombozytenaggregation, den Gefäßtonus und ist weiterhin an der Inflammation und der Angiogenese beteiligt und fungiert als wichtiges metabolisch und endokrin aktives Gewebe (127).

Die Reaktion des Endothels auf das natürliche Agens Acetylcholin kann in isolierten Aortenringen im Rahmen isometrischer Spannungsmessungen untersucht werden und gilt als etabliertes Verfahren zum Test der Endothelfunktion (128). Die Endothelfunktion liefert als globale Funktionsprüfung Informationen über die Intaktheit des Endothels und ist letztlich das klinisch sichtbare Korrelat potentieller Gefäßschäden sowie eines Therapieerfolges bzw. Misserfolges, um diese Gefäßschäden zu beseitigen. Daher wird diese physiologische Anpassungsfähigkeit des Endothels auf verschiedene Reize als intakte Endothelfunktion bezeichnet.

Im in vivo Modell zeigen organische Nitrate wie ISMN, ISDN und GTN ihren blutdrucksenkenden Effekt mehr durch eine Dilatation venöser Kapazitätsgefäße als im arteriellen System (129). Dennoch sind die Endotheldysfunktion und die vaskuläre Inflammation in den Arterien, insbesondere den Koronararterien und der Aorta pathophysiologisch von höchster Relevanz. Die Atherosklerose der Koronararterien definiert die koronare Herzerkrankung und damit die Krankheitsentität mit der höchsten Mortalität der Industrienationen unserer Zeit (2). Aus diesem Grund wird in dieser, wie auch in anderen Arbeiten zur Untersuchung von Nebenwirkungen organischer Nitrate, das arterielle System untersucht.

Die Verabreichung von ISMN zeigte im Tiermodell eine endotheliale Dysfunktion. Diese Beobachtung der endothelialen Dysfunktion unter längerer Behandlung mit ISMN konnte am Menschen ebenfalls beschrieben werden. In Patienten mit KHK führte die Behandlung mit ISMN zu einer gestörten flussabhängigen Gefäßdilatation der Unterarmarterien (*flow mediated dilation*, FMD) (130). Die FMD ist ein klinischer Funktionsparameter, der gut mit der Endothelfunktion der Koronargefäße korreliert (131). ISMN im Rahmen dieser Arbeit führte jedoch nicht zu einer Nitrattoleranz gegenüber sich selbst oder einer Kreuztoleranz gegenüber GTN. Dies geht einher mit früheren Arbeiten von Kojda et al., in denen die in vivo Therapie mit ISMN und PETN

nicht zu einer Verringerung der sGC-Expression und -Aktivität führte (132). Als ein Mechanismus für die Kreuztoleranz der organischen Nitrate untereinander wird die Desensibilisierung der sGC als gemeinsame Endstrecke der organischen Nitrate beschrieben (133). Für GTN konnte eine (134) Kreuztoleranz zu anderen organischen Nitraten beschrieben werden, die auf eine Desensibilisierung der sGC zurückzuführen ist. Diese Desensibilisierung konnte durch Gabe von Acetylcystein als Donor von Thiolgruppen aufgehoben werden und unterstreicht die Wichtigkeit der Redoxregulation der sGC (54).

Zurzeit sind mindestens vier verschiedene Cysteinreste der sGC beschrieben, die einer Redoxregulation unterliegen (22). Sie können durch Peroxynitrit, Superoxid und Aktivierung der induzierbaren •NO-Synthase (iNOS) im inflammatorischen Zustand oxidiert und damit inaktiviert werden (135-137). Die Inflammation ist ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (134, 138, 139). Durch die Therapie mit ISMN und ISDN konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine Aktivierung des inflammatorischen Systems gezeigt werden, die mit Macitentan zum Teil unterdrückt werden konnte. So konnte unter der Gabe von ISMN und GTN an kultivierten Makrophagen eine signifikante Erhöhung des Interleukin-6 beobachtet werden. Weiterhin zeigen immunhistochemische Untersuchungen eine signifikant erhöhte Expression von Interleukin-6 im Aortengewebe unter ISDN, die sich mit Macitentan gänzlich normalisierte. Der Effekt dieses inflammatorischen Phänotyps auf die Aktivität bzw. der Redoxstatus der sGC wurde in dieser Arbeit nicht explizit untersucht. Jedoch ist anzunehmen, dass sich die antiinflammatorische Eigenschaft der Endothelin-Rezeptor-Antagonisierung positiv auf die sGC-Aktivität und damit auf das Risikoprofil kardiovaskuläre Erkrankungen ausüben muss. Es bedarf weiterer Studien, um diesen Zusammenhang zu erforschen.

Die endotheliale Dysfunktion steht im Einklang mit bereits publizierten Arbeiten über ISMN am Tiermodell und beim Menschen (7, 65). In derselben Arbeit wurde zudem eine geringgradige Kreuztoleranz zu GTN gezeigt (7), was in dieser Studie nicht beobachtet werden konnte. Die Behandlung mit Macitentan führte zu einer signifikanten Verbesserung der Endothelfunktion, was als globaler Funktionstest eindeutig den vorteilhaften Effekt des Endothelin-Rezeptor-Antagonismus unterstreicht.

In keiner der drei Gruppen ließ sich eine Änderung der Sensitivität gegenüber dem Vasokonstriktor $\text{PGF}_{2\alpha}$ feststellen. Eine erhöhte Sensitivität für Vasokonstriktoren wie KCl, Angiotensin II und Phenylephrin konnte für ISMN bereits gezeigt werden (7).

5.1.2. Endothelin Signaltransduktion (ISMN)

Das Peptidhormon Endothelin ist der potenteste Vasokonstriktor des Organismus und wird mittels proteolytischer Prozessierung aus den Vorstufen Präproendothelin über Proendothelin (= Big Endothelin) mithilfe des ECE-1 zum aktiven Endothelin-1 umgewandelt (140).

Um die Kausalität zwischen Endothelinantagonismus und ISMN herstellen zu können, musste zunächst bewiesen bzw. bestätigt werden, dass die Korrelation zwischen chronischer ISMN-Behandlung und erhöhtem Endothelin Signaltransduktion überhaupt besteht.

Unter der Behandlung mit ISMN kam es zu einer Erhöhung der Endothelin-1-Expression im Aortengewebe, die visuell immunhistochemisch dargestellt wurde. Dies bestätigte die Literatur zur Erhöhung der Endothelinexpression, sowie dessen Vorstufe Big Endothelin unter ISMN-Behandlung und beweist die Korrelation der beiden Faktoren ISMN und Endothelin-1 in- vivo und ex- vivo an Endothelzellen menschlicher Nabelschnurvenen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECS) in denen eine erhöhte Expression des Präproendothelins unter ISMN-Behandlung gefunden wurde (7). Unter GTN-Therapie wurde die verstärkte Endothelin- Signaltransduktion ebenfalls beobachtet (56). In der Western-Blot-Analyse zeigte ISMN keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression des ET_B -Rezeptors in der Aorta der behandelten Tiere. Am menschlichen Modell intraoperativ entnommener Arterien, ließ sich nachweisen, dass die PKC zu einer erhöhten Expression von ET_B führt (141). Die PKC selbst wird durch GTN aktiviert (56). Es ließ sich keine erhöhte mRNA-Expression des Enzyms ECE-1 verzeichnen, welches Big Endothelin in das freie, aktive Endothelin spaltet.

5.1.3. Oxidativer Stress und Inflammation im Gefäßsystem und im Vollblut (ISMN)

Die endotheliale Dysfunktion im Rahmen der Nitrattherapie wird durch oxidativen Stress angetrieben und ausgelöst. Die erhöhte Konzentration des Superoxids „fängt“ das protektive •NO in einer diffusionslimitierten Reaktion ab und inaktiviert es. Dadurch geht nicht nur der protektive Effekt des •NO für das Gefäßsystem verloren, sondern zusätzlich kommt es zur erhöhten Synthese von Peroxynitrit, welches noch schädlichere oxidative Eigenschaften als Superoxid aufweist. In einzelnen Studien wurde ISMN im Tiermodell der Atherosklerose (induziert durch Hypercholesterinämie) eine ROS senkende Eigenschaft zugesprochen. Allerdings wurden in dieser Studie die toxischen Eigenschaften des Produktes Peroxynitrit auf zahlreiche Proteine (Entkopplung der eNOS, Inaktivierung der Prostazyklinsynthase, Desensibilisierung der sGC durch Oxidation von Cysteinresten) nicht berücksichtigt (142). Durch Katalyse Metall-haltiger Enzyme führt Peroxynitrit zu Nitrierungen von Tyrosinresten der Proteine und damit zu dessen Inaktivierung (28, 143, 144). So wird die für die Endothelfunktion u.a. sehr wichtige Prostazyklinsynthase durch Nitrierungen inaktiviert und gilt als ein Marker für Peroxynitrit (50, 145, 146). Daneben können auch die lösliche Guanylatzyklase und die eNOS durch Peroxynitrit oxidativ geschädigt werden (147).

Als wichtige Quelle des oxidativen Stresses im Rahmen der ISMN Behandlung gilt die vaskuläre und leukozytäre NOX (7). Interessanterweise führt die chronische ISMN-Therapie zu einer erhöhten Endothelin-1-Expression und verstärkter Endothelin-1-Signaltransduktion, die wiederum den oxidativen Stress erhöht. Andersherum erhöht der oxidative Stress die Endothelin-1-Expression durch Stabilisierung des Promotors und die Sensibilität des Gefäßendothels für Endothelin-1 (58, 90, 91). Der oxidative Stress lässt sich wahrscheinlich mit einer erhöhten NOX-Aktivität und erhöhtem Inflammationsphänotyp erklären, wie er im Tiermodell leichter Hypertonie gezeigt wurde (88, 89). Eine erhöhte Aktivität der phagozytären NOX konnte unter GTN und ISMN-Therapie beobachtet werden (7, 68). Die ISMN-Therapie verschlechtert die vaskulären Komplikationen synergistisch mit proatherosklerotischen Erkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 1 und arterieller Hypertonie (148, 149). Für die Atherosklerose und endotheliale Dysfunktion im Hypercholesterinämie Modell konnte zwar keine Verschlechterung, jedoch auch keine Verbesserung unter zusätzlicher Gabe von ISMN beobachtet werden (150). Außerdem induziert Endothelin-1 eine

PKC-vermittelte eNOS-Entkopplung (92). Da die PKC die NOX ebenfalls aktivieren kann, wird der enge Zusammenhang zwischen Endothelin-1 Signaltransduktion und NOX-Aktivität erneut bestätigt.

Da die Nitrate ISMN und ISDN nicht über die ALDH-2 aktiviert werden, entfallen die Mitochondrien als ROS-Quelle und auch der cross talk zwischen dem Mitochondrium und der membranösen NOX, welcher zu deren Aktivität beiträgt. Es liegt folglich nahe, dass eine andere ROS-Quelle für den oxidativen Stress im Rahmen der ISMN-Therapie verantwortlich sein muss, möglicherweise die o.g. NOX-2 (22).

Zum Nachweis des oxidativen Stresses können die RONS nicht direkt nachgewiesen werden. Stattdessen hat sich etabliert, deren „Spuren“ im Gefäßsystem (3-Nitrotyrosin) nachzuweisen oder sie direkt beispielsweise mit fluoreszierenden Farbstoffen wie dem hochspezifischen Farbstoff DHE reagieren zu lassen.

In dieser Arbeit wurde das Herzgewebe auf die Konzentration von Proteinen mit 3-NT Resten mittels Dot-Blot-Verfahren untersucht. Zur genaueren Lokalisation der ROS wurden Kryoschnitte von Aorten der Tiere nach Anfärbung mit DHE mikroskopisch gemessen und die Fluoreszenz quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikante, über das doppelte Niveau erhöhte ROS-Produktion im Endothel, die sich unter Macitentantherapie signifikant reduzierte. Der erhöhte oxidative Stress unter ISMN konnte auch in früheren Arbeiten gezeigt werden.

Man fand in vivo an Koronararterien unter ISMN- und GTN-Therapie eine Verringerung reduzierter Thiole und Erhöhung von Disulfidbindungen bedingt durch oxidativen Stress. Die zusätzliche mechanische Entfernung des Endothels führte wiederum zu einer deutlichen Erhöhung der reduzierten Thiolreste. Dies betont erneut den Mechanismus der Bioaktivierung der organischen Nitrate in Endothelzellen und die Pathophysiologie des oxidativen Stresses unter GTN und ISMN-Therapie beginnend in den Gefäßendothelzellen (124). Die erhöhte ROS-Konzentration in den Kryoschnitten in dieser Arbeit ist passend zu der oben beschriebenen endothelialen Dysfunktion unter ISMN-Therapie und unterstreicht vorherige Arbeiten (7) und den Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und oxidativem Stress.

Analog dazu ließ sich im Herzgewebe eine fast zweifache Erhöhung der 3-NT-positiven Proteine nachweisen, die sich unter Macitentantherapie fast auf das Kontrollgruppenniveau normalisierte. Die „Fußspur“ des schädlichen Oxidanz Peroxynitrit ließ sich deutlich vermehrt nachweisen und bestätigt den Zusammenhang zwischen Peroxynitritbildung aus •NO und Superoxid als wichtiger Beitrag zum

oxidativen Stress und endothelialer Dysfunktion wie sie für die chronische GTN Therapie bereits bekannt ist (125). Weiterhin zeigt der Abfall durch Macitentan dessen Einfluss auf die signifikante Reduktion des oxidativen Stresses im Herzgewebe.

Passend zu den Befunden der aktuellen Arbeit ließen sich in der Literatur ebenfalls einige wichtige befürwortende Studien finden (7, 34, 65). Es wurde durch Inhibition mit dem eNOS-Inhibitor L-NMMA gezeigt, dass die endotheliale Funktion mit der Aktivität der eNOS und damit der •NO-Synthese einhergeht. Unterstützend wurde gezeigt, dass die Stimulation der eNOS mit Acetylcholin unter ISMN ebenfalls verringert ist (65). Eine weitere wichtige und essentielle Verbindung zu dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass die Gabe des Antioxidans Vitamin C zur Verbesserung der •NO-Freisetzung führte (65). Dies deutet erneut auf einen Zusammenhang zwischen Radikalen bzw. oxidativem und nitrosativem Stress als pathophysiologische Grundlage der endothelialen Dysfunktion und der Dysfunktion/Entkopplung der eNOS einher (65).

In dieser vorliegenden Studie geht die endotheliale Dysfunktion unter ISMN und ISDN eindeutig mit einer signifikanten Erhöhung des oxidativen Stresses in Kryoschnitten von Aortengewebe einher, die zusätzlich unter Endothelinrezeptorantagonismus reversibel war. Außerdem konnte unter ISMN eine signifikante Erhöhung der Konzentration von 3-NTpositiven Proteinen gemessen werden, die auf Peroxynitrit als zentrales pathophysiologisches Molekül hindeuten. Es zeigte sich, dass die endotheliale Dysfunktion unter ISMN und ISDN sowohl im Tiermodell (in der hier vorliegenden Dissertation) als auch klinisch am Patienten (Abb. 5-1) mit einer verminderten •NO-Synthese, einer dysfunktionellen eNOS sowie einem erhöhten oxidativen Stress einhergeht, was zum Teil unter Macitentan deutliche Besserungen zeigte. Auch die im Tiermodell beobachtete ISMN-induzierte endotheliale Dysfunktion und erhöhte Sensibilität gegen die Vasokonstriktoren AT-II und Phenylephrin (7) konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abbildung 5-1). Dies sind Befunde, die in Zukunft von hoher klinischer Bedeutung sein könnten.

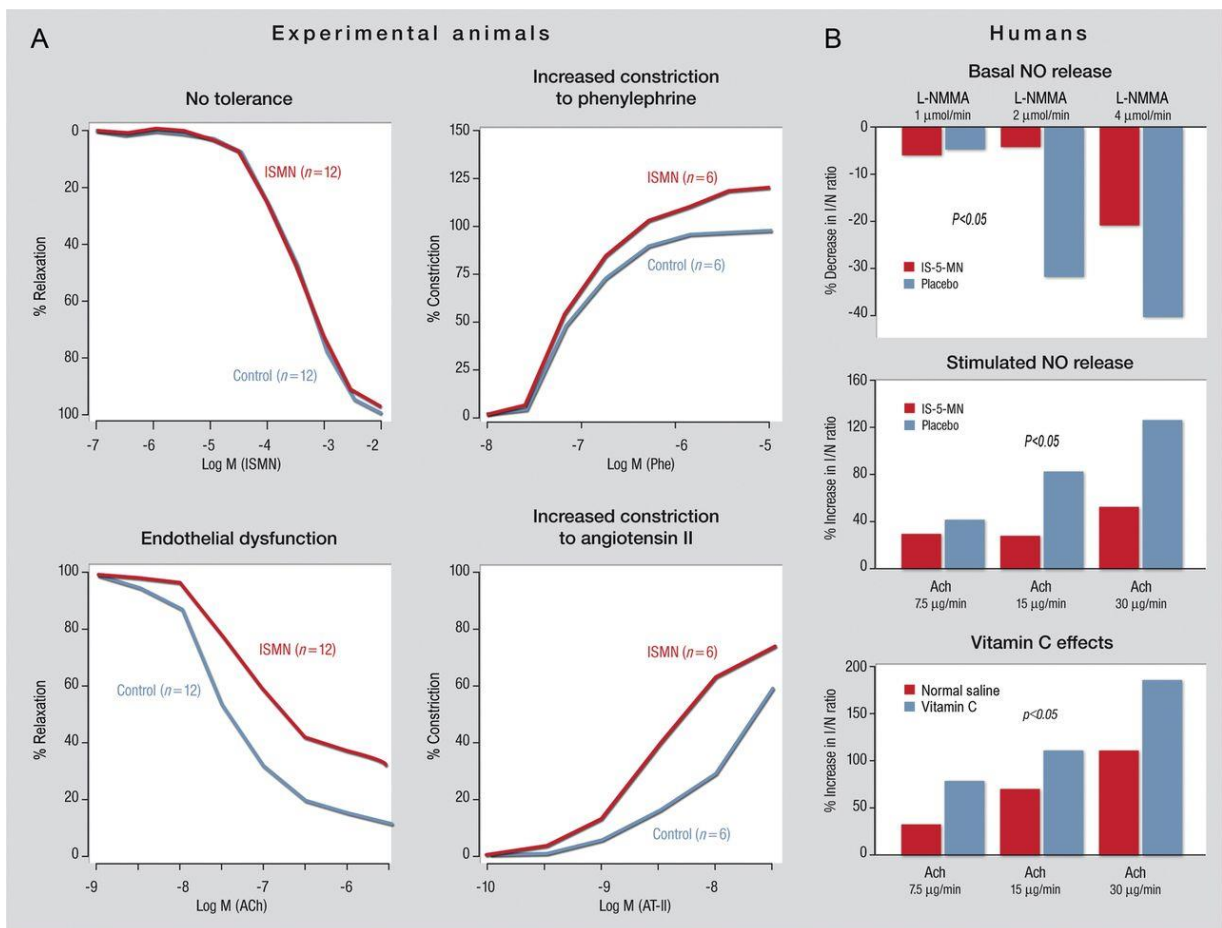


Abbildung 5-1 Pathophysiologische Mechanismen der ISMN induzierten endothelialen Dysfunktion

Im Tiermodell zeigte die ISMN-Therapie keine Toleranz gegen ISMN (A), jedoch eine stark ausgeprägte endotheliale Dysfunktion anhand der Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve auf Acetylcholin (ACh) gegenüber der Kontrollgruppe. Außerdem zeigte sich in den Gefäßen eine signifikante Erhöhung der Sensibilität für die Vasokonstriktoren Phenylephrin und Angiotensin II. In klinischen Studien an gesunden Probanden konnte in der Placebogruppe die eNOS durch L-NMMA stärker inhibiert werden als durch 120mg/d ISMN, die die Patienten eingenommen haben (B, oben). Gleichzeitig konnte durch das Placebo unter aufsteigender Acetylcholingabe mehr •NO freigesetzt werden als mit der ISMN Gabe. Demnach ist durch ISMN basal eine verringerte •NO Freisetzung zu verzeichnen, die als das klinische Korrelat der eNOS-Entkopplung und der verringerten •NO Bioverfügbarkeit durch oxidativen Stress zu betrachten sind. Dieser Effekt konnte durch Hinzugabe des Antioxidans Vitamin C (B, unten) korrigiert werden (65). Abbildung modifiziert von (34).

Diese Ergebnisse zeigen einige interessante Gesichtspunkte auf. Die NOX-Expression scheint sehr stark durch Macitentan suppressierbar zu sein, was die enge Interaktion zwischen Endothelin-1 und der NOX-2 betont. Interessant ist auch, dass sich die ROS-Bildung im Gewebe (z.B. DHE Kryoschnitte) und dessen Auswirkungen in Form von oxidativen Proteinschäden (z.B. 3-NT) zwar durch Macitentan statistisch signifikant reduzieren (DHE Kryoschnitte) oder im besten Falle auf das Kontrollniveau normalisieren (3-NT Proteinexpression) ließen, jedoch Macitentan die Expression der NOX auf ein Niveau deutlich unter dem der Kontrollgruppe reduzierte. Sprich die NOX-2-Expression wurde deutlich stärker abgesenkt als die gesamte ROS-Bildung. Daher können zusätzliche ROS-Quellen (z.B. NOX-1, NOX-4, Xanthinoxidase) nicht ausgeschlossen werden. In einer vorherigen Arbeit konnte der oxidative Stress unter ISMN-Therapie deutlich mit Gabe des eNOS Inhibitors L-NAME normalisiert werden

(7), was auf einen Beitrag der entkoppelten eNOS zum oxidativen Stress unter ISMN-Therapie hindeutet. Die gängigen Mechanismen zur eNOS-Entkopplung wie die S-Glutathionylierung und die verringerte Expression des BH₄ synthetisierenden Enzyms GCH-1 konnten ebenfalls nachgewiesen werden (7). Daher besteht die Möglichkeit, dass ein großer Teil der Diskrepanz zwischen starkem Abfall der NOX-Expression und dem geringeren Abfall des gesamten oxidativen Stresses unter Macitentherapie auf eine entkoppelte eNOS als zusätzliche ROS-Quelle zurückzuführen ist. In der selbigen Arbeit ließen sich ebenfalls erhöhte NOX-1- und NOX-4 -Expressionen verzeichnen, die jedoch moderat ausgeprägt waren.

Als weiteres interessantes Phänomen ließen sich die Zeichen des oxidativen Stresses im Herzgewebe unter Macitentherapie deutlicher reduzieren als im Aortengewebe, was auf verschiedene ROS-Quellen unter ISMN-Therapie in diesen Geweben hindeutet.

Zur Untersuchung der NOX-2 und dem Einfluss von GTN, ISDN, ISMN und Macitentan auf menschliche, isolierte neutrophile Granulozyten und auf Zellkulturen kultivierter RAW 264.7 Makrophagen wurden hier auch Nebenstudien durchgeführt. Die NOX-2 wird neben Zellen des kardiovaskulären Systems vor allem und im höheren Maße in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert (151) und führt nach Stimulation zur massiven Synthese von Superoxid, das augenblicklich zu Wasserstoffperoxid abgebaut wird (*phagocytic burst*). Beide reaktive Spezies dienen der Immunabwehr (77, 152). Die Zugabe von GTN zu Vollblut induziert einen solchen oxidativen Burst und deutet auf den Zusammenhang zwischen organischen Nitraten und der leukozytären NOX-2 hin (87). Für die chronische GTN- und ISMN- Behandlung ließ sich am Tiermodell eine solche zum Teil dosisabhängige Aktivierung der leukozytären NOX-2 ebenfalls beobachten (7, 68, 153). Der Anstieg des oxidativen Burst unter ISMN oder Endothelin-1 Gabe in Vollblutproben ließ sich durch Gabe von Bosentan signifikant reduzieren. Unterstützend dazu blieb die ROS-Synthese im in-vivo knock-out der NOX Untereinheit gp91phox auch unter ISMN Gabe unverändert, was die NOX-2 als ursächliche Quelle des oxidativen Stresses unter ISMN hervorhebt (7).

Die ausgeprägte Wechselwirkung von Endothelin-1 und der NOX-2 in Phagozyten legt einen Zusammenhang zwischen Endothelin-1 und Entzündungsreaktionen (z.B. Infiltration von Immunzellen ins Gewebe) nahe. So ließ sich im Tiermodell arterieller Hypertonie zeigen, dass die Gabe von Endothelin-1 über eine erhöhte NOX-2

Superoxidsynthese zu einer signifikanten Erhöhung des VCAM-1 Zelladhäsionsmoleküls in den Halsschlagadern behandelter Tiere führte. VCAM-1 gilt als früher Schlüsselmarker in der Entwicklung der atherosklerotischen Gefäßläsionen (sog. *fatty streaks* und fibröse Plaques) (154-157).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Inflammation durch Messung verschiedener Zytokine, Chemokine und Oberflächenmarkern von Immunzellen (IL-6, MCP-1, F4/80 und CD11b) an kultivierten RAW 264.7 Makrophagen und in Aortengewebe gemessen. Die Ergebnisse werden im Folgenden gemeinsam mit den Resultaten des oxidativen Bursts in kultivierten RAW 264.7 Makrophagen, sowie isolierten Granulozyten diskutiert.

In unserer Arbeit konnten wir in Zellkulturen kultivierter RAW 264.7 Makrophagen einen dosisabhängigen Anstieg des oxidativen Bursts in der GTN, ISDN- und ISMN-Gruppe nach Stimulation mit einem Phorbol ester und Messung des Chemilumineszenzsignals aufzeigen (allerdings mit einem Maximum bei eher mittleren Konzentrationen). In suprapharmakologischer Dosierung der Nitrate kam es wiederum zu einem Abfall, der sich am ehesten durch die Auslöschung des Superoxids durch nitratinduzierte •NO-Freisetzung unter Synthese von Peroxynitrit erklären lässt. Analog dazu zeigten dieselben Zellen für GTN eine dosisabhängige Erhöhung der Konzentration an 3-NT-positiven Proteinen, was als biologische „Fußspur“ des Peroxynitrits gilt. Diese Ergebnisse bestätigen eindeutig den Anstieg des phagozytär induzierten oxidativen Stresses unter Gabe der Nitrate GTN und ISMN. Passend dazu ließ sich bei der Behandlung der Makrophagen mit GTN, ISDN und ISMN für mindestens eine Konzentration ein signifikanter Anstieg in der Konzentration des wichtigen Inflammationsmarkers IL-6 mittels Dot-Blot-Analyse nachweisen.

Um den Einfluss von Macitentan auf den oxidativen Burst zu untersuchen, wurden humane, isolierte neutrophile Granulozyten (PMNs) gesunder Probanden unter Stimulation mit einem Phorbol ester in aufsteigender Dosis mit Macitentan behandelt. Mit zwei unterschiedlichen Messverfahren für die ROS-Bildung wurde die Unterdrückung des oxidativen Burst durch Macitentan bestätigt. Der positive Einfluss von Macitentan ließ sich ebenfalls durch die Unterdrückung der Inflammationsmarker F4/80, MCP-1, IL-6 und CD11b in Aortengewebe von ISMN-behandelten Mäusen nachweisen.

In Zusammenschau der Datenlage zeichnet sich folgendes Bild ab: Es ist bekannt, dass Endothelin-1 zu einer Hochregulation der NOX-Aktivität führt und andersherum ROS zu einer erhöhten Synthese von Endothelin-1 Vorstufen führen, ein sich gegenseitig verstärkender Mechanismus (88, 91). Weiterhin führt Endothelin-1 und ISMN in Vollblutproben und in PMNs zu einer Erhöhung des oxidativen Bursts, die sich zum Teil unter Bosentangabe signifikant reduzierten (7). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun eingängig, dass sich in kultivierten RAW 264.7 Makrophagen der oxidative Burst und die Zytokinsynthese von IL-6 in Abhängigkeit von der Dosis erhöht und sich in isolierten PMNs der Burst unter Macitentangabe dosisabhängig verringert. Weiterhin zeigt Macitentan einen positiven Effekt auf weitere Inflammationsmarker (F4/80, MCP-1) im Aortengewebe. Der genaue Mechanismus dieser antiinflammatorischen Wirkung ist noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Im Tiermodell einer jüngeren Studie zur pulmonalen Hypertonie ließ sich für Macitentan klinisch eine deutliche Reduktion des pulmonalarteriellen Drucks feststellen. Histopathologisch konnte eine verminderte Infiltration von Gewebsmakrophagen, Verringerung von proinflammatorischen Zytokinen und der Aktivität des für die Inflammation essentiellen Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) gezeigt werden (158).

Die antiinflammatorischen Effekte im Rahmen der vorliegenden Arbeit unterstreichen eindeutig den Zusammenhang zwischen dem organischen Nitrat ISMN, der Aktivierung der phagozytären NOX-2 und Inflammation, sowie dessen Antagonisierung mit Gabe des unselektiven Endothelinrezeptorantagonisten Macitentan. Dies unterstützt nochmals die Hypothese einer direkten NOX-2/Endothelin-1-Signalkaskade und einer Interaktion zwischen Endothelin-1-vermittelter NOX-2-Aktivität und Inflammation.

5.2. ISDN und Macitentan

5.2.1. Endothelfunktion

In der Literatur ist sehr wenig über die Nebenwirkungen der ISDN-Therapie beschrieben und es gibt bis dato keine präklinischen Studien, die ISDN und Endotheldysfunktion untersucht haben und inwiefern diese ebenfalls durch oxidativen Stress oder Endothelinaktivität angetrieben wird. Einen klinischen Benefit konnte für das Kombinationspräparat aus Hydralazin und ISDN im Rahmen der Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion gezeigt werden (159). Insofern

stellen die Ergebnisse dieser Arbeit die Erforschung eines gänzlich neuen Gebiets dar und beleuchten die Nebenwirkungen des klinisch häufig angewendeten organischen Nitrats ISDN. In der Hauptstudie wurden am Mausmodell das ISDN wie auch das ISMN per subkutane Gabe mittels osmotischer Minipumpen verabreicht. In einer Pilotstudie wurde erstmalig das ISDN in aufsteigenden Konzentrationen in das Trinkwasser von Wistar Ratten gemischt.

5.2.1.1. Orale Gabe (Ratte, Pilotstudie)

In der Pilotstudie zeigte die orale Verabreichung des ISDN keine endotheliale Dysfunktion in den Aorten der Tiere, obgleich eine Tendenz zur gestörten Acetylcholin-vermittelten Relaxation sichtbar war. Um zu überprüfen, ob das ISDN den Organismus der Ratte in einer ausreichenden Dosis effektiv erreicht hat, wurde mittels ESR die Konzentration an Nitrosyleisen-Hämoglobin (HbNO) gemessen. Da •NO eine Affinität zu zweiwertigem Eisen hat, bindet es in Vollblut an das Hämoglobin der Erythrozyten und wurde als Marker für nitrosativen Stress aufgrund von hohen Konzentrationen an •NO-vermittelten nitrosierenden Spezies für die Gabe von GTN bereits beschrieben (160). Es ließ sich dosisabhängig eine signifikante Erhöhung des HbNO-Spiegels im Vollblut der Tiere nachweisen, was die erfolgreiche orale Gabe des Wirkstoffs beweist. Zwar ließ sich keine signifikante endotheliale Dysfunktion im Sinne einer gestörten Acetylcholin-vermittelten Vasodilatation nachweisen, jedoch zeigte sich eine signifikant abgeschwächte ISDN-vermittelte Relaxation der Aorten, insbesondere in den Dosen 25 und 50mg/kg/d, was auf eine geringgradige Toleranz gegenüber ISDN hindeutet. An den Unterarmen menschlicher Probanden ließ sich die endotheliale Dysfunktion unter ISDN bereits nachweisen, wenngleich ohne genauere Erklärung für den Mechanismus (66).

Interessanterweise zeigten die Rattenaorten in der Dosis von 25 mg/kg/d oral verabreichten ISDN eine deutlich erhöhte Sensibilität für den Vasokonstriktor Endothelin-1, ein weiterer Mechanismus, der die Gefäßfunktion negativ beeinflussen kann. Die weiteren Untersuchungen zu der ISDN/Endothelin-1-Interaktion wurden im Rahmen der Hauptstudie durchgeführt.

5.2.1.2. Subkutane Gabe (Maus)

Um die ISDN/Endothelin-1 Interaktion weiter zu beleuchten, wurde o.g. Messung des HbNO Spiegels für ISDN und ISMN in Vollblut durchgeführt. Es zeigten sich für ISMN und ISDN jeweils gegenüber der Macitentangruppe tendenziell erhöhte HbNO Konzentrationen. In der ISMN-Gruppe konnte Macitentan einen signifikanten Abfall des HbNO Spiegels und damit des nitrosativen Stresses bewirken. Zunächst verwundert dieses Ergebnis, da Macitentan die Bioverfügbarkeit von •NO zu verringern scheint – ein eher gefäßschädigender Mechanismus. In Studien mit GTN ließ sich jedoch zeigen, dass die effektive Bioverfügbarkeit von •NO, also die Konzentration an protektiv wirkendem •NO, in Rattenaorten trotz erhöhter HbNO Konzentrationen im Vollblut verringert war (153, 161). Demnach ist die HbNO Konzentration als Marker für nitrosativen Stress, also einen negativen Faktor, zu verstehen. In diesem Sinne lässt sich der hier gezeigte Effekt des Endothelinrezeptorantagonismus auf das HbNO als protektiv interpretieren, da es den nitrosativen Stress vermindert.

Die subkutane ISDN-Gabe zeigte am Mausmodell eine signifikante endotheliale Dysfunktion mit gestörter Acetylcholin-induzierter Vasodilatation. Diese normalisierte sich unter Macitentantherapie. Eine Toleranz zu ISDN oder Kreuztoleranz für GTN ließ sich nicht zeigen, obwohl eine moderate Verschiebung der Konzentrations-Relaxations-Kurve für die ISDN-Gruppe beobachtet werden konnte.

Im klinischen Kontext am Patienten ließ sich die endotheliale Dysfunktion unter ISDN bestätigen (66). Hier führte die dreimonatige Therapie mit ISDN (40mg/d) zu einer verminderten flussabhängigen Gefäßdilatation (FMD) der Unterarmarterien (siehe E in Abbildung 5-2) (21, 65). Ein ähnlicher Effekt konnte auch für die Therapie mit GTN und ISMN in menschlichen Probanden gezeigt werden (siehe A, B und C in Abbildung 5-2) (64, 162, 163). Die endotheliale Dysfunktion unter GTN in Koronararterien der Maus ist ebenfalls signifikant und vorbeschrieben (63). Interessanterweise ließ sich für das organische Nitrat PETN beim Menschen keine endotheliale Dysfunktion zeigen, ein Phänomen das mit der Hochregulation der Hämoxxygenase-1 assoziiert wird (164) (siehe Abbildung 5-2 D). Darüber hinaus konnte auch an Zellkulturen endothelialer Vorläuferzellen (EPC) von KHK Patienten eine endotheliale Dysfunktion unter der Therapie mit ISDN gezeigt werden, die interessanterweise unter PETN nicht auftrat (165).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die endotheliale Dysfunktion für ISMN und ISDN ebenfalls bestätigt werden und zusätzlich der protektive Effekt auf die endotheliale

Funktion durch Macitentan gezeigt werden. Dieser Zusammenhang der endothelialen Dysfunktion unter ISDN mit Endothelin-1 stellt ein Novum dar.

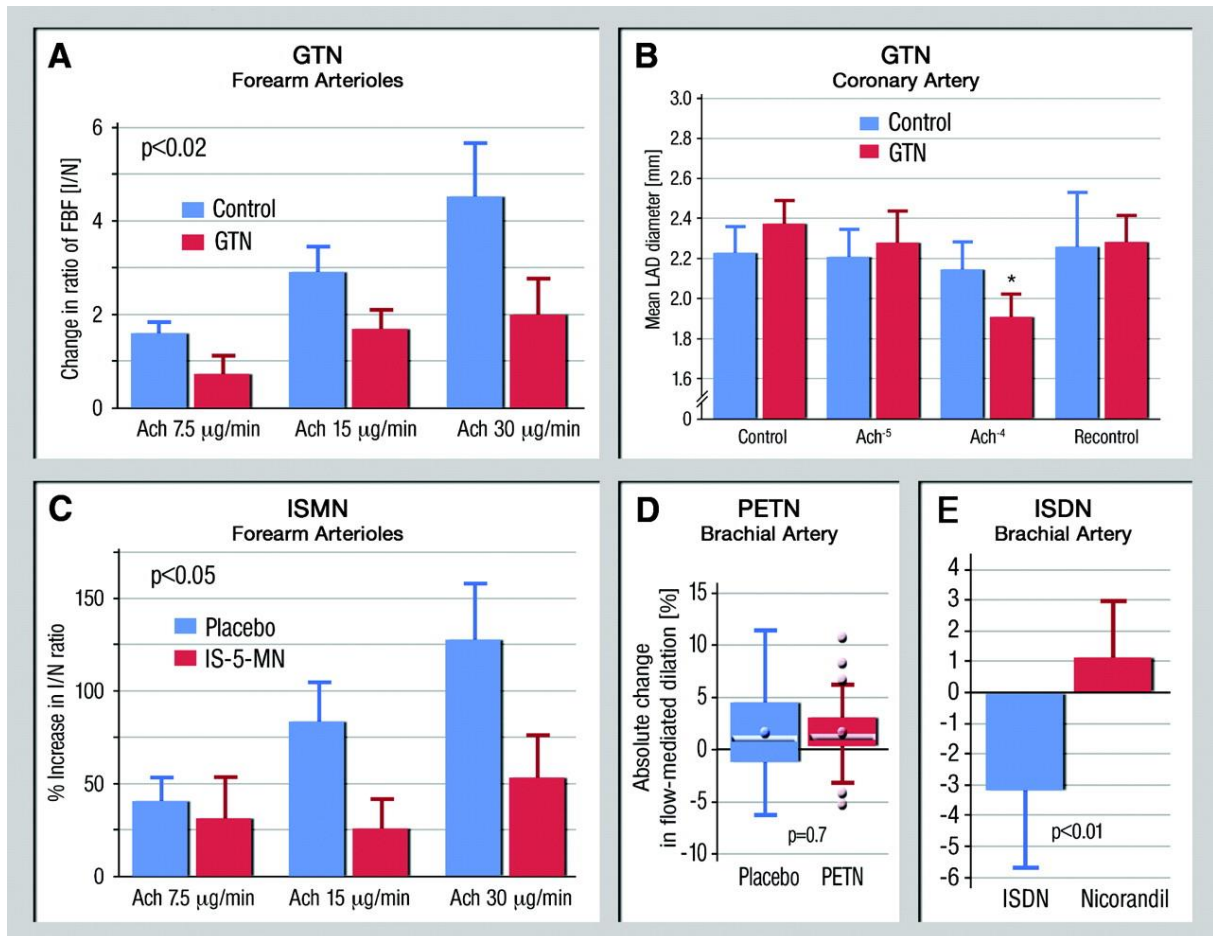


Abbildung 5-2: Endotheliale Dysfunktion und organische Nitrate

Beschreibung einer endothelialen Dysfunktion für die organischen Nitrate ISMN, ISDN und GTN. Die endotheliale Dysfunktion konnte sowohl in isolierten Aorten der Maus für GTN (B), als auch nichtinvasiv in menschlichen Probanden mithilfe der FMD am Unterarm für ISMN (C), ISDN (E) und GTN (A) nachgewiesen werden. PETN zeigte in der FMD keine endotheliale Dysfunktion (D). Abbildung aus (21).

5.2.2. Endothelin Signaltransduktion (ISDN)

In der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich unter ISDN-Therapie ein Anstieg der Endothelin-1-Expression im Endothel der Mauseorten. Macitentan führte zu einem Abfall dieses Signals. Auch auf Niveau der mRNA-Expression zeigte Macitentan einen signifikanten Effekt und reduzierte die ECE-1 mRNA-Expression. Dies bestätigt zunächst quantitativ den Effekt des Macitentans auf die Expression des Endothelins und erstmalig auch auf die ISDN induzierte Endothelinexpression. Um die effektiven, funktionellen Auswirkungen dieses Antagonismus auf die Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion zu prüfen, wurden weitere Messungen durchgeführt, die im Folgenden diskutiert werden.

5.2.3. Oxidativer Stress und Inflammation im Gefäßsystem und im Vollblut (ISDN)

Als wichtigste Grundvoraussetzung in der Pathophysiologie der Nitrat-induzierten endothelialen Dysfunktion gilt der oxidative Stress (28, 166). Während für die übrigen klinisch angewendeten organischen Nitrate eine breite Datenlage bezüglich Nitrattoleranz und oxidativen Stress als Mediator dieses Prozesses existiert, ist zu ISDN wenig bekannt. Einige Studien deuten auf den Zusammenhang zwischen ISDN und oxidativen Stress hin. So ließen sich an endothelialen Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*, EPC) zeigen, dass ISDN zu einem erhöhten oxidativen Stress und einer gestörten Zellmigration führt. An Zellkulturen humaner endothelialer Vorläuferzellen ließ sich außerdem eine erhöhte Aktivität der NADPH-Oxidase als Korrelat des erhöhten oxidativen Stresses messen. Die zusätzliche Gabe von Polyethylenglukol-konjugierter Superoxiddismutase hob den oxidativen Stress und die gestörte Zellmigration gänzlich auf (167).

Zur weiteren Untersuchung dieses pathophysiologischen Mechanismus wurden die mit ISDN behandelten Tiere auf oxidativen Stress untersucht. Die im Rahmen der aktuellen Arbeit bestätigte endotheliale Dysfunktion unter ISDN wurde zunächst auf oxidativen Stress untersucht und weiterhin auf die Quellen der ROS und auf das Vorliegen von Inflammation im Gefäßsystem.

In der DHE Fluoreszenzmikroskopie von Aorten zeigte sich eine beinahe Verdopplung des oxidativen Stresses im Gewebe. Diese wurde unter Macitentantherapie fast auf das Kontrollgruppenniveau halbiert. Die mRNA-Expression der NOX-2 als mögliche Quelle des Superoxids zeigte unter ISDN-Therapie keinen signifikanten Anstieg, jedoch eine Reduktion unter Macitentan von ca. 50%. Dies deutet möglicherweise nicht auf eine vermehrte *Expression* der NOX-2, jedoch auf eine vermehrte *Aktivität* der NOX-2 hin. Außerdem scheint ein großer Teil des oxidativen Stresses im Rahmen der ISDN-Therapie durch die NOX-2 als Quelle verursacht zu sein, da der Abfall des gesamten oxidativen Stresses unter Macitentan prozentual ähnlich zu dem Abfall der NOX-2-Expression ist. Dies scheint entgegen den Resultaten für ISMN zu sein, bei dem neben der NOX-2 wahrscheinlich weitere wichtige ROS-Quellen zum gesamten oxidativen Stress beitragen (siehe Abschnitt 5.1.3.). In jedem Fall scheint auch bei ISDN ein signifikanter Zusammenhang zum Endothelinsystem zu bestehen, da Macitentan in beiden Assays einen deutlichen Beitrag zur Reduktion des oxidativen Stresses leistet.

Um den Einfluss von ISDN auf Leukozyten und den NOX-2 induzierten *oxidative burst* zu untersuchen, wurden, wie auch bei ISMN, Zellkulturen von RAW 264.7 Makrophagen in aufsteigender Dosis mit ISDN versetzt und nach Stimulation mit einem Phorbol ester deren ROS-Produktion auf Basis eines Chemilumineszenzassays untersucht. Auch hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der ROS-Synthese unter ISDN und eine Abnahme des Signals bei suprapharmakologischer ISDN-Dosierung, die am ehesten auf das Quenching mit •NO unter Bildung von Peroxynitrit zurückzuführen ist. Es sei dabei erneut auf die spiegelbildlich verlaufende Erhöhung der 3-NT Proteinkonzentration unter aufsteigender GTN-Behandlung verwiesen, die die Quenchinghypothese belegt. Auch hier sei auf die dosisabhängige Reduktion der ROS-Synthese unter Macitentantherapie bei humanen PMNs verwiesen, die eindeutig einen kausalen Zusammenhang zwischen ROS-Synthese und dem Endothelinsystem nahelegt.

Analog zu den Ergebnissen der anderen organischen Nitrate, zeigte die ISDN Behandlung der Makrophagen in allen Konzentrationen einen signifikanten Anstieg in der Expression des Inflammationsmarkers IL-6. Passend dazu zeigte auch die IL-6 mRNA-Expression in den Aorten der behandelten Mäuse eine mehr als doppelte Erhöhung unter ISDN-Therapie, die sich unter Macitentantherapie komplett normalisierte. Der Inflammationsmarker MCP-1 zeigte von den Tendenzen her ebenfalls einen Anstieg unter ISDN, der sich unter Macitentantherapie zurückbildete.

Der erstmalige präklinische Beweis einer endothelialen Dysfunktion unter ISDN-Therapie, die eindeutig mit erhöhtem oxidativem Stress und dem Endothelin-1 Signalweg zusammenhängt, stellt eine bedeutende Erkenntnis dieser Arbeit dar.

Interessanterweise zeigten groß angelegte klinische Studien mit einer Kombinationstherapie von Hydralazin und ISDN zusätzlich zur Standardtherapie der Herzinsuffizienz eine Senkung der Mortalitäts- und Morbiditätsrate gegenüber der Standardtherapie allein (168). Insbesondere in der groß angelegten „African- American Heart Failure Trial“ der afroamerikanischen Bevölkerung mit hochgradiger Herzinsuffizienz (basierend auf der klinischen Standardklassifikation der New York Heart Association (NYHA)) konnte die Kombinationstherapie dabei eine deutliche Verringerung der Mortalitäts- und Morbiditätsrate, sowie eine Verbesserung der allgemeinen Lebensqualität zeigen (169). Dies führte dazu, dass die Kombinationstherapie von Hydralazin und ISDN in die ESC Guidelines zur Therapie der hochgradigen Herzinsuffizienz bei afroamerikanischen Patienten eingeführt wurde

(170), jedoch neuesten Studien nach dennoch nicht konsequent verschrieben wird (171). Es kann angenommen werden, dass aufgrund der hohen Kosten des Kombinationspräparats „BiDil“ (mit ISDN und Hydralazin) Ärzte eher die beiden Präparate einzeln verschrieben haben und diese separate Medikation sich der statistischen Erfassung entzogen hat.

Der mögliche Erklärungsansatz für den Vorteil der Hydralazin-ISDN Kombination wird in der Verbesserung des Nitroso-Redox Balance, der zellulären Balance zwischen •NO und Superoxid im kardiovaskulären System gesehen. Durch die Kombination aus dem •NO-Donor ISDN und dem Peroxynitrit Quencher, Antioxidans und Vasodilatator Hydralazin (172, 173) soll die Nitroso-Redox Balance im Rahmen der Herzinsuffizienz wiederhergestellt werden (174). Der positive Effekt beruht folglich nicht nur auf der vasodilatierenden und drucksenkenden Wirkung beider Wirkstoffe, sondern auch auf zellulärer Ebene sollen die positiven Eigenschaften des Hydralazins die Nebenwirkungen von ISDN (oxidativen Stress, Inflammation, endotheliale Dysfunktion) verhindern.

6. Zusammenfassung

Organische Nitrate werden seit ihrer Entdeckung im 19. Jahrhundert bis heute zur Behandlung der Angina Pectoris verwendet und sind in den Leitlinien verankert (15, 20). Bei dauerhafter Anwendung führen sie zur Nitrattoleranz, welches bewiesenermaßen mit endothelialer Dysfunktion und erhöhtem oxidativen Stress einhergeht (34, 49). Das Phänomen der Nitrattoleranz wurde über die letzten 30 Jahre intensiv erforscht und dies lieferte einen tiefen Einblick und Verständnis für einige zugrundeliegende Mechanismen. Während ein Großteil dieser Forschung dem ersten bekannten organischen Nitrat GTN galt (21, 34), zeigen neuere Ergebnisse zu dem aktuell am häufigsten verwendeten organischen Nitrat, ISMN, einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zu GTN auf. Die chronische ISMN-Therapie führt ebenso zu einer endothelialen Dysfunktion und oxidativem Stress (7). Anders als GTN wird ISMN (und auch ISDN) nicht über die mitochondriale ALDH-2 bioaktiviert, was die Mitochondrien als Ursache des oxidativen Stresses unwahrscheinlich macht (23, 125). Für ISMN und ISDN konnte am menschlichen Modell ebenfalls eine endotheliale Dysfunktion gezeigt werden (66). Bis heute existiert außer der zeitweiligen Pausierung der organischen Nitrate („Nitratpause“) keine kausale Therapie für die Nebenwirkungen organischer Nitrate wie ISMN und ISDN. Die Korrelation zum Endothelinsystem als ein mögliches Target konnte jedoch bereits für GTN (56) und im menschlichen Modell für ISDN gezeigt werden (175). Neuere Ergebnisse zeigten darüber hinaus für die ISMN-induzierte endotheliale Dysfunktion eine deutliche Erhöhung der Endothelin-1 Synthese, NOX-2-Aktivierung und eine Entkopplung der eNOS. Die Behandlung mit dem unselektiven Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan zeigte eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion und eine Verringerung des oxidativen Stresses durch Inhibition der phagozytären NOX-2 (7). Bosentan ist bisweilen wie auch Macitentan zur Therapie der pulmonalen Hypertonie zugelassen (6), allerdings zeigt Macitentan bessere pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften, sowie weniger Nebenwirkungen als Bosentan (84, 86). Endothelin-1 und die NOX-2 zeigen eine enge Korrelation, wonach erhöhte NOX-Aktivität mit erhöhter Endothelin-1-Expression einhergeht (88, 89) und andersherum erhöhter oxidativer Stress durch die NOX zu einer vermehrten Expression der Endothelin-1-Vorstufen und einer erhöhten Sensibilität des Gefäßes für Endothelin-1-vermittelte Vasokonstriktion führt (58, 90, 91).

Für ISDN gibt es in der Literatur kaum Arbeiten über die klinisch beschriebene endotheliale Nebenwirkung und keine Arbeiten über einen mechanistischen Zusammenhang zu oxidativem Stress oder dem Endothelinsystem. In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass die klinisch beschriebene, ISDN-vermittelte endotheliale Dysfunktion (66) mit oxidativem Stress und Aktivierung des Endothelinsystems einhergeht. Unter chronischer Therapie mit ISMN und ISDN führte Macitentan zu einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion, Verringerung des oxidativen Stresses im Gefäßsystem und im Herzgewebe, Inhibition der Aktivität des Endothelinsystems und zeigte einen deutlich positiven Effekt auf den durch ISMN und ISDN ausgelösten inflammatorischen Phänotypen. Damit bestätigen die hier erarbeiteten Befunde hinsichtlich der protektiven Wirkungen von Macitentan auf die ISMN-induzierten Gefäßschäden, die bereits früher publizierten ähnlichen Befunde mit dem Endothelin-1-Rezeptorblocker Bosentan. Durch den hier gezeigten kausalen Zusammenhang zwischen Endothelin-1 und NOX konnte erstmalig der vermutete Teufelskreis zwischen Endothelin-1-Aktivierung und NOX-Aktivität bewiesen werden. Demnach zeigt Macitentan in Kombination mit ISMN/ISDN eine vielversprechende Möglichkeit einer Kombitherapie zur Behandlung der akuten Angina Pectoris Symptomatik durch ISMN/ISDN unter gleichzeitiger Aufhebung der schädlichen Nebenwirkungen durch Macitentan. Die Schlüsselbefunde und zentralen protektiven Mechanismen von Macitentan sind in Abb. 6-1 dargestellt. Es bedarf folglich klinischer Studien, die diese vielversprechende Kombinationstherapie am Menschen erproben.

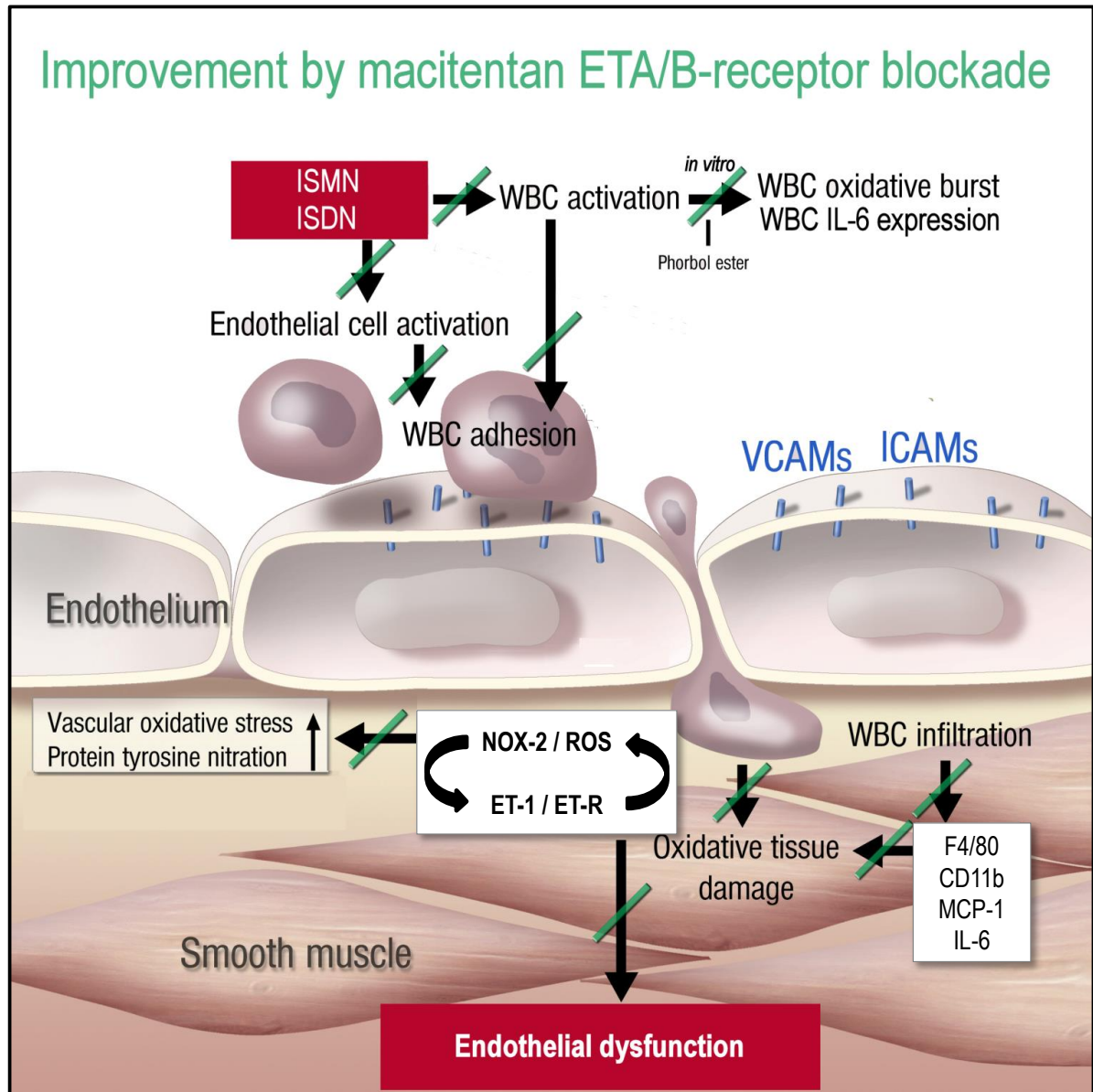


Abbildung 6-1 Die ISMN/ISDN induzierte endotheliale Dysfunktion und die protektiven Mechanismen von Macitentan

Ein zentraler Punkt im Pathomechanismus der ISMN/ISDN vermittelten endothelialen Dysfunktion ist die erhöhte Aktivität der sich selbst verstärkenden Achse von NADPH-Oxidase-2 (NOX-2) und Endothelin-1. Die NOX-2 abhängige Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erhöht die Expression von Endothelin-1, welches andersherum die Aktivität der NOX-2 und damit die ROS-Synthese verstärkt. Durch diesen „Teufelskreis“ wird die Interaktion zwischen ROS-Synthese und Endothelin-1 vermittelter Vasokonstriktion vorangetrieben. Der erhöhte oxidative und nitrosative Stress schädigt die Gefäßfunktion durch Inaktivierung, Desensibilisierung und Entkopplung protektiver Enzyme. Außerdem sind ISMN, ISDN, ROS und Endothelin-1 potente Auslöser einer vaskulären Inflammation, die die Aktivierung und Extravasation von weißen Blutkörperchen fördern. Der oxidative Gewebeschaden der leukozytären Enzyme verschlimmert eine bereits entstandene Endotheldysfunktion. Die Endothelinrezeptorblockade durch Macitentan inhibiert erfolgreich die Aktivierung von weißen Blutkörperchen, deren Infiltration und oxidativen Schaden im Gewebe und unterbindet den Teufelskreis aus ROS und Endothelin-1. Dadurch unterbindet es die unerwünschten Nebenwirkungen von ISMN und ISDN auf das Gefäßsystem und verbessert die globale endotheliale Funktion. Abbildung in Anlehnung an (176).

7. Quellenverzeichnis

1. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2019.
2. Innere Medizin 2018 : eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2018.
3. Richard E. Klabunde P. General Pharmacology 2012 [Available from: <https://cvpharmacology.com/vasodilator/nitro>].
4. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104(22):2673-8.
5. Anitha N, Mubeen Unnisa S. A REVIEW ON ENDOTHELINS: AN UPDATE. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(4).
6. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal*. 2015;37(1):67-119.
7. Oelze M, Knorr M, Kroller-Schon S, Kossmann S, Gottschlich A, Rummeler R, et al. Chronic therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction, oxidative stress, and a marked increase in vascular endothelin-1 expression. *European heart journal*. 2013;34(41):3206-16.
8. Deutsches Museum München B. In: Ascanio Sobrero EdN, editor.
9. historytoday.com. Alfred Nobel portrait.
10. Bergengren E. Alfred Nobel : eine Biographie. 2. Aufl. ed. Stähle NK, editor. München etc.: Bechtle; 1965.
11. Remane H, Remane Y. Entdeckungsgeschichte des Nitroglycerins. Ein Sprengstoff wird Medikament. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2010;39(5):340-4.
12. Association AH. Angina, Chest Pain 2015 [Available from: <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-attack/angina-chest-pain>].
13. Campeau L. Letter: Grading of angina pectoris. *Circulation*. 1976;54(3):522-3.
14. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2019;41(3):407-77.
15. Roffi M, Patrono C, Collet J-P, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2016;37(3):267-315.
16. Ignarro LJ. Stickstoffmonoxid: ein einzigartiges endogenes Signalmolekül in der Gefäßbiologie (Nobel-Vortrag). *Angewandte Chemie*. 1999;111(13-14):2002-13.
17. Furchgott RF. Der relaxierende Faktor aus Endothelzellen: Entdeckung, frühe Untersuchungen und Identifizierung als Stickstoffmonoxid (Nobel-Vortrag). *Angewandte Chemie*. 1999;111(13-14):1990-2000.
18. Murad F. Die Entdeckung einiger biologischer Wirkungen von Stickstoffmonoxid und seiner Rolle für die Zellkommunikation (Nobel-Vortrag). *Angewandte Chemie*. 1999;111(13-14):1976-89.
19. Gori T, Daiber A. Non-hemodynamic effects of organic nitrates and the distinctive characteristics of pentaerythryl tetranitrate. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2009;9(1):7-15.
20. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Ganiats TG, Holmes DR, et al. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Non–ST-Elevation Acute Coronary

- Syndromes. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2014;64(24):e139-e228.
21. Munzel T, Daiber A, Gori T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance. *Circulation*. 2011;123(19):2132-44.
 22. Daiber A, Munzel T. Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2015;23(11):899-942.
 23. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8306-11.
 24. Xiao Q, Weiner H, Crabb DW. The mutation in the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) gene responsible for alcohol-induced flushing increases turnover of the enzyme tetramers in a dominant fashion. *J Clin Invest*. 1996;98(9):2027-32.
 25. Dudek M, Bednarski M, Bilska A, Iciek M, Sokolowska-Jezewicz M, Filipek B, et al. The role of lipoic acid in prevention of nitroglycerin tolerance. *Eur J Pharmacol*. 2008;591(1-3):203-10.
 26. Wenzel P, Hink U, Oelze M, Schuppan S, Schaeuble K, Schildknecht S, et al. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity. Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J Biol Chem*. 2007;282(1):792-9.
 27. Kollau A, Hofer A, Russwurm M, Koesling D, Keung WM, Schmidt K, et al. Contribution of aldehyde dehydrogenase to mitochondrial bioactivation of nitroglycerin: evidence for the activation of purified soluble guanylate cyclase through direct formation of nitric oxide. *Biochem J*. 2005;385(Pt 3):769-77.
 28. Daiber A, Münzel T. Pentaerythrityltetranitrat: Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO Bioverfügbarkeit - experimentelle und klinische Aspekte: Steinkopff; 2006.
 29. Daiber A, Wenzel P, Oelze M, Münzel T. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clinical Research in Cardiology*. 2008;97(1):12-20.
 30. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K, et al. Oxidative Stress and Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity: A Comparison of Pentaerythritol Tetranitrate with Other Organic Nitrates. *Molecular Pharmacology*. 2004;66(6):1372-82.
 31. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res*. 2005;97(7):618-28.
 32. Daiber A, Gori T, Münzel T. Mechanismen und klinischer Stellenwert der Nitrattoleranz. Diversität und Nebenwirkungen organischer Nitrate. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2010;39(5):375-84.
 33. Doel JJ, Godber BLJ, Eisenhal R, Harrison R. Reduction of organic nitrates catalysed by xanthine oxidoreductase under anaerobic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2001;1527(1):81-7.
 34. Munzel T, Daiber A, Gori T. More answers to the still unresolved question of nitrate tolerance. *European heart journal*. 2013;34(34):2666-73.
 35. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2010.
 36. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel*: Urban & Fischer/Elsevier; 2017.
 37. Kuo IY, Ehrlich BE. *Signaling in Muscle Contraction. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015;7(2).
 38. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(1):32-9.
 39. Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:1-18.
 40. Corbin JD, Francis SH, Webb DJ. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology*. 2002;60(2 Suppl 2):4-11.
 41. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital

- Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal*. 2016;37(1):67-119.
42. Parker JD, Parker JO. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *N Engl J Med*. 1998;338(8):520-31.
 43. Elkayam U, Kulick D, McIntosh N, Roth A, Hsueh W, Rahimtoola SH. Incidence of early tolerance to hemodynamic effects of continuous infusion of nitroglycerin in patients with coronary artery disease and heart failure. *Circulation*. 1987;76(3):577-84.
 44. Münzel T, Daiber A, Gori T. Nitrate Therapy. *Circulation*. 2011;123(19):2132-44.
 45. Packer M, Lee WH, Kessler PD, Gottlieb SS, Medina N, Yushak M. Prevention and reversal of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1987;317(13):799-804.
 46. Parker JD, Farrell B, Fenton T, Cohan M, Parker JO. Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. *Circulation*. 1991;84(6):2336-45.
 47. Munzel T, Heitzer T, Kurz S, Harrison DG, Luhman C, Pape L, et al. Dissociation of coronary vascular tolerance and neurohormonal adjustments during long-term nitroglycerin therapy in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(2):297-303.
 48. Heitzer T, Just H, Brockhoff C, Meinertz T, Olschewski M, Munzel T. Long-term nitroglycerin treatment is associated with supersensitivity to vasoconstrictors in men with stable coronary artery disease: prevention by concomitant treatment with captopril. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(1):83-8.
 49. Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest*. 1995;95(1):187-94.
 50. Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, Daiber A, et al. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(10):1826-34.
 51. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K, et al. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol*. 2004;66(6):1372-82.
 52. Garcia-Bou R, Rocha M, Apostolova N, Herance R, Hernandez-Mijares A, Victor VM. Evidence for a relationship between mitochondrial Complex I activity and mitochondrial aldehyde dehydrogenase during nitroglycerin tolerance: effects of mitochondrial antioxidants. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1817(5):828-37.
 53. Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, Daiber A, et al. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42(10):1826-34.
 54. Sayed N, Kim DD, Fioramonti X, Iwahashi T, Duran WN, Beuve A. Nitroglycerin-induced S-nitrosylation and desensitization of soluble guanylyl cyclase contribute to nitrate tolerance. *Circ Res*. 2008;103(6):606-14.
 55. Kurz S, Hink U, Nickenig G, Borthayre AB, Harrison DG, Munzel T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in nitrate tolerance. *Circulation*. 1999;99(24):3181-7.
 56. Munzel T, Giaid A, Kurz S, Stewart DJ, Harrison DG. Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in nitroglycerin tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(11):5244-8.
 57. Kahler J, Mendel S, Weckmuller J, Orzechowski HD, Mittmann C, Koster R, et al. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000;32(8):1429-37.
 58. Kahler J, Ewert A, Weckmuller J, Stobbe S, Mittmann C, Koster R, et al. Oxidative stress increases endothelin-1 synthesis in human coronary artery smooth muscle cells. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2001;38(1):49-57.
 59. Heinrich PC. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.
 60. Colussi C, Scopece A, Vitale S, Spallotta F, Mattiussi S, Rosati J, et al. P300/CBP associated factor regulates nitroglycerin-dependent arterial relaxation by N(epsilon)-lysine acetylation of contractile proteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(10):2435-43.
 61. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101(16):1899-906.

62. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(6):1115-26.
63. Caramori PR, Adelman AG, Azevedo ER, Newton GE, Parker AB, Parker JD. Therapy with nitroglycerin increases coronary vasoconstriction in response to acetylcholine. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(7):1969-74.
64. Gori T, Mak SS, Kelly S, Parker JD. Evidence supporting abnormalities in nitric oxide synthase function induced by nitroglycerin in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(4):1096-101.
65. Thomas GR, DiFabio JM, Gori T, Parker JD. Once daily therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction in humans: evidence of a free-radical-mediated mechanism. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(12):1289-95.
66. Sekiya M, Sato M, Funada J, Ohtani T, Akutsu H, Watanabe K. Effects of the long-term administration of nicorandil on vascular endothelial function and the progression of arteriosclerosis. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2005;46(1):63-7.
67. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Schulz E, et al. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1670-89.
68. Knorr M, Hausding M, Kroller-Schuhmacher S, Steven S, Oelze M, Heeren T, et al. Nitroglycerin-induced endothelial dysfunction and tolerance involve adverse phosphorylation and S-Glutathionylation of endothelial nitric oxide synthase: beneficial effects of therapy with the AT1 receptor blocker telmisartan. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(10):2223-31.
69. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res*. 2003;37(2):121-7.
70. Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Fleming I, Busse R, Pritchard KA, Jr., et al. Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2003;278(45):44719-26.
71. Chen CA, Wang TY, Varadharaj S, Reyes LA, Hemann C, Talukder MA, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature*. 2010;468(7327):1115-8.
72. Crow JP, Beckman JS. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol*. 1995;34:17-43.
73. Greenacre SA, Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res*. 2001;34(6):541-81.
74. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49(2 Suppl 1):3-8.
75. Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem*. 2002;383(3-4):401-9.
76. Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, et al. Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(1):101-11.
77. Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2012;110(10):1364-90.
78. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332(6163):411-5.
79. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:391-415.
80. Maguire JJ, Davenport AP. Endothelin receptors and their antagonists. *Semin Nephrol*. 2015;35(2):125-36.
81. Kholdani CA, Fares WH, Trow TK. Macitentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Vasc Health Risk Manag*. 2014;10:665-73.
82. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D1074-d82.
83. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galiè N, Ghofrani H-A, et al. Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(9):809-18.

84. Gatfield J, Mueller Grandjean C, Sasse T, Clozel M, Nayler O. Slow receptor dissociation kinetics differentiate macitentan from other endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial smooth muscle cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e47662.
85. Wei A, Gu Z, Li J, Liu X, Wu X, Han Y, et al. Clinical Adverse Effects of Endothelin Receptor Antagonists: Insights From the Meta-Analysis of 4894 Patients From 24 Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trials. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(11).
86. Iglarz M, Bossu A, Wanner D, Bortolamiol C, Rey M, Hess P, et al. Comparison of pharmacological activity of macitentan and bosentan in preclinical models of systemic and pulmonary hypertension. *Life Sci*. 2014;118(2):333-9.
87. Schwemmer M, Bassenge E. New approaches to overcome tolerance to nitrates. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2003;17(2):159-73.
88. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, et al. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*. 2003;107(7):1053-8.
89. Li L, Chu Y, Fink GD, Engelhardt JF, Heistad DD, Chen AF. Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003;42(5):997-1003.
90. Kähler J, Mendel S, Weckmüller J, Orzechowski H-D, Mittmann C, Köster R, et al. Oxidative Stress Increases Synthesis of Big Endothelin-1 by Activation of the Endothelin-1 Promoter. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000;32(8):1429-37.
91. Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced venoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003;42(3):316-21.
92. Ramzy D, Rao V, Tumiati LC, Xu N, Sheshgiri R, Miriuka S, et al. Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I319-26.
93. Stein J, Steven S, Bros M, Sudowe S, Hausding M, Oelze M, et al. Role of Protein Kinase C and Nox2-Derived Reactive Oxygen Species Formation in the Activation and Maturation of Dendritic Cells by Phorbol Ester and Lipopolysaccharide. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017:4157213.
94. ALZET op, Cupertino, USA. ALZET Osmotic pump, how does it work? [Available from: http://www.alzet.com/products/ALZET_Pumps/howdoesitwork.html].
95. Theeuwes F, Yum SI. Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann Biomed Eng*. 1976;4(4):343-53.
96. (WMA) WMA. WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects 2018 [Available from: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>].
97. Li R, Tablin F. In Vitro Canine Neutrophil Extracellular Trap Formation: Dynamic and Quantitative Analysis by Fluorescence Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*. 2018;2018.
98. Welsh E. What is chemiluminescence ? 2011 [Available from: <https://www.scienceinschool.org/2011/issue19/chemiluminescence>].
99. Nazarewicz RR, Bikineyeva A, Dikalov SI. Rapid and specific measurements of superoxide using fluorescence spectroscopy. *J Biomol Screen*. 2013;18(4):498-503.
100. Moldoveanu SC, David V. Chapter 4 - Basic Information Regarding the HPLC Techniques. In: Moldoveanu SC, David V, editors. *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. Boston: Elsevier; 2017. p. 87-187.
101. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
102. İskit PDAB. Arterial dilatation Organ bath technique in Endothelial Dysfunction in Sepsis Prof. Dr. Alper B. İskit Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Hacettepe University 2015 [Available from: <https://www.slideshare.net/tyfngnc/alperiskiti>].
103. Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*: Thieme; 2018.
104. HyperPhysics group APDRF, Bergische Universität Wuppertal. Elektronenspin [Available from: <http://hydrogen.physik.uni-wuppertal.de/hyperphysics/hyperphysics/hbase/spin.html>].
105. Magnetismus A - Z

Magnetisches Moment

Was ist das magnetische Moment? 2018 [Available from:

https://www.supermagnete.de/magnetismus/magnetisches_moment.

106. Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG. Detection of superoxide in vascular tissue. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2002;22(11):1761-8.
107. Portal NRBC. Superoxide; Detection of superoxide with lucigenin chemiluminescent reaction [Available from: http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/so.html].
108. Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mulsch A, Harrison DG, Sindermann I, et al. Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. Biochem Biophys Res Commun. 1999;254(2):319-24.
109. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.
110. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical biochemistry. 1972;48(2):422-7.
111. Mülhardt C. Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
112. Biologie SdLd. Taq-DNA-Polymerase: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 1999 [Available from: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/taq-dna-polymerase/65425>].
113. Clegg RM. Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. 33: Elsevier; 2009. p. 1-57.
114. Bio-Resource. TaqMan Assay Vs SYBR Green Assay Bio-Resource, Technical Resources in Biotechnology; 2013 [Available from: <http://technologyinscience.blogspot.com/2013/05/taqman-assay-vs-sybr-green-assay.html#.XLsaaKJS8dU>].
115. Schoales J. 5 Interesting Facts About TaqMan Assays: Thermo Fisher Scientific; 2018 [Available from: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/5-interesting-facts-about-taqman-assays/>].
116. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. Hypertension. 2007;49(4):717-27.
117. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976;72:248-54.
118. Rehm H, Letzel T. Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
119. Yang-Hartwich Y, Romanoff E, Bingham J, B Alvero A, Mor G. Detection of p53 Protein Transcriptional Activity by Chromatin Immunoprecipitation2015. 87-93 p.
120. Desel C, Schmitz S. Der Experimentator Zellbiologie: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
121. Wuhan Fine Biotech Co. L. Polymerase Secondary Antibody Introduction 2019 [Available from: <https://www.fn-test.com/services/technical-services/antibody/polymerase-secondary-antibody-introduction/>].
122. Armstrong RA. When to use the Bonferroni correction. Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists). 2014;34(5):502-8.
123. Miyauchi T, Masaki T. PATHOPHYSIOLOGY OF ENDOTHELIN IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM. Annual Review of Physiology. 1999;61(1):391-415.
124. Kojda G, Meyer W, Noack E. Influence of endothelium and nitrovasodilators on free thiols and disulfides in porcine coronary smooth muscle. Eur J Pharmacol. 1993;250(3):385-94.
125. Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, et al. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. J Clin Invest. 2004;113(3):482-9.
126. Ratz JD, Fraser AB, Rees-Milton KJ, Adams MA, Bennett BM. Endothelin receptor antagonism does not prevent the development of in vivo glyceryl trinitrate tolerance in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 2000;295(2):578-85.
127. Feletou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease. San Rafael (CA)2011.

128. Gonzales RJ, Carter RW, Kanagy NL. Laboratory demonstration of vascular smooth muscle function using rat aortic ring segments. *Adv Physiol Educ.* 2000;24(1):13-21.
129. Husgen B, Noack E, Kojda G. Comparison of the vasorelaxing effect of different nitrovasodilators in conductive arterial and venous blood vessels. *Agents Actions Suppl.* 1995;45:183-7.
130. Lai J, Wu B, Sun J, Shang Y, Zhu J. Long-term isosorbide mononitrate treatment impairs endothelial function in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2013;24(7):566-71.
131. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation.* 2003;108(17):2054-9.
132. Oppermann M, Dao VT, Suvorava T, Bas M, Kojda G. Effect of oral organic nitrates on expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol.* 2008;155(3):335-42.
133. Mulsch A, Busse R, Bassenge E. Desensitization of guanylate cyclase in nitrate tolerance does not impair endothelium-dependent responses. *Eur J Pharmacol.* 1988;158(3):191-8.
134. Kossmann S, Hu H, Steven S, Schönfelder T, Fraccarollo D, Mikhed Y, et al. Inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by angiotensin II. *J Biol Chem.* 2014;289(40):27540-50.
135. Brune B, Schmidt KU, Ullrich V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem.* 1990;192(3):683-8.
136. Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1360-7.
137. Kessler P, Bauersachs J, Busse R, Schini-Kerth VB. Inhibition of inducible nitric oxide synthase restores endothelium-dependent relaxations in proinflammatory mediator-induced blood vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 1997;17(9):1746-55.
138. McManus DD, Beaulieu LM, Mick E, Tanriverdi K, Larson MG, Kearney JF, Jr., et al. Relationship among circulating inflammatory proteins, platelet gene expression, and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(11):2666-73.
139. Wenzel P, Knorr M, Kossmann S, Stratmann J, Hausding M, Schuhmacher S, et al. Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation.* 2011;124(12):1370-81.
140. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, et al. Endothelin. *Pharmacol Rev.* 2016;68(2):357-418.
141. Nilsson D, Gustafsson L, Wackenfors A, Gesslein B, Edvinsson L, Paulsson P, et al. Up-regulation of endothelin type B receptors in the human internal mammary artery in culture is dependent on protein kinase C and mitogen-activated kinase signaling pathways. *BMC Cardiovasc Disord.* 2008;8:21.
142. Müller S, König I, Meyer W, Kojda G. Inhibition of Vascular Oxidative Stress in Hypercholesterolemia by Eccentric Isosorbide Mononitrate. *Journal of the American College of Cardiology.* 2004;44(3):624-31.
143. Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* 2018;14:618-25.
144. Souza JM, Peluffo G, Radi R. Protein tyrosine nitration—Functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine.* 2008;45(4):357-66.
145. Schmidt P, Youhnovski N, Daiber A, Balan A, Arsic M, Bachschmid M, et al. Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *J Biol Chem.* 2003;278(15):12813-9.
146. Zou MH, Bachschmid M. Hypoxia-reoxygenation triggers coronary vasospasm in isolated bovine coronary arteries via tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *J Exp Med.* 1999;190(1):135-9.
147. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1591-619.
148. Schuhmacher S, Oelze M, Bollmann F, Kleinert H, Otto C, Heeren T, et al. Vascular dysfunction in experimental diabetes is improved by pentaerithryl tetranitrate but not isosorbide-5-mononitrate therapy. *Diabetes.* 2011;60(10):2608-16.

149. Schuhmacher S, Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Mang C, Kamuf J, et al. Pentaerythritol tetranitrate improves angiotensin II-induced vascular dysfunction via induction of heme oxygenase-1. *Hypertension*. 2010;55(4):897-904.
150. Kojda G, Stein D, Kottenberg E, Schnaith EM, Noack E. In vivo effects of pentaerythrityl-tetranitrate and isosorbide-5-mononitrate on the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction in cholesterol-fed rabbits. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1995;25(5):763-73.
151. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(2):R277-97.
152. Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*. 2014;76:208-26.
153. Mikhed Y, Fahrer J, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Welschof P, et al. Nitroglycerin induces DNA damage and vascular cell death in the setting of nitrate tolerance. *Basic research in cardiology*. 2016;111(4):52.
154. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;107(10):1255-62.
155. Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;107(10):1209-10.
156. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med*. 1999;107(1):85-97.
157. Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens*. 2001;14(6 Pt 2):44s-54s.
158. Kim K-h, Rha S-W, Park Y, Byun JK. Abstract 181: Anti-inflammatory Effects of Macitentan on Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension in a Rat Model. *Circulation Research*. 2019;125(Suppl_1):A181-A.
159. Nyolczas N, Dékány M, Muk B, Szabó B. Combination of Hydralazine and Isosorbide-Dinitrate in the Treatment of Patients with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. In: Islam MS, editor. *Heart Failure: From Research to Clinical Practice: Volume 3*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 31-45.
160. Janero DR, Bryan NS, Saijo F, Dhawan V, Schwalb DJ, Warren MC, et al. Differential nitros(yl)ation of blood and tissue constituents during glyceryl trinitrate biotransformation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(48):16958-63.
161. Jabs A, Oelze M, Mikhed Y, Stamm P, Kroller-Schon S, Welschof P, et al. Effect of soluble guanylyl cyclase activator and stimulator therapy on nitroglycerin-induced nitrate tolerance in rats. *Vascul Pharmacol*. 2015;71:181-91.
162. Azevedo ER, Schofield AM, Kelly S, Parker JD. Nitroglycerin withdrawal increases endothelium-dependent vasomotor response to acetylcholine. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(2):505-9.
163. Caramori PRA, Adelman AG, Azevedo ER, Newton GE, Parker AB, Parker JD. Therapy with nitroglycerin increases coronary vasoconstriction in response to acetylcholine. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;32(7):1969-74.
164. Schnorbus B, Schiewe R, Ostad MA, Medler C, Wachtlin D, Wenzel P, et al. Effects of pentaerythritol tetranitrate on endothelial function in coronary artery disease: results of the PENTA study. *Clin Res Cardiol*. 2010;99(2):115-24.
165. Thum T, Wiebking V, Ertl G, Bauersachs J. Organic nitrates differentially modulate circulating endothelial progenitor cells and endothelial function in patients with symptomatic coronary artery disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(4):925-31.
166. Daiber A, Mulsch A, Hink U, Mollnau H, Warnholtz A, Oelze M, et al. The oxidative stress concept of nitrate tolerance and the antioxidant properties of hydralazine. *Am J Cardiol*. 2005;96(7b):25i-36i.
167. Thum T, Fraccarollo D, Thum S, Schultheiss M, Daiber A, Wenzel P, et al. Differential effects of organic nitrates on endothelial progenitor cells are determined by oxidative stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(4):748-54.
168. Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, et al. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1991;325(5):303-10.

169. Taylor AL, Ziesche S, Yancy C, Carson P, D'Agostino R, Ferdinand K, et al. Combination of Isosorbide Dinitrate and Hydralazine in Blacks with Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(20):2049-57.
170. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal*. 2012;33(14):1787-847.
171. Brewster LM. Underuse of hydralazine and isosorbide dinitrate for heart failure in patients of African ancestry: a cross-European survey. *ESC Heart Fail*. 2019;6(3):487-98.
172. Munzel T, Kurz S, Rajagopalan S, Thoenes M, Berrington WR, Thompson JA, et al. Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. A new action for an old drug. *J Clin Invest*. 1996;98(6):1465-70.
173. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Kaiser K, Huth C, Schildknecht S, et al. Hydralazine is a powerful inhibitor of peroxynitrite formation as a possible explanation for its beneficial effects on prognosis in patients with congestive heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(4):1865-74.
174. Hare JM. Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 2004;351(20):2112-4.
175. Wang J, Wu SD, Chen SC, Yan YF, Wu CB, Xu JB, et al. [Effect of compound salvia injection on nitrate ester tolerance]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2005;25(1):25-9.
176. Kröller-Schön S, Knorr M, Hausding M, Oelze M, Schuff A, Schell R, et al. Glucose-independent improvement of vascular dysfunction in experimental sepsis by dipeptidyl-peptidase 4 inhibition. *Cardiovascular Research*. 2012;96(1):140-9.

8. Danksagung

Zu allererst möchte ich dem Direktor des Zentrums für Kardiologie (Kardiologie I) der Universitätsmedizin Mainz für die freundliche Überlassung dieses Themas danken.

Weiterhin geht mein großer Dank an den Leiter unserer Arbeitsgruppe, der mich meine ersten Schritte als Doktorand in der Wissenschaft und Grundlagenforschung machen ließ und mir stets mit einem offenen Ohr und tatkräftiger Unterstützung begegnet ist. Die äußerst fachkundige, wertschätzende und unterstützende Betreuung haben meine Zeit als Doktorand und Hilfwissenschaftler zu einem der positivsten Abschnitte meiner bisherigen Laufbahn gemacht.

Mein ganz besonderer Dank und die besten Wünsche gehen an unseren erfahrenen Postdoc und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Molekulare Kardiologie. Die enge Zusammenarbeit, kompetente Betreuung und das äußerst angenehme Arbeitsklima werde ich stets in bester Erinnerung behalten.