

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

In vitro und in vivo Charakterisierung eines neuen Hybridnitrats
basierend auf Pioglitazon - Entwicklung neuartiger Nitrovasodilatoren
mit geringem Nebenwirkungsprofil

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität

vorgelegt von

Amanda Mahnkopf (geb. Pfeffer)
aus Berlin

Mainz, 2020

Tag der Promotion:

06. Juli 2021

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	- 1 -
Abbildungsverzeichnis	- 5 -
Tabellenverzeichnis	- 6 -
1 Einleitung	- 7 -
2 Ziel der Dissertation	- 8 -
3 Literaturdiskussion	- 9 -
3.1 Koronare Herzkrankheit	- 9 -
3.1.1 Einteilung und Pathophysiologie- Rolle der Atherosklerose	- 9 -
3.1.2 Angina pectoris	- 11 -
3.1.3 Risikofaktoren und Diagnose der KHK	- 13 -
3.1.4 Konservative Therapieansätze für KHK und Angina pectoris	- 14 -
3.2 Diabetes mellitus	- 16 -
3.2.1 Einteilung, Ätiologie und Pathophysiologie	- 17 -
3.2.2 Komplikationen und Langzeitfolgen des Diabetes mellitus	- 18 -
3.2.3 Therapieansätze für Diabetes mellitus	- 19 -
3.3 Oxidativer Stress	- 20 -
3.3.1 Definition, Ursachen und Schlüssel-moleküle	- 20 -
3.3.2 Regulation des Gefäßtonus und die Rolle von NO	- 24 -
3.3.3 Endotheliale Dysfunktion und Entkopplung der NO-Synthase	- 27 -
3.3.4 Oxidativer Stress und Diabetes mellitus	- 30 -
3.3.4.1 Superoxidproduktion durch die mitochondriale Atmungskette	- 30 -
3.3.4.2 Glykierungsprodukte (AGE)	- 31 -
3.3.4.3 Xanthinoxidoreduktase	- 33 -
3.3.4.4 NADPH-Oxidasen	- 34 -
3.3.4.5 Diacylglycerol und die Proteinkinase C	- 36 -
3.3.4.6 Polyolweg	- 37 -
3.3.5 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose	- 38 -
3.4 Pioglitazon	- 38 -
3.5 Organische Nitrate und andere Nitrovasodilatoren: Substanzen, Indikation, Bioaktivierung und Wirkmechanismus	- 40 -
3.6 Nitrattoleranz	- 43 -
4 Material und Methoden	- 46 -

4.1	Material	- 46 -
4.1.1	Allgemeiner Laborgebrauch und Geräte	- 46 -
4.1.2	Verbrauchsmaterial	- 49 -
4.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	- 50 -
4.1.4	Lösungen und Puffer	- 54 -
4.1.5	Antikörper (siehe auch Tabelle 1).....	- 57 -
4.1.6	Programme	- 58 -
4.1.7	Versuchstiere.....	- 59 -
4.2	Methoden	- 59 -
4.2.1	Herstellung/Synthese von Hybridnitraten	- 59 -
4.2.2	Auswahl der Versuchstiere und in vivo Behandlung	- 61 -
4.2.3	Entnahme und Präparation der Aorta und des Herzens	- 63 -
4.2.4	Isometrische Tonusstudien im Organbad.....	- 64 -
4.2.5	Detektion von oxidativem Stress mittels Chemilumineszenz.....	- 66 -
4.2.5.1	Generierung von mitochondrialen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies	- 66 -
4.2.5.2	Detektion der Aktivität der kardialen NADPH-Oxidase in Herz-Membranfraktionen	- 68 -
4.2.6	Messung der ALDH-2-Aktivität durch HPLC Analyse.....	- 69 -
4.2.7	Topografische Detektion der vaskulären ROS-Produktion	- 71 -
4.2.8	Untersuchung der Enzymexpression (mit SDS-Page und Western Blot-Analyse)	- 72 -
4.2.8.1	Proteinisolierung aus Aortengewebe	- 73 -
4.2.8.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	- 73 -
4.2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	- 74 -
4.2.8.4	Proteinanalyse mittels Western Blot.....	- 75 -
4.2.9	Effekte auf die Hämostase	- 77 -
4.2.9.1	Blutungszeit	- 77 -
4.2.9.2	Plättchen-abhängige Thrombinproduktion	- 78 -
4.2.9.3	Humane Plättchenaggregation	- 79 -
4.2.10	Statistische Auswertung.....	- 79 -
5	Ergebnisse	- 80 -
5.1	CLC-3000- Ein neues Hybridnitrat-Molekül mit Pioglitazon	- 80 -
5.2	Gefäßfunktion	- 80 -
5.2.1	Vasodilatatorische Eigenschaften des Hybridmoleküls CLC-3000, des Linkers CLC-1275 und der Zielstruktur Pioglitazon in vitro	- 80 -
5.2.2	Vasodilatatorische Eigenschaften des Hybridmoleküls CLC-3000 in vivo.....	- 82 -
5.2.3	Effekte der Testsubstanzen auf die durch Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion in vitro und in vivo	- 83 -
5.3	Induktion von oxidativem Stress.....	- 84 -

5.3.1	Induktion von oxidativem Stress in Mitochondrien kardialen Gewebes durch Testsubstanzen in vitro	- 84 -
5.3.2	Oxidativer Stress in kardialen Mitochondrien nach in vivo Behandlung .	- 85 -
5.3.3	Superoxidproduktion durch die NADPH-Oxidase im Myokard.....	- 86 -
5.3.4	Messung der mitochondrialen ALDH-Aktivität mittels HPLC	- 87 -
5.3.5	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in Aortagewebe mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie	- 88 -
5.4	NADPH-Oxidase und antioxidative Enzyme: Analyse der Expression vaskulärer Proteine mit Western Blot.....	- 89 -
5.5	Effekte auf die Hämostase	- 90 -
5.5.1	Blutungszeit	- 91 -
5.5.2	Plättchenabhängige Thrombinproduktion.....	- 91 -
5.5.3	Thrombozytenaggregation induziert durch ADP in humanem thrombozytenreichem Plasma	- 92 -
6	Diskussion	- 93 -
6.1	CLC-3000 als neues Hybridnitrat für Diabetiker mit KHK.....	- 93 -
6.2	Einfluss auf die Gefäßfunktion	- 93 -
6.3	Induktion von oxidativem Stress.....	- 97 -
6.3.1	Mitochondrialer oxidativer Stress und Superoxidproduktion durch die NADPH-Oxidase	- 98 -
6.3.2	Topographische Detektion von oxidativem Stress.....	- 100 -
6.3.3	Enzymexpression	- 100 -
6.4	Einfluss auf hämostaseologische Parameter	- 102 -
6.5	Limitationen der Studie.....	- 103 -
6.6	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	- 104 -
7	Zusammenfassung.....	- 107 -
8	Literaturverzeichnis.....	- 109 -
9	Danksagung	- 127 -
10	Publikationen.....	- 128 -

Abkürzungsverzeichnis

A

ACh	Acetylcholin
ADH	Antidiuretisches Hormon
AEN	Aminoethylnitrat
AGE	advanced glycation end-product
AkdÄ	Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
ANOVA	Analysis of variance
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Angina pectoris
aP2	adipocyte lipid-binding protein
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
AT-II	Angiotensin II

B

BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	bovines Serumalbumin

C

CAT	Calibrated Automatic Thrombogram
cGK1	cGMP abhängige Proteinkinase 1
cGMP	Cyklisches Guanosintriphosphat
CLC-1275	Chloromethyl 2-(nitrooxy)-ethylcarbammat
CLC-3000	Pioglitazonmononitrat, (2-Nitroxyethyl) Carbaminsäure 5-(4-[2-ethylpyridin-2-yl]Ethoxy]benzyl)-2,4-Dioxothiazolidin-3-ylmethylester
COX	Cyclooxygenase
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen

D

DAG	1,2-Diacylglycerol
DEA/NONOat	Diethylamindiazoniumdiolat
DEGAM	Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin
DHE	Dihydroethidin
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4

E

ECL	Enhanced chemiluminescence
EC-SOD	Extrazelluläre Superoxiddismutase
ED	Endotheliale Dysfunktion
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET-1	Endothelin-1
ETP	Endogenes Thrombin-Potential

F

FAD/FADH2	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FDA	Food and Drug Administration

G

GAD	Glutamat-Decarboxylase
GBA	Gemeinsamer Bundesausschuss
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
GLUT-4	Glucosetransporter Typ 4
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
GTN	Glyceroltrinitrat/ Nitroglycerin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat

H

HbA1c	Glykiertes Hämoglobin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HMGB1	High-Mobility-Group-Box 1 Protein
HO-1	Häm-Oxygenase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
hsp90	Heat shock protein 90

I

IDF	International Diabetes Federation
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IQWiG	Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen
ISDN	Isosorbiddinitrat

ISMN Isosorbid-5'-mononitrat

J

JAK Januskinase

K

KADN Kardiale autonome diabetische Neuropathie

KCl Kaliumchlorid

KHK Koronare Herzkrankheit

L

LADA latent autoimmune diabetes in adults

M

MAPK mitogen activated proteinkinase

MgSO₄ Magnesiumsulfat

MLCP Myosin light Chain Phosphatase

mmol/l Millimol/Liter

MnSOD Manganhaltige (mitochondriale) Superoxiddismutase

MODY Maturity-Onset Diabetes of the Young

N

NaCl Natriumchlorid

NADH/NAD⁺ Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert/oxidiert)

NF-κB nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NO Stickstoffmonoxid

NOHLA N^G-Hydroxy-L-Arginin

Nox NADPH-Oxidase

P

PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese

pAVK Periphere Arterielle Verschlusskrankheit

PBS phosphatgepufferte Salzlösung

pD₂ vasodilatatorische Potenz

PDGF platelet-derived growth factor

PE Phenylephrin

PETN Pentaerithryltetranitrat

PGH₂ Prostaglandinendoperoxid

PGI₂ Prostacyclin

PIP₂ Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PKA Proteinkinase A

PLC Phospholipase C

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

PPAR- γ Peroxisome Proliferator-activated Receptor, Typ γ

R

RAAS Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RAGE receptor for AGE

RNS Reaktive Stickstoffspezies

ROS Reaktive Sauerstoffspezies

RP-HPLC Umkehrphasen-HPLC

S

SDS Natriumdodecylsulfat

SEM Standardfehler des Mittelwerts

sGC Guanylatzyklase

SGLT2 Natrium-Glukose-Cotransporter 2

SNP Nitroporussidnatrium

SOD Superoxiddismutase

STAT Signal Transducers and Activators of Transcription

STZ Streptozotocin

T

TEMED Tetramethylethylendiamin

TNF- α Tumornekrosefaktor- α

V

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

VSMC Vascular Smooth Muscle Cells

X

XDH Xanthindehydrogenase

XO Xanthinoxidase

XOR Xanthinoxidoreduktase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung einer atherosklerotischen Plaque, Ruptur und Heilung. Morphologisches Korrelat des Atheroms bei Myokardinfarkt und Angina pectoris.....	- 11 -
Abbildung 2: Klassifikation der stabilen Angina pectoris nach der Canadian Cardiovascular Society	- 13 -
Abbildung 3: Medikamentöse Therapie der stabilen Angina pectoris	- 16 -
Abbildung 4: Überblick der wichtigsten biologischen Quellen für Superoxid	- 22 -
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Regulation des Gefäßtonus.....	- 26 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung der durch die NO-Synthase katalysierten Reaktion	- 27 -
Abbildung 7: Struktur der humanen eNOS	- 28 -
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Entstehung von Superoxid während des Elektronentransports in der mitochondrialen Atmungskette	- 31 -
Abbildung 9: Superoxid-induzierte Lucigenin-Chemilumineszenz in Aortenringen diabetischer Kaninchen.....	- 34 -
Abbildung 10: Aufbau der Nox2.....	- 35 -
Abbildung 11: Entstehung von oxidativem Stress via Polyolweg	- 37 -
Abbildung 12: Struktur unterschiedlicher organischer Nitrate.....	- 41 -
Abbildung 13: Mechanismen der Bioaktivierung von organischen Nitraten.....	- 42 -
Abbildung 14: Mechanismus der vasodilatierenden Wirkung von organischen Nitraten... -	43 -
Abbildung 15: Mechanismen der Nitrattoleranz, Kreuztoleranz und Pseudotoleranz	- 45 -
Abbildung 16: Synthese des Hybridnitrats.....	- 60 -
Abbildung 17: Aufbau und Prinzip der osmotischen Minipumpe.....	- 63 -
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Organbadapparatur.....	- 65 -
Abbildung 19: Schematischer Aufbau einer HPLC	- 71 -
Abbildung 20: Vasodilatatorische Eigenschaften des Hybridmoleküls CLC- 3000, CLC-1275, Pioglitazon und ISDN in vitro	- 81 -
Abbildung 21: Vasodilatatorische Potenz des Hybridmoleküls CLC-3000, ACh und GTN nach siebentägiger in vivo Behandlung von Ratten mit der Testsubstanz in unterschiedlicher Dosierung	- 82 -
Abbildung 22: Effekte der Testsubstanzen auf die durch Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion in vitro und in vivo	- 84 -
Abbildung 23: RONS- Bildung in isolierten kardialen Mitochondrien unter in vitro Inkubation mit Testsubstanzen	- 85 -

Abbildung 24: RONS-Bildung in kardialen Mitochondrien nach in vivo Behandlung mit CLC-3000	- 86 -
Abbildung 25: Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid durch die kardiale NADPH-Oxidase	- 87 -
Abbildung 26: ALDH-2-Aktivität in kardialen Mitochondrien	- 88 -
Abbildung 27: Topographischer Nachweis von RONS in Aortagewebe mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie	- 89 -
Abbildung 28: Auswirkungen von CLC-3000 auf die Expression von eNOS, Nox2, HO-1 und DHFR in aortalem Gewebe.....	- 90 -
Abbildung 29: Blutungszeit nach kurzfristiger und langfristiger Behandlung mit AEN und ISMN.....	- 91 -
Abbildung 30: Endogenes Thrombinpotenzial und ADP induzierte Thrombozytenaggregation unter verschiedenen Vasodilatoren.....	- 92 -
Abbildung 31: Auswirkungen einer dreitägigen GTN-Therapie auf die vasokonstriktorische Sensitivität von Gefäßsegmenten.....	- 94 -
Abbildung 32: Auswirkung der Behandlung mit verschiedenen Vasodilatoren in vitro auf die anschließende PE-induzierte Vasokonstriktion	- 95 -
Abbildung 33: Effekt von chronischer GTN Therapie und Dihydroliponsäure auf die GTN-induzierte Relaxation in vitro	- 96 -
Abbildung 34: Einfluss von AEN und anderer organischer Nitrate in vitro und in vivo auf die mitochondriale RONS Produktion	- 99 -
Abbildung 35: Expression von Nox2, HO-1, eNOS und DHFR nach STZ Therapie und unter Therapie mit verschiedenen Nitraten.....	- 101 -
Abbildung 36: Rolle des Endothels in der Hämostase	- 102 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper im Westernblot	- 77 -
---	--------

1 Einleitung

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) ist weltweit die Haupttodesursache. Im Jahr 2013 war sie für den Tod von 8.1 Millionen Menschen verantwortlich. Das entspricht 14,8 % der weltweiten Todesfälle und macht beinahe die Hälfte aller Todesfälle an kardiovaskulären Erkrankungen aus. Von 1990 bis 2013 hat sich die Zahl der an KHK Verstorbenen um 42 % erhöht (1). Bei der KHK handelt es sich um eine Manifestationsform der arteriellen Verschlusskrankheit (aVK). Dabei sind die Herzkranzgefäße, also die Gefäße, die den Herzmuskel (Myokard) mit sauerstoffreichem Blut versorgen, durch Atherosklerose verengt. Ihr pathologisches Korrelat ist die sogenannte Koronarinsuffizienz, ein Missverhältnis von myokardialem Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot. Das Risiko, von einer Kardiovaskulären Erkrankung betroffen zu sein, wird durch sogenannte „kardiovaskuläre Risikofaktoren“ bestimmt. Ein wesentlicher Risikofaktor für die KHK ist Diabetes (2).

Der „Diabetes mellitus“ (DM) bezeichnet unterschiedliche Störungen des Stoffwechsels, die durch eine Hyperglykämie als Leitbefund charakterisiert sind (3). Weltweit starben im Jahr 2017 4 Millionen Menschen an Diabetes und seinen Folgeerkrankungen (4). Das Risiko, von einer kardiovaskulären Erkrankung (CVD) betroffen zu sein, ist für Diabetiker um das Zweifache bis Dreifache erhöht im Vergleich zu Nichtdiabetikern (5). Bereits bevor ein manifester Diabetes diagnostiziert werden kann, steigen Morbidität und Mortalität im Bezug auf CVD kontinuierlich mit steigenden nüchtern-Blutglukose-Werten (6). Die Spätfolgen der DM-Erkrankung betreffen unterschiedliche Organsysteme. Dabei sind die Folgen der durch chronische Hyperglykämie hervorgerufenen Schäden im Gefäßsystem die Haupttodesursache unter Diabetikern (6, 7). Es sind verschiedene pathogenetische Mechanismen identifiziert worden, die dieser vaskulären Schädigung durch Hyperglykämie zugrunde liegen und die in Zusammenhang mit erhöhtem oxidativem Stress stehen (8). Hierbei gelten die NADPH-Oxidase sowie eine dysfunktionale endotheliale NO-Synthase (eNOS) als Hauptquellen von oxidativem Stress (9). Außerdem können auch Glukose-Autoxidation und die nicht enzymatische Glykierung von Proteinen und anderen Molekülen (AGE=advanced glycation endproducts) als Ursache für erhöhte Superoxidproduktion in Diabetes mellitus angenommen werden (10). Daher hat die Diabetestherapie zum Ziel, einen langfristig (annähernd) normoglykämien Zustand zu erreichen. Hierzu stehen orale Antidiabetika und die Insulintherapie zur Verfügung sowie Lebensstilinterventionen.

Das Kardinalsymptom der KHK ist die Angina pectoris. Hierbei handelt es sich um einen typischerweise anfallsartig auftretenden thorakalen Schmerz mit Engegefühl, wobei die Schmerzen in Arme und Schultern, aber auch in Oberbauch, Rücken, Hals und Kiefer ausstrahlen können (2). Zur akuten Therapie der Angina pectoris sowie der Anfallsprophylaxe werden organische Nitrate eingesetzt. Durch enzymatische Freisetzung von Stickstoffmonoxid, das vasodilatatorisch wirkt, wird die Myokardperfusion verbessert. Allerdings ist die Therapie mit Nitraten limitiert durch das Auftreten einer sogenannten Nitrattoleranz, einen Gewöhnungseffekt (11), der bei langfristiger Einnahme der Nitrate auftritt bzw. der Nitratresistenz, die bei Diabetes mellitus und anderen kardiovaskulären Erkrankungen ohne vorherige Einnahme von Nitraten beobachtet wurde. Dabei konnten unter langfristiger Nitrattherapie die vermehrte Entstehung von oxidativem Stress und das Auftreten einer endothelialen Dysfunktion gezeigt werden (12, 13). Ein Ansatz, um diese Nebenwirkungen und Einschränkungen des Gebrauchs von organischen Nitraten zu verhindern, ist die Kopplung der Substanz an andere vasoaktive Medikamente, die Erzeugung sogenannter Hybridmoleküle. Das Ziel dabei ist, die Effizienz zu verbessern und Nebenwirkungen zu mindern (14). In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche verschiedene Hybridnitrate entwickelt und untersucht. So wurde mit dem Wirkstoff Nicorandil beispielsweise ein Nicotinamid-Derivat erzeugt, in dem die Funktion der Aktivierung des ATP-abhängigen Kalium-Kanals mit einer Nitratgruppe gekoppelt wurde (15, 16). Die Verbindung eines Thromboxan Synthase Hemmers und Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten mit einer NO-freisetzenden Gruppe ergab den Wirkstoff 2NTX-99 (17). Auch unsere Arbeitsgruppe synthetisierte und untersuchte 2012 neue Hybridnitrate, die auf der kovalenten Bindung zwischen Valsartan bzw. Cilostazol und einer Nitratgruppe basieren (18).

2 Ziel der Dissertation

In der vorliegenden Arbeit soll ein neu synthetisiertes Hybridnitrat, CLC-3000, das auf dem oralen Antidiabetikum Pioglitazon basiert, untersucht werden. Die Verbindung der antidiabetischen Komponente des Pioglitazon mit einer direkt vasodilatatorisch wirkenden Nitratgruppe hat zum Ziel, eine effiziente und nebenwirkungsarme medikamentöse Therapie für Diabetiker, die an Koronarer Herzkrankheit leiden, zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde CLC-3000 auf seine vasodilatatorischen Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* sowie sein Potenzial, oxidativen Stress und eine Nitrattoleranz zu verursachen mithilfe unterschiedlicher Methoden *in vitro* und *in vivo* untersucht. Außerdem wurde sein Einfluss auf verschiedene hämostaseologische Parameter untersucht.

3 Literaturdiskussion

3.1 Koronare Herzkrankheit

Die Koronare Herzkrankheit bezeichnet die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzarterien. Durch Stenosen, die den Fluss limitieren, kommt es hierbei zur sogenannten Koronarinsuffizienz. Dabei besteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot und es kommt zur Myokardischämie. Die KHK gilt als eine der wichtigsten Volkskrankheiten (19). Das Risiko im Laufe des Lebens an KHK zu erkranken wird in Deutschland bei 40- bis 79-Jährigen auf 9,3 % (12,3 % unter Männern und 6,4 % unter Frauen) geschätzt (20). In Deutschland und weltweit ist sie die häufigste Todesursache (1).

3.1.1 Einteilung und Pathophysiologie- Rolle der Atherosklerose

Die KHK kann sich in unterschiedlichen Manifestationen zeigen. Es kann die asymptomatische KHK (stumme Ischämie) von der symptomatischen KHK unterschieden werden, wobei die symptomatische KHK wiederum diverse Entitäten umfasst. Hierzu zählen stabile Angina pectoris, akutes Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris, ST-Streckenhebungsinfarkt, Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt), ischämische Herzmuskelschädigung, Herzrhythmusstörungen und der plötzliche Herztod. Die Hauptursache der Koronaren Herzkrankheit sowie anderer kardiovaskulärer Erkrankungen wie pAVK, bzw. der Koronarinsuffizienz ist die Abnahme der Perfusion infolge einer Atherosklerose. Die Atherosklerose beschreibt einen chronisch, über Jahrzehnte ablaufenden stenosierenden Prozess. Er ist in mittelgroßen und großen arteriellen Gefäßen des gesamten Körpers lokalisiert und führt letztendlich zur Ischämie des entsprechenden arteriellen Versorgungsgebietes. Abhängig von der Lokalisation kann die Atherosklerose neben dem Krankheitsbild der KHK auch zur pAVK, zerebralen sowie zur viszeralen Durchblutungsstörung führen. Grundsätzlich können mehrere Phasen von atherosklerotischen Läsionen unterschieden werden (2) (siehe Abbildung 1). Ausgangspunkt des Prozesses sind Funktionsstörungen des Endothels. Die endotheliale Dysfunktion gilt als Vorstufe der manifesten Atherosklerose (21) (3.3.5.). In den frühen atherosklerotischen Läsionen imponieren Fettablagerungen als sogenannte „fatty streaks“, eine Ansammlung von Schaumzellen, die oxidiertes LDL enthalten. Außerdem wachsen glatte Gefäßmuskelzellen unter die Intima. Diese Ablagerungen sind reversibel und führen nicht zu einer Einengung des Gefäßlumens. Durch Anhaften von Thrombozyten und nachfolgend Ausschüttung von Wachstumsfaktoren kommt es im Rahmen von Jahren bis Jahrzehnten dann zur Bildung einer Plaque, in der eine fibröse Kappe aus

Gefäßmuskelzellen sowie extrazelluläre Matrix einen inneren Lipidkern bedeckt und gegenüber dem Gefäßlumen abgrenzt (2). Im frühen Atherom gelingt es durch exzentrisches Remodelling, den so genannten Glagov Effekt, eine Einengung des Gefäßdurchschnitts zu verhindern. Bei Eindämmung der wirkenden Risikofaktoren kann sich eine stabile Plaque mit dicker Deckplatte und kleinem Lipidkern bilden oder, bei Persistenz jener, eine instabile Plaque mit großem Lipidkern und dünner Deckplatte. Durch Ruptur oder Ulzeration einer dünnen Deckplatte kann es zum Austritt des Plaqueinhalts und akuter Koronarthrombose mit Infarkt des abhängigen Gewebes kommen. Eine rupturierte Plaque kann aber auch ausheilen, wobei es zu einer hochgradigen Einengung des Gefäßes kommen kann, die sich im klinischen Bild einer stabilen Angina pectoris zeigt (22). Die Schwere der Stenose beziehungsweise der Charakter ihrer Klinik hängt von Lokalisation, Länge und Anzahl ab sowie vom Ausmaß der Verminderung des Gefäßdurchmessers. Je länger die stenosierte Strecke, desto hämodynamisch relevanter ist die Einengung. Je weiter proximal im betroffenen Gefäß die Stenose lokalisiert ist und je mehr Gefäße betroffen sind, im Sinne einer sogenannten Ein-, Zwei-, oder Dreigefäßerkrankung, desto größer ist das betroffene Myokardareal (2). Zunehmende Koronarstenosen gehen mit einer Verringerung der Koronarreserve einher, die die Differenz zwischen Koronarperfusion in Ruhe und der maximal möglichen Koronarperfusion bezeichnet. Der Schweregrad der Koronarstenose kann anhand der Lumeneinengung eingeteilt werden. Ab 50 % Einengung (Grad II) sind regionale Perforationsstörungen des Myokards zu erwarten, wobei das Ausmaß gebildeter Kollateralen im entsprechenden Gebiet relevant ist. Ab 75 % Verminderung des Durchmessers liegt eine kritische Stenose vor. Bei Fehlen von Kollateralen ist die Koronarreserve hier erschöpft, was zum klinischen Bild der belastungsabhängigen Angina pectoris führt.

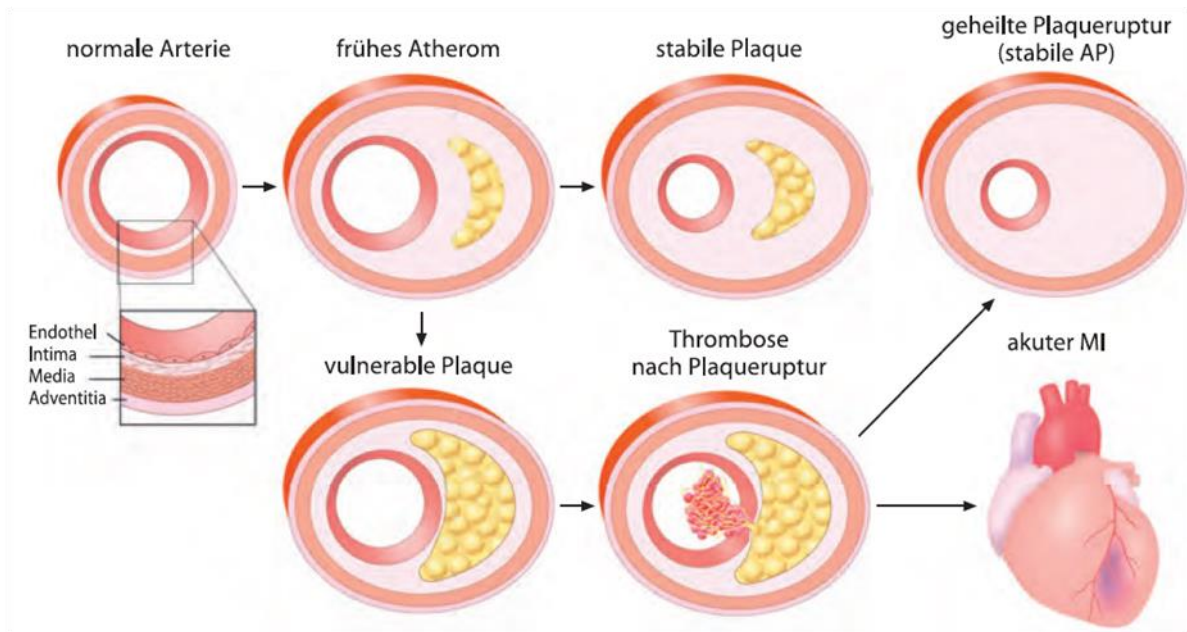


Abbildung 1: Entstehung einer atherosklerotischen Plaque, Ruptur und Heilung. Morphologisches Korrelat des Atheroms bei Myokardinfarkt und Angina pectoris

Im frühen Atherom ist das Gefäßlumen nicht eingeengt. Je nach Persistenz von Risikofaktoren entwickelt sich eine stabile oder instabile Plaque. Die instabile Plaque kann rupturieren und dann abheilen oder durch eine Verlegung epikardialer Gefäße zum akuten Myokardinfarkt führen. Abb. aus (22).

3.1.2 Angina pectoris

Die Angina pectoris (AP) ist die klinische Manifestation der KHK. Sie beschreibt einen erstens durch körperliche oder psychische Belastung ausgelösten Schmerz, der zweitens vorwiegend retrosternal lokalisiert ist, aber auch in Hals, Kiefer, Schultern, Arme oder Abdomen ausstrahlen kann und auch als Druck, Brennen oder Engegefühl empfunden werden kann. Er klingt drittens bei Ruhe meist innerhalb von 10-15 Minuten beziehungsweise bei Gabe von Nitroglycerin innerhalb von 1-2 Minuten ab. Bei Erfüllung aller drei Kriterien spricht man von einer typischen Angina pectoris. Wenn nur zwei Kriterien erfüllt sind handelt es sich um eine atypische Angina. Weiterhin kann man den nichtkardialen Schmerz unterscheiden, bei Erfüllung eines oder keines der obengenannten Kriterien. Außerdem kann man je nach Muster des Auftretens die stabile AP von der instabilen AP unterscheiden. Die stabile AP tritt regelmäßig durch bestimmte Reize auf und spricht gut auf die Gabe von Nitraten an. Dagegen nimmt die instabile AP mit der Zeit an Schwere, Dauer und Häufigkeit der Symptomatik zu oder der Bedarf an antiangiös wirkenden Medikamenten zum Abklingen der Symptomatik steigt. Auch eine Ruhe-Angina, die ohne Belastung auftritt gilt als instabile AP. Außerdem wird jede Erstangina als

(primär) instabile AP gezählt. Es werden zudem Sonderformen der Angina unterschieden: einerseits die Prinzmetal-Angina (Variant Angina), die mit reversibler ST-Streckenhebung im EKG ohne einen Anstieg des Enzyms Troponin I oder T einhergeht und durch Spasmen in stenotischen Koronararterien entsteht, andererseits die Walking through-Angina, die bei Belastung auftritt, aber bei andauernder Belastung abklingt. Die Angina nocturna tritt nachts aus dem Schlaf heraus auf (19).

Die häufig verwendete Klassifizierung der stabilen AP der Canadian Cardiovascular Society (CCS) teilt diese in 4 Schweregrade, wobei die maximale erlebte Einschränkung maßgeblich ist (Abbildung 2). Darüber hinaus kann bei allen Graden zusätzlich ein Engegefühl aus der Ruhe heraus durch vorübergehende begleitende Vasospasmen auftreten. Die pathomechanistische Basis der stabilen AP ist eine Kombination aus Stenosen in epikardialen Gefäßen, einer mikrovaskulären Dysfunktion und diffusen oder lokalen epikardialen Vasospasmen (23). Die instabile Angina pectoris zählt zum Komplex des akuten Koronarsyndroms. Dabei handelt es sich um eine Arbeitsdiagnose, die drei Krankheitsbilder zusammenfasst, die klinisch nicht eindeutig voneinander zu trennen sind und unmittelbar lebensbedrohliche Episoden der KHK darstellen. Es umfasst den ST-Streckenhebungsinfarkt, den nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt und die instabile Angina pectoris.

Die stumme Ischämie (asymptomatische KHK) ist gekennzeichnet durch das Auftreten einer myokardialen Minderversorgung ohne Angina-typische Beschwerden. Vor allem Diabetiker und Raucher sind davon betroffen (2). Die chronische Hyperglykämie bei Diabetes oder einer Glukosetoleranzstörung kann zur Entwicklung einer kardialen autonomen diabetischen Neuropathie (KADN) führen. Hierdurch kann die Wahrnehmungsschwelle der Angina pectoris unter Belastung steigen, sodass bei Ischämie keine typische Klinik wahrgenommen wird (24). Durch diese Schwellenerhöhung können ausgeprägte Ischämieperioden toleriert werden.

Klassifikation des Schweregrades einer Angina pectoris nach der Canadian Cardiovascular Society	
Klasse I	<u>Normale Aktivitäten wie Gehen oder Treppensteigen führen nicht zu Angina.</u> Angina tritt nur bei sehr anstrengenden, schnell einsetzenden oder lange dauernden Belastungen bei der Arbeit oder in der Freizeit auf.
Klasse II	<u>Leichte Einschränkung bei normalen Aktivitäten.</u> Angina tritt bei schnellem Gehen oder Treppensteigen, beim Gehen oder Treppensteigen nach Mahlzeiten, in der Kälte, bei Wind, unter emotionaler Belastung oder nur während der ersten Stunden morgens nach dem Aufwachen auf. In dieser Klasse sollte es möglich sein, mehr als zwei Häuserblöcke* weit auf ebener Erde zu gehen und mehr als eine Etage normal hoher Treppen in einem normalen Tempo bei normalen Umgebungsbedingungen zu steigen.
Klasse III	<u>Deutliche Einschränkung normaler physischer Aktivitäten.</u> Angina tritt bereits beim Gehen zu ebener Erde von mehr als einem Häuserblock oder beim Steigen einer Treppenetage beim normalen Tempo und Umgebungsbedingungen auf.
Klasse IV	<u>Keine physische Aktivität kann ohne Symptome durchgeführt werden.</u> Angina pectoris kann auch in Ruhe vorhanden sein.

Abbildung 2: Klassifikation der stabilen Angina pectoris nach der Canadian Cardiovascular Society

Entscheidend für den Schweregrad ist die größte auftretende Einschränkung der Belastbarkeit. Zusätzlich kann in allen Stadien eine Ruhe-Angina durch begleitende Vasospasmen hinzukommen. Abbildung modifiziert aus (23).

3.1.3 Risikofaktoren und Diagnose der KHK

Grundsätzlich entsprechen die Risikofaktoren der KHK denen aller kardiovaskulären Erkrankungen. Zu den Hauptrisikofaktoren für die vorzeitige Entwicklung einer Atherosklerose zählen (25):

1. Tabakkonsum
2. Diabetes mellitus
3. Arterielle Hypertonie
4. Hyperlipoproteinämie (LDL-Cholesterinerhöhung, HDL-Cholesterinerniedrigung)
5. Kardiovaskuläre Grunderkrankung
6. Familienanamnese: Kardiovaskuläre Ereignisse bei Familienangehörigen 1. Grades vor dem (m) 55./ (w) 65. Lebensjahr
7. Lebensalter (Männer ≥ 45 ; Frauen ≥ 55 Jahre)

Weitere Risikofaktoren stellen zum Beispiel Adipositas, körperliche Inaktivität, Hypertriglyzeridämie, genetische Prädisposition und die Glukosetoleranzstörung, als Vorstufe des Diabetes, dar. Das Risiko, innerhalb der nächsten zehn Jahre an KHK zu erkranken, kann mit verschiedenen Risikokalkulatoren berechnet werden, die unterschiedliche Sensitivitäten

beziehungsweise Spezifitäten aufweisen. Beispiele sind der Framingham-Risikokalkulator (für die USA) oder der PROCAM-Risikokalkulator auf Basis der Prospektiven Cardiovasculären Münster-Studie (19). Laut PROCAM-Score beträgt das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse in 10 Jahren in der Hochrisikogruppe mehr als 20 %.

3.1.4 Konservative Therapieansätze für KHK und Angina pectoris

Die kausale Therapie der KHK hat zum Ziel, die Risikofaktoren der Atherosklerose zu eliminieren. Je nach Stadium der Erkrankung geht es dabei um Primär-, Sekundär oder Tertiärprävention. Dabei gilt es, die vorhandenen Risikofaktoren (3.1.3) zu identifizieren und entsprechende therapeutische Maßnahmen zu treffen. Hierzu zählen Lebensstilinterventionen wie Raucherentwöhnung, Normalisierung des Körpergewichts bei Übergewicht, Mediterrane Diät, moderates körperliches Training und Erlernen von Techniken zur Stressbewältigung (19). Bei Patienten mit einem hohen kardiovaskulären Risiko kann durch eine mediterrane Ernährung (mit regelmäßigem Verzehr von Olivenöl oder Nüssen) das relative Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis um 30 % gesenkt werden (26, 27). Außerdem sollte bei KHK ein erhöhter Blutdruck ($\geq 140/90$ mmHg) medikamentös auf Werte $\leq 130/80$ mmHg gesenkt werden, sowie bei Diabetikern zusätzlich ein HbA1c-Wert von $\leq 7,0$ angestrebt werden (28). Bei KHK kann durch die medikamentöse Senkung der LDL-Cholesterin-Spiegel im Blut mit Statinen die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität sowie die Gesamtmortalität gesenkt werden (29).

Die Therapie der stabilen Angina pectoris beinhaltet eine Basistherapie, die das Auftreten von Myokardinfarkten verhindern und die Letalität senken soll (zusammengefasst in Abbildung 3). Hierzu gehören Thrombozytenaggregationshemmer, wie Acetylsalicylsäure (ASS) oder Clopidogrel. ASS senkt bei Patienten mit stabiler Angina pectoris oder hohem kardiovaskulärem Risiko das Auftreten sowohl von nicht-tödlichen Myokardinfarkten und Schlaganfällen sowie die vaskuläre und Gesamtmortalität (30-32). Die antiaggregatorische Therapie bei stabiler KHK sollte mit 100 mg/d ASS erfolgen. Bei Unverträglichkeit, Allergie oder Kontraindikationen sollte es durch 75 mg/d Clopidogrel ersetzt werden. Zahlreiche randomisierte und kontrollierte Langzeitstudien haben gezeigt, dass eine medikamentöse Senkung des LDL-Cholesterin-Spiegels im Blut durch Statine einen positiven Effekt auf Mortalität und Morbidität hat (28). Statine senken das Risiko für die Entwicklung von Komplikationen der KHK wie pAVK (33, 34) und Schlaganfall (35, 36). Für jede Absenkung des LDL-Spiegels von 25 mg/dl (0,65 mmol/L) wird eine relative Risikoreduktion kardialer Ereignisse von 10-15 % beobachtet (37). Daher sollen alle KHK-Patienten unabhängig vom Ausgangswert der Blutfettwerte mit einem Statin behandelt werden, wobei Zielwerte von ≤ 100 mg/dl ($\leq 2,6$ mmol/L) Plasma-LDL

angestrebt werden. Bei Unverträglichkeit oder Kontraindikation ist die Kombination von Statinen mit anderen lipidsenkenden Substanzen oder der Einsatz jener als alleinige medikamentöse Therapie möglich. Hierzu kommen Fibrate, Anionenaustauscher oder Cholesterinresorptionshemmer in Betracht (28). Auch den Betablockern kommt in der Therapie der KHK eine wichtige Rolle zu. Betablocker senken bei Patienten mit arteriellem Hypertonus das Risiko Morbidität und Mortalität bezüglich KHK häufiger als andere Antihypertensiva (38) und sind daher die erste Wahl bei der Behandlung der Hypertonie bei KHK. Auch bei KHK-Patienten mit Herzinsuffizienz (39) verbessern Betablocker die Prognose, sowie nach einem Herzinfarkt unabhängig vom Vorliegen einer hypertensiven Erkrankung (40, 41), sodass bei diesen Patienten eine Therapie mit Betablockern empfohlen wird. Bei eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion sollen KHK-Patienten zusätzlich einen ACE-Hemmer erhalten (28). Neben der Basistherapie hat die symptomatische Therapie zum Ziel, medikamentös die Angina pectoris Symptome zu mildern, die Anfallshäufigkeit zu vermindern und die Belastungstoleranz zu erhöhen.

Eine wichtige Substanzgruppe zur symptomatischen Behandlung stellen die Nitrate dar. Zur Kupierung von Angina-Anfällen sind schnellwirksame Nitrate wie Glyceroltrinitrat (GTN) oder Isosorbiddinitrat (ISDN) erste Wahl. Sie erweitern die Koronararterien und verbessern so die Sauerstoffversorgung (28). Sie werden bei Bedarf und prophylaktisch bei zu erwartendem körperlichem oder psychischem Stress sublingual verabreicht (42). Dabei wirkt GTN schneller und kürzer als ISDN, das erst in der Leber zum pharmakologisch aktiven Isosorbidmononitrat (ISMN) metabolisiert wird (43). Langwirksame Nitrate dagegen gelten zur Prophylaxe von Angina pectoris wie auch die Kalziumkanalblocker nur als zweite Wahl. Durch Hemmung der Katecholaminwirkung auf Herzfrequenz, Kontraktilität und Gefäßwiderstand senken Betablocker den myokardialen Sauerstoffbedarf und können so auch Angina pectoris-Symptome vermindern und die Belastungstoleranz verbessern. Zusätzlich zu ihrer prognoseverbessernden Eigenschaft wirken sie so auch positiv auf die Angina-Symptomatik. Nur wenn sie kontraindiziert sind oder bei unzureichender antianginöser Wirkung sind alternativ beziehungsweise additiv langwirksame Kalziumkanalblocker, langwirksame Nitrate, Ranolazin oder Ivabradin indiziert (28).

Außerdem stehen interventionelle und operative Verfahren zur Revaskularisation zur Verfügung, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll. Es kann die Ballonkatheterdilatation im Rahmen einer PTCA (Perkutane transluminare coronare Angioplastie)/PCI (Perkutane coronare Intervention) mit nachfolgender Stentimplantation von der operativen aortokoronaren Bypassanlage unterschieden werden. Grundsätzlich ist eine Indikation für einen solchen

Eingriff individuell zu stellen. In mehreren Meta-Analysen zeigte sich kein Vorteil einer PCI mit zusätzlicher medikamentöser Therapie gegenüber der Pharmakotherapie allein (44-46). Davon getrennt zu beachten ist eine symptomatische Indikation. Bei konservativ unzureichend zu beherrschender Einschränkung der Lebensqualität durch KHK, sollte bei geeignetem morphologischem Befund eine PCI erwogen werden (28). Die Bypass-Operation konnte in der MASS-II-Studie in 10 Jahren eine Verringerung von Herzinfarkten und der kardialen Mortalität im Vergleich zur alleinigen medikamentösen Therapie bewirken (47).

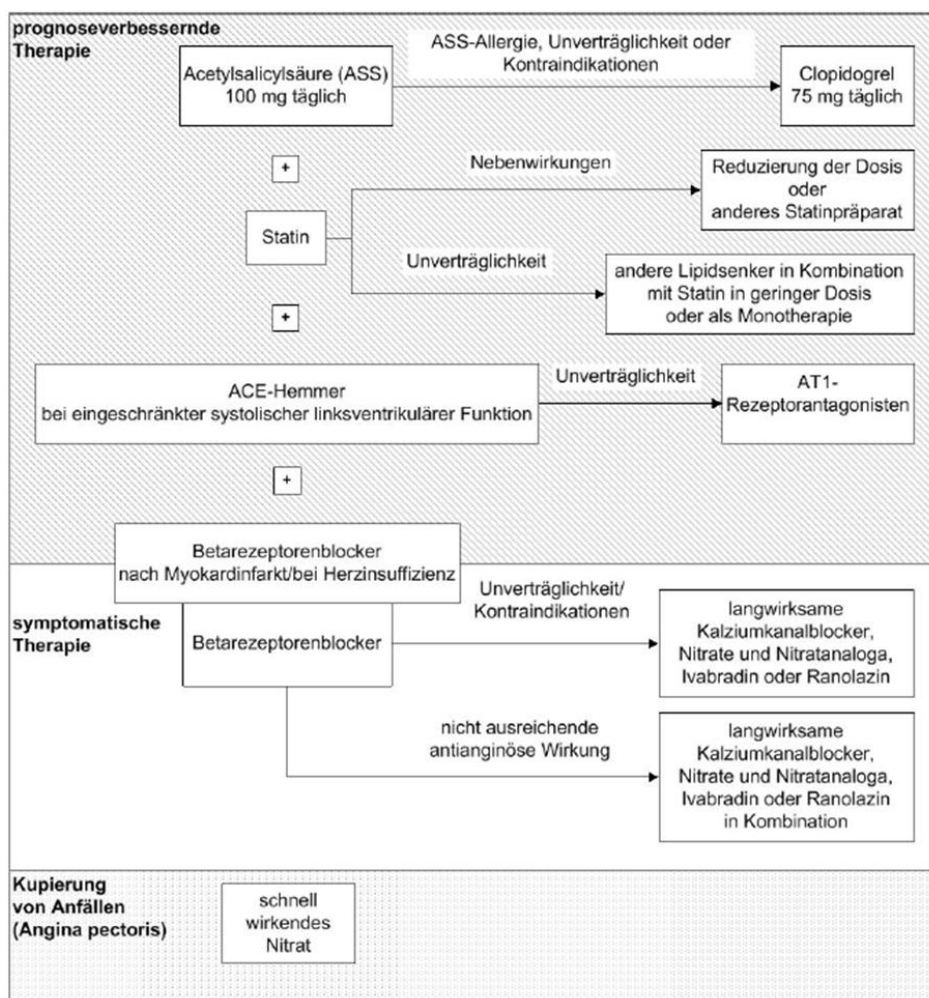


Abbildung 3: Medikamentöse Therapie der stabilen Angina pectoris

Abbildung aus (28).

3.2 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus (DM) bezeichnet unterschiedliche Störungen des Stoffwechsels, die eine Hyperglykämie als Leitbefund zeigen (48). Der Begriff setzt sich zusammen aus dem Alt-

Griechischen und dem Lateinischen und kann mit „honigsüßer Durchfluss“ übersetzt werden. Bereits in der Antike kannte man die Erkrankung, die durch vermehrte Harnausscheidung und Glucosurie (Ausscheidung von Zuckern mit dem Harn) charakterisiert ist. Diabetes ist eine chronische Erkrankung, bei der entweder die Produktion von Insulin im Pankreas gestört ist und es zu einem Insulinmangel im Blut kommt oder die Sensibilität der Zellen auf vorhandenes Insulin vermindert ist. In beiden Fällen kommt es zu einer Hyperglykämie. Meistens liegt eine Kombination aus beiden Mechanismen vor (48). Diabetes gilt als Volkskrankheit. Die International Diabetes Federation (IDF) schätzt in ihrem „Diabetes Atlas“, dass im Jahr 2017 über 400 Millionen Erwachsene zwischen 20 und 79 Jahren an Diabetes erkrankt waren (8,8 %) und schätzt dass die Prävalenz bis zum Jahr 2045 auf mehr als 600 Millionen steigen wird. Weltweit starben im Jahr 2017 4 Millionen Menschen an Diabetes und seinen Folgeerkrankungen (4).

3.2.1 Einteilung, Ätiologie und Pathophysiologie

Es lassen sich im Wesentlichen vier Typen von Diabetes unterscheiden, die sich in Ätiologie, Pathophysiologie und klinischer Erscheinung unterscheiden. Typ 1 macht nur 5-10 % aller Diabetiker aus und bezeichnet den „absoluten Insulinmangel“ durch Zerstörung der β -Zellen des Pankreas. Diese Zerstörung erfolgt autoimmun. Es können Autoantikörper gegen pankreatische Inselzellen, Autoantikörper gegen Insulin und die Glutamat-Decarboxylase (GAD) sowie Antikörper gegen die Tyrosinphosphatase (IA-2- und IA-2 β -AK) nachgewiesen werden. Der Typ 1 Diabetes tritt meist bereits Kindes- und Jugendalter auf, kann seltener aber auch erst viel später im Leben in Erscheinung treten. Die Geschwindigkeit der β -Zell-Destruktion ist sehr variabel, was die unterschiedlich frühen Erkrankungsalter erklärt. Eine Sonderform ist der *latent autoimmune diabetes in adults* (LADA). Häufig zeigt sich der Diabetes Typ 1 bei Kindern oder Jugendlichen erstmals durch eine Ketoazidose. Durch das Ausbleiben einer Insulinproduktion kann keine Glukose aus dem Blut in die Zellen quergestreifter Muskelzellen aufgenommen werden. Alternativ werden vom Organismus zur Energiegewinnung Fettsäuren verstoffwechselt, wobei Ketonkörper anfallen, die bei Akkumulation eine metabolische Azidose verursachen. Ursächlich für die Zerstörung der Insulin-produzierenden Zellen durch Antikörper ist ein Zusammenspiel von Umwelt, genetischer Prädisposition (HLA-Assoziation) und immunologischen Faktoren (Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen) (49).

Der Typ 2 Diabetes betrifft 90-95 % der Diabetiker. Er zeigt sehr unterschiedliche Verlaufsformen. So kann er vor allem durch eine Insulinresistenz mit einem „relativen Insulinmangel“ auffallen oder vorwiegend einen sekretorischen Defekt mit einer Insulinresistenz aufweisen. Er wurde früher, im Vergleich zum Typ 1, als „insulinunabhängiger“ Diabetes bezeichnet, da

häufig keine oder erst später im Laufe der Erkrankung eine Erschöpfung der Insulinproduktion erfolgt und eine Insulintherapie nötig wird (48). Ätiologisch vermutet man viele unterschiedliche Gründe. Deutlich zeigt sich allerdings eine starke genetische Komponente sowie die Assoziation zum Symptomkomplex des Metabolischen Syndroms, das definiert ist als Kombination aus mindestens drei der folgenden Kriterien: Abdominale Adipositas, Hypertriglyceridämie, Dyslipidämie, arterieller Hypertonus, gestörte nüchtern-Blutzucker-Werte oder Diabetes. Im Alter steigt das Risiko für einen Diabetes mellitus Typ 2. Übergewicht und geringe körperlicher Aktivität haben den größten Anteil an den weltweiten Fällen von Diabetes. Häufig bleibt der Typ 2 Diabetes viele Jahre unerkannt, da die Betroffenen nicht unter Diabetes-typischen Symptomen leiden. Ketoazidosen treten sehr selten spontan auf, sondern im Zusammenhang mit Krankheiten wie Infektionen oder anderen Formen von Stress. Die Patienten zeigen zu den erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut normale oder kompensatorisch erhöhte Insulinkonzentrationen. Da aber neben der Insulinproduktion aber auch die Insulinsensitivität gestört ist, kann so die Insulinresistenz nicht vollständig ausgeglichen werden (49, 50).

Neben den beiden Hauptformen des Diabetes kann man noch eine Gruppe anderer spezifischer Diabetesformen sowie den Gestationsdiabetes unterscheiden. Zur ersteren gehören unter anderem Erkrankungen des exokrinen Pankreas, die sekundär zum Verlust der endokrinen Pankreasfunktion führen (z.B. Mukoviszidose, Pankreatitis), sowie andere endokrine Erkrankungen (z.B. Chushing-Syndrom) und medikamentös-chemisch induzierter Diabetes. Auch der Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) zählt zu dieser Gruppe (48). Der Gestationsdiabetes ist eine Glukosetoleranzstörung, die erstmals in der Schwangerschaft auftritt oder festgestellt wird und meist nach Ende der Schwangerschaft wieder verschwindet. Er bedeutet eine erhöhte perinatale Morbidität und Mortalität für Mutter und Kind. Frauen mit Gestationsdiabetes haben ein erhöhtes Risiko postpartal einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln (51, 52).

Die Diagnosekriterien für einen Diabetes mellitus sind ein nüchtern-Glukose-Wert im venösen Plasma von ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l), ein 2-h Wert von ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) im oralen Glukosetoleranztest (oGTT) mit 75 g Glukose, ein HbA1c $\geq 6,5$ % (≥ 48 mmol/mol) oder ein Gelegenheits-Plasmaglukosewert von ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l) (48).

3.2.2 Komplikationen und Langzeitfolgen des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist ein lange bekannter Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD). Das Erkrankungsrisiko ist um das Zwei- bis Dreifache erhöht im Vergleich zu nicht-Diabetikern (5). Häufige Langzeitfolgen eines chronisch erhöhten Blutzuckerspiegels sind Koronare Herzkrankheit (KHK), ischämischer Schlaganfall, periphere Arterielle

Verschlusskrankheit (pAVK), diabetische Nephropathie, diabetische Retinopathie sowie die diabetische Neuropathie. Das Risiko eines Diabetikers, einen Herzinfarkt zu erleiden, ist vergleichbar mit dem eines bereits kardiologisch Vorerkrankten (53) sowie die Wahrscheinlichkeit, an einem erlittenen Herzinfarkt zu sterben, erhöht im Vergleich zu nicht-Diabetikern (54). Außerdem erleiden an Diabetes Erkrankte deutlich häufiger physische Einschränkungen in den Aktivitäten ihres täglichen Lebens (55).

Wie genau eine chronische Hyperglykämie, die allen Diabetesformen gemein ist, zu vaskulären Schäden führt ist nicht endgültig und im Detail geklärt. Eine zentrale Rolle spielt hierbei aber Glukotoxizität, daraus resultierendes AGE/RAGE Signaling mit Induktion der Inflammation und von oxidativem Stress. Es konnte gezeigt werden, dass Hyperglykämie über verschiedene Mechanismen zu einer vermehrten mitochondrialen Produktion von Superoxid führt (8).

3.2.3 Therapieansätze für Diabetes mellitus

Bei der Behandlung des Typ 1 Diabetes sollten mit dem Patienten individuelle Therapieziele vereinbart werden. Dabei sollte die Wahl des Ziel-HbA1c-Wertes einen Kompromiss darstellen zwischen guter glykämischer Kontrolle und einem geringen Hypoglykämierisiko. In der Regel sollte ein HbA1c-Wert von <7,5 % angestrebt werden. Die Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 besteht aus den Komponenten Schulung, Ernährung, psychosozialer Betreuung und der Insulinsubstitution. Der individuelle Insulinbedarf hängt von verschiedenen Faktoren ab. Standard ist die intensivierete Insulintherapie mit einem langwirksamen Basisinsulin und einem kurzwirksamen Normalinsulin, das zu der Nahrungsaufnahme zusätzlich verabreicht wird. Alternativ ist eine Insulinpumpentherapie möglich oder nachrangig unter bestimmten Bedingungen die konventionelle Insulintherapie (56).

Neben der Basistherapie, die in einer Lebensstilintervention besteht, steht auch die medikamentöse Therapie zur Verfügung. Die Lebensstilintervention umfasst die Schulung bezüglich der Erkrankung, eine Ernährungsumstellung, die Umsetzung individueller Gewichtsziele, die Steigerung der körperlichen Aktivität und gegebenenfalls eine Raucher-Entwöhnung. Durch Kalorienreduktion und körperliche Aktivität lassen sich die mitochondriale Funktion verbessern, Bildung von Radikalen reduzieren, Proliferation hemmen und die Insulinwirksamkeit verbessern (57). Allein durch die Änderung der Lebensgewohnheiten kann bei übergewichtigen und adipösen Typ 2 Diabetikern die kardiovaskuläre Morbidität gesenkt werden (58). Die medikamentöse Therapie hat zum Ziel, mikroangiopathische (Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie) sowie makroangiopathische (Herzinfarkt, Schlaganfall, Amputation von Extremitäten) Folgeschäden zu verhindern unter Vermeidung von Hypoglykämien und Gewichtszunahme

unter der Therapie. Neben der Therapie mit Insulin oder seinen Analoga, die beim Typ 2 Diabetes meist erst später im Verlauf zum Einsatz kommen, stehen verschiedene Substanzgruppen von oralen Antidiabetika sowie Präparate zur subcutanen Injektion zur Verfügung. Die nationale Versorgungsleitlinie gibt eine Stufentherapie vor, bei der der HbA1c-Wert als ein Parameter zur Erfolgskontrolle genutzt wird. Bei Menschen mit Typ-2-Diabetes soll zur Prävention von Folgekomplikationen ein HbA1c-Korridor von 6,5 % bis 7,5 % unter Berücksichtigung der individualisierten Therapieziele erreicht werden. Bei der Festlegung der HbA1c-Zielwerte soll das Risiko für Hypoglykämien als wichtige Nebenwirkung der Diabetestherapie mit einbezogen werden. Die Lebensstilintervention stellt hier die Basistherapie dar, die auch in höheren Stufen erhalten bleibt. Wenn nach 3-6 Monaten die individuellen HbA1c-Zielwerte nicht erreicht werden, folgt die nächste Stufe. Sie besteht aus einer Monotherapie mit einem oralen Antidiabetikum. Alle oralen Antidiabetika setzen eine verbliebene (Rest-)Insulinsekretion voraus. Erste Wahl ist hier das Biguanid Metformin. Bei Unverträglichkeit oder Kontraindikation gegenüber Metformin stehen zur Monotherapie DPP4-Inhibitoren, SGLT2-Inhibitoren, Glinide, Sulfonylharnstoffe, Alpha-Glukosidase-Hemmer, Pioglitazon und Humaninsulin zur Verfügung. Die nächste Stufe sieht eine Monotherapie mit Insulin vor oder alternativ eine Zweifachkombination aus zwei verschiedenen oralen Antidiabetika. Die Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (DEGAM) und die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) schlagen hier explizit drei Kombinationen vor: Metformin mit 1. Insulin, 2. Glibenclamid oder 3. einem DPP4-Inhibitor. Bei Versagen folgt die vierte und letzte Stufe. Sie beinhaltet eine intensiviertere Insulintherapie oder weitere Kombinationstherapien aus Insulin und Antidiabetika (59).

3.3 Oxidativer Stress

3.3.1 Definition, Ursachen und Schlüssel-moleküle

Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde von Helmut Sies Ende der 1980er Jahre definiert als ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Oxidantien, das potentiell zu Schäden führen kann. Dazu kommt es einerseits, wenn zu viele oxidierende Spezies anfallen oder zu wenig enzymatische oder nicht-enzymatische Antioxidantien für die Entgiftung dieser oxidierenden Spezies vorhanden sind (60, 61). Freie Radikale wurden das erste Mal 1900 von Moses Gomberg beschrieben (62), aber erst in den 50er Jahren wurde ihr Vorkommen in biologischen Systemen entdeckt (63). Ihre Rolle hier war allerdings noch wenig erforscht. Man nahm lange an, dass sie vor allem in pathologische Prozesse und das Altern involviert sind

(64, 65). Diese Rolle wurde durch Publikationen zwischen 1970 und 1990 stark in Frage gestellt und das Verständnis dieser Moleküle erweiterte sich. Als erstes wurden sie als Mediator bei der Bekämpfung von Infektionen durch das Immunsystem identifiziert (66). Später wurde dem Stickstoffmonoxid (NO) die Rolle eines endothelium-derived relaxing factors (EDRF) zugeschrieben, der in der physiologischen Regulation des Gefäßtonus agiert und der in Endothelzellen aus L-Arginin produziert wird (67-69). Heute weiß man, dass Radikale nicht nur als Akteure in schädigenden Prozessen gesehen werden können, sondern an vielerlei physiologischen Prozessen teilnehmen und so die normale Funktion lebender Organismen möglich machen. In menschlichen Zellen spielen als Oxidantien vor allem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) eine Rolle. Zu den wichtigsten ROS zählen hier das Sauerstoff-Radikal Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Unter den RNS haben das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit (ONOO^{\cdot}) die größte Bedeutung. Das Hydroxylradikal ist zwar sehr reaktiv, aber wenig selektiv in der Wahl seiner Reaktionspartner. Deshalb ist seine Lebenszeit relativ kurz und seine schädigende Wirkung in der Zelle begrenzt bzw. auf wenig kritische Targets wie z.B. Zucker beschränkt.

Superoxid kommt eine außerordentlich wichtige Rolle im Gefäßsystem zu. Es entsteht auf vielfältigen biologischen Stoffwechselwegen: zum Beispiel als Nebenprodukt in der mitochondrialen Atmungskette, durch NADPH-Oxidasen, die Xanthinoxidase sowie durch Cytochrom-P₄₅₀-Oxidasen (70) (Abbildung 4). Außerdem wird Superoxid durch die entkoppelte NO-Synthase gebildet (71, 72). Das Superoxid-Anion entsteht chemisch aus Sauerstoff durch die Reduktion eines Elektrons. Es ist selbst relativ wenig reaktionsfreudig. Durch seine Reaktion mit NO aber, entsteht das hochreaktive Oxidans Peroxynitrit. Der Zerfall von Superoxid, der durch Disproportionierung gesteuert wird, wird in der Zelle durch Superoxid-Dismutasen (SOD) beschleunigt. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid, das durch Katalasen weiter entgiftet wird (22).

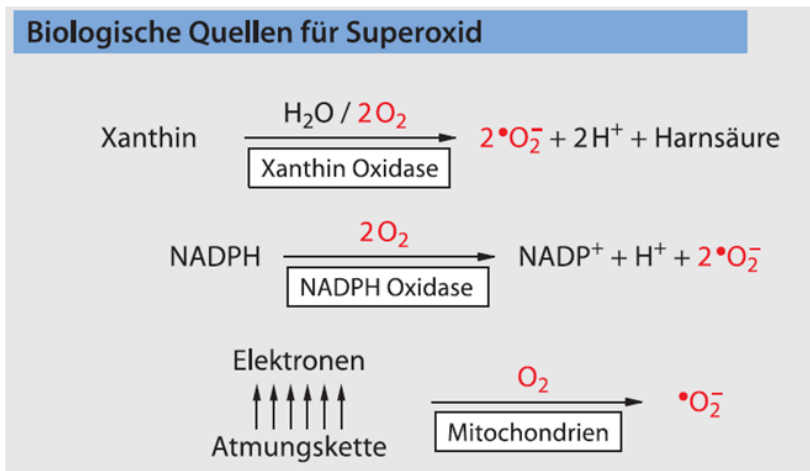
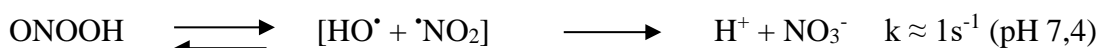


Abbildung 4: Überblick der wichtigsten biologischen Quellen für Superoxid
 Abbildung modifiziert aus (22).

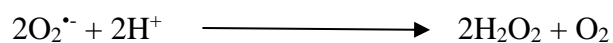
Stickstoffmonoxid ist zwar ein Radikal, aber ist wie Superoxid eher reaktionsträge und reagiert nur mit ausgewählten Molekülen. $\cdot\text{NO}$ wird von NO-Synthasen produziert, dessen Isoformen in verschiedenen Kompartimenten und Zellen zu finden sind. Da seine Reaktion mit Sauerstoff und die nachfolgende Disproportionierung langsam stattfinden, hat es eine relativ lange Lebenszeit in der Zelle und bewegt sich frei, auch transmembranär. Es bildet mit hoher Affinität stabile Komplexe mit Eisen II und Eisen III, worauf seine bedeutende Rolle als Signalmolekül und seine zytotoxischen Eigenschaften beruhen. Einerseits agiert es so als physiologischer Aktivator der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und reguliert den Vasotonus im Sinne einer Vasodilatation (73). Andererseits bewirkt es eine Entkopplung der Cytochrom c-Oxidoreduktase und eine vermehrte Produktion von Oxidantien durch die mitochondriale Atmungskette (74, 75). Insgesamt überwiegen jedoch die protektiven Eigenschaften des Moleküls.

Wie oben erwähnt reagiert $\cdot\text{NO}$ mit Superoxid zu Peroxynitrit. Diese Reaktion läuft diffusionskontrolliert und schneller ab als der Abbau von Superoxid durch die SOD stattfindet. Sie ist also abhängig von dem durch Diffusion stattfindenden Transport der reagierenden Teilchen zueinander. Das Peroxynitrit-Ion und seine protonierte Form ONOOH befinden sich in einer Gleichgewichtsreaktion. Peroxynitrit hat eine Lebenszeit von etwa einer Sekunde und isomerisiert zu Nitrat und Wasserstoff. Anteilig werden durch Homolyse dabei Radikale ($\cdot\text{OH}$ und $\cdot\text{NO}_2$) gebildet, die ebenfalls zur Toxizität von Peroxynitrit beitragen, da sie mit einer Vielzahl an Molekülen reagieren (22, 76).



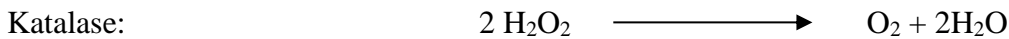
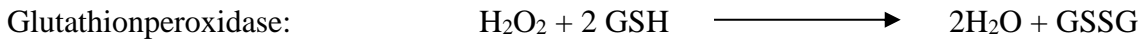
Da Superoxid eine sehr kurze Halbwertszeit hat, ist der Ort der Peroxynitrit-Bildung räumlich von der Superoxid-Entstehung abhängig. Solche Superoxidquellen sind wie oben erwähnt beispielsweise die membrangebundene NADPH-Oxidase oder die mitochondriale Atmungskette, weshalb hier Peroxynitrit entsteht, das auf vielen Wegen schädlich auf zelluläre Strukturen und Prozesse wirken kann. Es oxidiert Thiol-Gruppen und Glutathione als reduzierend wirkende Speicherform von Cystein, antioxidative Enzyme und inaktiviert diese. Es inaktiviert essentielle Kofaktoren der eNOS wie Tetrahydrobiopterin (BH₄) durch Reduktion zu 5,6- Dihydrobiopterin beziehungsweise 6,7- Dihydrobiopterin und bewirkt so die Entkopplung der NO-Synthase. Es oxidiert Purin-Nukleotide in der DNA und führt zu Strangbrüchen in selbiger (75, 77). Superoxid wirkt also einerseits durch die Reduktion der Verfügbarkeit von *NO und andererseits durch die Bildung des toxischen Peroxynitrits aus der Reaktion mit Stickstoffmonoxid prooxidativ im Organismus.

Um den oxidativen Stress in den Zellen zu bewältigen und in physiologischen Grenzen zu halten, verfügt der Organismus über verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Systeme. Die enzymatischen Systeme setzen die reaktiven Spezies in harmlosere Moleküle um. Zu den wichtigsten gehören die Superoxid-Dismutase, die Katalase und Glutathionperoxidasen. Für die erste enzymatische Reaktion der schrittweisen Entgiftung von Superoxid sind die SODs verantwortlich, bei denen eine zytosolische (Cu/Zn-Sod, Sod1), eine mitochondriale (MnSOD, Sod2) und eine extrazelluläre SOD (EC-SOD, Sod3) unterschieden werden kann. Sie katalysieren die Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und molekularem Sauerstoff:



Obwohl Wasserstoffperoxid kein Radikal ist, ist es dennoch ein reaktionsfreudiges Molekül und wird in der Fenton-Reaktion wiederum schnell zum reaktiven Hydroxylradikal umgewandelt (*OH). An der Entgiftung des H₂O₂ sind je nach Kompartiment zwei Enzyme beteiligt. Die Glutathionperoxidase kommt sowohl im Zytosol als auch in Mitochondrien vor. Die Katalase findet man hauptsächlich in Peroxisomen, aber auch im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Zytosol. Die Glutathionperoxidase setzt H₂O₂ zu Wasser um, wobei die benötigten Elektronen vom Reduktionsfaktor Glutathion kommen. Auf ein ähnliches Prinzip greifen die Peroxiredoxine zurück, wobei hier die Elektronen von Thiolgruppen in den Peroxiredoxin-

Proteinen selbst stammen und bei der Entgiftung über Disulfidbrücken-verknüpfte Peroxiredoxindimere gebildet werden. Die Katalase setzt H_2O_2 zu Wasser und molekularem Sauerstoff um.



Die nicht-enzymatischen (niedermolekularen) Systeme bilden Moleküle, die elektronenübertragende Metallionen binden und dadurch die ROS Bildung verhindern oder mit bereits entstandenen Radikalen sowie nicht-radikalischen reaktiven Spezies reagieren und sie so unschädlich machen. Hierzu gehören zum Beispiel Ceruloplasmin, Ferritin und Transferrin, thiolgruppenenthaltende Metallothioneine und Glutathion (GSH) sowie Vitamin C, Vitamin E und Coenzym Q. Diese Moleküle kommen teilweise intrazellulär in Zytoplasma, Nukleus und Mitochondrien vor und teilweise extrazellulär im Blut (78-80). Desweiteren gibt es Enzyme, die bereits entstandene Schäden an DNA und Proteinen und Schäden an der Zellmembran (z.B. oxidierte Lipide) reparieren können (81). Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien.

3.3.2 Regulation des Gefäßtonus und die Rolle von NO

Der Gefäßtonus entspricht dem allgemeinen Spannungszustand der glatten Gefäßmuskulatur, die für die Durchblutung verantwortlich ist. Eine Regulation der Gefäßweite ist für das Funktionieren des menschlichen Körpers unerlässlich. So kann die Durchblutung reguliert werden abhängig von Faktoren wie Außentemperatur, körperlicher Aktivität, Stress und Krankheit. Der Gefäßtonus bestimmt maßgeblich den totalen peripheren Widerstand im Kreislaufsystem und trägt so zur Regulation des Blutdrucks bei. Ziel der Regulation ist, die Perfusion der Organe sicherzustellen. Die Gefäßwand ist speziell aufgebaut: sie besteht aus der äußersten Bindegewebsschicht, der *Adventitia*, darunter aus der *Media*, die von elastischen Fasern und glatten Muskelzellen gebildet wird und der innersten Zellschicht, der *Intima*, die aus einer einfachen Schicht abgeplatteter Endothelzellen besteht. Diese trennt nicht nur den intravasalen Raum und damit den Blutstrom von der Gefäßmuskelschicht und dem darunter liegenden Gewebe, sondern steuert durch Ausschüttung verschiedener vasoaktiver Substanzen den Gefäßtonus, hemmt die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten und beeinflusst so die

Hämostase und Inflammation (82-84). Außerdem reguliert das Endothel auch Gefäßneubildung und die Proliferation von Gefäßwandzellen (85, 86).

Bei der Regulation des Gefäßtonus wirken eine Vielzahl von Stoffen und Signalwegen zusammen. Zu den wichtigsten vasokonstriktiv wirkenden Substanzen gehören Adrenalin, Noradrenalin, Endothelin-1, Angiotensin II, Thromboxan A₂ und ADH (Antidiuretisches Hormon oder Vasopressin). Sie wirken an spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Bindung des Liganden bewirkt durch Konformationsänderung des Rezeptors eine Gq-Protein (α -Untereinheit) vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die ihrerseits aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) das Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) synthetisiert. IP₃ vermittelt einen Kalzium-Einstrom aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Plasma der Zelle. Durch den Anstieg der Ca²⁺-Konzentration in den Glattmuskelzellen wird eine Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase bewirkt, wodurch die Myosin-Aktin-Filamente leichter kontrahieren und sich die Gefäßmuskulatur zusammenzieht. Entgegengesetzt wirken Vasodilatoren wie zum Beispiel Prostaglandine, insbesondere Prostacyclin (PGI₂), aber auch Vasodilatoren anderer Klassen wie Dopamin, atriales natriuretisches Peptid (ANP) und b-Typ natriuretisches Peptid (BNP) sowie Stickstoffmonoxid (87). NO kommt hierbei eine außerordentlich wichtige Rolle zu. Von Furchgott wurde der endothelium-derived relaxing factor (EDRF) bereits 1980 entdeckt (67). Die Identifizierung von NO als dieser EDRF fand erst in den späten 1980er Jahren unter anderem durch Ignarro et al. (88) sowie Moncada et al. (89), nachdem auch die NOSynthese durch die NOS Enzyme näher charakterisiert war (90, 91). Für ihre gemeinsame Entdeckung erhielten Furchgott, Murad und Ignarro den Nobelpreis für Medizin 1998. NO bindet im Gegensatz zu ANP und BNP überwiegend an die lösliche, nicht an die membrangebundene Guanylatzyklase. Über diese Bindung entsteht aus GTP das cGMP, das die cGK1 (cGMP abhängige Proteinkinase 1 oder Proteinkinase G) aktiviert. Diese phosphoryliert ein IP₃-Rezeptor-assoziiertes G-Protein und Ionenkanal (IRAK) und den IP₃ Rezeptor am ER und verhindert so den Kalzium-Einstrom ins Zytoplasma und damit die vermehrte Aktivität der Myosin-Leichtketten-Kinase sowie die vermehrte Kontraktilität der Myosin-Aktin-Filamente im Glattmuskel. Dopamin und Prostacyclin vermitteln eine Aktivierung der Adenylatzyklase (AC), die aus ATP cAMP synthetisiert. Eine nachfolgende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) aktiviert die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (Myosin light Chain Phosphatase, MLCP). Durch eine Dephosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins wird dieses weniger kontraktile. So wird auf zwei Wegen die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur gehemmt (22, 87). Das Wechselspiel der verschiedenen Vasodilatoren und

Vasokonstriktoren im Gefäßgewebe ist in (Abbildung 5) zusammengefasst. Stickstoffmonoxid wird von der NO-Synthase aus L-Arginin gebildet (69).

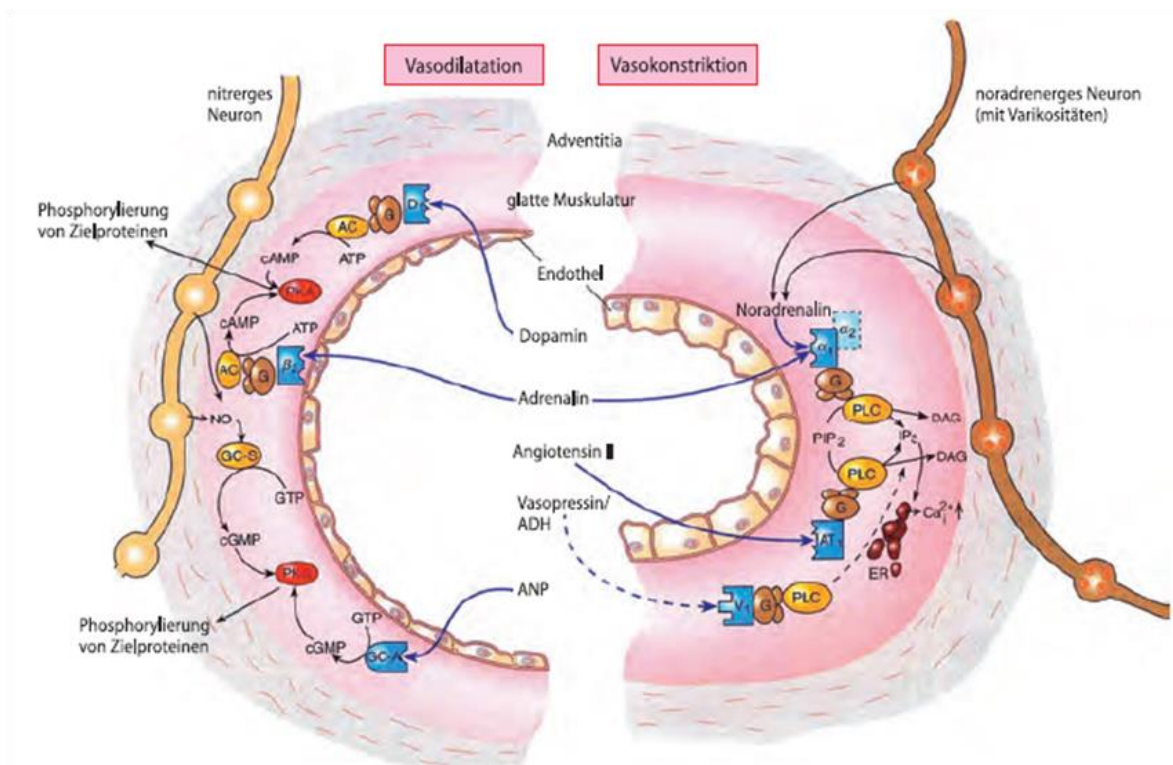


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Regulation des Gefäßtonus
 Erläuterung siehe Text. Abbildung aus (92).

Die Synthese erfolgt in zwei Schritten: über eine 5-Elektronen-Oxidation von L-Arginin zu N^G-Hydroxy-L-Arginin (NOHLA) als Zwischenprodukt, welches selbst auch Substrat der NO-Synthase ist, und dann in einem weiteren Oxidationsschritt zu *NO und L-Citrullin weiter umgewandelt wird (Abbildung 6). Hierbei ist NADPH ein Co-Substrat und Flavin Adenin Dinucleotid (FAD), Flavin Mononucleotid (FMN), Zink sowie Tetrahydrobiopterin (BH₄) sind Co-Faktoren (93). Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) wird auf verschiedene Weisen in ihrer Funktion reguliert. Einerseits wird sie durch den Ca²⁺-Calmodulin Komplex aktiviert, wodurch bei intrazellulärem Ca²⁺-Anstieg in der Endothelzelle die eNOS induziert wird (94). Heat shock protein 90 (hsp90) kann die „Re-Kopplung“ einer entkoppelten eNOS bewirken (95). Andererseits wird ihre Aktivität positiv durch Bradykinin und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Insulin und Östrogen reguliert. Der Mechanismus dieser Regulationswege ist die Phosphorylierung von Serin-, Tyrosin- und Threoninresten der eNOS durch verschiedene Protein-kinasen. Mechanische Scherkräfte zum Beispiel bewirken die Phosphorylierung vor allem via PKA (96, 97).

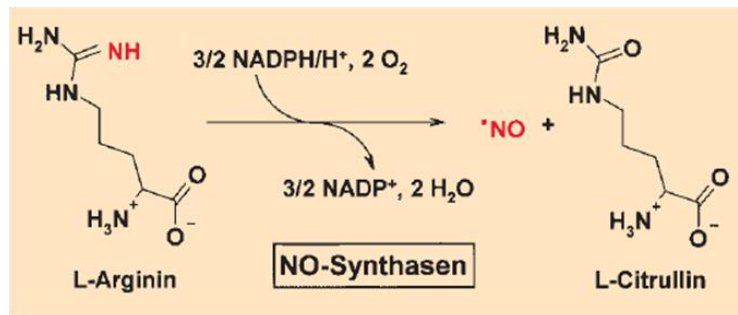


Abbildung 6: Schematische Darstellung der durch die NO-Synthase katalysierten Reaktion

Die NO-Synthase stellt in einer Oxidationsreaktion aus L-Arginin L-Citrullin und Stickstoffmonoxid her. Dabei bildet NADPH ein Cosubstrat und Tetrahydrobiopterin (BH₄) und FAD (hier nicht gezeigt) Cofaktoren. Abbildung modifiziert aus (76).

3.3.3 Endotheliale Dysfunktion und Entkopplung der NO-Synthase

Die endotheliale Dysfunktion (ED) bezeichnet einen Zustand der Dysbalance zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation, in dem die Vasokonstriktion überwiegt. Das Gefäß kann hierbei nicht mehr angemessen mit der Produktion von *NO auf innere oder äußere Einflüsse auf die Gefäßweite reagieren. Es verliert außerdem auch seine weiter oben erläuterten protektiven Eigenschaften wie die Hemmung von Thrombozytenaggregation oder die Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen der Gefäßwand. Die ED gilt als Vorstufe der Atherosklerose (98). Assoziiert mit der ED sind kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie (99), Rauchen (100, 101), Alter (102, 103), arterieller Hypertonus (104) und Diabetes (105). Auf molekularer Ebene liegt bei diesen Risikofaktoren vermehrt oxidativer Stress vor. Dieser führt zu einer Erniedrigung der NO-Bioverfügbarkeit, indem Superoxid *NO inaktiviert. Dabei entsteht gleichzeitig das Oxidans Peroxynitrit. Andererseits kann die NO-Synthase unter bestimmten Bedingungen auch selbst Quelle von Superoxid werden. Dies geschieht wahrscheinlich durch zwei Mechanismen: Der für die NO-Synthase essentielle Kofaktor BH₄ wird durch Peroxynitrit oxidiert und steht somit nicht mehr ausreichend für die Stabilisierung der mehrfachen Elektronentransfers zwischen Sauerstoff, Eisen, Substrat und Coenzym NADPH zur Verfügung, die Elektronen werden fehlgeleitet und auf molekularen Sauerstoff übertragen (106). Auch das Fehlen des Substrates L-Arginin ist limitierend für die NO-Produktion (107). Außerdem können Zink-Thiolat-Cluster (ZnCys₄) im Enzym durch Peroxynitrit oder Superoxid oxidiert werden, wodurch die Bindung im Homodimer verändert wird (108). Diesen Zustand der NO-Synthase nennt man „entkoppelt“. Ein neuerer Mechanismus der Entkopplung ist die S-Glutathionylierung in der Reduktasedomäne (109). Auch die Bildung und der Abbau des

stärksten endogenen eNOS Inhibitors, dem asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA), ist redox-reguliert und ADMA kann zur Entkopplung des Enzyms führen. Die Phosphorylierung durch die redox-sensitive Proteintyrosinkinase-2 (PYK-2) und die Proteinkinase C (PKC) an Tyr657 und Thr495 führt vermutlich nicht zur Entkopplung der eNOS, aber zur Dysfunktion/Inaktivierung. All diese sogenannten „Redox-Schalter“ in der eNOS sind in (Abbildung 7) zusammengefasst.

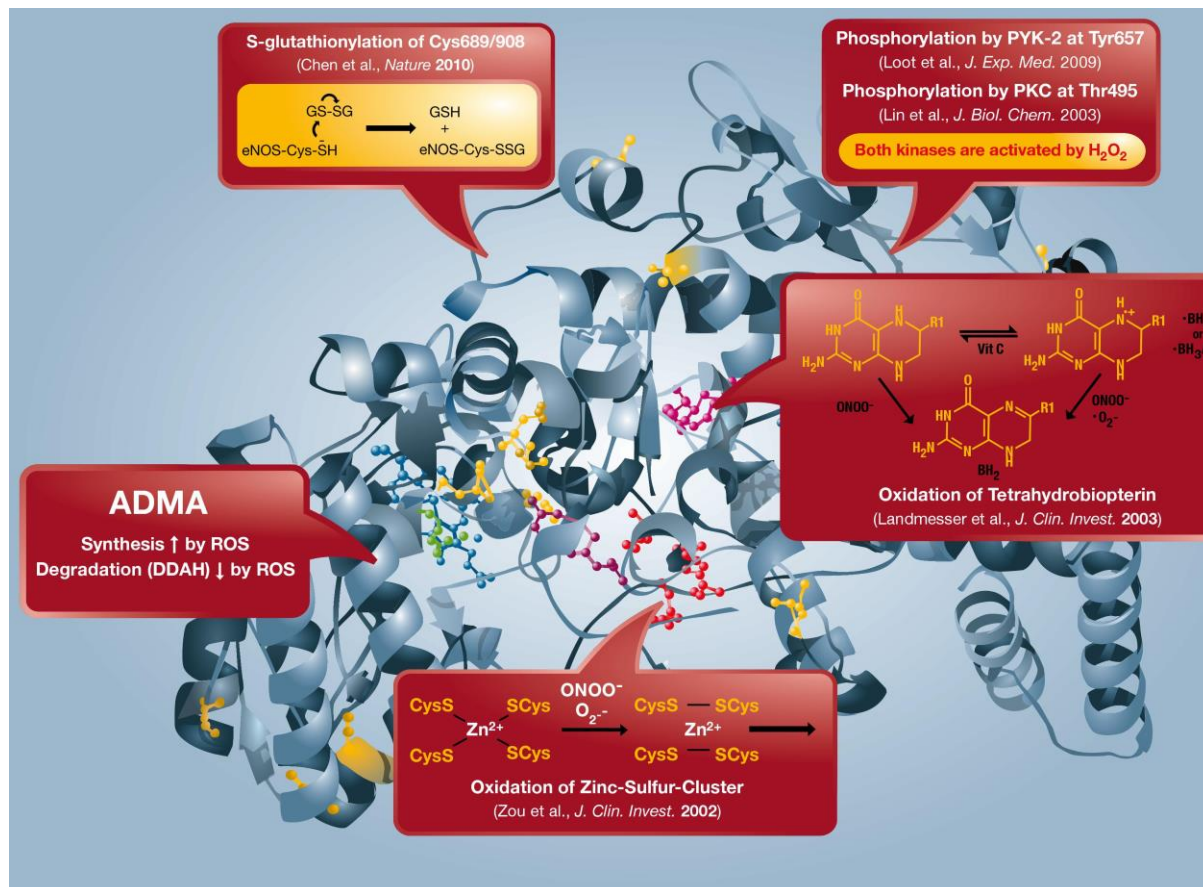


Abbildung 7: Struktur der humanen eNOS

Dargestellt sind die Mechanismen der Entkopplung des Enzyms sowie außerdem Zink-Thiolat-Cluster bildende Cysteine (rot), Zn^{2+} (nicht gezeigt), der Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4) (lila), Substrat L-Arginin (grün) und Eisen-Porphyrin (blau). Abbildung aus (72).

Bei dieser Entkopplung können Elektronen im Enzym nicht mehr auf das Substrat L-Arginin übertragen werden beziehungsweise reaktive Zwischenprodukte nicht mehr ausreichend stabilisiert werden. So können Elektronen dann auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, wodurch das proatherogene Superoxidanion anstelle des protektiven, antiatherogenen $\cdot\text{NO}$ entsteht (22).

Die pathomechanistischen Prozesse der ED sind allerdings nicht auf das Endothel beschränkt, weshalb korrekterweise von einer „Vaskulären Dysfunktion“ gesprochen werden sollte. Zum

einen ist eine gesteigerte Bildung von Radikalen nicht auf das Endothel beschränkt, sondern findet auch in glattmuskulären Zellen der Media, in der Adventitia und sogar im zirkulierenden Blut statt (110), zum anderen finden weitere pathophysiologische Schlüsselereignisse in der Signaltransduktion von NO statt. Die redox-sensitive Guanylatzyklase, als Schlüsselenzym in der Signalkaskade der Vasodilatation, wird durch Superoxid und Peroxynitrit durch Oxidation verschiedener Thiolgruppen im katalytischen Zentrum inaktiviert. Peroxynitrit kann außerdem durch eine Eisen-katalysierte Reaktion einen Thyrosinrest (Y430) im katalytischen Zentrum der Prostacyclinsynthase, die aus dem Substrat Prostaglandinendoperoxid (PGH_2) Prostaglandin I_2 (PGI_2), auch Prostacyclin genannt, herstellt, nitrieren und diese so inaktivieren. Das Prostacyclin bewirkt über den G-Protein gekoppelten IP-Rezeptor physiologischerweise eine Relaxation glatter Muskelzellen. Bei Inaktivierung kommt es zu Anhäufung von PGH_2 , das durch die Cyclooxygenase (COX) aus Arachidonsäure synthetisiert wird. Dieses wird dann vermehrt zu Thromboxan A_2 verstoffwechselt, das, wie auch der Intermediat PGH_2 , vasokonstriktorisch sowie proaggregatorisch wirkt (111). Die durch oxidativen Stress hervorgerufene vaskuläre Dysfunktion ist ein sich selbst katalysierender pathologischer Zustand. In diesem herrscht einerseits verminderte Produktion antiatherogener, antiaggregatorischer, antiphlogistischer Substanzen, was unter anderem zur Migration und Aktivierung von Entzündungszellen und Adhäsion von Thrombozyten führt, sowie einer Entkopplung der NO -Synthase. Beides führt wiederum zu vermehrtem oxidativem Stress und so zu einer Verschlimmerung der vaskulären Dysfunktion im Sinne eines Circulus vitiosus (22). In unseren Untersuchungen wurde die vaskuläre Funktion mithilfe isometrischer Tonusstudien *in vitro* quantifiziert. Durch Inkubation von Aortensegmenten mit verschiedenen Reagenzien wie Acetylcholin (ACh) und GTN wurde die endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatation gemessen (siehe 4.2.4). Acetylcholin wirkt in den Endothelzellen, aber auch in den glattmuskulären Zellen der Media. Während es im Endothel über den muskarinergen ACh-Rezeptor durch Kalzium-Einstrom in das Zytosol die eNOS aktiviert und vasodilatierend wirkt, fördert es gleichzeitig in der glatten Muskulatur der Gefäße über den nikotinergen ACh-Rezeptor durch Kalzium-Einstrom in das Zytosol die Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase und somit die Konstriktion, wobei unter physiologischen Umständen die Dilatation überwiegt. Bei funktionsgestörtem Endothel ist dieses Verhältnis verändert und die Vasokonstriktion überwiegt – sprich hier wird nach ACh Infusion eine „paradoxe“ Vasokonstriktion beobachtet, wie im Herzkatheter ACh Test für die Identifizierung stenotischer Koronargefäße eingesetzt (22).

3.3.4 Oxidativer Stress und Diabetes mellitus

Die Hyperglykämie ist der Leitbefund des Diabetes mellitus. Es konnte in tierexperimentellen sowie in klinischen Patientenstudien eine Assoziation von vaskulärer Dysfunktion sowohl mit Typ 1 Diabetes also auch mit dem Typ 2 Diabetes nachgewiesen werden (112-115). In in vivo Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Antioxidans Ascorbinsäure die verminderte Reagibilität von diabetischen Gefäßen wiederherstellen kann (116). Dies lässt schlussfolgern, dass die vaskuläre Dysfunktion bei Diabetes im Zusammenhang mit erhöhtem oxidativem Stress steht. Hyperglykämie induziert oxidativen Stress auf verschiedenen Wegen.

3.3.4.1 Superoxidproduktion durch die mitochondriale Atmungskette

Durch einen erhöhten Zuckerstoffwechsel entstehen im Rahmen der Glykolyse beziehungsweise des Zitratzyklus bei Hyperglykämie vermehrt NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) sowie FADH₂ (Flavin-Adenin-Dinucleotid). Diese sind elektronenübertragende Coenzyme in der Elektronentransportkette der Atmungskette, die der Energiegewinnung der Zelle dient und an dessen Ende aus ADP und Phosphat ATP hergestellt wird (117). Durch exzessives Vorkommen von NADH und FADH₂ steigt auch der elektrochemische Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran. Hierdurch wird der Elektronentransport an Komplex III gehemmt und die Halbwertszeit von radikalischen Intermediaten des Ubiquinols steigt. So kann vermehrt O₂ zu Superoxid reduziert werden (118). Außerdem werden durch die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) (119) sowie zwischen Ubiquinon und Komplex III (120) der Atmungskette vermehrt Elektronen auf Sauerstoff übertragen und es entsteht Superoxid. Das in der Matrix der Mitochondrien entstehende Superoxid kann unter anderem durch die mitochondriale Superoxid-Dismutase (Mn-SOD/ SOD2) entgiftet werden, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Diese Prozesse sind in (Abbildung 8) zusammengefasst.

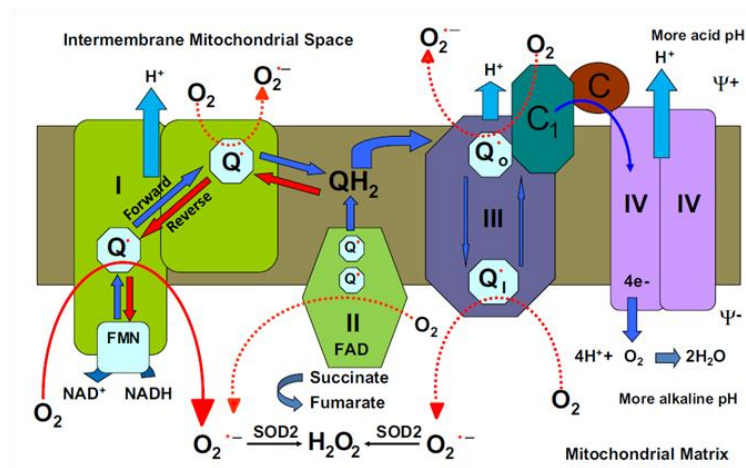


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Entstehung von Superoxid während des Elektronentransports in der mitochondrialen Atmungskette

Physiologischerweise werden an Komplex I Elektronen von NADH über FMN auf Ubiquinon (Q) übertragen. Dabei werden am Komplex I pro verbrauchtem NADH 4 Protonen in den Intermembranraum befördert. An Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) wird Succinat zu Fumarat oxidiert und die Elektronen über FAD auf Ubichinon übertragen, wobei keine Protonen in den Intermembranraum gepumpt werden. So entsteht an Komplex I und II Ubichinol (QH₂). Dieses führt an Komplex III (Cytochrom-c-Oxidase) zur Reduktion von 2 Cytochrom-c-Molekülen und wird dabei selbst wieder zu Ubichinon oxidiert. Es werden hier weitere 4 Protonen in den Intermembranraum befördert. Am letzten Komplex (IV) der Atmungskette wird Cytochrom-c oxidiert wobei durch Reduktion von Sauerstoff H₂O entsteht. Hierdurch werden 2 Protonen exportiert. Durch den entstandenen Protonengradienten über der Membran strömen die Protonen über ATP-Synthase wieder in die Mitochondrienmatrix, wobei durch das Enzym ADP und anorganischem Phosphat zu ATP umwandelt (87). Abbildung aus (121).

3.3.4.2 Glykierungsendprodukte (AGE)

Unter andauernder Hyperglykämie, wie beim Diabetes mellitus, kann es zur Entstehung sogenannter Glykierungsendprodukte kommen. Glykierungsendprodukte (engl.: advanced glycation end-products=AGEs) stellen eine heterogene Substanzgruppe dar, die durch nicht-enzymatische Glykierung von terminalen Aminogruppen von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren im Rahmen der *Maillard Reaktion* entstehen (122). Die Reaktion erfolgt in mehreren Schritten: Zunächst reagiert reversibel die Carbonylgruppe von Glukose oder einem anderen reduzierenden Zucker mit einer Aminogruppe oben genannter Reaktionspartner, wodurch eine instabile Verbindung, die Schiffsche Base, entsteht. Durch Neuordnung der chemischen Struktur entstehen dann in einer irreversiblen Reaktion die stabileren Ketoamine oder *Amadori Produkte*. (123, 124). Ein solches ist zum Beispiel HbA1c. In einem letzten Schritt entstehen durch weitere chemische Transformation, wie Oxidation, Dehydratation und Cyclisierungs-Reaktionen, irreversibel strukturell heterogene sogenannte AGEs (125). Außerdem kann es zur Bildung von AGE-Vorläufern kommen, die dann mit intra- und extrazellulären Proteinen reagieren,

wodurch AGEs entstehen. Diese Vorläufer entstehen durch intrazelluläre Glukoseautoxidation, wobei Glyoxal entsteht, sowie durch Abbau von Amadori Produkten zu 3-Desoxyglucoson und Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat beziehungsweise Dihydroacetonphosphat zu Methylglyoxal (118). AGEs können Rezeptor-vermittelt und nicht Rezeptor-vermittelt ihre pathologische Wirkung entfalten. Bei der Pathogenese von diabetischen Komplikationen spielt die Interaktion von AGEs mit zellulären Rezeptoren eine entscheidende Rolle. Der sogenannte RAGE (receptor for AGE), von *Nepper et al.* (126) als erstes beschrieben, ist hier der am besten untersuchte. RAGE gehört zur Immunglobulin-Superfamilie der Oberflächen-Moleküle. Er wird von Endothelzellen exprimiert, sowie unter anderem von glatten Gefäßmuskelzellen, Makrophagen und verschiedenen Nervenzellen (127, 128). Neben AGEs (129) bindet er unter anderem auch Amyloid-typische β -Faltblatt Fibrillen (130, 131), S100/ Calgranulin (132) und Amphoterin/HMGB1 (High-Mobility-Group-Box Protein B1) (133). Die Bindung eines Liganden an den RAGE bewirkt über die Phosphorylierung von verschiedenen Proteinkinasen einschließlich MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinase) und JAK/STAT (Januskinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription) eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (134-137) und beeinflusst so die genetische Transkription. Es ist bekannt, dass über die AGE-RAGE Interaktion proatherogene Effekte erzielt beziehungsweise proinflammatorische Prozesse gefördert werden. Bezüglich der vaskulären Dysfunktion als erster Stufe der Atherosklerose konnte im Diabetes eine Erniedrigung der Bioverfügbarkeit und Aktivität von NO durch AGEs nachgewiesen werden (138). Die Serum-Konzentrationen von AGEs in Typ 2 Diabetikern korrelieren negativ mit dem Ausmaß der endothelunabhängigen sowie der endothelabhängigen Vasodilatation (139). Außerdem fördern AGEs die Migration von Monozyten aus dem intravasalen Raum in die Endothelzellschicht (140). Die Glykierung des LDL-Rezeptors und von Lipoproteinen bewirkt desweiteren eine Störung der Aufnahme von Cholesterol aus dem Blut und fördert so die proatherogene Dyslipidämie (140). Die proatherogene Wirkung der AGEs wird außerdem über eine Induktion von oxidativem Stress mediiert. Dies geschieht ebenfalls via Bindung von AGEs an RAGE (10, 141). Die nachfolgende Aktivierung der NADPH-Oxidase ist vermutlich ein Mechanismus über den AGEs ihre pathologischen Effekte bewirken (142). So spielen AGEs bei der Entwicklung von Folgeerkrankungen bei Diabetikern eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Inhibitoren der AGE-Bildung die Entwicklung von mikrovaskulären Schäden an Niere, Nervensystem und Retina unterbinden können (143-146). Für Methylglyoxal konnte eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der diabetischen Neuropathie gezeigt werden (147).

3.3.4.3 Xanthinoxidoreduktase

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) ist ein Enzym, das im menschlichen Organismus den Abbau von Xanthin zu Hypoxanthin zu Harnsäure im Rahmen des Purinstoffwechsels katalysiert (148). Das Enzym enthält im aktiven Zentrum ein Molybdänatom und besitzt FAD als prosthetische Gruppe. Es kommt in zwei Formen vor, die ineinander umwandelbar sind und die unterschiedliche Elektronenakzeptoren nutzen: Die Xanthinoxidase (XO) und die Xanthindehydrogenase (XDH) (149).

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Enzym überwiegend als XDH vor. Für die Interkonversion sind zwei Mechanismen bekannt. Irreversibel kann es durch Proteolyse, zum Beispiel durch Trypsin/Chymotrypsin, in die XO umgewandelt werden (149, 150). Außerdem geschieht eine Konversion reversibel durch Oxidation von Thiolgruppen im Enzym (151). Die Xanthinoxidase oxidiert sein Substrat, indem es Sauerstoff reduziert. Dabei entsteht ein Superoxid-Anion. Die Xanthindehydrogenase überträgt die Elektronen bevorzugt auf NAD^+ , wodurch NADH entsteht (152-154). Außerdem katalysiert die XO die Oxidation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid, das vermutlich so oder so als Endprodukt den hauptsächlichsten Anteil der durch die XO produzierten ROS ausmacht (155). ROS spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen des Diabetes. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die ROS-Bildung bei Diabetes sowie die XO-Aktivität maßgeblich erhöht sind. Die erhöhte Superoxidproduktion konnte hier durch die Gabe des XO-Hemmers Allopurinol/Oxipurinol normalisiert werden (156). Von *Butler et al.* konnte auch klinisch gezeigt werden, dass die Hemmung der XOR durch Allopurinol bei Typ 2 Diabetikern mit leichter Hypertonie eine Verminderung der endothelialen Dysfunktion, im Sinne einer verbesserten endothelabhängigen Vasodilatation, bewirkt (157). Die größte XOR-Aktivität konnte beim Menschen in der Leber, Dünndarm und im laktierenden Brustdrüsengewebe nachgewiesen werden (158), aber auch in Endothelzellen tierischen Gewebes sowie des Menschen (159). Außer intrazellulär, im Zytoplasma lokalisiert konnte die XO auch an der äußeren Zelloberfläche von Endothelzellen nachgewiesen werden (160). Bei Diabetikern ist die Aktivität der XO erhöht und es wird vermehrt XO aus der Leber ins Plasma abgegeben (161). Diese bindet über Glykosaminoglykane an der Oberfläche von Endothelzellen, wo sie dann durch Superoxidproduktion direkt lokale Schäden hervorruft sowie örtliche neutrophile Granulozyten anlockt und aktiviert, die ihrerseits weiter zu oxidativem Stress beitragen. Heparin kann diese Bindung auflösen (162). Die erhöhte Superoxidproduktion in Aortenringen von diabetischen Kaninchen konnte durch die Gabe von Allopurinol oder Heparin deutlich verringert werden (Abbildung 9), wohingegen sie bei gesunden Kontroll-Tieren keine Auswirkung zeigte. Es konnte beobachtet

werden, dass die XOR unter Hypoxie und in Anwesenheit von NADH auch $\cdot\text{NO}$ produzieren kann. Sie katalysiert die Bildung von $\cdot\text{NO}$ aus Nitrit und bildet damit einen wichtigen protektiven Mechanismus der Wiederherstellung der Durchblutung in hypoxischem Gewebe (163, 164).

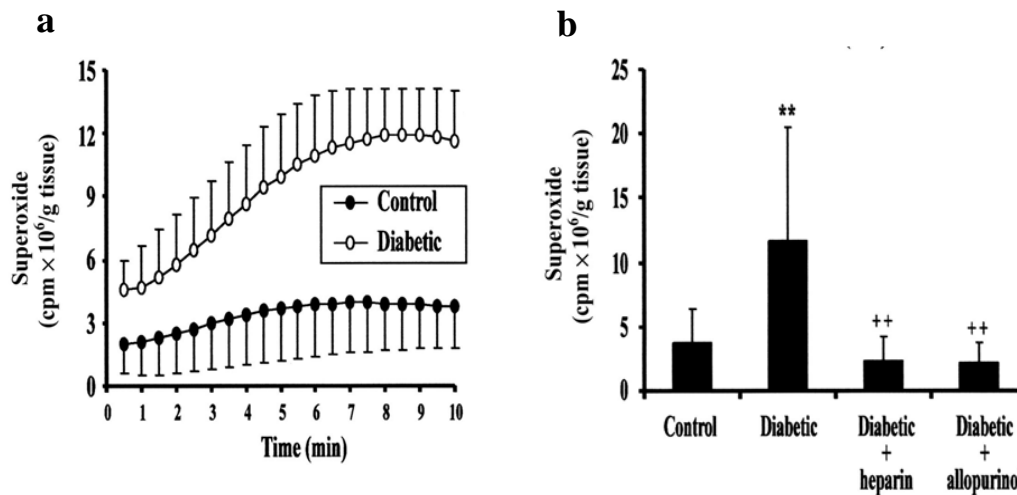
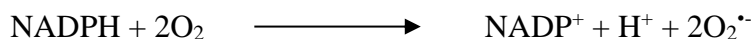


Abbildung 9: Superoxid-induzierte Lucigenin-Chemilumineszenz in Aortenringen diabetischer Kaninchen

a) Chemilumineszenz gemessen *in vitro* in Aortenringen diabetischer Kaninchen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. **b)** Chemilumineszenz gemessen nach 10 Minuten von Kontrolltieren, diabetischen Kaninchen, diabetischen Kaninchen *in vivo* behandelt mit Heparin bzw. mit Allopurinol. Mittelwerte \pm SEM aus fünf Messungen. ** $p < 0,01$, Diabetes vs. Kontrolle; ++ $p < 0,01$, Diabetes+Heparin bzw. Diabetes+Allopurinol vs. Diabetes. Abbildung aus (161).

3.3.4.4 NADPH-Oxidasen

Die NADPH-Oxidase (Nox) ist ein membrangebundener Enzymkomplex und bildet eine wichtige Quelle für Superoxid im Gefäßsystem. Sie katalysiert die Reaktion von Sauerstoff zu Superoxid im Sinne einer 1-Elektronen Reduktion und unter Oxidation des Cofaktors NADPH (165).



Es sind sieben unterschiedliche Isoformen bekannt, von denen vier im Gefäßsystem eine Rolle spielen (Nox1, Nox2, Nox4, Nox5). Die am besten untersuchte davon ist die phagozytäre NADPH Oxidase (Nox2 Isoform). Sie besteht aus zwei membranständigen Untereinheiten gp91^{phox}, auch als Nox2 bezeichnet, sowie p22^{phox} die das katalytische Zentrum bilden. Außerdem gibt es drei zytosolische Untereinheiten p67^{phox}, p47^{phox} und p40^{phox} sowie das kleine GTP-bindende Protein Rac. An ihrem Beispiel soll auch die Funktionsweise des Enzyms erläutert

werden: Nox2 und $p22^{phox}$ stabilisieren einander gegenseitig und bilden zusammen das Cytochrom b558. Bei Phosphorylierung der zytosolischen $p47^{phox}$ durch die PKC und der Bindung von GDP an Rac, wodurch der GTP-Rac-Komplex entsteht, erfolgt die Aktivierung des Enzyms durch Assoziation der zytosolischen Komponenten mit dem Membrankomplex Cytochrom b558 (166). In der katalysierten Reaktion von Sauerstoff zu Superoxid dient NADPH als Donator eines Elektrons, das auf molekularen Sauerstoff übertragen wird. Aufbau und Katalyse der Nox2 sind in Abbildung 10 zusammengefasst.

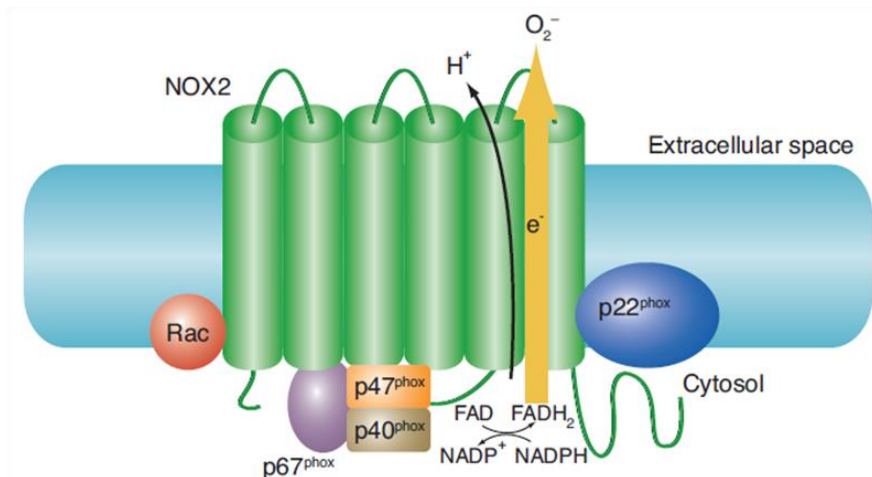


Abbildung 10: Aufbau der Nox2

Die Nox2 besteht aus ihren membrangebundenen Anteilen $gp91^{phox}$ (Nox2) und $p22^{phox}$ sowie den zytosolischen Untereinheiten $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ und $p40^{phox}$ und dem GTP-bindenden Rac-Protein. Abbildung aus (167).

Reguliert wird die Nox abhängig von ihrer Lokalisation von unterschiedlichen Hormonen, mechanischen Effekten und metabolischen Gegebenheiten. In glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC=engl. Vascular Smooth Muscle Cells) (168) und Fibroblasten der aortalen Adventitia (169) wird die Nox von Angiotensin II oder genauer dem potenten PKC Aktivator DAG aktiviert. In VSMC wird die Nox außerdem unter anderem von $TNF-\alpha$ und Thrombin und platelet-derived growth factor (PDGF) induziert (170-172). In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte NADPH-abhängige Produktion von Superoxid durch $TNF-\alpha$, Interleukin-1 sowie platelet-activating factor bewirkt wird (173, 174). Außerdem scheint ein „Crosstalk“ zwischen Mitochondrien und NADPH-Oxidase stattzufinden. Durch ROS-Produktion in den Mitochondrien wird unter anderem via PKC-Aktivierung, nachdem die ROS durch den mPTP Kanal ins Zytosol gelangt sind, die NADPH-Oxidase in Phagozyten sowie in Herz- und Gefäßgewebe aktiviert (175). Natürlicherweise entsteht durch die Superoxidproduktion der NADPH-Oxidase kein oxidativer Stress. Die durch die NADPH-Oxidase produzierten ROS (letztendlich hauptsächlich Wasserstoffperoxid durch Dismutation des Superoxids) fungieren als

Signalmoleküle in Prozessen wie Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration, Wachstum und Fibrosierung (176-178). Aufgrund der körpereigenen antioxidativen Systeme herrscht in physiologischem Zustand ein Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Akteuren. Es konnte gezeigt werden, dass im Diabetes mellitus die Expression der Nox1 und der Nox2 sowie die Aktivität des Enzyms in Aorta- beziehungsweise in Herz- und Aortagewebe erhöht sind (9, 179). *Hink, Li et al.* konnten zeigen, dass dies durch die Proteinkinase C (PKC) gesteuert wird und durch Hemmung jener PKC mit N-Benzoyl-Staurosporin eine Verminderung der Superoxidproduktion durch die NADPH-Oxidase bewirkt werden kann (9). Neben der phagozytären NADPH-Oxidase Untereinheit (gp91^{phox}), die in den Endothelzellen und in infiltrierenden Leukozyten vorkommt und die als Hauptquelle für die vaskuläre Superoxidproduktion gilt, trägt auch die in glatten Gefäßmuskelzellen vorkommende Nox1 zur ROS-Bildung bei (179). Die Reaktion des Superoxids zu Peroxynitrit fördert, wie oben erläutert, die Entkopplung der eNOS und die Vaskuläre Dysfunktion. Die Nox4 kommt unter anderem in den Mitochondrien kardialer Muskelzellen vor. Es konnte gezeigt werden, dass in transgenen Mäusen mit erhöhter Expression der Nox4 die Entstehung von oxidativem Stress in Herzmuskelzellen erhöht ist (180).

3.3.4.5 Diacylglycerol und die Proteinkinase C

Bei einer Hyperglykämie fällt in der Glykolyse vermehrt der Intermediat Dihydroacetonphosphat an. Dieser wird zu Glycerol-3-Phosphat reduziert, wodurch die Synthese von Diacylglycerin (DAG) verstärkt wird (181). Bei Diabetes mellitus können unter anderem in Aorta- und Herzgewebe erhöhte Spiegel von DAG sowie erhöhte PKC-Aktivität nachgewiesen werden (182). *Tesfamariam et al.* reklamierten eine Bedeutung der PKC bei der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion: Die Inkubation von Aortenabschnitten mit Glucose *in vitro* bewirkte eine endotheliale Dysfunktion, welche durch simultane Inkubation mit dem PKC-Inhibitor *H-7* oder Sphingosin verhindert werden konnte (183). Da die NADPH-Oxidase bei Diabetes eine Hauptquelle für Superoxid in Gefäß- und Entzündungszellen darstellt (184) und diese Produktion durch Hemmung der PKC vermindert werden kann, ist davon auszugehen, dass die PKC zumindest zum Teil die erhöhte ROS-Produktion des Diabetes via NADPH-Oxidase vermittelt (9). Bei Diabetikern ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) stärker aktiv (185-187). Durch die Wirkung von AT-II am Angiotensin-rezeptor AT1, wird vermehrt DAG produziert, das die PKC aktiviert (188). Außerdem geht man davon aus, dass die PKC durch mitochondriale ROS aktiviert werden kann, die bei Diabetikern erhöht sind. (189). Bei Diabetikern beeinflusst die PKC zahlreiche Prozesse im Gefäßsystem: Unter anderem steigert sie Permeabilität des Endothels für Albumin und andere Makromoleküle und erhöht die Expression von VEGF, was die Neovaskularisation beeinflusst (190-192), sie stört die Produktion und Aktivität

von Prostaglandinen und erhöht die Produktion von Thromboxan und anderen COX-abhängigen Vasokonstriktoren sowie von Endothelin-1 (193, 194).

3.3.4.6 Polyolweg

Bei der Entstehung von oxidativem Stress durch den Polyolweg spielen zwei Enzyme eine entscheidende Rolle: Die Aldosereduktase und die Sorbitdehydrogenase. Unter Hyperglykämie werden bis zu 35 % der Glukose im Blut durch die Aldosereduktase verstoffwechselt. Unter normoglykämischen Bedingungen dagegen findet kaum ein Abbau der Glukose auf diesem Weg statt (195). Die Aldosereduktase wandelt Glukose mithilfe der Oxidation von NADPH in Sorbitol um. Das hierbei verbrauchte NADPH steht so unter anderem nicht mehr für die Regeneration des Antioxidans Glutathion durch die Glutathion-Reduktase zur Verfügung, wodurch Glutathion vermehrt in oxidiert Form (Glutathion-Disulfid=GSSG) vorliegt. Einerseits kann es so zur sogenannten S-Glutathionylierung kommen. Hierbei interagiert die Thiol-Disulfid-Verbindung des oxidierten Glutathions mit der eNOS und beeinflusst so ihre Aktivität.

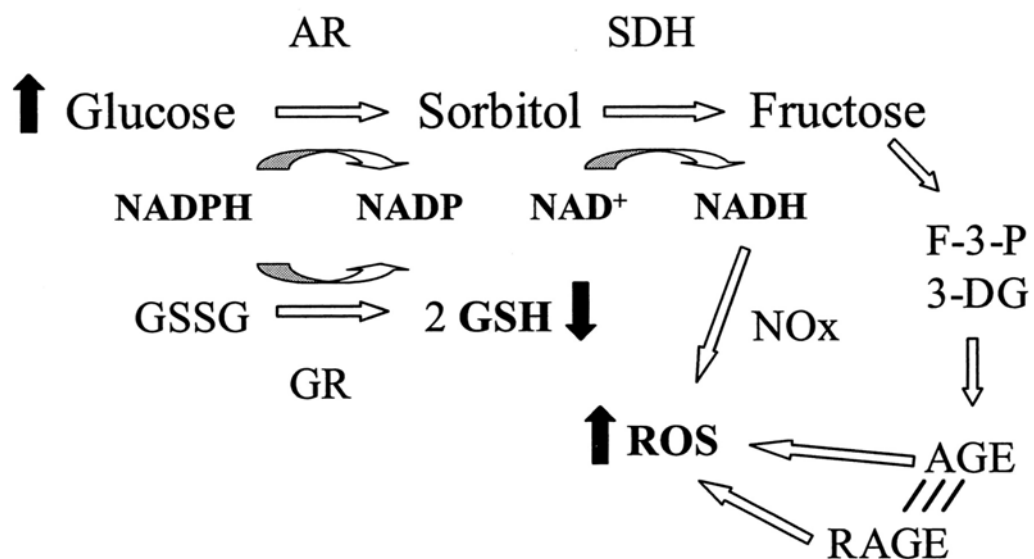
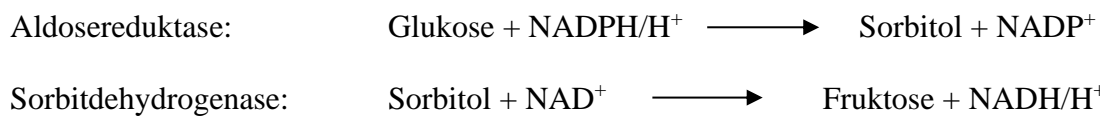


Abbildung 11: Entstehung von oxidativem Stress via Polyolweg

Die Aldosereduktase (AR) konkurriert mit der Glutathionreduktase (GR) um den Kofaktor NADPH/H⁺. Das durch die Sorbitdehydrogenase (SDH) produzierte NADH/H⁺ fördert die ROS-Produktion durch die mitochondriale NADH Dehydrogenase (früher irrtümlich als NOX interpretiert). Metaboliten der Fruktose, Fruktose-3-Phosphat und 3-Desoxyfructose, erhöhen die Produktion von AGE, die über AGE-Rezeptor (RAGE) oxidativen Stress bewirken. Abbildung aus (196).

Andererseits benötigt die NO-Synthase den Kofaktor NADPH zur Produktion von *NO. Zusätzlich kann die Glutathionylierung die NOS entkoppeln, wodurch sie weniger *NO und stattdessen Superoxid produziert (197, 198). In einem weiteren Schritt oxidiert die Sorbitdehydrogenase das Sorbitol zu Fruktose, wobei NADH anfällt. Dieses NADH kann wiederum von der NADH-Dehydrogenase in Mitochondrien genutzt werden, um Superoxid zu produzieren (199). Außerdem sind die im Polyolweg entstehende Fruktose und seine Metaboliten wie Fruktose-3-Phosphat und 3-Desoxyglucoson Vorläufer von AGEs und können so ebenfalls für vermehrten oxidativen Stress sorgen. Diese Prozesse sind in Abbildung 11 zusammengefasst.



3.3.5 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose

Wie oben erläutert führt die chronische Einwirkung von kardiovaskulären Risikofaktoren, wie auch der Diabetes, und die damit verbundene Zirkulation schädigender Mediatoren zum Verlust des Endothels von seinen physiologischen protektiven Eigenschaften und zu der Entwicklung proatherogenen Potenzials mit einer Dysbalance zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation: der „endothelialen Dysfunktion“. Die ED gilt als Vorstufe der Atherosklerose (98). Zahlreiche Untersuchungen konnten eine endotheliale Dysfunktion sowohl in atherosklerotischen Gefäßen als auch in nicht atherosklerotischen Gefäßen von Patienten mit diagnostizierter Arteriosklerose feststellen (200-202). Durch den erhöhten oxidativen Stress wird vermehrt LDL-Cholesterin oxidiert, das von Makrophagen aufgenommen wird. Diese bilden die sogenannten Schaumzellen in den „fatty streaks“ früher atherosklerotischer Läsionen (2). Außerdem steigt bei der ED steigt das Ausmaß der Adhäsion von Thrombozyten, aber auch von Leukozyten am Endothel sowie seine Permeabilität und Ausschüttung von Cytokinen und Wachstumsfaktoren. Beim Vorliegen dieser Prozesse und der induzierenden Risikofaktoren resultiert eine lokale Entzündung, die zusammen mit der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen zu der Entstehung intermediärer atherosklerotischer Läsionen führt (203-205).

3.4 Pioglitazon

Zu den oralen Antidiabetika zählt auch die Gruppe der Glitazone. Diese Thiazolidienidone binden mit großer Spezifität im Zellkern befindlichen Peroxisome Proliferator-activated Receptor, Typ γ (PPAR- γ) worüber sie ihre Wirkung im Insulinstoffwechsel vermitteln (206). Durch die

agonistische Wirkung am PPAR- γ -Rezeptor wird die Transkription verschiedener Gene induziert. Über eine resultierende vermehrte Expression von aP2 (adipocyte lipid-binding protein) und dem Glucose-Transporter GLUT-4, der maßgeblich für den erleichterten Transport von Glucose in Adipozyten und Skelettmuskel verantwortlich ist, sowie eine verminderte Expression von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Leptin wird seine positive Wirkung auf die Insulinresistenz erzielt. TNF- α bewirkt eine Hemmung der GLUT-4 Synthese sowie der Signalkaskade, die physiologischerweise durch Bindung von Insulin an den Rezeptor in Gang gesetzt wird (207, 208). Die Verminderung der Insulinresistenz konnte in verschiedenen adipösen und diabetischen Modellen gezeigt werden (209-213). Im Jahr 2000 wurde Pioglitazon erstmals unter dem Handelsamen *Actos* zugelassen. In 2010 beschloss der Gemeinsame Bundesausschuss (GBA) nach Warnhinweisen der FDA (Food and Drug Administration, USA) und der EMA (European Medicines Agency) in den entsprechenden Fachinformationen wegen eines ungünstigen Risiko-Nutzen-Verhältnisses ab April 2011 die Verordnung über die GKV (Gesetzliche Krankenversicherung), abgesehen von begründeten Einzelfällen, auszuschließen. Er richtete sich dabei nach dem Abschlussbericht von 2008 des Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG), das er zuvor mit einer Bewertung beauftragt hatte. Der Abschlussbericht bezieht sich unter anderem auf die PROactive-Studie (214), die einen Zusatznutzen der Therapieoptimierung mit Pioglitazon bei Kontraindikationen gegen Metformin bezüglich der kombinierten sekundären Endpunkte Gesamtmortalität und nicht-tödlicher Herzinfarkte und Schlaganfälle zeigte. Dagegen bewies sie aber keinen Zusatznutzen bezüglich patientenrelevanter Endpunkte wie makro- und mikrovaskulärer Folgekomplikationen und Mortalität. Bezogen auf das Auftreten von Hypoglykämien und Ausmaß der Blutzuckersenkung fanden sich in der PROactive-Studie und in der PERISCOPE-Studie (215) unterschiedliche Ergebnisse. Weiter zeigten sich unter zusätzlicher Behandlung mit Pioglitazon beziehungsweise im Vergleich zu anderen oralen Antidiabetika Hinweise auf schädliche Wirkungen wie unter anderem eine erhöhte Gesamtrate von Ödemen, stärkere Zunahme von Körpergewicht/BMI, vermehrtes Auftreten von kardialen (schwerwiegenden) Ereignissen, erhöhte Frakturnraten bei Frauen und häufigere Herzinfarkte durch Pioglitazon. Der Bericht kam zu dem begründenden Schluss, dass der Langzeitnutzen und -schaden der Glitazone nicht ausreichend untersucht sei (216). Die Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) kritisiert in einer *Stellungnahme zum Verordnungsaußchluss von Pioglitazon zu Lasten der GKV* die Entscheidung des GBA und argumentiert, dass es sehr wohl Patienten gebe, die von einer Therapie mit Glitazonen profitiere und für die es aufgrund von Kontraindikationen keine gleichwertige Alternative einer medikamentösen Therapie gebe. Sie postuliert eine Verschlechterung der Versorgung diabetischer Patienten in Sondersituationen, wie zum Beispiel von Patienten in Berufen, in denen ein

durch die Anwendung von Sulfonylharnstoffen bedingtes Hypoglykämierisiko nicht akzeptabel ist. Die Anzahl solcher Patienten Sondersituationen sei aufgrund der hohen Prävalenz nicht zu vernachlässigen. Auch in aktuellen Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass Pioglitazon für Patienten mit Diabetes im Bezug auf die Mortalität sowohl durch kardiovaskuläre Ereignisse als auch durch andere Ursachen einen Vorteil bringt im Vergleich zu Diabetikern, die mit anderen oralen Antidiabetika oder Insulin therapiert wurden (217). Bezüglich des Ausmaßes einer Erhöhung des Risikos für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms in Abhängigkeit von Dosis und Behandlungsdauer durch Pioglitazon ist die Studienlage ebenfalls nicht eindeutig (218-221). Diesbezüglich schloss die EMA im Jahr 2011 einen Review über die Sicherheit von Pioglitazon-enthaltenden Präparaten ab. Sie kam zu dem Schluss, dass Pioglitazon eine valide Therapieoption für bestimmte Patienten mit Diabetes Typ 2 bleibt, für den Fall, dass medikamentöse Alternativen wie Metformin nicht indiziert sind oder keinen ausreichenden Erfolg erzielt haben und unter sorgfältiger Abwägung von Kontraindikationen wie aktueller Anamnese eines Harnblasenkarzinoms oder ungeklärter Makrohämaturie (222, 223). Bislang ist Pioglitazon dennoch von der Verordnung durch die GKV ausgeschlossen, eventuell weil es mittlerweile mit den DPP-4 Inhibitoren (Gliptine), GLP-1 Analoga und SGLT2 Inhibitoren ausreichende moderne Alternativen mit sehr gutem Nebenwirkungsprofil, geringer Tendenz zu Hypoglykämien und sehr guter kardiovaskulärer Verträglichkeit gibt (224).

3.5 Organische Nitrate und andere Nitrovasodilatoren: Substanzen, Indikation, Bioaktivierung und Wirkmechanismus

Die Nitrovasodilatoren fassen verschiedene pharmakologisch wirksame Substanzen zusammen, die im Körper $\cdot\text{NO}$ freisetzen und so unabhängig von der endothelialen NO-Produktion eine Vasodilatation bewirken können. Außerdem vermitteln sie wie endogenes $\cdot\text{NO}$ antiaggregatorischen, antithrombotischen und antiatherosklerotischen Schutz. Zu diesen NO-Donatoren gehören zum Beispiel die bewährten organischen Nitrate Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbid-5'-mononitrat (ISMN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Pentaerithryltetranitrat (PETN), bei denen $\cdot\text{NO}$ nach enzymatischer Bioaktivierung freigesetzt wird, aber auch der neuere Wirkstoff Molsidomin, der $\cdot\text{NO}$ nicht-enzymatisch freisetzt. Aminoethylnitrat (AEN) ist ein wiederentdecktes, sehr potentes organisches Nitrat (225). Eine Übersicht über die chemischen Strukturen bietet Abbildung 12. Organische Nitrate sind etabliert in der Therapie der Angina pectoris bei KHK (siehe 3.1.4), aber auch der chronischen Herzinsuffizienz und zur kurzfristigen Senkung des Blutdrucks bei hypertensiver Entgleisung. Über eine venöse Vasodilatation wird die kardi-ale Vorlast gesenkt. So werden das Herzzeitvolumen und der Sauerstoffverbrauch des Herzens

herabgesetzt. Außerdem findet eine Erweiterung der Koronararterien statt, die im Bereich von Stenosen zur Verbesserung der Durchblutung abhängiger Myokardanteile führt (73, S. 430).

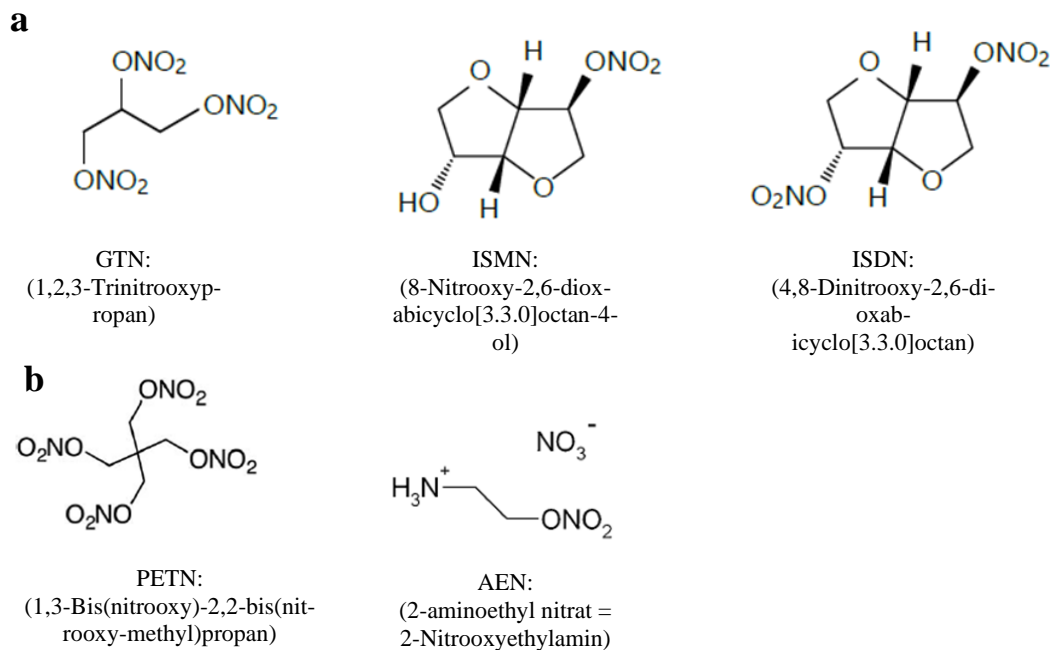


Abbildung 12: Struktur unterschiedlicher organischer Nitrate

Abbildung **a**) aus (226) und **b**) aus (227, 228).

Das freigesetzte $\cdot\text{NO}$ beziehungsweise der noch nicht identifizierte Mediator NO_x ruft über die vermehrte Induktion von cGMP-Bildung durch die Guanylatzyklase eine Vasodilatation hervor (siehe 3.3.2). Die organischen Nitrate GTN und ISDN werden zur Therapie des AP-Anfalles meist sublingual oder auch buccal verabreicht, lediglich bei instabiler Angina wird GTN unter Blutdruckkontrolle intravenös eingesetzt. Zur Anfallsprophylaxe können ISMN und ISDN als Retard-Präparate eingenommen werden. GTN und ISDN zeigen bei enteraler Applikation einen starken first-pass-Effekt, wohingegen ISMN besser bioverfügbar ist und eine längere Halbwertszeit besitzt (19). ISMN und ISDN werden durch Cytochrom P450 metabolisiert, wodurch $\cdot\text{NO}$ frei wird. Die hochpotenten Substanzen GTN und PETN werden in pharmakologischen ex vivo oder tierexperimentellen Dosierungen $>1 \mu\text{M}$ ebenfalls durch Cytochrom P450 verstoffwechselt. In therapeutischen, niedrigen Dosen ($<1 \mu\text{M}$) werden sie durch die Reduktase-Aktivität der Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) bioaktiviert. Dabei entstehen wahrscheinlich Nitrit und die jeweiligen denitrierten Metabolite 1,2-Glyceroldinitrat bzw. PETriN (229). *Chen, Zhang et al.* (230) haben 2002 die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) als entscheidendes Enzym bei der Bioaktivierung des hochpotenten Nitrats GTN identifiziert. Es existieren verschiedene Theorien bezüglich der Bioaktivierung organischer Nitrate durch die

Interaktion mit der ALDH-2, die auch in Abbildung 13 zusammengefasst sind: 1. Die direkte Bildung von $\cdot\text{NO}$, 2. Reduktion des durch die ALDH-2 entstandenen Nitrits zu einem Mediator NO_x durch die mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase oder Disproportionierung durch H^+ im sauren mitochondrialen intermembranären Raum und 3. Reduktion des in den Mitochondrien entstandenen Nitrits durch die zytoplasmatische Xanthinoxidoreduktase, wodurch ebenfalls $\cdot\text{NO}$ entsteht (231, 232). Neuere Ergebnisse legen nahe, dass die Bioaktivierung der hochpotenten Nitrate nur bei höheren Konzentrationen durch die mitochondriale ALDH-2 glatter Muskelzellen stattfindet und sonst überwiegend durch die zytosolische Form geschieht (233, 234) und auch epigenetische Mechanismen sowie direkte Wirkungen auf andere Ionenkanäle die protektiven Wirkungen der cGMP Bildung unter Nitrattherapie vermitteln (Abbildung 14) (234).

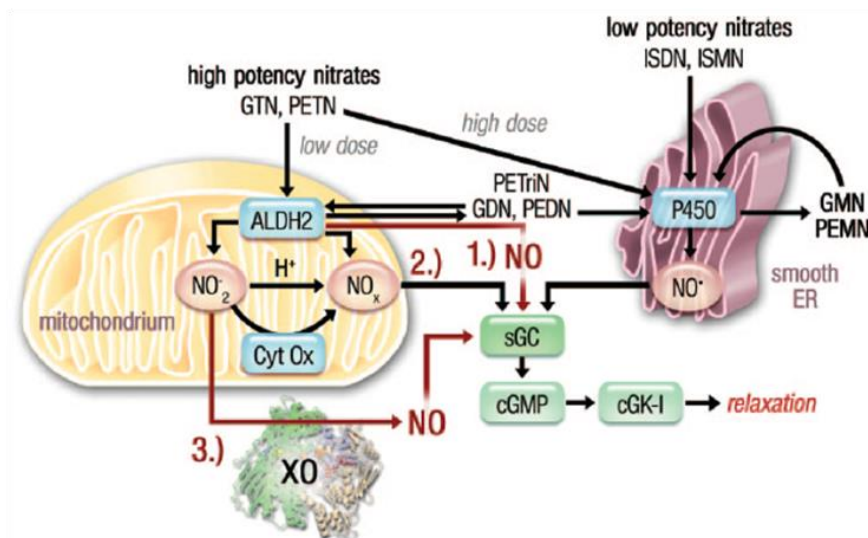


Abbildung 13: Mechanismen der Bioaktivierung von organischen Nitraten

Links: GTN und PETN werden niedrig dosiert von der ALDH-2 bioaktiviert, wobei entweder (1.) direkt NO entsteht, (2.) entstandenes Nitrit von der Cytochrom-c-Oxidase oder Disproportionierung zu NO_x wird oder (3.) durch die Reduktion von Nitrit durch die zytoplasmatische Xanthinoxidase $\cdot\text{NO}$ entsteht. Rechts: GTN und PETN in hoher Dosierung und die organischen Nitrate ISMN und ISDN, sowie die von der ALDH-2 denitrierten Metabolite PETriN, PEDN und GDN und ihre Mononitrate werden von Cytochrom P450 am glatten ER bioaktiviert. $\cdot\text{NO}/\text{NO}_x$ bewirken über die Guanylatzyklase (sGC) die Entstehung von cGMP, wodurch die cGMP-abhängige Kinase (cGK-I) aktiviert wird, die über weitere Schritte Relaxation der glatten Muskulatur bewirkt. Abbildung aus (231).

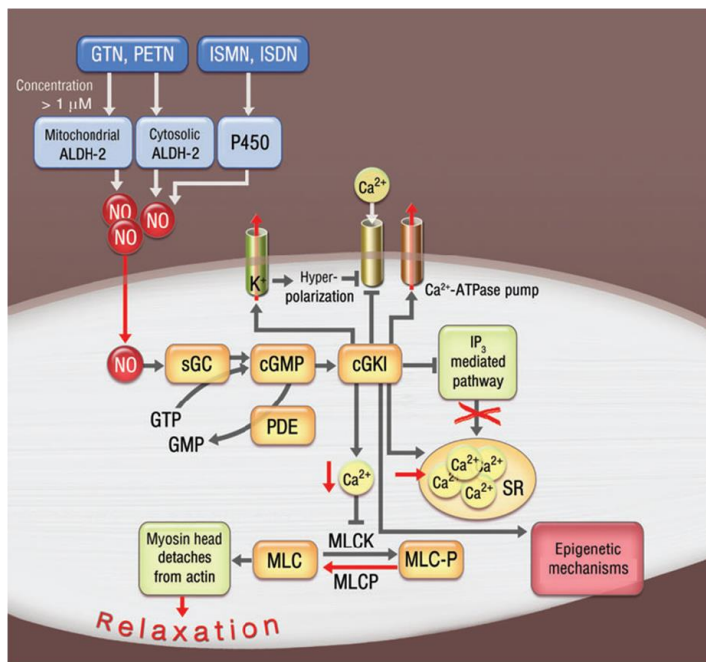


Abbildung 14: Mechanismus der vasodilatierenden Wirkung von organischen Nitraten

In die Signaltransduktion der Vasodilatation involviert ist die lösliche Guanylatzyklase (sGC) und nachfolgend die cGMP-abhängige Kinase (cGKI). Durch die Aktivierung dieser wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration gesenkt, indem einerseits durch Kaliumausstrom der Einstrom von Ca^{2+} durch Kalziumkanäle gehemmt wird, andererseits die Ca^{2+} -ATPase aktiviert wird und der Kalziumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) via Inositoltrisphosphat (IP_3) gehemmt wird. Außerdem spielen zusätzlich epigenetische Mechanismen eine Rolle. Laut neuen Untersuchungen findet die Bioaktivierung der hochpotenten Nitrate GTN und PETN, im Gegensatz zu den bisherigen Annahmen, nur bei pharmakologischen Konzentrationen von $>1\mu\text{M}$ durch die mitochondriale ALDH-2 statt und zum überwiegenden Teil durch die zytosolische Variante. Abbildung aus (234).

3.6 Nitrattoleranz

Bei chronischer Anwendung von Nitraten tritt ein Verlust ihrer hämodynamischen und klinischen Effekte auf (231). So konnte schon bald nach der Einführung der Nitrate gezeigt werden, dass unter chronischer Infusion von GTN bei AP und Herzinsuffizienz eine Verminderung der hämodynamischen Effekte auftritt (11). Dieses Phänomen bezeichnet man als Nitrattoleranz. Dabei lässt sich die sogenannte Pseudotoleranz von der echten Nitrattoleranz unterscheiden (Abbildung 15). Die Pseudotoleranz bezeichnet die neurohumorale Gegenregulation, die physiologischerweise bei Absenkung des Blutdrucks, zum Beispiel durch organische Nitrate, auftritt. Zu den Mechanismen gehören unter anderem eine Erhöhung der Blutplasmaspiegel von Katecholaminen, Renin, Aldosteron und ADH (235, 236). Sie tritt bereits nach 24 Stunden kontinuierlicher GTN-Infusion in niedriger Dosierung auf. Diese Reaktion ist nicht spezifisch für organische Nitrate, sondern tritt auch unter anderen blutdrucksenkenden Einflüssen auf (232). Die echte Nitrattoleranz stellt eine Störung des Endothels und der glattmuskulären Zellen

hervorgerufen durch Nitrate dar (234). Sie ist nach zwei- bis dreitägiger Behandlung mit GTN zu beobachten. Die molekularen Mechanismen dieser Erscheinung sind immer noch nicht ganz verstanden. Es wird angenommen, dass sowohl die Entstehung von oxidativem Stress, der die durch NO induzierte Signalkaskade stört, als auch eine eingeschränkte Bioaktivierung der Nitrate eine Rolle spielen (nur relevant für GTN und PETN). Die Theorie, dass Nitrate wie (GTN, ISMN, aber auch ISDN und PETN in geringerem Maße) oxidativen Stress verursachen, lässt es zu, die verschiedenen postulierten Mechanismen der Nitrattoleranz zu vereinen (237). Die verschiedenen Wege der Entstehung sind in Abbildung 15 dargestellt: 1. Vermehrte Bildung von Superoxid im Endothel durch die NADPH-Oxidasen, PKC-abhängig induziert durch erhöhtes ATII oder mitochondriale ROS. Dies führt 2. zur direkten Hemmung der NO-Synthase durch die PKC, 3. einer Enkopplung der NO-Synthase durch verminderte Bioverfügbarkeit des Cofaktors BH_4 . Dies geschieht durch direkte Oxidation dessen durch Peroxynitrit, das aus Superoxid mit dem überschüssigen NO von den Nitraten entsteht. 4. Andererseits hemmt GTN direkt die Expression der GTP-Cyclohydrolase 1 (GTP-CH-I) und damit die Neusynthese des Cofaktors BH_4 . 5. wird die Bildung von Prostazyklin (PGI_2) vermindert, indem durch Peroxynitrit die Prostazyklin-Synthase ($\text{PGI}_2\text{-S}$) nitriert und gehemmt wird. Diese Mechanismen bewirken eine endotheliale Dysfunktion. Zusätzlich wird die glattmuskuläre Funktion gestört: 6. Die vermehrte Superoxidbildung im Endothel führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Endothelin-1 (ET-1), das die Aktivierung der ebenfalls PKC-abhängigen glattmuskulären NADPH-Oxidasen fördert. Das entstandene Superoxid inaktiviert das durch die Bioaktivierung von GTN entstandene NO unter Bildung von Peroxynitrit. 7. Zusätzlich wird die Bioaktivierung von Nitraten wie GTN oder PETN, bedingt durch die Hemmung der ALDH-2 durch Superoxid/Peroxynitrit, gestört. 8. GTN bewirkt über den oxidativen Stress zudem eine Hemmung der löslichen Guanylatzyklase sowie 9. eine vermehrte Inaktivierung von cGMP durch Phosphodiesterasen (PDE). Diese beiden letzten Mechanismen erklären das Phänomen der sogenannten Kreuztoleranz, bei dem neben GTN gleichzeitig eine Toleranz gegenüber anderen Nitrovasodilatoren sowie Endothel-abhängigen Vasodilatoren wie ACh besteht (22, 231).

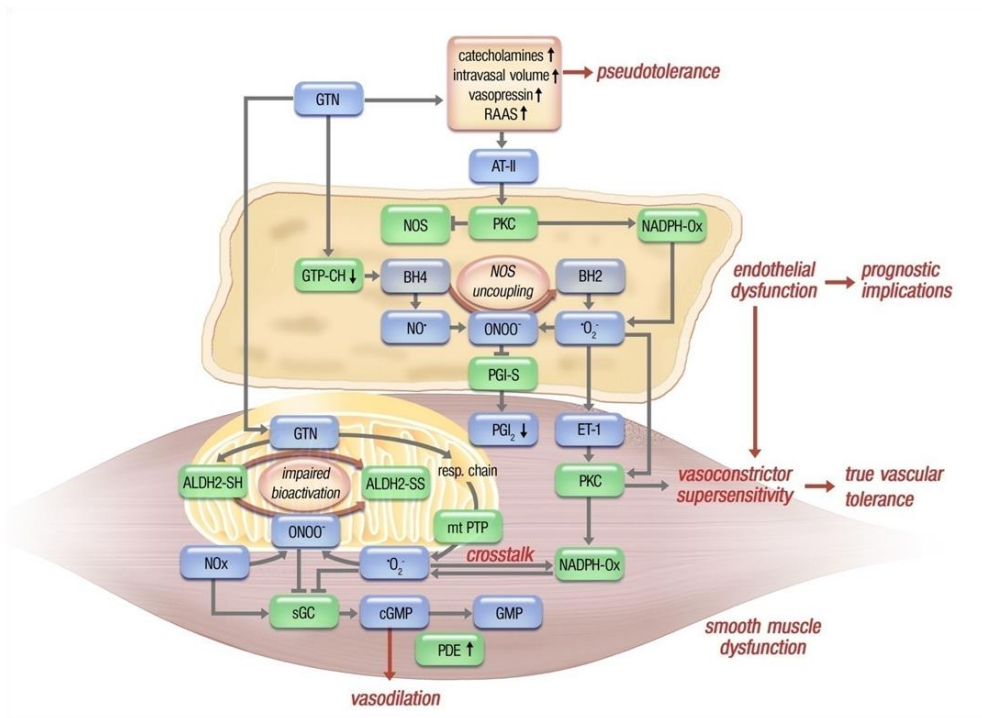


Abbildung 15: Mechanismen der Nitrattoleranz, Kreuztoleranz und Pseudotoleranz

Die bereits nach 24-stündiger GTN-Infusion auftretende Pseudotoleranz führt zu einer Aktivierung des RAAS. Bei der „echten“ Nitrattoleranz kommt es ATII-vermittelt zu einer Entkopplung der eNOS und Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion. Außerdem entsteht in den glattmuskulären Zellen eine allgemeine vaskuläre Dysfunktion mit erhöhtem oxidativem Stress, wobei ein crosstalk zwischen unterschiedlichen ROS-Quellen stattfindet, es kommt zur Hemmung der ALDH-2 durch Oxidation, einer Hemmung der sGC und vermehrtem Abbau von cGMP durch PDE. Durch eine Hemmung der PGI₂-Synthese und die vermehrte Sensibilität und Ausschüttung von vasokonstriktorischen Mediatoren, wird weiter vermehrt Vasokonstriktion gefördert. Die endotheliale Dysfunktion selbst hat prognostisch negative Auswirkungen. Abbildung aus (231).

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Allgemeiner Laborgebrauch und Geräte

Aggregometer Apact 4S	DiasSys Greiner GmbH, Flacht
Axiocam MRm	Zeiss, Göttingen
Blotting-Anlage	BioRAD Laboratories GmbH, München
Bridge Bioamplifier ETH 255	C.B.Sciences Inc., Dover, NH, USA
ChemiLux Imager CsX-1400 M	Intas, Göttingen
Draht (für Aortensegmente, Organbad)	Goodfellow GmbH, Hamburg
Durchlichtmikroskop MZ 5400	Krüss, Hamburg
Elektrischer Rasierer (QC5050)	Philips, GmbH market DACH, Hamburg
Federschere "Noyes Spring Scissors" (14mm Blades)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Federschere Vannas-Stil	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinwaage ARJ 120-4M	Kern GmbH, Balingen
Feinwaage KB800-2	Kern GmbH, Balingen
Feinwaage LE225D	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, Göttingen
Fluoroskan Ascent® reader	Thermo LabSystems, Helsinki, Finland
Gel-Pro Analyzer™ Version 6.0	Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA
Heizplatte HL1220 Nussloch	Leica Microsystems Nussloch GmbH,
Heizrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Hitachi Sorvall Discovery	
Ultrazentrifuge	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold

Homogenisator RW16 Basic	IKA Werk Laboratory Equipment, Staufen
HPLC-Anlage	Jasco, Gross-Umstadt
HPLC-Säule C18-Nucleosil	Macherey & Nagel, Düren
HPLC-Trennsäule 100-3	Macherey & Nagel, Düren
Isometrischer Transducer	Letica Scientific Instruments, Harvard Apparatus, MA, USA
Isometrische Transducer FT03	Grass instruments, USA
Isometrische Transducer TRN001	Kent, Torrington, CO, USA
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott AG, Mainz
Kamera: Axiocam MRm	Zeiss, Göttingen
Keramik Mörsergefäß	Haldenwanger GmbH, Waldkraiburg
Klammer Applikator Graefe Forceps (0.8mm-1mm Tip)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Kryostat Leica CM 3050 S	Leica Biosystems, Wetzlar
Laborrührwerk RW 16 basic	KA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Lumat LB 9507	Bertold Technologies, Bad Wildbad
Microplate reader MRX 2	Dynex, USA
Mikro 22R, Typ 1110 Zentrifuge	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Mikropräparierschere + Pinzette	Fine Science Tools, Heidelberg
Mini Protean III	BioRAD Laboratories, München
Mini Spin Plus 5435	Eppendorf AG, Hamburg
Mini Trans-Blot®	BioRAD Laboratories, München
MiniShaker M52	Laboratory Equipment
Nitrozellulosemembran Protran BA85	Schleicher & Schuell, Dassel
Octal Bridge Amp ML228	ADInstruments, Sydney, Australien
Organbad	Kent, Torrington, CO, USA
Organbad	Radnoti, Monrovia, CA, USA

Osmotische Minipumpen	Alzet, CA, USA
pH-Meter Microprozessor PH211	Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein
Photometer Helios alpha	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Photometrisches Aggregometer	Apact 4S, DiasSys Greiner GmbH, Flacht
Pinzette Graefe Forceps (0.8 mm-1 mm Tip)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pipette Eppendorf Research 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 10 - 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 100 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten: Pipetman	Gilson, WI, USA
Power Pac Basic	BioRAD Laboratories, München
Powerlab 8/30 ML870	ADInstruments, Sydney, Australien
Powerlab 8sp	ADInstruments, Sydney, Australien
Quecksilberdampf Kurzbogenlampe, HBO 50 für Fluoreszenzmikroskopie	Osram, München
Rotofix 32 Typ 1205	Hettich, Tuttlingen
RührerMR 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Schütteltisch GFL 3005	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Test Tube ThermostatTCR 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Thermomixer comfort MTP 5355	Eppendorf AG, Hamburg

Thermostat 2761	Eppendorf AG, Hamburg
ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg
Transferpette S 200 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus HD/GM 2070	Bandelin electronic GmbH, Berlin
Ultraschallnadel UW 2070	Bandelin electronic GmbH, Berlin
Vortex Genie 2 G560E	Scientific Industries, NY, USA
Zellcounter KX-21N	Sysmex Corporation, Japan
4.1.2 Verbrauchsmaterial	
Einmal-Küvetten halbmikro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Einwegskalpell No. 10	Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
Eppendorf- Tubes 0,2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf- Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf- Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf- Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf-Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon 15 ml	Schubert&Weiss Omnilab GmbH&Co, München
Falcon 50 ml	Schubert&Weiss Omnilab GmbH&Co, München
Filter Microcon 10 kDa	Millipore, Billierica, MA, USA
Glaskapillare (zur BE)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Ger- many
Microcon YM-10 Filter	Millipore, Bedford, MA, USA.
Mini-Trans-Blot Filterpapier	BioRAD Laboratories GmbH, München

Multipipetten 10 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Multipipetten 25 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Multipipetten 5 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Objektträger SuperFrost®Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipettenspitzen blau-1000	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen gelb-1000	Ratiolab GmbH, Dreieich
Röhren 5ml, 75x12 mm, PS	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
S-Monovette Citrat	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Spritze 10 ml	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Spritze 2 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze 5 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterican® Einmal-Injektionskanüle	
Gr. 18, 0,45 x 25 mm (für Maus)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Wundklammer Michel (7,5x1,75mm)	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

(R)-(-)-Phenylephrinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd (2H3NBA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure (2H3NBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg
ABC-Reagenz	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Acrylamid/Bis Lösung 40 % (29:1)	BioRAD Laboratories GmbH, München
Agarose Elektrophorese Grad	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg

Adenosin-5'-diphosphat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aminoethylnitrat (AEN)	Cardiolynx AG, Basel
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Hamburg
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Hamburg
BenchMark™ Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bio-Rad DC Protein Assay Reagent A	BioRAD Laboratories GmbH, München
Bio-Rad DC Protein Assay Reagent B	BioRAD Laboratories GmbH, München
Bio-Rad DC Protein Assay Reagent S	BioRADLaboratories GmbH, München
Bradford-Reagenz	BioRAD Laboratories GmbH, München
Braunol® (Providon-Iod)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Fluka & Riedel, Seelze
CLC-1275	Siegfried Ltd., Zofingen, Schweiz
CLC-3000	Solvias, Basel, Schweiz
Coomassie-Brilliant Blau G-250	Sigma-Aldrich, Hamburg
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, Hamburg
Daidzin	Hoelzel Diagnostika Handels GmbH, Köln
D-Glukose (-D(+)-Glucose-Monohydrat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dihydroethidium (DHE)	Fluka & Riedel, Seelze
Dinatriumhydrogencarbonat (Na ₂ HCO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka & Riedel, Seelze
Dithiothreitol (DTT)	Affymetrix, High Wycombe, UK
D-Mannitol	Fluka & Riedel, Seelze
ECL (<u>E</u> nhanced <u>C</u> hemi <u>L</u> umineszens) Reagenz	Perbio Science, Erembodegem, Belgien

EDTA-free COMPLETE	
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylenglykolbis(aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glyzerin (wasserfrei)	AppliChem GmbH, Darmstadt
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (magnesium- und kalziumfrei)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Heparin-Natrium 2500	Ratiopharm GmbH, Ulm
Hepes(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'- (2-ethansulfonsäure) heminatrimmsalz	Sigma-Aldrich, Hamburg
Indometacin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Isofluran Gas	Abbott, Wiesbaden
Isosorbid-5-mononitrat (ISMN)	LKT Laboratories St. Paul, Minn., USA
Isosorbiddinitrat (ISDN) (40 % (w/w) mit 60 % (w/w) lactose)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
L-012 Japan	Wako Pure Chemical Industries, Osaka,
Leupeptin-HCl	Sigma-Aldrich, Hamburg
Lucigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'biacridiumdinitrat)	Fluka & Riedel, Seelze
Luminol 98 %	Fluka & Riedel, Seelze
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Meerrettichperoxidase (HRP)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Microscopy Entellan®	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumchlorid Lösung (NaCl) 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdihydrogencarbonat (NaH ₂ CO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natrium-Hepes (Na-Hepes)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nitroglycerin (GTN) (Ethanollösung, 450 mmol/l)	Novasep, Darmstadt
Nitroglycerin (GTN) (Nitrolingual, wässrige Infusionslösung, 4.5 mmol/l)	G.Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphate buffered saline (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pioglitazon	Sigma-Aldrich, Hamburg
Pipes	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Hamburg
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	BioRAD Laboratories GmbH, München
Prostaglandin E1	Sigma-Aldrich, Hamburg
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Hamburg
Roti®-Quant für lösliche Proteine (Bradford)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Saccharose (Sucrose)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Succinat	Fluka & Riedel, Seelze
Süßstoff (Natreem Classic)	Jacobs Douwe Egberts DE GmbH, Bremen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tissue-Tec©OCT-Compound	Sakura Finetek , USA

Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris(Tris(hydroxymethyl)aminomethan)-base	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris(Tris(hydroxymethyl)aminomethan)-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka & Riedel, Seelze
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Z-Gly-Gly-Arg-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz

4.1.4 Lösungen und Puffer

3fach Lämmli's-Puffer:

1880 µl Tris-HCl (1 M, pH 6,8)
 3000 µl SDS (20 %)
 3000 µl Glyzerin
 300 µl 1 % Bromphenolblau in a.d.
 150 µl 2-Mercaptoethanol
 320 µl H₂O

Hepes-Mito-Puffer (pH 7,4):

45 mM HEPES
 70 mM Saccharose
 220 mM Mannitol
 1 mM EGTA
 33 µM BSA
 ad 50 ml Aqua dest.

Homogenisierungslösung (Hg-Lösung) auf 10 ml Hg-Puffer:

100 µl Protease Inhibitor Cocktail
 100 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail
 50 µl PMSF (0,1 M; in Methanol)
 100 µl Triton X-100 (1 % v/v)

Homogenisierungspuffer (Hg-Puffer) bei pH 7,4:

250 mM Saccharose
20 mM Tris-HCl
20 mM EDTA
3 mM EGTA

Krebs-Hepes-Puffer (KH-Puffer) bei pH 7,4:

99,01 mM Natriumchlorid
4,69 mM Kaliumchlorid
2,5 mM Kalziumchlorid
1,2 mM Magnesiumsulfat
1,03 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat
11,1 mM Glukose
20 mM Na⁺-HEPES
25 mM Natriumhydrogencarbonat

Laufpuffer Elektrophorese (pH nicht justiert):

25 mM Tris-base
192 mM Glycin
3,5 mM SDS

Organbadpuffer bei pH 7,4:

99,01 mM Natriumchlorid
4,69 mM Kaliumchlorid
2,5 mM Kalziumchlorid
1,2 mM Magnesiumsulfat
1,03 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat
11,1 mM Glukose
25 mM Natriumhydrogencarbonat
10µM Indometacin
ad 3000 ml Aqua dest.

Pipes-Puffer bei pH 7,0:

25 mM Pipes

137 mM NaCl

4 mM KCl

0,1% w/v Glukose

Protease-Inhibitoren-Puffer (auf 10 ml Krebs-Hepes-Puffer):

100 µl Aprotinin (1,2 mg/ml)

40 µl Pepstatin (2,5 mg/ml)

10 µl Leupeptin (5 mg/ml)

SDS-PAGE Sammelgel (Gesamtkonzentration an Acrylamiden T= 4%):

1,2 ml 0,5 M Tris, pH 6,6

0,5 ml 40% Acrylamid/Bis Lösung 29:1

50 µl 10% SDS

50 µl 10% APS

5 µl TEMED

ad 5 ml Aqua dest.

SDS-PAGE Trenngel (Gesamtkonzentration an Acrylamiden T= 10%):

2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8

2,5 ml 40% Acrylamid/Bis Lösung 29:1

100 µl 10% SDS

100 µl 10% APS

10 µl TEMED

ad 10 ml Aqua dest.

Transferpuffer (pH 8,3 (nicht nachjustiert)):

192 mM Glycin

25 mM Tris-base

250 ml Methanol

ad 1000 ml H₂O bidest.

Tris-dTT:

10 ml Membranfraktion Tris-Puffer (Tris-Mem) pH 7,4
1 mM DTT

Tris-Mem-Puffer (pH 7,4):

50 mM Tris-hydrochlorid 1 Tbl. EDTAfree complete
ad 50 ml Aqua dest.

Tris-Mito-Puffer (pH 7,5):

340 mM Saccharose
100 mM KCl
20 mM Tris-hydrochlorid
1 mM EDTA
ad 50 ml Aqua dest.

Waschpuffer (TBS-T):

2,42 g Tris Base
8 g NaCl
1 ml Tween-20
ad 1000 ml Aqua dest.

Zitrat-puffer (pH 4,5):

0,1 M Zitronensäure
0,1 M tri-Natriumzitrat

4.1.5 Antikörper (siehe auch Tabelle 1)

Primäre Antikörper

β-Actin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
eNOS	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Nox2 (gp91 ^{phox})	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

HO-1	Enzo Life Science, Farmingdale, USA
DHFR	RDI Divison of Fitzgerald Industries, Concord, USA

Sekundäre Antikörper

Peroxidase gekoppelter anti-Kanninchen IgG	Vector Lab., Burlingame, USA
Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG	Vector Lab., Burlingame, USA

4.1.6 Programme

Synapse B.V. Software	Maastricht, Niederlande
Revelation 4.25	ilf bioserve, Langenau
Lab Chart 5	ADInstruments, Sydney, Australien
Thrombinoscope™BV Software	Maastricht, Niederlande
Adobe Photoshop CS2, Version 9.0	Adobe Systems, CA, USA
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Systems, CA, USA
Axiovision 4.3	Carl Zeiss Microimaging, Aalen
CellB Grafiksoftware	Olympus, Tokio, Japan
ChromPass 1.8.6.1	Jasco, Groß Umstadt
Endnote X8	Thomson Reuters, NY, USA
Office 2007	Microsoft, USA
Excel	Microsoft, USA
Gel-Pro Analyzer™ Version 6.0	Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA
Prism 5.02	GraphPad Software Inc, La Jolla, CA,
USA	
SigmaStat for Windows Version 3.5	Systat Software Inc., Erkrath

4.1.7 Versuchstiere

C57BL/6 Mäuse (männlich)

Tierstall, Universitätsmedizin Mainz

Wistar Ratten (männlich)

Charles River Laboratories, Sulzfeld

4.2 Methoden

4.2.1 Herstellung/Synthese von Hybridnitraten

Für die Synthese des Hybrid Moleküls CLC-3000 wurde zunächst der Linker CLC-1275 (Chloromethyl N-2-nitrooxyethylcarbammat) hergestellt, der anschließend mit Pioglitazon hybridisiert werden sollte. Gewonnen wurde die Linkersubstanz Chloromethyl N-2-nitrooxyethylcarbammat folgendermaßen: 20 g Ethanolamin (328 mmol) wurden bei -20°C tröpfchenweise in 60 g HNO_3 (100%) titriert, wobei die Temperatur der Lösung nicht über 5°C steigen darf. Diese Reaktionslösung wurde anschließend zu Ethylether (300 g) gegeben und bei 0°C für 1 Stunde gerührt. Anschließend wurde die Suspension gefiltert. Der Feststoff wurde mit Ethylether gewaschen und bei 30°C in Ethanol (120 g) gelöst. Beim darauffolgenden abkühlen auf 0°C fiel erneut ein Feststoff aus. Dieser wurde in Portionen von 60 g und bei 5°C zu 100 % HNO_3 gegeben, weiter abgekühlt auf -15°C und dann mit Ethanol versetzt. Anschließend wurde Ethylether (200 g) zugegeben und eine Stunde bei -10°C gerührt. Der durch Filtern gewonnene Feststoff wurde erneut mit Ethylether gereinigt und anschließend bei Heißluft getrocknet bis eine Masse von 21,9 g (41 %) Nitroxyethylammoniumnitrat in Form von weißen Kristallen geblieben ist. Anschließend wurden bei -15°C und innerhalb von 5 Minuten 4,25 g Chloromethyl Chloroformat (33,0 mmol) tröpfchenweise zu 5,0 g 2-Nitroxyethylammoniumnitrat (29,6 mmol) und 7.5 g Triethylamin (74,1 mmol) in 130 g CH_2Cl_2 gegeben und die Lösung bei -10°C für eine Stunde gerührt. Anschließend wurde Wasser (40 g) hinzugegeben. Die organische Phase wurde dann gewaschen mit 10 % Zitronensäure und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (NaHCO_3), anschließend über Natriumsulfat (Na_2SO_4) getrocknet und verdampft bis 4,6 g (78 %) eines gelblichen Öls zurückblieben. Die Kernspinresonanz Spektroskopie (NMR) zeigte folgende Parameter und bestätigte damit die erfolgreiche Synthese und Charakteristika des erwarteten Produkts: $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): 3.53-3.63 (m, 2 H); 4.57 (t, $J = 5.1$, 2 H); 5.74 (s, 2 H).

Für die Herstellung des Hybridmoleküls ((2-Nitroxyethyl) Carbaminsäure 5-(4-[2-ethylpyridin-2-yl)Ethoxy]benzyl)-2,4- Dioxothiazolidin-3-ylmethylester (Pioglitazonmononitrat, CLC-3000) wurde eine Lösung des Chloromethyl 2-(Nitrooxy)ethylcarbamate (Abbildung 16) in CH_2Cl_2 hergestellt (13,3 g, 67,3 mmol ad 20 ml CH_2Cl_2). Diese wurde tröpfchenweise bei Raumtemperatur (22°C) und unter Argonatmosphäre in eine Suspension von 5-(4-(2-(5-Ethylpyridin-2-yl)ethoxy)benzyl)-Thiazolidine-2,4-dione (Pioglitazon) (Abbildung 16) in CH_2Cl_2 und Triethylamin gegeben (12 g, 33,7 mmol Pioglitazon ad 160 ml CH_2Cl_2 und 9,38 ml, 67,3 mmol Triethylamin) und für 8 h gerührt und das Reaktionsprodukt wurde anschließend in CH_2Cl_2 und H_2O gelöst. Die Phasen wurden getrennt: Die organische Schicht wurde getrocknet, sodass wir Magnesiumsulfat (MgSO_4) erhalten. Die Flüssige Phase wurde verdampft. Das entstandene Rohprodukt wurde anschließend mithilfe der Säulenchromatographie (stationäre Phase: Silicium, mobile Phase: Ethylacetat/Heptan 40:60) aufgereinigt.

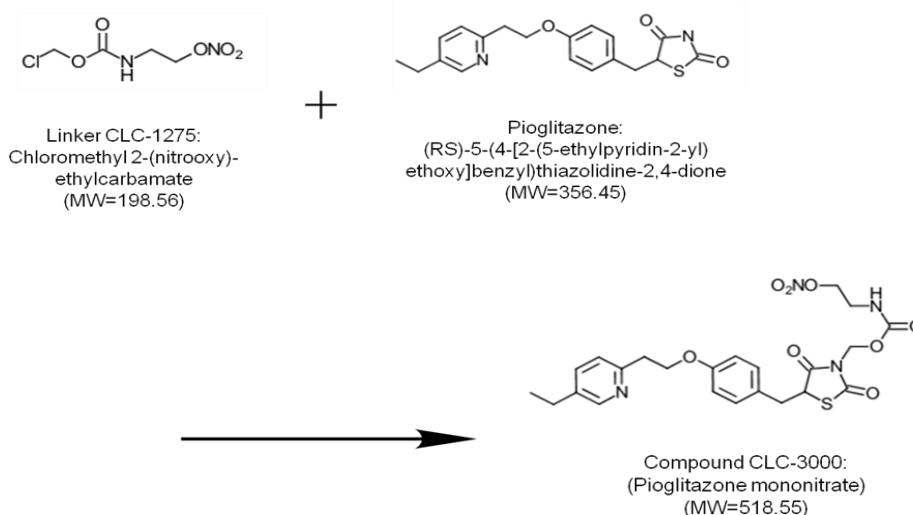


Abbildung 16: Synthese des Hybridnitrats

Durch Hybridisierung wird mit der Linkersubstanz CLC-1275 und Pioglitazon das Hybridnitrat CLC-3000 synthetisiert.

Das entstandene Produkt (Trennung mittels Dünnschichtchromatographie, Rf-Wert 0.3 (80:20 ethyl acetate:heptane)) war ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 5,3 g (30 %). Die Kernspinresonanz Spektroskopie (NMR) zeigte folgende Parameter und bestätigte damit die erfolgreiche Synthese und Charakteristika des erwarteten Produkts: ^1H NMR: δ 8.41 (s, 1H), 7.50 (d, J = 7, 1H), 7.21 (d, J = 7, 1H), 7.15 (d, J = 7, 2H), 6.82 (d, J = 7, 2H), 5.50 (q, J = 9, 2H), 5.40 (br s, 1H), 4.58 (t, J = 2, 2H), 4.45 (dd, J = 7, 2, 1H), 4.35 (t, J = 7, 2H), 3.55 (q, J = 3, 2H), 3.45 (dd, J = 12, 2, 1H), 3.25 (t, J = 7, 2H), 3.10 (dd, J = 12, 7, 1H), 2.68 (q, J = 7.5,

2H), 1.30 (t, J = 7.5, 3H). ¹³C NMR: δ 172.6, 170.0, 158.4, 155.5, 154.4, 148.8, 137.3, 136.1, 130.4, 127.3, 123.4, 114.9, 71.5, 67.3, 63.6, 51.8, 38.5, 37.6, 37.4, 25.7, 15.3. LCMS: 519 (M+H⁺), 443. Die Synthese der Substanz CLC-1275 wurde von Siegfried Ltd. (Zofingen, Switzerland) durchgeführt. CLC-3000 wurde von Solvias (Basel, Switzerland) hergestellt.

4.2.2 Auswahl der Versuchstiere und in vivo Behandlung

Für die Versuche der Blutungszeit und der plättchenabhängigen Thrombinproduktion wurden männliche C57BL/6 Mäuse aus dem Tierstall der Universitätsmedizin Mainz verwendet, die zu Beginn der Versuche 6-8 Wochen alt waren und deren Körpergewicht 25-30 Gramm betrug.

Für die in vivo Untersuchungen wurden die Mäuse zufällig einer von drei Gruppen zugeteilt:

- Kontrolle: Die Versuchstiere der Kontrollgruppe erhielten je nach Versuchsaufbau entweder Kochsalzlösung (NaCl, 200 µl) intraperitoneal injiziert oder normales Trinkwasser, das mit einer kleinen Menge Süßstoff versetzt war, verabreicht (für 24 h, 7 Tage oder 14 Tage).
- AEN: Den Versuchstieren wurde je nach Versuchsaufbau entweder Aminoethylnitrat (AEN, 100 µg in 100 µl NaCl) intraperitoneal injiziert oder, je nach Untergruppe, 24 h, 7 Tage oder 14 Tage gewichtsadjustiert mit AEN versetztes (9 mg/kg Körpergewicht/Tag) und mit Süßstoff gesüßtes Trinkwasser verabreicht.
- ISMN: Den Versuchstieren der dritten Gruppe wurde je nach Versuchsaufbau entweder Isosorbidmononitrat (ISMN, 100 µg in 100 µl NaCl) intraperitoneal injiziert oder, je nach Untergruppe, 24 h, 7 Tage oder 14 Tage gewichtsadjustiert mit ISMN versetztes (9 mg/kg Körpergewicht/Tag) und mit Süßstoff gesüßtes Trinkwasser verabreicht.

Für alle anderen Versuche wurden männliche Wistar Ratten verwendet. Zu Versuchsbeginn waren sie 6 Wochen alt. Ihr Körpergewicht betrug 250 Gramm.

Für die in vivo Experimente wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in vier Gruppen eingeteilt:

- DMSO solvent control: Die Kontrollgruppe erhielt eine reine Dimethylsulfoxid-(DMSO)Lösung infundiert (1 µl/h, 7 Tage). Die Tiere der Kontrollgruppe wurden über den gleichen Zeitraum und unter gleichen Bedingungen gehalten wie die Tiere der anderen Testgruppen.
- CLC-3000, low dose: Die Tiere dieser Gruppe wurden mit der Testsubstanz CLC-3000 gelöst in DMSO behandelt. Sie erhielten 7 Tage lang gewichtsadjustiert 3 mg/kg Körpergewicht/Tag.

- CLC-3000, middle dose: Die Versuchsgruppe erhielt die Substanz CLC-3000 gelöst in DMSO gewichtadjustiert in einer Dosis von 9 mg/kg Körpergewicht/Tag für 7 Tage.
- CLC-3000, high dose: Den Versuchstieren dieser Gruppe wurden von der Testsubstanz CLC-3000 gewichtadjustiert für 7 Tage 27 mg/kg Körpergewicht/Tag verabreicht.

Die oben genannten Substanzen wurden den Ratten durch osmotische Minipumpen der Firma Alzet injiziert. Hierzu wurden diese mit den zu verabreichenden Lösungen befüllt und den Tieren implantiert. So konnten die Pharmaka kontinuierlich appliziert werden und Stress aufgrund von wiederholten Injektionen für die Versuchstiere vermieden werden. Die Implantation der Minipumpen erfolgte subkutan. Hierzu wurden die Tiere mit Isofluran Gas narkotisiert.

Es wurde die untere Rückenpartie des Tieres rasiert und nach der Hautdesinfektion mit einer spitzen Schere eine Hautinzision 2-3 cm dorsal oberhalb des Schwanzes gesetzt. Mithilfe einer Graefe-Pinzette konnte das subcutane Fettgewebe gespreizt und so die Pumpe in eine Gewebetasche platziert werden. Anschließend wurden die Wundränder adaptiert und die Läsion mit Klammertechnik verschlossen. Die Eingriffe zur Implantation fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die postoperative Wundhygiene wurde mit Braunol durchgeführt. Die Minipumpen sind dreischichtig aufgebaut. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 17 gezeigt. Das Lumen im Inneren der Pumpe, das das Pharmakon enthält, ist ausgekleidet mit der innersten Schicht. Es handelt sich um eine impermeable, aber kollabierbare Membran. Um diese herum liegt ein osmotisch aktiver Raum, der wiederum von einer Membran umgeben ist. Diese äußerste Schicht der Pumpe wird von einer nicht kollabierbaren semipermeablen Membran gebildet. Befindet sich die Pumpe in einem wässrigen Medium, strömt Wasser durch diese semipermeable Membran in das darunter liegende osmotisch aktive Kompartiment. Durch den hierdurch erhöhten hydrostatischen Druck auf das kollabierbare Pharmakareservoir, kann die enthaltene Substanz durch den Flussmoderator kontinuierlich in das umgebende Gewebe des Tieres abgegeben werden (238). Die verschiedenen Testlösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und vor Implantation der Pumpe auf 37° C erwärmt. Die vorab definierten Versuchsbedingungen wurden für jede Gruppe eingehalten, um die Ergebnisse der verschiedenen Gruppen direkt vergleichen zu können. Die Experimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierexperimente des U.S. National Institute of Health und wurden vom Ethik-Komitee der Universitätsmedizin Mainz sowie vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt. Alle Tiere wurden im Tierstall der Universitätsmedizin Mainz gehalten.

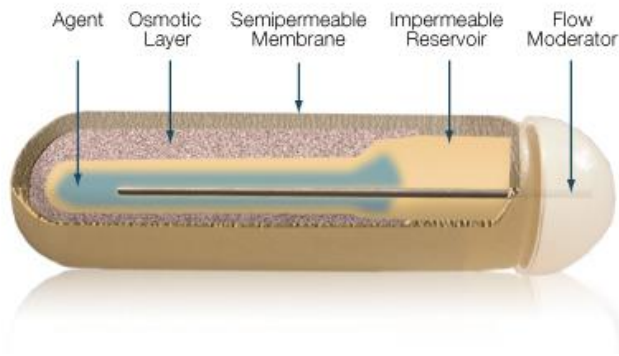


Abbildung 17: Aufbau und Prinzip der osmotischen Minipumpe
Abbildung aus (239).

4.2.3 Entnahme und Präparation der Aorta und des Herzens

Für die *in vitro* Versuche wurde Gewebe unbehandelter Tiere verwendet. Für die *in vivo* Testung der Substanzen, wurden die Gewebe nach einwöchiger Behandlung der Tiere untersucht. Um Störfaktoren zu minimieren, wurden die folgenden Arbeitsschritte für alle Versuchsgruppen einheitlich durchgeführt. Unter Isofluran Narkose wurde zunächst das Bauch- und Brustfell mit einem elektrischen Rasierer entfernt. Mit einer scharfen Schere wurde von kaudal beginnend der Thorax eröffnet. Durch Inzision des Diaphragmas entlang des Rippenbogens und Lösung von der Thoraxwand konnte das Herz dargestellt werden. Vor der Entnahme wurden in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens 1000 I.E. Heparin (in 1 ml NaCl, 0,9 %) injiziert, um eine Hämostasie-bedingte Blutkoagulation zu verhindern. Anschließend erfolgte das Absetzen des Truncus pulmonalis und der Aorta ascendens und das Herz konnte entnommen werden. Dann erfolgte die Entnahme Aorta thoracica. Diese wurde sehr vorsichtig und unter Vermeidung von Zugkräften freipräpariert, um das Endothel nicht zu beschädigen. Herz und Aorta wurden unmittelbar nach der Entnahme in Krebs-Hepes Puffer (4.1) und eisgekühlt gelagert. In einem weiteren Schritt wurden die Aortagefäße unter dem Binokular und ebenfalls in gekühltem Krebs-Hepes-Puffer sorgfältig aus dem perivaskulären Fett- und Bindegewebe freipräpariert. Zur Präparation wurden Mikropinzette und feinchirurgische Präparierschere verwendet. Um das Endothel nicht zu verletzen, mussten während der Präparation Druck oder Zugbelastung des Gewebes von außen sowie direkter Kontakt der Instrumente mit der Gefäßinnenseite vermieden werden. Anschließend wurden die Aorten vorsichtig mit einem scharfen Skalpell in 4 mm breite Ringe geschnitten. Bis zur Messung dieser im Organbad wurden sie weiter eisgekühlt gelagert. Außerdem wurden Aortensektionen jedes Tieres für die Herstellung von Kryoschnitten zur Detektion von Superoxid *in situ* (4.2.7) in Tissue-Tec®/OCT-Compound

eingefroren. Einige Ringe wurden auch in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die spätere Untersuchung mithilfe von SDS-Page und Western Blot bei -80°C gelagert.

4.2.4 Isometrische Tonusstudien im Organbad

Mit dieser Methode kann die Gefäßfunktion von Aortensegmenten ex vivo mittels Messung der Reaktion auf physiologische und pharmakologische Stimuli gemessen werden. Einerseits wurden isometrische Tonusstudien in vitro und ex vivo durchgeführt, um die vasodilatativen Eigenschaften der Testsubstanzen in vitro zu untersuchen. Hierzu wurden die vorgespannten Aortenringe unbehandelter Tiere den Substanzen Pioglitazon, CLC-1275, CLC-3000 und dem klassischen Nitrat ISDN ausgesetzt. In den in vivo Versuchen dagegen wurden Konzentrations-Relaxations-Kurven von Aortensegmenten erhoben, nachdem die Tiere zuvor 7 Tage lang mit der Testsubstanz behandelt worden waren. Dabei wurden nacheinander die endothelabhängige Dilatation durch Gabe von Acetylcholin (ACh), die endothel-unabhängige Dilatation durch Glyceroltrinitrat/Nitroglycerin (GTN) und die Dilatation durch CLC-3000 untersucht. Das auch als körpereigener Neurotransmitter vorkommende Acetylcholin stimuliert physiologischerweise über den muskarinergen Acetylcholinrezeptor (M3) des Endothels die Produktion von Stickstoffmonoxid (*NO) durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Dieses wiederum bewirkt über ein second messenger System eine Entspannung der glatten Muskelzellen und so eine Vasodilatation (22). Bei einer gestörten Endothelfunktion und damit gestörten NO-Produktion überwiegt allerdings die Vasokonstriktion, die gleichzeitig direkt von Acetylcholin an Rezeptoren der glatten Muskelzelle induziert wird. Dieses Phänomen nennt man paradoxe Vasokonstriktion (240, 241). Nitroglycerin wird von der mitochondrialen Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) bioaktiviert, wobei *NO gebildet wird (230). So kann durch organische Nitrate unabhängig von der Endothelfunktion eine Dilatation des Gefäßes bewirkt werden. Eine verminderte Vasodilatation durch GTN deutet auf eine Nitrattoleranz hin oder bei Vorliegen eines Diabetes mellitus auf eine sogenannte Nitratresistenz. Dieser Nitrattoleranz liegen nach derzeitigem Forschungsstand folgende Pathomechanismen zugrunde: Einerseits die Inhibition, der ALDH-2, die zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von *NO führen (242). Und andererseits die Störung der NO-vermittelten Signaltransduktion durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (243).

Nach der Präparation der Aorten (4.2.3) wurden die Gefäßringe vorsichtig auf zwei dünne dreieckige Stahldrähte aufgefädelt und wie in Abbildung 18 gezeigt zwischen diesen ins Organbad eingespannt. Eines der beiden Dreiecke war fixiert, das andere über einen langen Draht mit einem isometrischen Kraftaufnehmer und Signalverstärker verbunden. Alle

Spannungsmessungen wurden elektronisch auf einem Powerlab 8sp (SP8552) aufgezeichnet und mit der Chart5 Software Windows, Version 5.4.2. ausgewertet. So konnte ständig die Spannung gemessen und das Signal umgewandelt und verarbeitet werden. Die Aorten befanden sich während der Untersuchung in einem doppelwandigen Glaszylinder-Gefäß gefüllt mit 25 ml Organbadpuffer (4.1.4). Um die Testbedingungen möglichst vergleichbar mit dem physiologischen Milieu im Organismus zu gestalten, betrug die Temperatur 37°C und es fand eine ständige Begasung der Flüssigkeit mit Carbogengas (95 % O₂, 5 % CO₂) statt. Durch die doppelte Wand des Zylinders zirkulierte 37°C warmes Wasser um die Puffertemperatur konstant zu halten. Mithilfe eines Reservoirs und einer elektrischen Pumpe konnte der Puffer ausgetauscht werden. Um eine Prostaglandinproduktion in den Gefäßzellen zu vermeiden, wurde der Puffer zusätzlich mit dem Cyclooxygenasehemmer Indometacin (10 µM) versetzt.

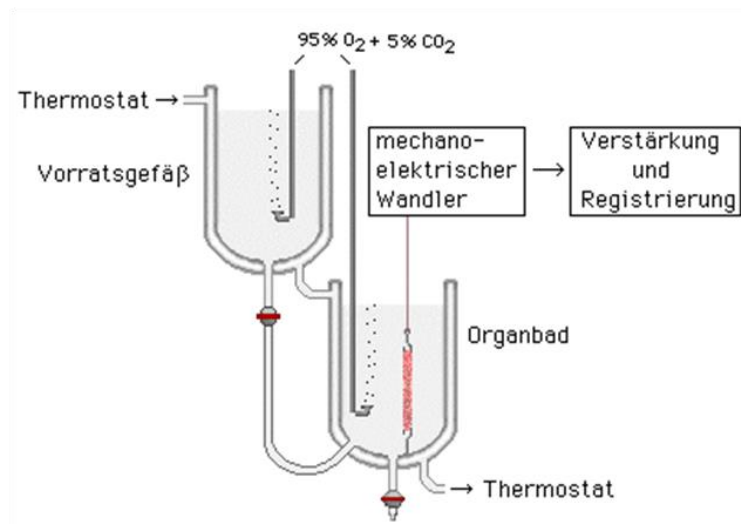


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Organbadapparatur
 Abbildung aus (244).

Zu Beginn wurden die Proben mithilfe von KCl bis zu einer Konzentration von 80 mM maximal vorgespannt. Dann wurde das KCl ausgewaschen und der Alpharezeptor-Agonist Phenylephrin (PE) (0,5-1 µM) in den Puffer titriert, wobei ständig die Spannung und die Phenylephrinkonzentration erfasst wurden, bis 50 % - 60 % der maximalen Konstriktion erreicht war und sich als stabiles Tonusplateau hielt und als 0 % Vasodilatation definiert.

Für die Konzentrations-Relaxations-Kurven wurde nun begonnen die bezüglich ihrer vasodilatatorischen Eigenschaften zu untersuchenden Testsubstanzen in der niedrigsten Konzentration dem Puffer zuzufügen und anschließend in halb-logarithmischen Schritten die Konzentration

zu erhöhen und dabei die erzeugte Spannung des Gefäßsegments zu messen. Bei jeder Konzentrationsstufe wurde ein Plateau in der Konzentrations-Relaxations Kurve abgewartet, jedoch nicht länger als 2 Minuten. (Hierbei wurde die Vasodilatation prozentual als Reduktion der durch PE induzierten Vorspannung dargestellt). Nach Testung der maximalen Wirkstoffkonzentration wurde das Aortengewebe durch dreimaligen Austausch der Pufferlösung gespült und erneut mit PE vorkontrahiert, wobei die Konzentrationen von PE und die entsprechenden resultierenden Spannungen des Gewebes gemessen wurden, und anschließend für die gleiche Substanz eine zweite Kurve erhoben (um eine mögliche in vitro Toleranz bzw. Tachyphylaxie zu erfassen).

Für die in vivo Untersuchung wurden Spannungsmessungen in gleicher Weise wie oben beschrieben durchgeführt. Hierfür wurden Aortensegmente von Tieren gewählt, die die letzten sieben Tage lang mit den Testkomponenten behandelt worden waren. Hierbei wurden bei jedem Ring drei verschiedene Konzentrations-Relaxations-Kurven erstellt. Die erste mit ACh, um die endothelabhängige Vasodilatation zu untersuchen, die zweite mit dem neuen Hybrid CLC-3000 selbst und eine dritte mit Nitroglycerin (GTN), um die endothelunabhängige vasodilatatorische Aktivität zu untersuchen. Wie auch in den in vitro Betrachtungen wurde für jede Substanz zweimalig eine Konzentrations-Relaxations-Kurve erstellt.

4.2.5 Detektion von oxidativem Stress mittels Chemilumineszenz

Vaskulärer oxidativer Stress ist ein Pathomechanismus bei der Entstehung einer Nitrattoleranz (232). Das Potenzial der Testkomponenten, die Bildung von oxidativem Stress zu induzieren, wurde in verschiedenen Experimenten sowohl in vitro als auch nach in vivo Behandlung untersucht, unter anderem mittels Chemilumineszenz. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass bei bestimmten chemischen Reaktionen elektromagnetische Strahlung im Bereich von ultraviolettem und sichtbarem Licht freigesetzt wird. Dies geschieht, wenn bei der Reaktion energiereiche instabile Zwischenprodukte entstehen, die dann spontan zerfallen und dabei Energie abgeben (245). Für die Detektion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) eignen sich Chemilumineszenz-basierte Assays, da sie schnell und sensitiv sind (22). Die Bildung von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen wurde in Mitochondrien und Herzmuskelzellen untersucht.

4.2.5.1 Generierung von mitochondrialen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Für die Erfassung mitochondrialen Wasserstoffperoxids (H₂O₂) und Peroxynitrits (ONOO⁻) hat sich der Farbstoff 8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido[3,4-d]pyridazin-1,4-(2H, 3H)Dion

(L-012) bewährt. Er ist unspezifischer als Lucigenin und der Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidium (DHE) (246). Diese Methode basiert darauf, dass die gebildeten RONS bei Hinzugabe von Succinat mit dem Chemilumineszenzfarbstoff (L-012) reagieren und dabei Lichtquanten emittiert werden. Diese wurden mithilfe des Luminometers Lumat LB9507 für 20 Minuten gemessen und dargestellt als counts/30 Sekunden. Zur präparativen Gewinnung von Mitochondrien muss das tierische Gewebe zerstört werden. Die Herzen der Versuchstiere wurden wie im Abschnitt 4.2.3 erläutert entnommen und anschließend in HEPES-Mito-Puffer (4.1.4) homogenisiert. Hierzu wurde jeweils ein halbes Herz mit einem Skalpell grob zerkleinert und vorsichtig das am Gewebe anhaftende Blut mit einem Tuch entfernt. Die Segmente wurden anschließend in einem hohen Homogenisatorgefäß zusammen mit 1500 µl HEPES-Mito-Puffer (4.1.4) mit einem Glasstab homogenisiert, wobei durch Scherkräfte die Zellen aufgebrochen werden. Für die Chemilumineszenz Messung müssen die Mitochondrienfraktionen isoliert werden: Das Material wurde hierzu in Eppendorfgefäße überführt und mehreren Zentrifugationschritten unterzogen:

Zu Beginn wurde bei 4°C mit 1500 x g für 10 Minuten, daraufhin bei 2000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, wobei jeweils nur der Überstand weiterverwendet wurde und das entstandene Pellet verworfen. Es folgte eine Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C für 20 Minuten. Dieser Schritt wurde wiederholt, nachdem der im ersten Durchlauf entstandene Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml HEPES-Mito-Puffer (4.1.4) resuspendiert worden war. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet vorsichtig mit Tris-Mito (4.1.4) gespült und anschließend in 200-300 µl desselben resuspendiert. Alle Schritte erfolgten bei 4°C. Um die Ergebnisse der späteren RONS Messung in den verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurde eine quantitative Analyse der Proteinkonzentration nach *Lowry* durchgeführt. Hierbei handelt es sich um zwei aufeinander folgende chemische Reaktionen:

Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet. In einem zweiten Schritt reduziert dieser Komplex dann ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagens (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens), wobei gleichzeitig Cu^{2+} (Kupfer-Ion) im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu^+ reduziert wird. In Abhängigkeit von der Menge der vorhandenen Proteine verfärbt sich die Lösung durch das entstandene Molybdänblau intensiv blau. Photometrisch kann dann bei einer Wellenlänge von 540, 650 oder 700 nm die Extinktion gemessen und so die Proteinkonzentration bestimmt werden (247). Hierzu wurden 10 µl der Proben zunächst zusammen mit jeweils 90 µl 0,1 % SDS (4.1.4) für 10 Minuten dunkel und bei 37° C inkubiert. Als Leerwert wurden 10 µl Tris-Mito-Puffer (4.1.4) in gleicher SDS-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Proben gründlich geschüttelt und jeweils 25 µl Probe mit

125 µl des vorher bereits gemischten Reagenz A+S (4.1.4) (im Verhältnis 60 µl S + 3 ml A) in Küvetten pipettiert, dann 1000 µl des auf 37°C vorgewärmten Reagenz B (4.1.4) hinzugefügt, umgerührt und nach 10-minütiger dunkler Inkubation mit dem Photometer bei 700 nm die Extinktion gemessen. Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung, dessen Mittelwerte berechnet wurden. Alle Mitochondrienpräparationen wurden nun auf den gleichen Proteingehalt eingestellt (5-10 mg/ml). Erst jetzt folgte die Messung der RONS mittels Chemilumineszenz. Jede Probe wurde mit 500 µl des mit PBS (4.1.4) verdünnten Leuchtstoffes L-012 (100 µl) auf eine einheitliche finale Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml gebracht. Zum Starten der Reaktion wurden 10 µl (250 mM) Succinat, Komplex II-Substrat der Atmungskette, (5 mM final) hinzugegeben, die Proben kurz geschüttelt und unmittelbar in den Single-Photon Counter eingestellt. Für die in vitro Untersuchungen wurden zusätzlich die Testkomponenten (GTN, Pioglitazon, CLC-1275, CLC-3000) in verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 100 µM, 1000 µM) hinzugegeben. 20 Minuten lang wurden in Intervallen von 30 Sekunden die emittierten Photonen im Lumat LB9507 gemessen und als counts/30 Sekunden dargestellt. Jeweils die Werte des letzten 30-Sekunden-Intervalls nach 5 beziehungsweise 20 Minuten wurden dann als Vergleichswerte zwischen den Testgruppen herangezogen.

4.2.5.2 Detektion der Aktivität der kardialen NADPH-Oxidase in Herz-Membranfraktionen

Die NADPH-Oxidase spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Superoxid/Sauerstoffradikalen im Gefäßsystem (248). Mithilfe von Chemilumineszenz-Assays lässt sich die Bildung solcher detektieren. Besonders geeignet ist hierfür der Farbstoff Lucigenin. Er reagiert ausschließlich mit Superoxid. Dabei entsteht ein Dioxetan-Intermediat, das dann unter Emission von Lichtquanten zerfällt (249). Diese können mithilfe eines Luminometers quantifiziert werden. Lucigenin kann allerdings in hohen Konzentrationen auch selbst die Bildung von Superoxid induzieren (250, 251), für niedrigere Konzentrationen konnte dies allerdings nicht gezeigt werden (249, 252, 253). Deshalb sollte Lucigenin bei Untersuchungen zu oxidativem Stress nur in Konzentrationen von $\leq 10 \mu\text{M}$ verwendet werden. Außerdem verbreitet zur Detektion von Superoxid ist der Farbstoff Luminol. Er reagiert unter Katalyse durch die Meerrettichperoxidase (HRP, engl.: horseradish peroxidase) mit Wasserstoffperoxid, wie es aus dem durch die NADPH-Oxidase produzierten Superoxid durch Dismutation gebildet wird, wobei Lichtquanten emittiert werden, die dann ebenfalls mit einem Single-Photon-Counter registriert werden können. Mit diesen beiden Chemilumineszenz-Farbstoffen, wurde die Aktivität der NADPH-

Oxidase in kardialem Gewebe der Versuchstiere nach in vivo Behandlung mit den Testsubstanzen gemessen.

Nachdem die Organe der Tiere wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben präpariert worden waren, wurden sie wie oben (Abschnitt 4.2.5.1) erläutert zerkleinert und in Tris dTT-Puffer (4.1.4) homogenisiert. Nach Überführung in EppendorfgeläÙe, wurden drei Zentrifugationsschritte durchgeföhrt: Zunächst wurde das Homogenat bei 4 °C 5 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und anschließend bei 4°C 20 Minuten bei 20050 x g. Bei diesen beiden Schritten wurde lediglich der Überstand weiterverwendet. Zuletzt wurden die Proben bei 4°C, 100000 x g und für 60 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde nach Spülung mit Tris-Mem-Puffer (4.1.4) in ebensolchem resuspendiert und dann mit PBS (4.1.4) auf eine Proteinkonzentration von etwa 7 mg/ml verdünnt. Anschließend folgte die Proteinkonzentrationsbestimmung nach *Lowry* (4.2.5.1).

Es folgte die ROS Messung im Single-Photon-Counter: Die Proben wurden mit 500 µl PBS auf eine finale Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml verdünnt und Lucigenin (5 µM final) beziehungsweise Luminol (100 µM final) + HRP (0,1 µM final) hinzugefügt. Durch die Zugabe von 5 µl NADPH (200 µM final) als Substrat der NADPH-Oxidase wurde die Reaktion gestartet. Nach kurzem Schütteln wurden die Emissionen im Lumat LB9507 der Firma Berthold Technologies in Intervallen von 30 Sekunden 5 Minuten lang gemessen. Die Werte des jeweils letzten Intervalls wurden dargestellt als Counts/30 Sekunden.

4.2.6 Messung der ALDH-2-Aktivität durch HPLC Analyse

Die ALDH-2 spielt bei der Bioaktivierung von organischen Nitraten und dem Pathomechanismus der Nitrattoleranz eine entscheidende Rolle (230, 242, 254). Sie katalysiert die Biotransformation von GTN zu dem wirksamen Metaboliten 1,2-Glyceryldinitrat und Nitrit. Die Entwicklung der Nitrattoleranz ist unter anderem zurückzuführen auf eine Inaktivierung der ALDH-2 und in der Folge einer verminderten Entstehung des vasoaktiven Metaboliten (230). Die ALDH-2-Aktivität ist ein Marker für das Vorhandensein von oxidativem Stress, da das Enzym Redox reguliert ist (255). Eine Methode, um die Aktivität der mitochondrialen Unterform der Aldehyd-Dehydrogenase, der ALDH-2, zu messen, ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography, HPLC). Sie basiert auf der Konversion von 2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd zu seinem Benzoesäure-Produkt durch die ALDH-2, wobei ultraviolettes oder sichtbares Licht frei wird, das detektiert und quantifiziert werden kann. So können Rückschlüsse auf die Aktivität beziehungsweise die Hemmung des mitochondrialen Enzyms gezogen werden (256).

Bei der HPLC handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren für Flüssigkeiten. Die zu analysierende Substanz läuft dabei in der mobilen Phase durch die Trennsäule, die die stationäre Phase enthält. Je nach physiko-chemischen Eigenschaften der untersuchten Substanz, hat diese ein intensiveres Bindungsvermögen zu den Oberflächengruppen der stationären Phase oder hält sich bevorzugt in der mobilen Phase auf. Diese Eigenschaft kann mithilfe eines Verteilungskoeffizienten K beschrieben werden. Daraus ergibt sich für jede Substanz eine charakteristische Zeit, nach der sie den Säulenausgang erreicht und detektiert werden kann, die sogenannte Retentionszeit. Bei der sogenannten reversed phase HPLC (engl. für Umkehrphasen-HPLC), die bei unseren Versuchen Anwendung gefunden hat, ist die Oberfläche der stationären Phase (Silicagel) modifiziert. Die polaren Oberflächensilanolgruppen sind mit einer Schicht aus unpolaren Alkanen überzogen. Die polare mobile Phase enthält bei der RP-HPLC zum Beispiel ein Acetonitril-Wasser-Gemisch (25/75). Der grundsätzliche apparative Aufbau der HPLC ist in Abbildung 19. gezeigt. Die mobile Phase befindet sich in einem oder mehreren Elutionsmittelvorratsgefäßen. Sie wird mit einer Hochdruckpumpe über eine Pulsationsdämpfung und über einen Filter bis zum Injektor befördert. Hier wird die Probe zugeführt. Eine Vorsäule dient dazu, mögliche Probenkontaminationen zurückzuhalten und so die Hauptsäule zu schonen, in der dann die Substanzen durch Wechselwirkungen mit stationärer und mobiler Phase getrennt werden. Nach Passage der Trennsäule werden in einem oder mehreren hintereinander geschalteten Detektoren die Fraktionen registriert. Die Detektoren sind mit einem Computer verbunden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ChromPass und das Signal am Detektor wurde in der Einheit mV/Sekunde dargestellt.

Durch die Messung der Menge an Benzoesäure, die aus der Konversion von 2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd entsteht, kann auf die Aktivität der ALDH-2 in Mitochondrien geschlossen werden. Hierfür wurden die Mitochondrienfraktionen isoliert und der Proteingehalt mit der *Lowry*-Methode (4.2.5.1) bestimmt und anschließend die Proben jeweils in 0,25 ml PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml Protein verdünnt. Die Proben wurden draufhin für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zwar jeweils mit und ohne Daidzin (200 μ M). Daidzin ist ein spezifischer Inhibitor der ALDH-2. Dann wurden die Proben zusammen mit 2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd (100 μ M) als Substrat der ALDH-2 weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert: Zugewetzt wurden verschiedene Testsubstanzen, um ihre Auswirkungen auf die ALDH-2-Aktivität im Vergleich zu Kontrollproben zu untersuchen. Dies waren Nitroglycerin (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Aminoethylnitrat (AEN) jeweils in Konzentrationen von 1 μ mol/l, 10 μ mol/l und 100 μ mol/l. Daraufhin wurden die Proben mit Ultraschall behandelt, um die Mitochondrien aufzubrechen und für 20 Minuten bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert. Durch

Zentrifugation und Filtrierung des Überstandes mittels eines Ausschluss-Filters der Firma Millipore (10 kDa Porengröße, d.h. alle größeren Moleküle werden zurückgehalten und kleinere passieren den Filter) für 20 min bei 18000 x g wurde dieser gereinigt und dann 100 µl jeder Probe der HPLC zugeführt. Die stationäre Phase bildete eine C18-Nucleosil 125x4 mm, 100-3 Trennsäule. Die mobile Phase enthielt zu 65 vol% 50 mM Zitratpuffer, pH 2,2 und 35 vol% Acetonitril. Die Elution erfolgte isokratisch bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min. Die Substrate und Ihre Produkte wurden nach Verlassen der Trennsäule am Detektor anhand ihrer Absorption bei 360 nm detektiert. Für die Quantifizierung wurden interne und externe Standards von 2-Hydroxy-3-nitro-benzoesäure und 2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd verwendet. Die Stoffe konnten über ihre charakteristischen Retentionszeiten und typischen Absorptionseigenschaften identifiziert werden. Bei 2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd beträgt diese ~5,6 Minuten und von 2-Hydroxy-3-nitro-benzoesäure ~3,4 Minuten. Im Chromatogramm wird die Stärke des Signals der Absorption (in mV) über der Zeit angegeben.

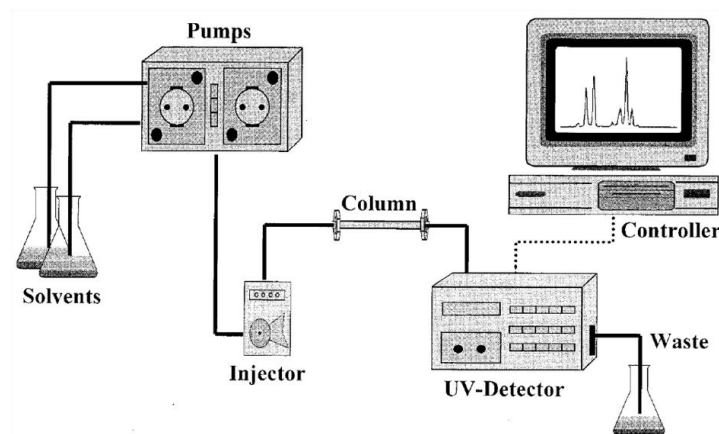


Abbildung 19: Schematischer Aufbau einer HPLC
Abbildung aus (258).

4.2.7 Topografische Detektion der vaskulären ROS-Produktion

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidin (DHE) lässt sich die Superoxidbildung in intakten Geweben nachweisen. Es kann frei die Zellmembran passieren und wird intrazellulär oxidiert durch ROS. Ethidium interkaliert mit der DNA im Zellkern und zeigt bei Anregung durch Licht der Wellenlänge 500-530 nm eine rote Fluoreszenz (590-620 nm) (249, 259), wobei die Untersuchungen von *Zhao et al. 2003* (260) nahelegen, dass als Reaktionsprodukt das 2-Hydroxyethidium bei der Reaktion von DHE mit Superoxid entsteht, das eine Fluoreszenz im Bereich von 567 nm aufweist. Allerdings entstehen auch andere Oxidationsprodukte.

Die Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Aortenringen lässt so eine topographische Zuordnung von Superoxidquellen treffen. Hierzu wurden 4 mm breite aortale Sektionen (4.2.3) zuerst bei 37°C 10 Minuten in Protease-Inhibitorenpuffer inkubiert und anschließend nach kurzem Kontakt mit Zellstoff, um überschüssigen Puffer ablaufen zu lassen, aufrecht in kleine Schiffchen aus Aluminiumfolie gesetzt, die mit Einbettmedium (OCT™-Compound, TissueTek®) gefüllt waren, und in flüssigem Stickstoff eingefroren. So konnten die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert werden. Mit einem Kryostat wurden bei -25°C 6 µm dicke Cryoschnitte angefertigt und auf vorgekühlte Objektträger (SuperFrost®Plus) aufgebracht. Die Objektträger mit den Schnitten wurden entweder sofort weiterverwendet oder bis zu zwei Wochen bei -80°C gelagert. Zum Färben wurden die Präparate zuerst bei 37°C aufgetaut und anschließend für 30 Minuten in bei 37°C in einem DHE-Bad (1 µM) und bei Dunkelheit inkubiert, da DHE lichtsensibel ist. Die Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde dann angehalten, indem die Objektträger für weitere 10 Minuten auf Eis gelagert und die Schnitte mit Deckgläschen fixiert wurden. Anschließend konnten in einer Dunkelkammer Bilder angefertigt werden. Die Fluoreszenz (bei 605 nm) wurde nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 518 nm mit einer Kamera (AxioCam MRm, Zeiss), angeschlossen an ein Zeiss Axiovert 40 CFL-Mikroskop, detektiert und mit der AxioVision 4.3 Software dokumentiert. Die densitometrische Quantifizierung erfolgte mithilfe der Gel-Pro™ Analyser Software und die Ergebnisse wurden ausgedrückt in Prozent zur Kontrollgruppe (= 100%).

4.2.8 Untersuchung der Enzymexpression (mit SDS-Page und Western Blot-Analyse)

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die Untereinheit Nox-2 der vaskulären NADPH-Oxidase, die Häm-Oxygenase (HO-1) und die Dihydrofolatreduktase (DHFR) sind Enzyme, die eine wichtige Rolle in der (Patho-)physiologie der endothelialen Dysfunktion und der Nitratintoleranz (und der in deren Rahmen beobachteten kompensatorischen Mechanismen) spielen (261-263). NADPH-Oxidasen sind maßgeblich an der Produktion von ROS im Gefäßgewebe beteiligt (165, 168, 264). Die Nox2 ist eine Unterform, die auch gp91^{phox} genannt wird. Sie ist membranständig und kommt auf Phagozyten, in Endothelzellen (184), Adventitiazellen (265) und in den glatten Muskelzellen von Gefäßen vor (266). In den glatten Muskelzellen der Aorta ist sie nicht zu finden (165). Eine erhöhte Expression der Nox2 führt zu einer vermehrten Produktion von ROS. HO-1, eNOS und DHFR dagegen sind protektive Enzyme. Ist deren Expression vermehrt, kann als Ursache eine kompensatorische Hochregulation bei erhöhtem oxidativem Stress angenommen werden. Ihre Expression in aortalem Gewebe wurde mittels Western Blot untersucht. Dabei wurden zunächst aus dem präparierten Gewebe von Tieren, die zuvor sieben Tage

lang in vivo therapiert worden waren, die Proteine isoliert. Das zu untersuchende Proteingemisch wurde dann in einer sogenannten Polyacrylamid-Gelelektrophorese, entlang eines Ladungsgradienten/ elektrischen Feldes aufgetrennt. Daraufhin konnten die aufgetrennten Proteinbanden auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert werden, um dort in einem Immuno-Assay analysiert zu werden.

4.2.8.1 Proteinisolierung aus Aortengewebe

Vor der Elektrophorese der Proteine muss das Gewebe vorbereitet werden. Die Proteinlösungen müssen frei von festen Partikeln und Fetttropfchen sein, damit diese nicht die Poren der Matrix verstopfen und die Trennung stören. Die zuvor in flüssigem Stickstoff gefrorenen Segmente der Aorta abdominalis wurden hierzu in einem vorgekühlten Mörsergefäß unter flüssigem Stickstoff fein zerkleinert. Dabei durfte die Probe nicht auftauen. Anschließend wurde das Material in Eppendorfgefäße, die über flüssigem Stickstoff gelagert wurden, transferiert und dort mit ebenfalls gekühlter Homogenisierungslösung (4.1.4) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf dem Vortexer langsam aufgetaut. Die Homogenisierungslösung enthält neben dem Homogenisierungspuffer zusätzlich Protease- und Phosphataseinhibitoren, um einen Zerfall der Proteine und ihre posttranslationalen Modifikationen zu verhindern. Das zu verwendende Probenvolumen beziehungsweise die Füllhöhe des Eppendorfgefäßes mit der Probe wurde dabei optisch abgeschätzt mithilfe eines Eppendorfgefäßes, das eine Referenzmenge Wasser enthielt. Nach 60-minütiger Inkubation und gelegentlichem Vortexen, konnten durch Zentrifugation bei 10000 x g und 4°C für 10 Minuten die Proteine von Zellbestandteilen und Fett getrennt werden. Das Pellet wurde verworfen und der gewonnene Überstand wurde auf seine Proteinkonzentration untersucht, indem 10 µl dessen abgenommen und nach dem *Bradford-Test* analysiert wurden. Das übrige Homogenat wurde zusammen mit Lämmli's-Puffer (3x) (4.1.4) bei 95°C für 5 Minuten inkubiert, um die Proteine zu denaturieren, und anschließend bis zum nächsten Tag und der weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

4.2.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der bei dieser Methode verwendete Farbstoff ist der Triphenylmethan Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G 250. In saurem Milieu bindet er relativ unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Durch diese Komplexbildung mit dem Protein wird er stabilisiert in seiner unprotonierten anionischen Sulfonat-Form und sein Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 zu 595 nm (267). Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Proteinkomplexes liegt sehr viel höher im Vergleich zum Farbstoff allein. So kann die Zunahme

der Absorption von Licht bei 595 nm durch die Reaktion des Coomassie-Brilliantblau mit Proteinmolekülen gegenüber einem Leerwert ohne Protein photometrisch bestimmt werden und stellt ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung dar (268). Der Bradford-Assay ist sehr sensitiv.

Um die Proteinkonzentrationen bestimmen zu können, werden Standardproteine als Referenz benutzt. Es wurden zum Vergleich 5 Proben von bovinem Serumalbumin (BSA) in verschiedenen bekannten Konzentrationen untersucht. Sie enthielten 1, 5, 10, 20 oder 30 ng/µl. Die Proben des Aortengewebes wurden in einem Verhältnis von 1:1000 mit 400 µl destilliertem Wasser verdünnt. Als Leerwert wurde ebenfalls destilliertes Wasser verwendet. In einer 96-Well Platte wurden zuerst 80 µl der Probe beziehungsweise des BSA pro Well vorgelegt und anschließend je 200 µl 1:5 mit Aqua dest. verdünntes Roti®-Quant hinzugefügt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Flüssigkeiten vermischt und dann für 10 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte die Messung im Mikroplate Reader MRX II bei 595 nm. Proben und Standards wurden dabei vierfach bestimmt und ihr Mittelwert verwendet. Die Auswertung der Messwerte und Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Revelation- Software.

4.2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Page (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*), ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Hierbei wird das aufzutrennende Gemisch zu Beginn im Verhältnis 2:1 zusammen mit dem dreifachen Lämmli's-Puffer auf 95°C erhitzt, um sowohl Sekundär- und Tertiärstruktur sowie Disulfidbrücken zu spalten. Das anionische Tensid SDS lagert sich hierbei um die Proteine und überdeckt die Eigenladungen von Proteinen. So entstehen Komplexe mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit: pro 1 g Protein binden 1,4 g Natriumdodecylsulfat (269). So ist es möglich, die Proteine nur nach ihrer Molekülmasse geordnet aufzutrennen. Die Proben wurden mit Lämmli's-Puffer auf eine Konzentration von 1 µg/ml eingestellt. Bei der SDS-Page handelt es sich um eine diskontinuierliche Elektrophorese, die das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt in das Gel verhindert und schärfere Bande ermöglicht. Die Gelmatrix besteht aus zwei Bereichen: einem engporigen Trenngel und einem weitporigen Sammelgel. Es wurden für die durchgeführten Versuche 10-prozentige Trenngele verwendet, deren Zusammensetzung in Abschnitt 4.1.4 gezeigt ist. Um die Zweischichtung der Gelmatrix zu erreichen, wurden sie nacheinander zwischen zwei Glasplatten gegossen, die mit einem Gelrahmen in einem Abstand von 1 mm zusammengehalten wurden. Zuerst wurde das Trenngel eingegossen. Dabei dürfen keine Bläschen im Gel verbleiben, weswegen anschließend 1 ml 2-Propanol auf den

Gusspiegel gegeben wurde. Nach etwa 20-30 Minuten bei Raumtemperatur war das Gel vollständig polymerisiert, das Propanol konnte abgesaugt und das Sammelgel aufgegossen werden. Um Taschen für die Proben zu generieren, musste, bevor das Gel polymerisierte, ein Gelkamm mit zehn Zinken in das Gel einbracht werden. Die Proben wurden aufgetaut und entsprechend der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford in ihrer Konzentration angeglichen auf 1 µg/ml, indem sie mit Lämmli's- Puffer (1x) verdünnt wurden. Dieser besteht aus Lämmli's-Puffer (3x) (4.1.4) und Homogenisierungs-Lösung (4.1.4) im Verhältnis 1:2. Nach etwa 15 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen und das Mini Protean III Cell System konnte an die Glasplatten mit dem Gel angeschlossen werden. Anschließend wurde SDS-PAGE-Laufpuffer 1x (4.1.4) (4°C) eingefüllt, der Gelkamm entfernt und die Taschen mithilfe einer Pipette mit dem Puffer vorsichtig gespült. Es wurde 60 V Spannung an das System angelegt. Die Proben sowie ein Marker von 10 kDa wurden bei 95°C für 5 Minuten ein weiteres Mal denaturiert. Hiernach konnte das System mit Proben befüllt werden. In die ganz äußeren Taschen am Rand wurden einerseits der Marker andererseits ein sogenannter „pre-stained Marker“, der den Fortschritt der Elektrophorese anzeigt, eingebracht. In die restlichen Taschen wurden vorsichtig jeweils 20 µl Probe pipettiert. Zu Beginn lief die Phorese bei 60 V. Nach etwa 15 Minuten hatten die Proben das Trenngel erreicht und die Spannung wurde auf 160 V erhöht. Nach ca. 2 Stunden zeigte der pre-stained Marker das Erreichen des Endes des Gels an.

4.2.8.4 Proteinanalyse mittels Western Blot

Um bestimmte Proteine mittels Immundetektion nachzuweisen, müssen die im Gel aufgetrennten Proteine zuerst auf einen Träger transferiert und dort immobilisiert werden. Per Elektroblothing werden die Proteine in derselben geometrischen Anordnung auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht wie sie im Gel separiert wurden. Das verwendete System (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad) besteht aus mehreren Schichten: einem Schwamm ganz unten, einem Filterpapier, dem Gel mit den aufgetrennten Proteinen, der Nitrozellulosemembran, darauf ein weiteres Filterpapier und ein Schwamm ganz oben. Diese Schichten wurden in eine flache Schale mit bei -20°C gelagertem Transferpuffer (4.1.4) gelegt und von einem Blothalter umschlossen. Dieser wurde so in die Transferkammer gestellt, dass die Nitrozellulosemembran sich zwischen dem Gel mit den separierten Proteinen und der Anode befand. Die Transferkammer wurde mit Transferpuffer (4.1.4) gefüllt. Um den Transferpuffer gekühlt zu lassen, wurden zwei Kühlaggregate eingebaut und das ganze System auf Eis in einer Styroporbox gelagert. Es wurden 240 mA angelegt. Bei 4°C erfolgte das Elektroblothing für 150 Minuten. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran vorsichtig entnommen und in einer Schale auf einem Schwenktisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Ponceau-S inkubiert, um die vorab im Gel separierten

Proteinbanden inklusive dem 10 kDa Marker reversibel rot anzufärben. Die Banden des Markers wurden mit einem Stift markiert. Daraufhin wurde die Membran horizontal so in Streifen geschnitten, dass jeweils die Banden eines zu untersuchenden Proteins aller Proben auf einem Streifen lagen. Die Proteinbanden wurden mithilfe spezifischer Antikörper (Tabelle 1) im Rahmen einer sogenannten Immundetektion identifiziert. Damit die Antikörper nicht an proteinfreie Stellen der Membran binden, mussten diese Flächen zunächst mit BSA blockiert werden. Anschließend wurde ein Primärantikörper aufgebracht, der mit seinem *Fab*-Teil an spezifische Bindungsstellen eines bestimmten Proteins, seines Antigens, bindet. In einem zweiten Schritt wurde ein Sekundärantikörper genutzt, der spezifisch den *Fc*-Teil des Primärantikörpers bindet. An diesen Antikörper ist schließlich die Meerrettichperoxidase (engl.:Horse-Radish-Peroxidase HRP) gebunden, die mit einem anschließend hinzugegebenen Substrat (ECL-Reagenz, 4.1.3), bestehend aus Wasserstoffperoxid und Luminol, reagiert. Dabei wird Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm emittiert. Das Signal wurde mit dem ChemiLux Imager CsX-1400M aufgenommen und densitometrisch mit der Gel-Pro Analyzer Software quantifiziert.

Bevor die Antikörperreaktion stattfinden konnte, wurde der Ponceau-S Farbstoff mithilfe des Waschpuffers (4.1.4) aus den Banden entfernt. Hierfür sowie für die folgenden Schritte wurde ein Horizontalschüttler genutzt, um eine gleichmäßige Verteilung der Inkubationsflüssigkeiten zu erreichen. Es folgte die Blockung mit BSA für eine Stunde. Währenddessen wurden die primären Antikörper vorbereitet. Sie wurden wie in Tabelle 1 beschrieben mit Waschpuffer inkl. Blockmedium verdünnt. Nach Inkubation der Membranen mit dem Blockmedium wurde dieses abgegossen und die Membranstreifen zusammen mit den entsprechenden Primärantikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag konnten die Proben mit dem Sekundärantikörper inkubiert werden, nachdem sie viermal für 5 Minuten auf dem Horizontalschüttler mit Waschpuffer gewaschen worden waren. So sollten schwach haftende, ungebundene Antikörper sowie unspezifische Antikörperbindungen entfernt bzw. reduziert werden. Nach 90-minütiger Inkubation mit dem Sekundärantikörper folgte wieder der viermalige Waschschrift. Daraufhin wurden die Membranstreifen auf einer Glasplatte mit ECL-Reagenz (4.1.3) vollständig benetzt, mit dem die am Sekundärantikörper gebundene HRP reagieren kann und wodurch ein Chemilumineszenzsignal entsteht. Das Reagenz wurde nach 60 Sekunden durch Abtropfen wieder entfernt. Um ein Trocknen der Membran zu verhindern, wurden die Streifen in Klarsichtfolie eingelegt. Die entstandenen Emissionen wurden mit einem Chemilumineszenz-Imager detektiert und densitometrisch ausgewertet. So konnte von der Emissionsintensität der antikörperspezifischen Banden eine bestimmte optische Dichte (IOD, integrated optical density) bestimmt werden und daraus auf relative Expressionsänderungen im

Verhältniss zu den Kontrollproben geschlossen werden. Das ebenfalls detektierte Protein β -Actin verändert sich in der Regel nicht abhängig von Metabolismus und Gefäßerkrankungen (house-keeping Protein). So kann dessen Quantifizierung zur Normalisierung für die zu untersuchenden Enzyme dienen, um eventuelle Ungenauigkeiten bei Beladung der Gelelektrophorese zu identifizieren und auszugleichen.

Primärer AK (Firma)	Eigenschaften (Größe im Gel)	Verdünnung (prim. AK)	Waschpuffer und Blockmedium	Sekundärer AK (Firma)	Verdünnung (sek. AK)
β-Actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	Kaninchen, polyklonal, (42 kDa)	1:2500	TBS-T, 3% BSA	Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen IgG (Vector Lab., Burlingame, USA)	1:10000
eNOS (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)	Maus, monoklonal (140 kDa)	1:000	TBS-T, 3% BSA	Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG (Vector Lab., Burlingame, USA)	1:10000
Nox2 (gp91^{phox}) (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)	Maus, monoklonal (58 kDa)	1:500	TBS-T, 3% BSA	Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG (Vector Lab., Burlingame, USA)	1:10000
HO-1 (Enzo Life Science, Farmingdale, USA)	Maus, monoklonal (32 kDa)	1:1000	TBS-T, 3% BSA	Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG (Vector Lab., Burlingame, USA)	1:10000
DHFR (RDI Divison of Fitzgerald Industries, Concord, USA)	Maus, monoklonal (21 kDa)	1 μ g/ml	TBS-T, 3% BSA	Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG (Vector Lab., Burlingame, USA)	1:10000

Tabelle 1: Verwendete Antikörper im Westernblot

4.2.9 Effekte auf die Hämostase

Mit Versuchen in vitro und in vivo wurden Auswirkungen der Testsubstanzen, der Linker-Moleküle und der Derivate der organischen Nitrate auf die Plättchenaggregation und Koagulation untersucht. Hierzu wurde die Blutungszeit und das endogene Thrombin-Potenzial (ETP) in Mäusen untersucht sowie die Plättchenaggregation in menschlichem Blut gemessen.

4.2.9.1 Blutungszeit

Die Blutungszeit, als ein allgemeiner Parameter der Hämostase, wurde in Mäusen untersucht, die entweder akut oder chronisch mit Aminoethylnitrat (AEN) oder ISMN behandelt worden waren. Hierzu wurde C57BL/6 Mäusen einmalig intraperitoneal 100 μ g AEN oder ISMN jeweils in 200 μ l NaCl injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten 200 μ l NaCl. Für die

Untersuchung der Effekte von chronischer Behandlung erhielten C57BL/6 Mäuse 24 h, 7 Tage oder 14 Tage lang AEN oder ISMN mit ihrem Trinkwasser. Die Tagesdosis betrug 9 mg/kg Körpergewicht. Zusätzlich wurde das Trinkwasser mit wenigen Tropfen Süßstoff versetzt. Es wurde ebenfalls eine Kontrollgruppe mitgeführt. Nach chronischer oder akuter Behandlung wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und die Blutungszeit gemessen. Hierzu wurde mit einem Skalpell ein kurzer oberflächlicher Schnitt in die Schwanzvene durchgeführt und mit einem Filterpapier in einem Intervall von 15 Sekunden vorsichtig die Tropfen abgetupft. Dabei wurde darauf geachtet keinerlei Druck auf die Wunde auszuüben und sie mit dem Filterpapier kaum zu berühren, um die Gerinnung nicht zu beeinflussen. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur (~20° C) durchgeführt. Die Blutungszeit wurde definiert als das zeitliche Intervall vom Einschnitt bis zum Zeitpunkt als das Filterpapier nach zweimaliger Berührung der Läsion trocken blieb. Wenn die Blutung nach 20 Minuten nicht sistiert hatte, wurde das Gewebe mit Strom verödet und ein Wert von 1200 Sekunden als Blutungszeit angegeben.

4.2.9.2 Plättchen-abhängige Thrombinproduktion

Das endogene Thrombin-Potenzial (ETP) ist definiert als „die Menge an Thrombin, die gebildet werden kann, nachdem die Gerinnung durch Zugabe von Tissuefactor und Phospholipiden gestartet wird“. Dabei geht man davon aus, dass die Menge, die dabei an Thrombin gebildet werden kann, Einschätzungen zulässt über die Balance zwischen prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Faktoren im Gerinnungssystem (270, 271). Das ETP wurde in thrombozytenreichem Plasma erhoben. Für die Herstellung des plättchenreichen Plasmas wurden die Mäuse, nachdem sie 14 Tage lang mit den zu untersuchenden Substanzen ISMN beziehungsweise AEN im Trinkwasser (9 mg/kgKG/Tag) behandelt worden waren, mit Isofluran anästhesiert und anschließend mit einer silanisierten Glaskapillare der retroorbitale Venen Plexus punktiert, indem vorsichtig mit gleichmäßigem Druck die Glaskapillare durch die Konjunktiva zwischen Lid und Bulbus in Richtung des Venenplexus eingebracht wurde. Das so gewonnen Blut wurde in einer Lösung aus Dextrose-Zitrat und HBSS (magnesium- und calziumfrei) im Verhältnis Zitrat:HBSS 1:9 (4.1.3) antikoaguliert und bei Raumtemperatur für 6 Minuten bei 280 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plättchen zweimal mit Pipes-Puffer (4.1.4), der 1 µM Prostaglandin E1 enthielt, gewaschen. Anschließend wurden die Thrombozyten gecounted im Coulter Counter mittels Durchflusszytometrie. Anschließend wurde das Konzentrat mit rekombinantem Tissuefaktor (0,6 pmol/l) oder Thrombin (0,1 U/ml) versetzt und das ETP bestimmt, indem die Thrombinproduktion mittels Calibrated Automatic Thrombography (CAT) im Fluoroskan Ascent® reader gemessen wurde. Hierbei wurde das Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC hinzugegeben, das durch Thrombin gespalten wird zum fluoreszierenden AMC

(7-amino-4-methylcoumarin). Die Produktion des AMC wird gemessen bei Anregung mit 390 nm und mit einem Emissions-Filter von 460 nm. Mit jeder Probe wurde eine Kontrolle mitgeführt. Die Kurven der Thrombin Produktion sowie das endogene Thrombinpotenzial (area under the curve) wurden ausgewertet mit der Thrombinoskope und Syapse BV Software.

4.2.9.3 Humane Plättchenaggregation

Die Plättchenaggregation in menschlichem thrombozytenreichem Plasma wurde abhängig von der Zugabe verschiedener Vasodilatoren in vitro und unter Aktivierung mit ADP untersucht. Hierzu wurde Zitrat-Blut von freiwilligen Testpersonen durch Punktion einer peripheren Vene gewonnen und durch Zentrifugation bei 200 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur thrombozytenarmes Plasma sowie thrombozytenreiches Plasma hergestellt. Aus diesen beiden wurde dann ein plättchenreiches Plasma mit 2×10^8 Thrombozyten/ml produziert. Die Plättchenaggregation wurde in diesem Plasma nach vorsichtigem Überführen in eine lichtdurchlässige Küvette mit Hilfe eines photometrischen Aggregometers und unter Zugabe von ADP (2 μ M) als Agonist sowie jeweils den Testsubstanzen AEN, GTN, ISMN, Diethylamin Diazoniumdiolat (DEA/NONOat), Nitroporussidnatrium (SNP) sowie der neuen Substanz CLC-3000 und dem Linker CLC-1275 in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Die einsetzende Aggregation der Thrombozyten bewirkt eine Verminderung der Trübung des Plasmas, die photometrisch als Änderung der Transmission gemessen werden kann. Hierdurch kann das Ausmaß der Thrombozytenaggregation quantifiziert werden und wird in Prozent (%) versus Kontrolle (100 %) angegeben.

4.2.10 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung vom Mittelwert (\pm SEM, engl.: standard error of the mean) ausgedrückt. Zum Vergleich der vasodilatatorischen Potenz und Effizienz der verschiedenen Testsubstanzen wurde der Two-way ANOVA (engl.: Analysis of variance) unter Zuhilfenahme der *Bonferroni*- oder *Dunn*-Korrektur für multiples Testen verwendet. Zum Vergleichen der mithilfe der Chemilumineszenz und Fluoreszenz gemessenen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, der gemessenen Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion, der Proteinkonzentrationen ermittelt im Westernblot und der Messung von in vivo Blutungszeit und der humanen Plättchenaggregation wurde der One-way ANOVA benutzt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Signifikante Werte wurden in den Diagrammen und Tabellen mit dem Symbol *, #, \$ oder & gekennzeichnet, je nachdem, mit welcher Gruppe jeweils verglichen wurde.

5 Ergebnisse

5.1 CLC-3000- Ein neues Hybridnitrat-Molekül mit Pioglitazon

Durch die kovalente Bindung des Linkers CLC-1275 (Chloromethyl 2-(nitrooxy)-ethyl-carbamate) an den PPAR- γ -Rezeptor-Agonisten Pioglitazon entsteht ein neues Molekül: CLC-3000, ein Pioglitazonmononitrat. Das Linkermolekül CLC-1275 ist charakterisiert durch seine Funktion als schneller Donator von Stickstoffmonoxid (NO). Seine Carbamatstruktur wird durch Hydrolyse in den Zellen gespalten, wodurch das Nitrat AEN freigesetzt wird. Dieses setzt wiederum nach Bioaktivierung NO frei. Durch Kopplung des Linkers an das Thiazolidindion Pioglitazon entsteht das Hybridmolekül CLC-3000, das die Funktion organischer Nitrate mit der insulinsensitivierenden und vasoprotektiven Wirkung von Pioglitazon am PPAR γ -Rezeptor verbindet. AEN besitzt deutlich potentere vasodilatatorische Eigenschaften als die bekannten organischen Mononitrate (228).

5.2 Gefäßfunktion

In isometrischen Tonusstudien konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Wirkung von verschiedenen Substanzen auf aus Versuchstieren isolierte Aortensegmente quantifiziert werden. Die Ergebnisse der Versuche werden als Konzentrations-Relaxations-Kurve im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt.

5.2.1 Vasodilatatorische Eigenschaften des Hybridmoleküls CLC-3000, des Linkers CLC-1275 und der Zielstruktur Pioglitazon *in vitro*

Der detaillierte Versuchsaufbau ist in 4.2.4 beschrieben. Zusätzlich zu den oben genannten Testkomponenten wurde auch ISDN als Vergleichssubstanz bezüglich seiner vasodilatatorischen Eigenschaften untersucht. Die einzelnen Testkomponenten wurden in halb-logarithmischen Schritten dem Organbad zugegeben, nachdem die Aortenringe mit Phenylephrin (PE) vorgespannt worden waren, und der Tonus der Ringe kontinuierlich gemessen. Die Konzentrations-Relaxations-Kurven der untersuchten Testkomponenten sind in Abbildung 20 gezeigt. Die höchste vasodilatatorische Potenz (pD_2) zeigte sich bei der Linkersubstanz CLC-1275, die durch Hydrolyse den potenten Vasodilatator AEN freisetzt, und einen pD_2 -Wert von 6 aufwies, wobei der pD_2 -Wert den negativen Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz beschreibt, die eine Vasodilatation von 50 % bewirkt. CLC-3000 zeigte nur einen geringfügig niedrigeren pD_2 von 5,8. Pioglitazon dagegen konnte maximal eine Vasodilatation von 60 % bei einer

maximal eingesetzten Konzentration von 330 μM ($10^{-4,5}$ M) bewirken. Die Untersuchung wurde an demselben tierischen Material erneut durchgeführt. Abbildung 20b zeigt die entsprechenden Konzentrations-Relaxations-Kurven zusammen mit denen der ersten Behandlung. Beim erneuten Versetzen mit CLC-1275 und Pioglitazon sowie ISDN zeigten die Aortenringe nahezu das gleiche Verhalten wie im ersten Versuch. Es ist anzunehmen, dass die Testsubstanzen zu keiner Entwicklung einer *in vitro* Toleranz (Tachyphylaxie) führen. Dagegen zeigte die Konzentrations-Relaxations-Kurve unter CLC-3000 eine deutlich andere Form als in der ersten Behandlung. Bis zu einer Konzentration von $\log -5,5$ zeigte sich keinerlei vasodilatatorische Wirkung. Bei weiterer Steigerung der Konzentration erfolgte dann eine nahezu lineare Zunahme der Vasodilatation bis zu einer Konzentration von $\log -3,5$, wobei hier ebenfalls die maximale Dilatation erreicht worden ist.

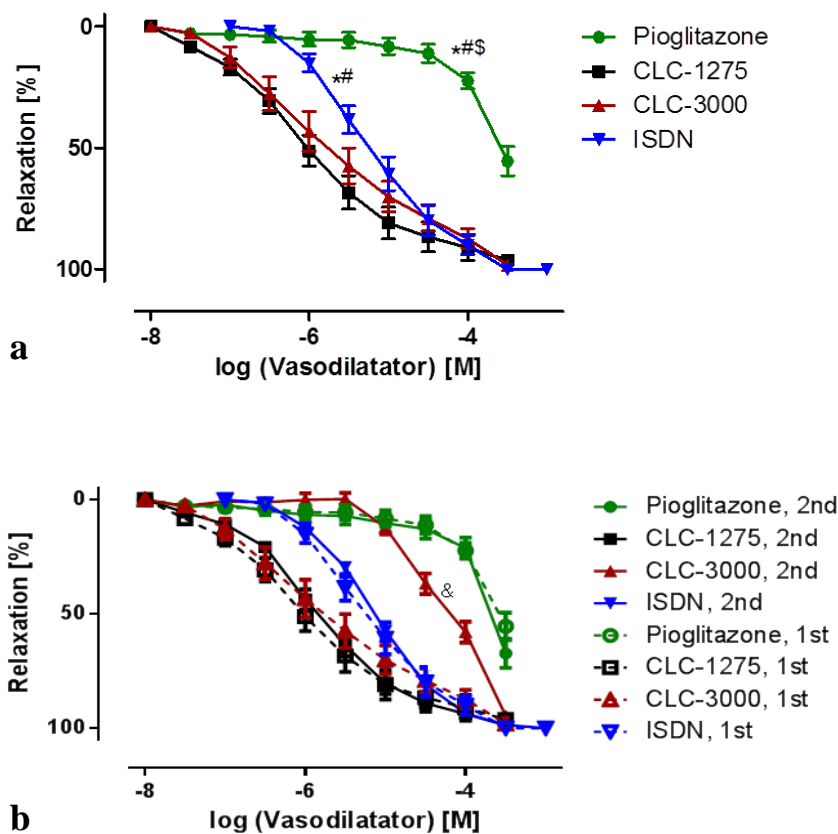


Abbildung 20: Vasodilatatorische Eigenschaften des Hybridmoleküls CLC- 3000, CLC-1275, Pioglitazon und ISDN *in vitro*

*Im Organbad wurde die Endothelfunktion unter *in vitro*-Anwendung der Testsubstanzen an mit PE vorkontrahierten Aortensegmenten von Ratten untersucht.*

*Mittelwert \pm SEM von 8-12 Tieren. * $p < 0,05$ vs. CLC-1275; # $p < 0,05$ vs. CLC-3000; \$ $p < 0,05$ vs. ISDN. **a)** Konzentrations-Relaxations-Kurven nach erster Behandlung mit den Testsubstanzen. **b)** Konzentrations-Relaxations-Kurven nach nochmaliger zweiter Behandlung mit den Testsubstanzen.*

5.2.2 Vasodilatatorische Eigenschaften des Hybridmoleküls CLC-3000 in vivo

Nachdem Versuchstiere über sieben Tage lang mit CLC-3000 behandelt worden waren, wurden die Aortenringe jener Tiere im Organbad auf ihre Gefäßfunktion untersucht. Für die genaue Versuchsanordnung siehe 4.2.4. Die Konzentrations-Relaxations-Kurven der entsprechenden Gruppen sind in Abbildung 21 gezeigt.

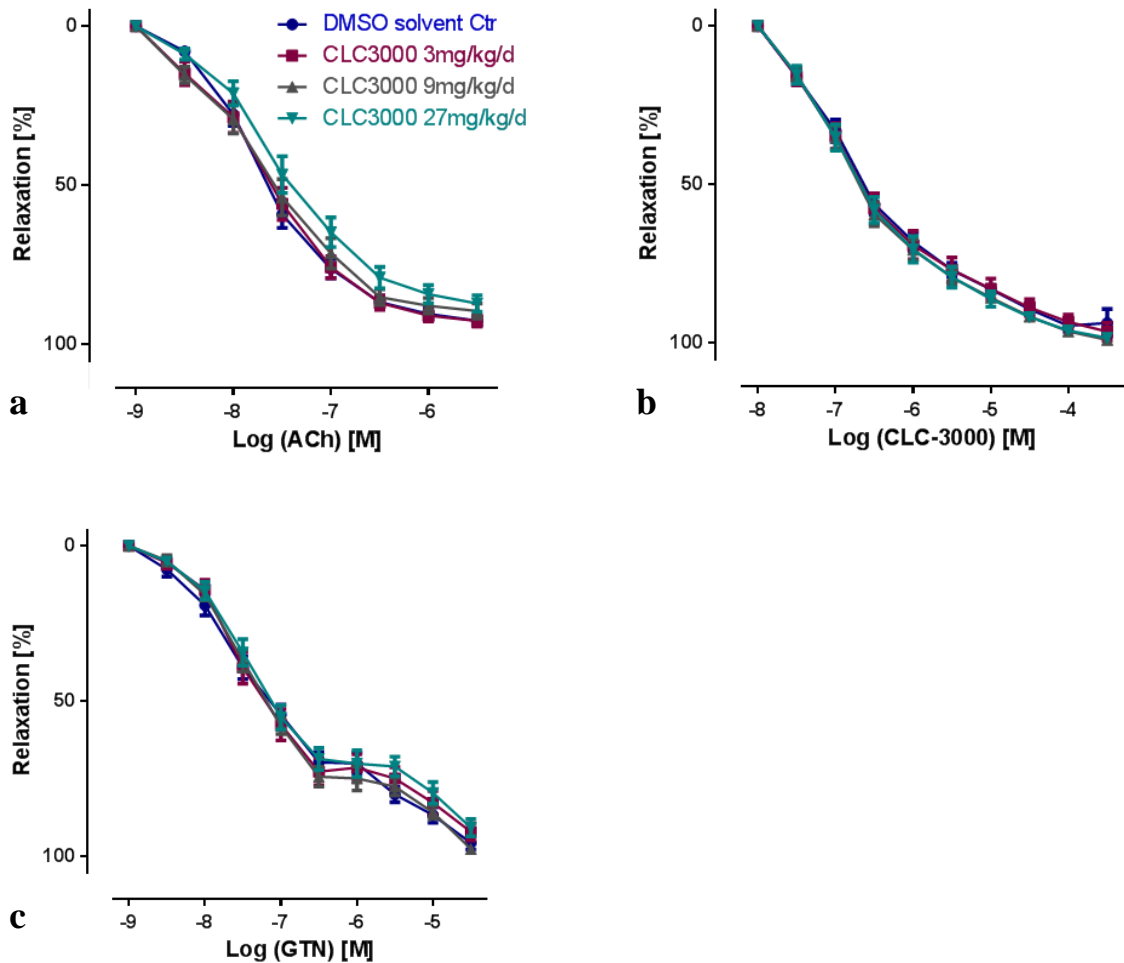


Abbildung 21: Vasodilatatorische Potenz des Hybridmoleküls CLC-3000, ACh und GTN nach sieben-tägiger in vivo Behandlung von Ratten mit der Testsubstanz in unterschiedlicher Dosierung

Im Organbad wurde die Endothelfunktion von mit PE vorkontrahierten Aortensegmenten von Ratten nach in vivo Anwendung der Testsubstanzen untersucht.

Mittelwert \pm SEM von 17-25 Tieren. Keine signifikanten Unterschiede. **a)** Erste Behandlung: ACh zur Untersuchung der endothelabhängigen Relaxation. **b)** Zweite Behandlung: CLC-3000 zur Untersuchung der Relaxation durch CLC-3000 selbst. **c)** Dritte Behandlung: GTN zur Untersuchung der endothelunabhängigen Relaxation.

Es zeigten sich keine Unterschiede in der endothelabhängigen (ACh) und in der endothelunabhängigen (GTN, CLC-3000) Gefäßreaktion (Dilatation) zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppen. Lediglich bei der Reaktion auf Acetylcholin konnte in der Dosis-Wirkungskurve der mit CLC-3000 in der höchsten Versuchskonzentration behandelten Gruppe (27 mg/kgKG/Tag) eine diskrete Rechtsverlagerung beobachtet werden, die aber nicht signifikant war. Die in vivo Behandlung mit CLC-3000 scheint also keine in vivo Toleranzentwicklung (echte klinische Toleranz) hervorzurufen bezüglich der Endothelreaktion auf CLC-3000, andere organische Nitrate sowie einer Stimulation mit Acetylcholin, also auch keine Kreuztoleranz und endotheliale Dysfunktion.

5.2.3 Effekte der Testsubstanzen auf die durch Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion in vitro und in vivo

Nitrattoleranz zeigt sich unter anderem in einer Zunahme der Vasokonstriktion durch PE nach Behandlung mit einem Nitrat. Diesbezüglich ist vor allem GTN gut untersucht. Nach einer dreitägigen in vivo Behandlung mit GTN konnte bei isolierten Aortenringen eine stärkere Reagibilität auf PE im Sinne einer stärkeren Vasokonstriktion beobachtet werden als bei unbehandelten Tieren (272), vermutlich unter anderem durch Mechanismen der „Pseudotoleranz“ wie vermehrte Aktivität des Endothelin-1 Signalweges und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Für die Untersuchung der der neuen Substanz bezüglich ihrer Induktion einer Nitrattoleranz wurde die durch PE induzierte Vasokonstriktion vor und nach der in vitro Behandlung mit CLC-3000, CLC-1275, Pioglitazon und ISDN gemessen sowie nach in vivo Behandlung mit CLC-3000 in verschiedenen Dosierungen. Abbildung 22a zeigt den durch PE hervorgerufenen Tonus der Aortenringe vor und nach dem ersten Versetzen mit den Testsubstanzen in vitro. CLC-3000 bewirkte eine Reduktion der induzierbaren Spannung um fast 80 % im Vergleich zur ersten Konzentrations-Relaxations-Kurve. Pioglitazon zeigte eine moderate Abnahme um 60 %, während bei dem Linker CLC-1275 kein Effekt nachgewiesen werden konnte. Nach in vivo Therapie mit dem neuen Hybridnitrat in unterschiedlichen Dosierungen über sieben Tage wurde ebenfalls die durch PE-induzierbare Vasokonstriktion in Aortensegmenten bestimmt, bevor sie zuerst mit Acetylcholin und dann anschließend mit CLC-3000 in vitro versetzt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22b dargestellt. Keine Zunahme der induzierbaren Vasokonstriktion konnte festgestellt werden. In den unterschiedlichen Versuchsgruppen sowie der Kontrollgruppe betrug die Spannung vor und nach in vitro Behandlung mit

Acetylcholin etwa 2 g. Das lässt annehmen, dass keine Nitrattoleranz oder Kreuztoleranz durch CLC-3000 verursacht wird.

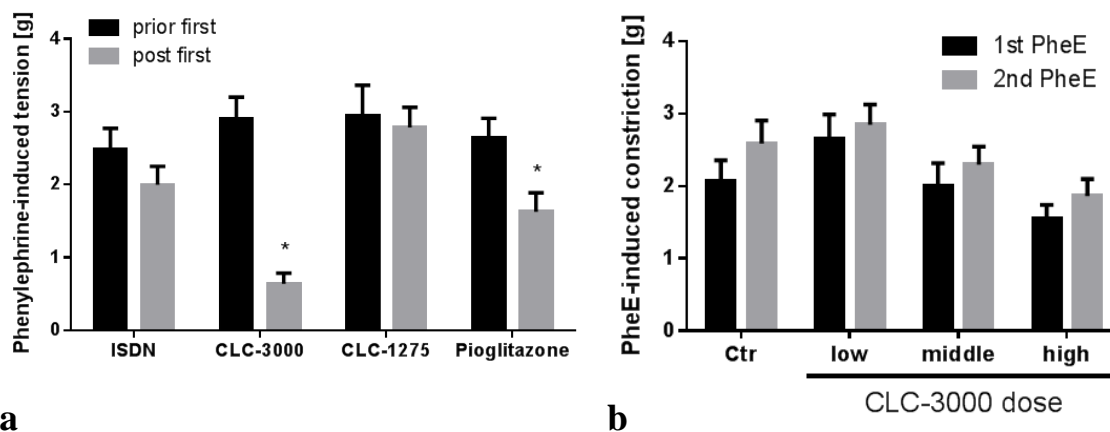


Abbildung 22: Effekte der Testsubstanzen auf die durch Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion in vitro und in vivo

Mittelwert \pm SEM von 12 (a) und 20 (b) Aortensegmenten. * $p < 0,05$ vs. PE-induzierte Spannung vor Erhebung der ersten Konzentrations-Relaxations-Kurve. **a**) Vor der ersten und vor der zweiten Bestimmung der Konzentrations-Relaxations-Kurven von ISDN, CLC-3000, CLC-1275 und Pioglitazon in vitro (maximale Konzentrationen wie in Abbildung 20 gezeigt). **b**) Nach in vivo Behandlung mit CLC-3000 in verschiedenen Dosierungen, vor der ersten (ACh) und vor der zweiten (CLC-3000) Bestimmung der Konzentrations-Relaxations-Kurven (in vivo Dosen wie in Abbildung 21 angegeben).

5.3 Induktion von oxidativem Stress

5.3.1 Induktion von oxidativem Stress in Mitochondrien kardialen Gewebes durch Testsubstanzen in vitro

Oxidativer Stress ist mit der Nitrattoleranz assoziiert. Er wurde als ein Phänomen erkannt, das einerseits aus der Nitrattoleranz resultiert und andererseits gleichzeitig zur selbigen führt (13, 273). Im Rahmen unserer Untersuchung wurden Mitochondrien aus tierischem Myokardgewebe isoliert und in vitro mit GTN, Pioglitazon, CLC-1275 und CLC-3000 versetzt und die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies mithilfe des Chemilumineszenzfarbstoffes L-012, der, unter Hinzugabe von Succinat, die induzierte mitochondriale RONS Bildung detektiert, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gemessen. In Abbildung 23 sind die detektierten RONS ausgedrückt in counts/30 sek nach 5 beziehungsweise 20 Minuten Inkubation gezeigt. GTN zeigte in Konzentrationen von 10 beziehungsweise 100 μ M keine oder eine geringe Zunahme der RONS Bildung nach 5 Minuten, jedoch nach 20 Minuten keine erhöhte

RONS Bildung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei hohen Konzentrationen dagegen konnte nach fünf Minuten Inkubation ein Anstieg der RONS Bildung um das Vierfache der Kontrollgruppe beobachtet werden, und nach 20 Minuten immerhin eine ca. 50 % Steigerung. Das Hybridnitrat CLC-3000 und der Linker CLC-1275 zeigten zunächst nach fünf Minuten in niedriger Konzentration beide keinen signifikanten Effekt auf die RONS Produktion. Nur in der höchsten verwendeten Konzentration konnte ein moderater Anstieg bereits nach 5 Minuten gemessen werden, wobei nur CLC-1275 eine deutliche Steigerung um 100 % aufwies. In den Messungen nach 20 Minuten Inkubation zeigten beide eine deutliche konzentrationsabhängige Steigerung der RONS Produktion verglichen zu den Kontrollen. Pioglitazon allein zeigte unter Konzentrationen von 100-1000 μM einen eher geringfügigen Anstieg des gemessenen oxidativen Stresses.

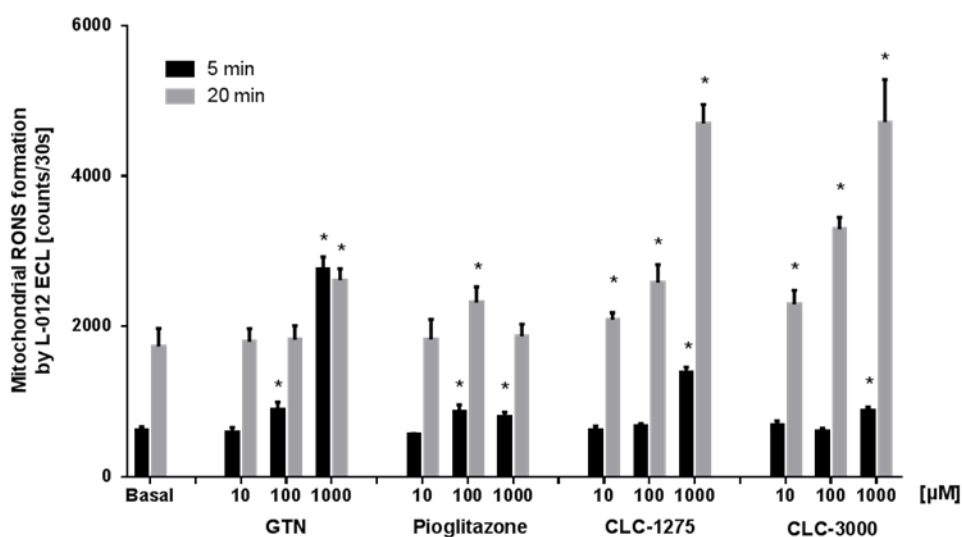


Abbildung 23: RONS- Bildung in isolierten kardialen Mitochondrien unter in vitro Inkubation mit Testsubstanzen

Mithilfe eines Chemilumineszenz-Assays mit dem Farbstoff L-012 wurde die Entstehung von oxidativem Stress unter Inkubation mit GTN, Pioglitazon, CLC-1275 und CLC-3000 in verschiedenen Konzentrationen ($\mu\text{mol/l}$) nach 5 und 20 Minuten gemessen.

Mittelwert \pm SEM von 6 unabhängigen Messungen pro Gruppe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle in der jeweiligen Gruppe 5 bzw. 20 min.

5.3.2 Oxidativer Stress in kardialen Mitochondrien nach in vivo Behandlung

Auch nach siebentägiger in vivo Behandlung der Versuchsratten mit dem neuen Hybridnitrat CLC-3000 in unterschiedlichen Dosen wurde die Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies in kardialen Mitochondrien mithilfe des Chemilumineszenzfarbstoffes L-012 untersucht. Wie Abbildung 24 zeigt konnte weder in niedriger noch in hoher Dosierung ein signifikanter Anstieg der detektierten mitochondrialen RONS festgestellt werden. In höchster

Konzentration der Substanz zeigte sich sogar die Tendenz einer verminderten Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen.

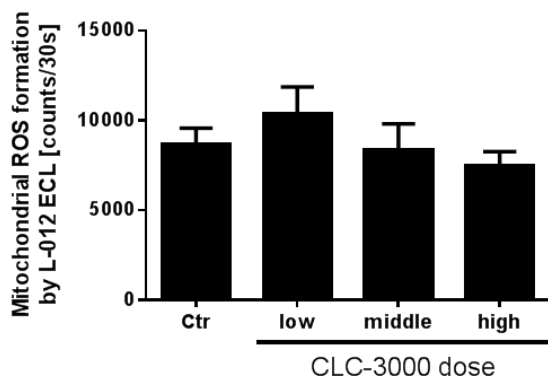


Abbildung 24: RONS-Bildung in kardialen Mitochondrien nach in vivo Behandlung mit CLC-3000

Nach siebentägiger Behandlung mit dem Hybridnitrat CLC-3000 in verschiedenen Dosierungen wurden mithilfe eines Chemilumineszenz-Assays mit dem Farbstoff L-012 die Bildung von RONS in isolierten Mitochondrien aus kardialem Gewebe von behandelten Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren gemessen.

Mittelwerte \pm SEM von 5 Ratten pro Gruppe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.3.3 Superoxidproduktion durch die NADPH-Oxidase im Myokard

Das Enzym NADPH-Oxidase spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Sauerstoffradikalen in Gefäßzellen tierischen Gewebes (274). Es ist gezeigt worden, dass GTN über die Aktivierung des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) unter anderem eine Induktion der NADPH-Oxidase bewirkt, wodurch die Superoxidproduktion zunimmt (275). Diese Aktivierung wird verantwortlich gemacht für die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion bei Auftreten der Nitrattoleranz nach in vivo Behandlung mit organischen Nitraten wie GTN (276). So wurden von Versuchstieren nach siebentägiger in vivo Behandlung mit CLC-3000 in verschiedenen Dosierungen kardiale Membranfraktionen isoliert und mithilfe der Chemilumineszenz und dem Farbstoff Lucigenin auch die Superoxidproduktion durch die NADPH-Oxidase gemessen. Außerdem wurde die Entstehung von Wasserstoffperoxid untersucht, das durch Reaktion zweier Superoxidradikale (Dismutation zu H_2O_2 und O_2) entsteht, indem das emittierte Licht aus der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Luminol und Meerrettichperoxidase (HRP) quantifiziert wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe konnte keine signifikante Zunahme des produzierten Superoxids und

Wasserstoffperoxids festgestellt werden. Dagegen zeigte sich sogar eine leichte, aber ebenfalls nicht signifikante, dosisabhängige Verminderung.

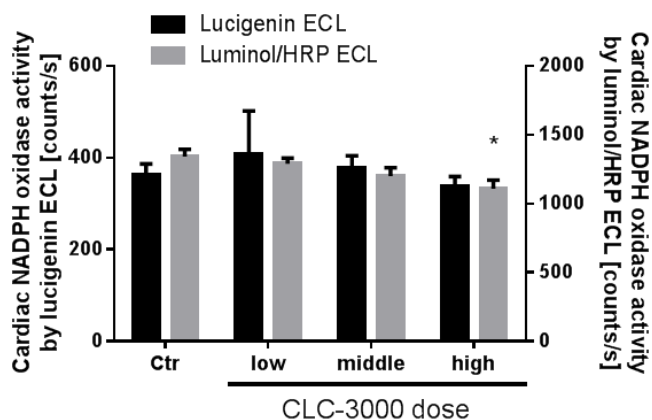


Abbildung 25: Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid durch die kardiale NADPH-Oxidase
Über die Reaktion von Superoxid mit dem Farbstoff Lucigenin und von Wasserstoffperoxid mit Luminol unter Katalyse der Meerrettichperoxidase (HRP) wurden mithilfe der Chemilumineszenz die Bildung von ROS in kardialen Membranfraktionen nach siebentägiger *in vivo* Behandlung mit CLC-3000 in unterschiedlicher Dosierung untersucht.
Mittelwerte \pm SEM von 5 Ratten pro Gruppe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.3.4 Messung der mitochondrialen ALDH-Aktivität mittels HPLC

Hierzu werden aus kardialem Gewebe der Versuchstiere Mitochondrienfraktionen isoliert und mithilfe der HPLC die Produktion von Benzoesäure aus 2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd durch Detektion von dabei entstehenden Lichtquanten gemessen. Da die ALDH-2 oxidationsempfindlich ist, wird seine Aktivität durch RONS inaktiviert (277). In Abbildung 26 ist der Einfluss verschiedener Nitrate auf die ALDH-2-Aktivität im Vergleich zu einer Kontrollgruppe in einem Säulendiagramm sowie das entsprechende Chromatogramm gezeigt. AEN, als wirksame Nitratkomponente im Hybrid CLC-3000 zeigte eine signifikante Hemmung der ALDH-2 im Vergleich zur Kontrolle erst bei Konzentrationen von 1 mM. Hier fiel die Hemmung allerdings immernoch deutlich milder aus als unter entsprechenden Konzentrationen von GTN oder ISDN. In Konzentrationen von 10 und 100 μ M konnte keine signifikante Verminderung der ALDH-2-Aktivität durch AEN im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Dagegen wird das Enzym durch GTN fast vollständig und durch ISDN merklich bereits bei einer Konzentration von 10 μ M in seiner Aktivität inhibiert.

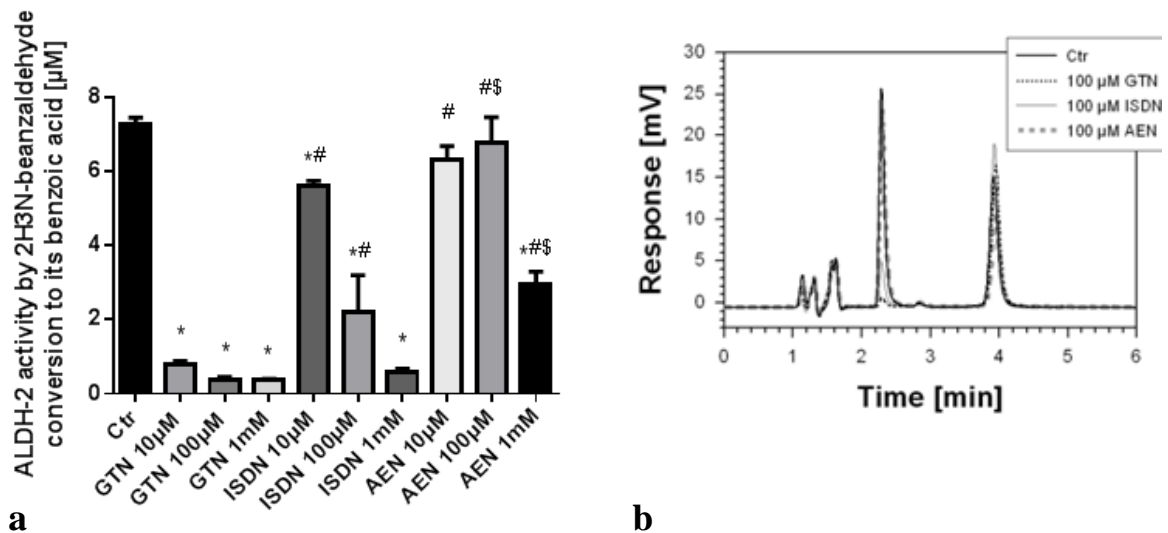


Abbildung 26: ALDH-2-Aktivität in kardialen Mitochondrien

Mithilfe der Messung Umsetzung von 2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd zum Benzoesäure-Produkt mittels HPLC wurde die ALDH-2-Aktivität unter in vitro Versetzen mit verschiedenen organischen Nitrat in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht.

a) Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Messungen pro Gruppe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. entsprechender GTN-Gruppe, § $p < 0,05$ vs. entsprechender ISDN-Gruppe. **b)** entsprechendes Chromatogramm für Konzentrationen von 100µmol/l.

5.3.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in Aortagewebe mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Dihydroethidin (DHE) kann die Bildung von Superoxid in situ sichtbar gemacht werden, wobei Superoxid intrazellulär zur Oxidation von DHE zu 2-Hydroxyethidium führt. Dieses emittiert rotes Licht. Allerdings gibt es auch unspezifische DHE Oxidationsprodukte, die ebenfalls rote Fluoreszenz zeigen. Die Basallaminae erscheinen in der Fluoreszenzmikroskopie durch ihre Autofluoreszenz grün. Es wurde aortales Gewebe von Versuchsratten gewonnen, die 7 Tage lang mit unterschiedlichen Dosen CLC-3000 behandelt worden waren. In Abbildung 27 sind die densitometrische Bestimmung und die repräsentativen mikroskopischen Bilder der verschiedenen Testgruppen gezeigt. Es konnte bei den behandelten Tieren nahezu kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Lediglich die Gruppe, die mit der mittleren Dosierung behandelt worden war, zeigte einen leichten Anstieg der Fluoreszenz von 20 %.

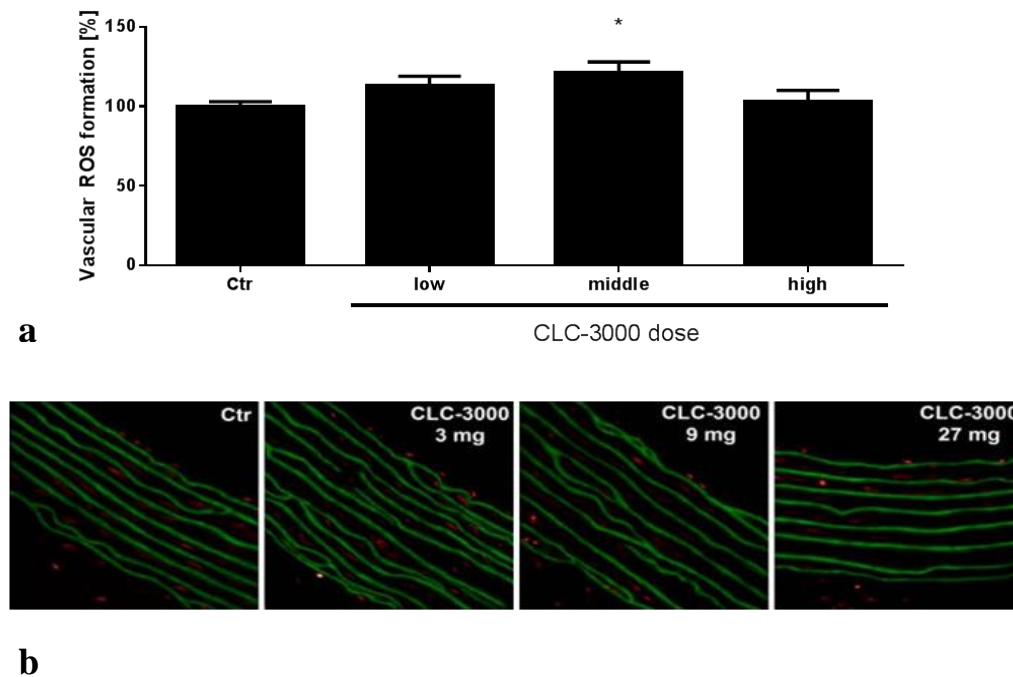


Abbildung 27: Topographischer Nachweis von RONS in Aortagewebe mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Untersuchung der RONS-Bildung in Kryoschnitten aortalen Gewebes nach siebentägiger *in vivo* Behandlung mit CLC-3000 in verschiedenen Dosierungen. **a)** Densitometrische Quantifizierungen der Fluoreszenzmikroskopie; Mittelwerte \pm SEM von 21-25 unabhängigen Messungen. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. **b)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von aortalen Kryoschnitten. Rote Fluoreszenz weist auf RONS Produktion hin, während die grüne Autofluoreszenz von den Basallaminae stammt.

5.4 NADPH-Oxidase und antioxidative Enzyme: Analyse der Expression vasculärer Proteine mit Western Blot

Um die Potenz des neuen Hybridnitrates, oxidativen Stress zu induzieren, zu untersuchen, ist es außerdem möglich die Expression verschiedener Proteine in aortalem Gewebe zu quantifizieren, die bei der Entstehung von oxidativ reaktiven Verbindungen mitwirken beziehungsweise an der Gegenregulation teilnehmen. Bezüglich ihrer Expression konnte bei allen untersuchten Enzymen kein Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Bei den *in vivo* mit dem Hybridnitrat behandelten Tieren zeigte sich sogar dosisabhängig eine verminderte Expression der Proteine (Abbildung 28). Die Ergebnisse sprechen deutlich gegen die Induktion von oxidativem Stress unter CLC-3000 *in vivo* Therapie.

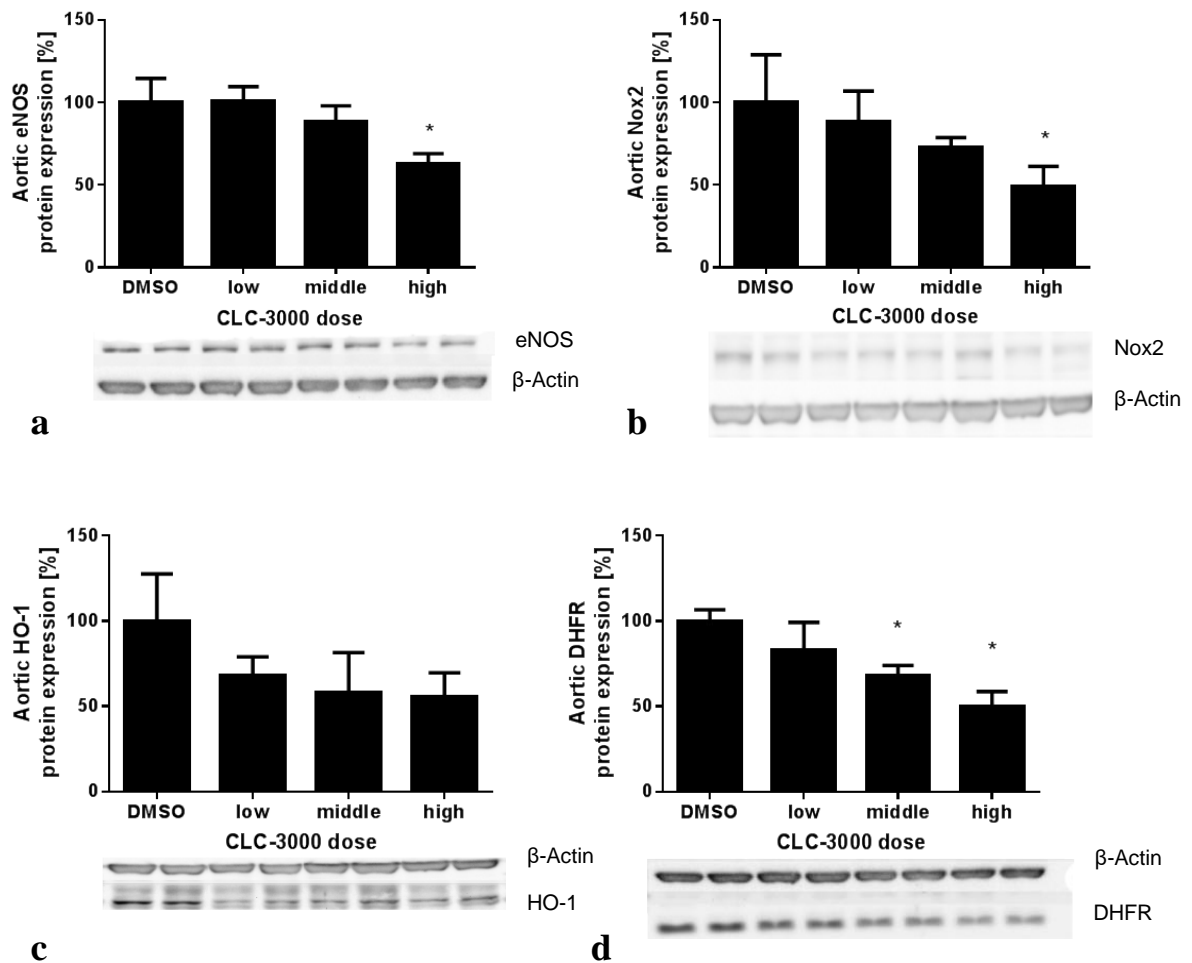


Abbildung 28: Auswirkungen von CLC-3000 auf die Expression von eNOS, Nox2, HO-1 und DHFR in aortalem Gewebe

Western Blot Analyse der Proteinexpression von **a)** eNOS, **b)** Nox2, **c)** Häm-Oxygenase (HO-1) und **d)** Dihydrofolatreduktase (DHFR) in Aortengewebe von Ratten nach siebentägiger *in vivo* Behandlung mit CLC-3000 in unterschiedlicher Dosierung. Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern nach SDS-Page. Repräsentative Blots sind unter der densitometrischen Quantifizierung gezeigt. Mittelwerte \pm SEM aortales Protein von 3-5 Ratten pro Gruppe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.5 Effekte auf die Hämostase

Es wurden die *in vivo* Blutungszeit nach kurzfristiger und chronischer Behandlung mit organischen Nitraten untersucht, sowie das endogene Thrombinpotenzial (ETP) und die durch ADP induzierte Plättchenaggregation in thrombozytenreichem humanem Plasma. Die erhobenen Parameter der Plättchenaggregation und Koagulabilität zeigten keine Hinweise auf eine prothrombotische Neigung unter *in vivo* und *in vitro* Behandlung mit Linkermolekülen beziehungsweise Derivaten organischer Nitrate. Es konnten dagegen teils antiaggregatorische Effekte nachgewiesen werden.

5.5.1 Blutungszeit

Bei der Untersuchung der Blutungszeit in C57BL/6 Mäusen konnte nach kurzfristiger und chronischer Therapie mit AEN und ISMN im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine signifikante Verlängerung der Blutungszeit. Dies zeigt zum einen, dass AEN bei akuter Gabe schnell genug metabolisiert wird, um ausreichende Mengen NO freizusetzen, um die Plättchenaggregation zu unterdrücken, was sich in der längeren Blutungszeit niederschlägt. Bei chronischer Therapie mit AEN zeigt die Aufrechterhaltung dieser verlängerten Blutungszeit, dass keine Toleranz hinsichtlich der NO Freisetzung durch AEN zu beobachten ist, d.h. die Bioaktivierung und Potenz von AEN bleibt auch bei chronischer Therapie erhalten. Unter ISMN konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl bei kurzfristiger als auch chronischer Behandlung lediglich eine Tendenz zur Verlängerung der Blutungszeit festgestellt werden (Abbildung 29).

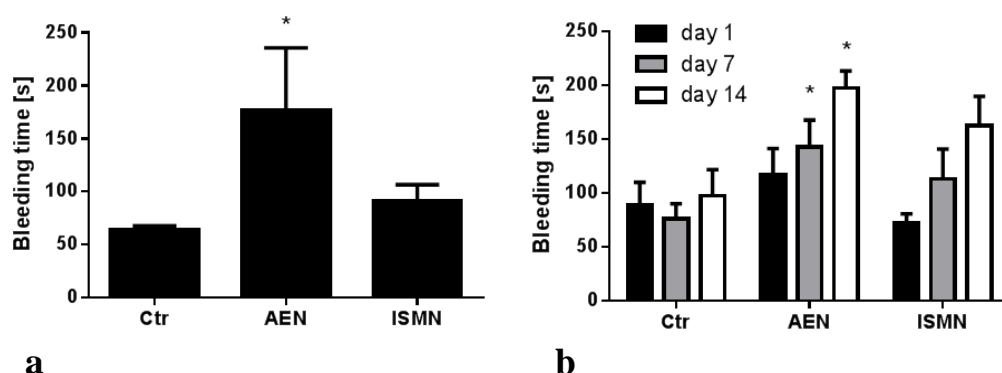


Abbildung 29: Blutungszeit nach kurzfristiger und langfristiger Behandlung mit AEN und ISMN

Auswirkungen von **a)** als Bolus intraperitoneal appliziertem AEN und ISMN (100 µg/Maus) und **b)** chronisch im Trinkwasser verabreichtem AEN und ISMN (9 mg/kg/Tag) auf die Blutungszeit der Schwanzvene von Mäusen gemessen **a)** 30 min. nach Injektion bzw. **b)** nach 1, 7 oder 14 Tagen oraler Verabreichung im Trinkwasser.

Mittelwerte \pm SEM von **a)** 4 bzw. **b)** 4-5 Mäusen pro Gruppe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5.5.2 Plättchenabhängige Thrombinproduktion

Das endogene Thrombinpotenzial (ETP) lässt Rückschlüsse auf die koagulatorische Potenz im Gerinnungssystem zu (271). Es zeigte sich nach Behandlung mit ISMN und AEN über 14 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied im gemessenen ETP. Nach AEN Behandlung konnte der leichte Trend einer Abnahme des Parameters festgestellt werden (Abbildung 30a).

5.5.3 Thrombozytenaggregation induziert durch ADP in humanem thrombozytenreichem Plasma

In humanem thrombozytenreichem Plasma, das aus Vollblut von gesunden, freiwilligen Spendern gewonnen worden war, wurde die Thrombozytenaggregation unter in vitro Versetzen mit ISMN, GTN, AEN, Diethylamin Diazoniumdiolat (DEA/NONOat), Nitroprusidnatrium (SNP) sowie CLC-1275 und CLC-3000 bestimmt. Die Ergebnisse sind ausgedrückt in Prozent der mitgeführten Kontrolle, die als 100 % festgesetzt wurde (Abbildung 30b). Die direkten Nitrovasodilatoren DEA/NONOat und SNP, die keine Bioaktivierung benötigen sondern NO spontan freisetzen, zeigten bereits bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ deutliche antiaggregatorische Eigenschaften, während GTN bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ und AEN und CLC-1275 bei 1 mmol/l ähnliche Effekte zeigten. CLC-3000 und ISMN bewirkten ab Konzentrationen >1 mmol/l potente Antiaggregation.

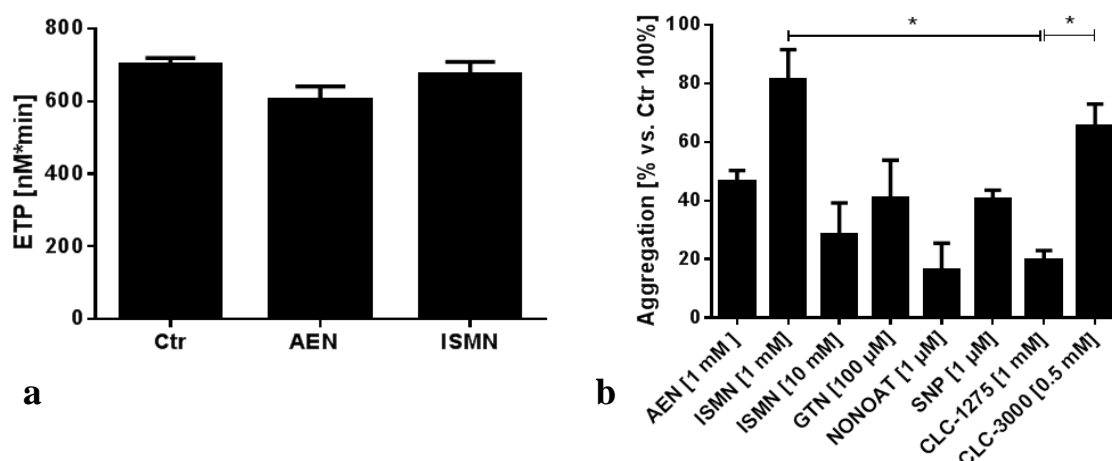


Abbildung 30: Endogenes Thrombinpotenzial und ADP induzierte Thrombozytenaggregation unter verschiedenen Vasodilatoren

Auswirkungen von **a**) AEN und ISMN auf das ETP nach 14-tägiger oraler in vivo Therapie bzw. von **b**) verschiedenen Vasodilatoren in vitro auf die durch ADP (2 $\mu\text{mol/l}$) induzierte Thrombozytenaggregation in humanem thrombozytenreichem Plasma in vitro.

Mittelwerte \pm SEM von **a**) 4 Mäusen/Gruppe bzw **b**) 3 unabhängigen Messungen bei 3 PRP-Proben von gesunden Probanden. * $p < 0,05$ vs. **a**) Kontrolle bzw. **b**) CLC-1275.

6 Diskussion

6.1 CLC-3000 als neues Hybridnitrat für Diabetiker mit KHK

Organische Nitrate gelten seit Langem als etablierte Therapeutika bei Angina pectoris unter KHK, aber auch bei chronischer Herzinsuffizienz und hypertensiver Entgleisung des arteriellen Blutdrucks. Ebenfalls seit Langem bekannt ist das Phänomen der Toleranzentwicklung gegenüber den hämodynamischen Effekten der Nitrate bei chronischer Anwendung, worauf in Kapitel 3.6 ausführlich eingegangen worden ist. Durch die Kombination einer Nitratfunktion mit der antidiabetischen Wirkung des PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon in einem Molekül sollte sich die protektive Effizienz verbessern und die negativen Nebenwirkungen wie Toleranzentwicklung vermindert werden. Gleichzeitig wurde mit CLC-1275 ein Linker verwendet, der das potente und nebenwirkungsarme Nitrat AEN freisetzt. *Schuhmacher et al.* konnten 2009 zeigen, dass AEN weder Toleranz noch Kreuztoleranz in vitro oder in vivo erzeugt (228). Allerdings haben sich die Hybridmoleküle in pharmazeutischen Formulierungen als chemisch instabil herausgestellt (persönliche Kommunikation mit Cardiolyntx), weshalb wir daraufhin in einer späteren Untersuchung die Kombination verschiedener Therapeutika in fester Dosis-Kombination mit AEN weiter untersucht haben (Abbildung 32) (278).

6.2 Einfluss auf die Gefäßfunktion

In erstmals durchgeführten in vitro Untersuchungen konnten wir zeigen, dass das neue Hybridmolekül CLC-3000 in seinen vasodilatatorischen Eigenschaften potenter wirkt als Pioglitazon allein. Pioglitazon konnte eine maximale Dilatation von 60 % erreichen. Das unterstützt die Annahme, dass, bevor oder nachdem die Carbamatstruktur im Pioglitazonmononitrat gespalten und der Linker CLC-1275 freigesetzt wird, *NO bioaktiviert wird und pharmakologisch wirken kann. CLC-3000 wies mit einem pD_2 -Wert von 5,8 nur eine leicht niedrigere vasodilatatorische Potenz auf als der Linker CLC-1275 selbst ($pD_2=6$). Die NO-Domäne scheint also leicht vom Hybridmolekül abgespalten zu werden und kann so ihre vasodilatatorische Wirkung entfalten. Um die Entwicklung einer in vitro Toleranz (Tachyphylaxie) zu untersuchen, wurden die Aortenringe nach dem Auswaschen der Substanzen ein zweites Mal mit den Testsubstanzen inkubiert. Zwischen dem Auswaschen und der erneuten Inkubation wurden die Aortenringe, wie auch schon vor der ersten Inkubation, mithilfe von Phenylephrin (PE) auf 50 % der Maximalspannung vorkontrahiert. Die durch PE induzierte Vasokonstriktion wurde quantifiziert und ebenfalls als Konzentrations-Wirkungs-Kurve dargestellt. Hierdurch sollte untersucht werden,

inwiefern die Vorbehandlung mit den Substanzen eine erhöhte Sensitivität auf Vasokonstriktoren zur Folge hat. Für Pioglitazon konnte eine signifikante Verminderung der Vasokonstriktion durch PE beobachtet werden. CLC-3000 dagegen bewirkte sogar eine Abnahme um 80 % im Vergleich zur ersten Dosis-Wirkungs-Kurve. Im Gegensatz dazu konnte in vorangegangenen Studien nach chronischer GTN-Therapie eine erhöhte Sensitivität für verschiedene Vasokonstriktoren wie PE oder KCl in vitro gezeigt werden (Abbildung 31). Der Proteinkinase C Inhibitor Calphostin C bewirkte eine Verminderung dieser erhöhten Sensitivität, was eine Rolle der PKC im Pathomechanismus der vasokonstriktorischen Neigung toleranter Gefäße wahrscheinlich macht (siehe Abbildung 31) (272) (siehe auch 3.6).

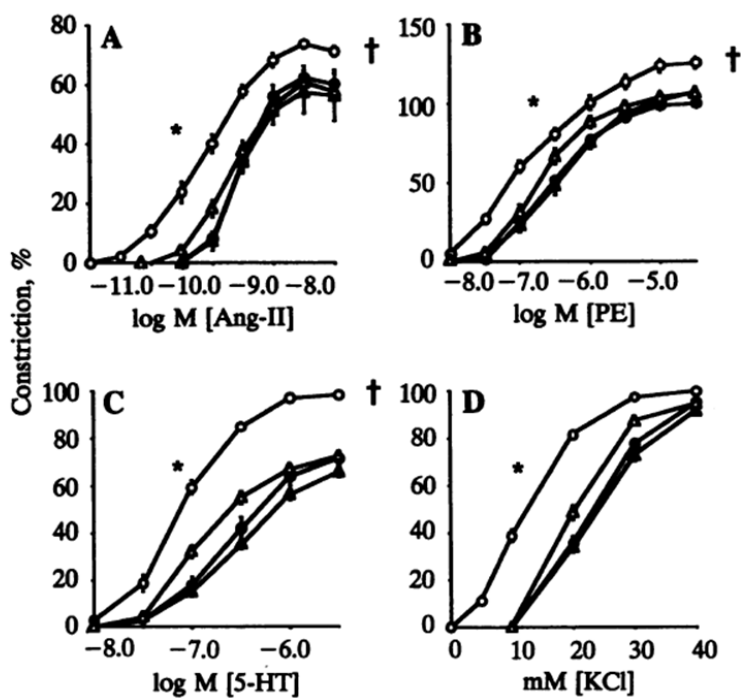


Abbildung 31: Auswirkungen einer dreitägigen GTN-Therapie auf die vasokonstriktorische Sensitivität von Gefäßsegmenten

Im Organbad wurden Konzentrations-Konstriktions-Kurven erhoben von Aortensegmenten von Ratten, die zuvor 3 Tage lang mit GTN behandelt worden waren und anschließend mit **A** Angiotensin II (ATII), **B** Phenylephrin (PE), **C** Serotonin (5-HT), **D** Kaliumchlorid (KCl) inkubiert wurden im Vergleich zu Kontrolltieren ohne in vivo Behandlung. Die Inkubation fand jeweils mit und ohne Zusatz von Calphostin C statt.

Mittelwert \pm SEM von 8-13 Messungen bzw. 5-7 Messungen bei Calphostin C. Nitrat-toleranz ist assoziiert mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber allen untersuchten Vasokonstriktoren und konnte durch Calphostin C beinahe vollständig ausgeglichen werden. ●: Kontrolle; ▲: Kontrolle + 10^{-7} M Calphostin C; ○: Nitrat-tolerant; △: Nitrat-tolerant + 10^{-7} M Calphostin C. * $EC_{50} p < 0,05$ vs. Kontrolle, † maximale Konstriktion $p < 0,05$ vs. Nitrat-tolerant. Abbildung aus (272)

Ein möglicher Mechanismus dieser hier beobachteten stark reduzierten Reaktion auf PE könnte sein, dass Reste des Hybridnitrats nicht ausreichend durch den Waschvorgang aus dem System

entfernt worden sind. CLC-3000 ist schwer löslich und könnte so anschließend bei der Reaktion auf PE interferiert haben. Andererseits wäre denkbar, dass Pioglitazonmononitrat langfristige vasodilatatorische beziehungsweise anti-vasokonstriktorische Wirkung besitzt, wodurch bei nachfolgender Inkubation mit PE dessen Wirkung abgeschwächt wird. Ein ähnliches Phänomen konnte auch in einer nachfolgenden Studie durch unsere Arbeitsgruppe beobachtet werden. Hier zeigte sich nach der *in vitro* Behandlung mit CLC-1011 (2-Aminoethylnitrat) sowie der Kombination aus Nitrat und Cilostazol ebenfalls eine Verminderung der PE-induzierten Vasokonstriktion im Vergleich zur Messung vor Behandlung mit denselben (Abbildung 32).

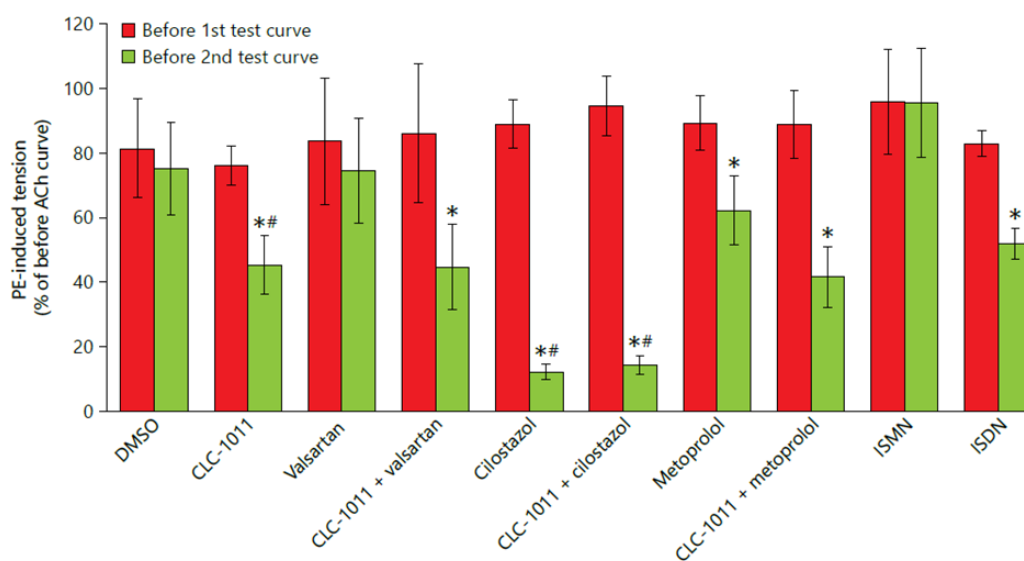


Abbildung 32: Auswirkung der Behandlung mit verschiedenen Vasodilatoren *in vitro* auf die anschließende PE-induzierte Vasokonstriktion

Gemessen wurde die durch PE induzierte Vasokonstriktion. Die erste Inkubation fand vor jeder Testung statt. Die zweite Inkubation mit PE fand nach der Behandlung mit Acetylcholin statt und die dritte Inkubation mit PE folgte der Behandlung der Aortenringe mit den hier gezeigten Testsubstanzen. CLC-1011 sowie Cilostazol und eine Kombination beider bewirkten (in der dritten Inkubation mit PE) eine signifikante Verminderung der PE-induzierten Konstriktion im Vergleich zur zweiten Inkubation mit PE.

Mittelwerte \pm SEM von 8-20 Aortenringen. * $p < 0,05$ vs. erster inkubation mit PE (vor Konzentrations-Relaxations-Kurve von Ach), # $p < 0,05$ vs. zweiter Inkubation mit PE (vor erster Konzentrations-Relaxations-Kurve von untersuchten Vasodilatoren). Abbildung aus (278).

Die zweiten Dosis-Wirkungs-Kurven von CLC-1275, Pioglitazon und ISDN zeigten eine nahezu identische Form zur ersten Behandlung, woraus geschlossen werden kann, dass hier keine *in vitro* Toleranz während der ersten Behandlung entwickelt wurde. CLC-3000 dagegen zeigte eine Kurve, die sich gänzlich in ihrer Form von der ersten unterscheidet. Es konnte zwar die maximale Vasodilatation unter einer Konzentration von log -3,5 erreicht werden, aber bis zu einer Konzentration von log -5,5 konnte keinerlei Dilatation beobachtet werden, es zeigte sich

also eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Relaxationskurve, die üblicherweise auf eine *in vitro* Toleranz (Tachyphylaxie) hindeutet. Weshalb während der zweiten Inkubation mit CLC-3000 ein so stark verändertes Ansprechen auf die Testsubstanz zu beobachten war, ist nicht eindeutig zu erklären. Eine typische Kurve bei Auftreten einer Toleranz würde lediglich eine Verschiebung nach rechts zeigen, aber ihre ursprüngliche Form behalten. *Wenzel et al.* zeigten 2007 neben einer um das Zehnfache reduzierten Vasodilatatorischen Potenz von GTN (ED_{50}) in GTN-toleranten Tieren außerdem, dass Dihydroliponsäure diesen Toleranzeffekt nahezu vollständig aufheben kann (Abbildung 33) (255).

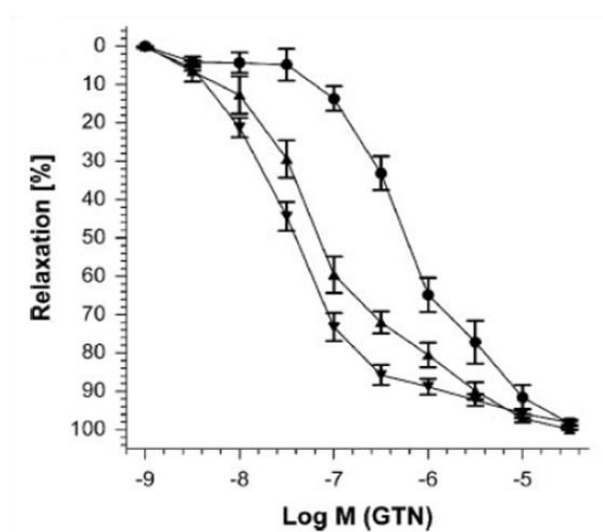


Abbildung 33: Effekt von chronischer GTN Therapie und Dihydroliponsäure auf die GTN-induzierte Relaxation *in vitro*

Konzentrations-Relaxations-Kurven unter Inkubation mit GTN (10^{-9} - $10^{-4.5}$ M) von aortalen Segmenten von Ratten, die zuvor 4 Tage lang mit Ethanol (▲) oder GTN in Ethanol (●) behandelt worden waren. Zusätzlich wurden Aortensegmente mit GTN in Ethanol behandelte Tiere zusammen mit Dihydroliponsäure/reduziertem Lipoamid ($100 \mu\text{M}$) inkubiert (▼).

Mittelwerte \pm SEM von 7-24 unabhängigen Versuchen. Abbildung aus (255).

Bei einer typischen „echten“ Nitrattoleranz würde außerdem eine vermehrte Vasokonstriktion durch PE zu erwarten sein wie unter anderem *Münzel et al.* 1994 zeigten (272). Wie oben erläutert, zeigte sich nach dem Versetzen mit CLC-3000 aber eine deutliche Reduktion der Vasokonstriktion durch PE. Auch die Tatsache, dass bis zu einer Konzentration von $\log -5,5$ gar kein Effekt zu beobachten war, lässt schlussfolgern, dass ein ganz anderes molekulares Geschehen zugrunde liegt als das der Nitrattoleranz.

In den *in vivo* Untersuchungen wurde CLC-3000 erstmals Wistar Ratten sieben Tage lang infundiert. Bei der Festlegung der Dosen (3 mg/kg/d, 9 mg/kg/d und 27 mg/kg/d) wurde die

maximale Dosis von Pioglitazon, die im Menschen empfohlen ist zur Grundlage genommen. Durch allometrische Skalierung wurde entsprechend eine Dosis von 2,6 mg/kg/d ermittelt. Die verwendete Formel, die die metabolische Rate berücksichtigt und die gesuchte Dosis ermittelt, lautet:

$$\text{Dosis}_2 = \text{Dosis}_1 \times (\text{Masse}_2^{3/4} / \text{Masse}_1^{3/4}),$$

wobei die Dosis in Milligramm und die Masse in Kilogramm angegeben wird. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen molaren Masse von CLC-3000 und Pioglitazon, ergab sich für die Versuchstiere eine äquivalente Dosis von 3,8 mg/kg/d CLC-3000. Die Staffelung der verwendeten Dosen deckt somit den therapeutischen Bereich sowie eine deutliche Sicherheitsspanne ab. Die höchste Dosierung entspricht etwa der siebenfachen empfohlenen Höchstdosis von Pioglitazon.

Bezüglich der Gefäßfunktion im Organbad konnten nach in vivo Therapie mit dem neuen Hybridnitrat nahezu keine Unterschiede in der vasodilatatorischen Funktion gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Lediglich in der high dose-Gruppe konnte eine Tendenz einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve beobachtet werden, die aber nicht signifikant war. Es bleibt zu bedenken, dass es sich in dieser Dosisgruppe (unter Berücksichtigung der allometrischen Skalierung und des Molekulargewichtes) um die mehr als siebenfache Dosis der entsprechenden empfohlenen Höchstdosis für Pioglitazon beim Menschen handelte. Es gibt demnach keine Hinweise darauf, dass durch chronische in vivo Therapie eine Toleranzentwicklung gegenüber CLC-3000 selbst, eine Kreuztoleranz gegenüber GTN oder eine Störung der endothelabhängigen Vasodilatation durch ACh entsteht.

6.3 Induktion von oxidativem Stress

Bei Diabetikern ist vermehrter oxidativer Stress ein entscheidender Mechanismus, über den eine vaskuläre Dysfunktion entsteht (279). Diese stellt die Vorstufe zur Atherosklerose, wie unter anderem bei der KHK, dar (98). Gleichzeitig kommt oxidativem Stress eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Nitrattoleranz zu, die den therapeutischen Einsatz der organischen Nitrate zur Behandlung der KHK limitiert (237). Diabetiker zeigen dementsprechend eine sogenannte Nitratresistenz, d.h. generell ein schlechteres Ansprechen auf organische Nitrate. Daher haben wir das entwickelte Hybridnitrat zur Behandlung von Diabetikern, die an KHK erkrankt sind, auf sein Potenzial, oxidativen Stress hervorzurufen, untersucht.

6.3.1 Mitochondrialer oxidativer Stress und Superoxidproduktion durch die NADPH-Oxidase

Neben der Kontrollgruppe sowie GTN als Vergleichssubstanz wurden Pioglitazon, CLC-1275 und CLC-3000 auf ihre Induktion von mitochondrialem oxidativem Stress *in vitro* untersucht. GTN zeigte in den niedrigen untersuchten Dosen nur eine gering erhöhte Menge von RONS via Chemilumineszenz. In Konzentrationen von 1000 μM dagegen konnten RONS Mengen von vierfacher Menge der Kontrollgruppe gemessen werden. Diese starke Zunahme des oxidativen Stresses durch GTN in hohen Dosen ist ein bekannter Effekt (242, 280). Unter dieser hohen Konzentration kam es bei GTN im Gegensatz zu den anderen untersuchten Substanzen nach 20 Minuten allerdings nicht zu einem weiteren Anstieg der Produktion von RONS. Dies legt nahe, dass der Entstehung von oxidativem Stress unter GTN ein anderer Mechanismus zugrunde liegt als der der anderen Testsubstanzen. Der Linker CLC-1275 sowie das Hybridmolekül CLC-3000 riefen nach 5 Minuten eine moderat erhöhte RONS-Bildung hervor, die nur in der höchsten Konzentration signifikant war. Nach 20 Minuten dagegen zeigten beide dosisabhängig eine massiv erhöhte Produktion oxidativen Stresses. Wie oben erläutert, wird aus CLC-3000 bzw. CLC-1275 durch Hydrolyse das Nitrat AEN freigesetzt. Dass die gemessenen erhöhten Mengen von RONS durch das wirksame Produkt AEN verursacht werden, ist eher unwahrscheinlich. *Schuhmacher et al.* haben bereits 2009 AEN bezüglich der mitochondrialen RONS-Produktion untersucht. Sie konnten weder *in vitro* noch *in vivo* eine Erhöhung im Vergleich zu Kontrollen beobachten (228) (Abbildung 34). Ein potentieller Grund für die erhöhten gemessenen RONS-Mengen nach 20 Minuten könnte sein, dass bei der Freisetzung des Linkers von der Komponente CLC-3000 als Nebenprodukt Ameisensäure frei wird (persönliche Korrespondenz mit den Chemikern von Cardiolyx). Bei der Hydrolyse der Carbamatstruktur im Hybridmolekül entstehen zwei Mol Ameisensäure (CH_2O_2) pro einem Mol freiem Linker. Da diese Reaktion *in vitro* abläuft und damit in einem geschlossenen System, kann die entstehende Ameisensäure akkumulieren. Es ist denkbar, dass diese für die erhöhte RONS-Produktion in den Mitochondrien verantwortlich ist.

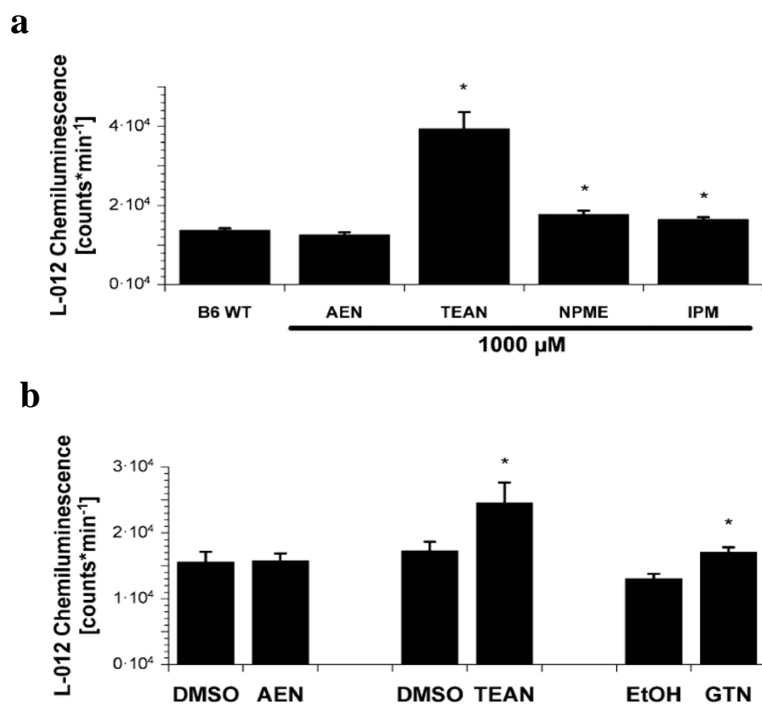


Abbildung 34: Einfluss von AEN und anderer organischer Nitrate in vitro und in vivo auf die mitochondriale RONS Produktion

RONS-Produktion in isolierten kardialen Mitochondrien von Mäusen **a**) bei in vitro Inkubation mit den organischen Nitraten 2-Nitrooxyethylammoniumnitrat (AEN), Triethanolamin Trinitrat (TEAN), Methyl-3-Nitrooxypropanoat (NPME) und Isopropylnitrat (IPM) (1000 μ M) im Vergleich zur Kontrollgruppe, **b**) nach dreitägiger in vivo Behandlung mit AEN, TEAN und GTN jeweils im Vergleich zu Kontrollen, die mit DMSO bzw. Ethanol (EtOH) behandelt wurden. Mittelwerte \pm SEM von **a**) 6-24 Versuchen (3-6 Tiere pro Gruppe), **b**) 24 Versuchen für AEN (mindestens 8 Tiere pro Gruppe) * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Abbildung aus (228).

Es wurde ebenfalls erstmals die mitochondriale RONS-Produktion nach siebentägiger in vivo Therapie untersucht. CLC-3000-Behandlung verursacht hiernach keine Erhöhung von mitochondrialem oxidativem Stress. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den oben erwähnten vorangegangenen Untersuchungen des wirksamen Metaboliten AEN (228) (Abbildung 34b).

Weiterhin wurde nach in vivo Therapie mit der neuen Substanz erstmals die Synthese von Superoxid oder Wasserstoffperoxid als Produkt der Reaktion zweier Superoxid-Moleküle in Membranfraktionen gemessen. Es zeigten sich keinerlei Hinweise auf eine Induktion der NADPH-Oxidase, die als verantwortliche Superoxidquelle unter Nitrattoleranz beziehungsweise GTN-induzierter endothelialer Dysfunktion gilt (276), durch Pioglitazonmononitrat (CLC-3000).

Auch die Aktivität der ALDH-2 stellt einen Marker für die Menge an mitochondrialem oxidativem Stress dar, da das Enzym Redox reguliert ist (255). In unserer Untersuchung wurde erstmals die ALDH-Aktivität unter in vitro Versetzen mit AEN, welches aus dem neuen

Hybridmolekül freigesetzt wird, mithilfe der HPLC untersucht. Es konnte erst unter hohen Konzentrationen (1 mmol/l), eine Hemmung der ALDH-2 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu hemmen GTN und ISDN diese bereits in Konzentrationen von 10 µmol/l. Dieses Ergebnis bildet einen weiteren Hinweis dafür, dass CLC-3000 nicht die Eigenschaft besitzt, wesentlich oxidativen Stress hervorzurufen.

6.3.2 Topographische Detektion von oxidativem Stress

Um intrazelluläre ROS-Quellen topographisch zu identifizieren, wurde Aortengewebe nach in vivo Therapie mit Pioglitazonmononitrat mit dem Fluoreszenzfarbstoff DHE behandelt. Wir konnten zeigen, dass es keinen dosisabhängigen Zusammenhang zwischen in situ fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren ROS und der Therapie mit dem neuen Hybrid gibt. Lediglich in der mittleren Dosis konnte ein Anstieg der ROS um etwa 20 % beobachtet werden. Dass sich aber in der höchsten Dosierung keine Erhöhung zeigte, macht einen Zusammenhang mit der Substanz nicht wahrscheinlich. Da dieser Zusammenhang durch uns erstmals untersucht wurde, ist eine erneute Durchführung des Experimentes sinnvoll, um eine kausale Wechselbeziehung sicher auszuschließen.

6.3.3 Enzymexpression

Die Untersuchung von Aortengewebe auf das Maß der Expression verschiedener Proteine hin sollte weitere Hinweise darauf geben, ob CLC-3000 ein Potenzial besitzt, oxidativen Stress zu verursachen. Unter chronisch hyperglykämischen Bedingungen ist das Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Faktoren gestört. Der erhöhte oxidative Stress im vaskulären System stört die Endothelfunktion und fördert Inflammation und Atherosklerose (98, 279). So konnten *Schuhmacher et al.* Tieren mit Streptozotocin (STZ) induziertem Diabetes mellitus bereits eine Steigerung, sowohl der Expression der Nox1 und Nox2, als auch des antioxidativ wirkenden Enzyms HO-1, sowie der antiatherosklerotisch agierenden eNOS und DHFR zeigen (261) (Abbildung 35). Um einen negativen Einfluss der entwickelten Substanz auf diesen Zustand bei diabetischen Patienten auszuschließen, haben wir die Expression der genannten Enzyme unter Therapie mit CLC-3000 quantifiziert. Weder die Superoxid-produzierende Nox2 noch die protektiven Enzyme eNOS, HO-1 und DHFR zeigten eine vermehrte Expression unter Therapie mit oben genannter Substanz. Ein Anstieg der protektiven Enzyme, wäre als kompensatorische Hochregulation bei vermehrter oxidativer Belastung zu erwarten, wie in der Vergangenheit für verschiedene Tiermodelle des oxidativen Stresses gezeigt. Es zeigte sich sogar eine leichte dosisabhängige Verminderung der Expression dieser Schutzenzyme, also eventuell sogar eine

direkte antioxidative Wirkung von CLC-3000. Allerdings ist bekannt, dass Pioglitazon im Rahmen seiner therapeutischen Wirkung via PPAR- γ -Rezeptor Auswirkungen auf die Expression verschiedener Gene hat. Um hier eine Unterscheidung treffen zu können, ob die beobachteten Effekte auf die Enzymexpression durch Pioglitazon oder die Nitratkomponente im Hybridmolekül zustande kommt, wäre eine zusätzliche Untersuchung der exprimierten Proteine nach Pioglitazon Monotherapie sinnvoll.

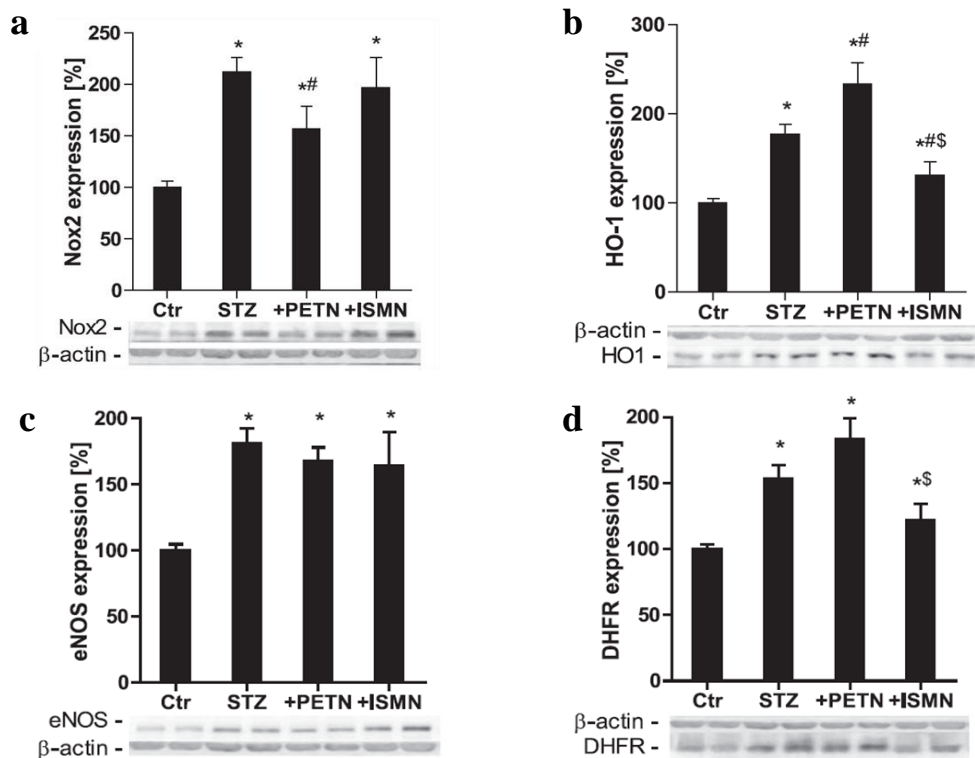


Abbildung 35: Expression von Nox2, HO-1, eNOS und DHFR nach STZ Therapie und unter Therapie mit verschiedenen Nitraten

Auswirkungen von STZ induziertem Diabetes auf die Expression von **a) Nox2**, **b) HO-1**, **c) eNOS** und **d) DHFR** sowie deren Beeinflussung durch *in vivo* Therapie mit PETN bzw. ISMN. Gezeigt sind densitometrische Quantifizierungen und darunter die repräsentativen Blots.

Mittelwerte \pm SEM von 6-15 Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. STZ, \$ $p < 0,05$ vs. PETN.

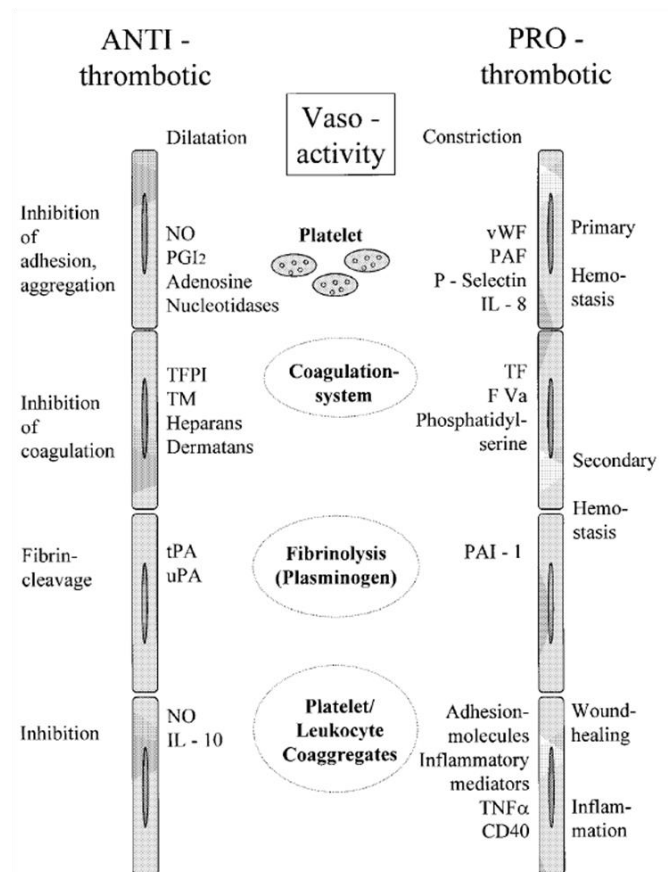


Abbildung 36: Rolle des Endothels in der Hämostase

Schematische Darstellung der Bedeutung des Endothels für die Blutgerinnung. Durch ein Gleichgewicht zwischen pro- und antithrombotischen Eigenschaften stellt es die Grundlage für eine physiologische Hämostase dar. Für die primäre Hämostase ist initial die Interaktion zwischen Endothel und Thrombozyten entscheidend. Hierbei spielen der von-Willebrand-Faktor (vWF), plättchenaktivierender Faktor (PAF), P-Selektin und Interleukin-8 (IL-8) eine wichtige Rolle. Außerdem agierende Faktoren sind: Tissue Factor (TF), Faktor Va (FVa), Phosphatidylserin, Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Adhäsionsmoleküle, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), CD-40 T-Lymphozyten und Entzündungsmediatoren. Für die antithrombotische Funktion des Endothels sind unter anderem Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI₂), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), tissue-type plasminogen activator (tPA) und urokinase-type plasminogen activator (uPA) wirksam.

Abbildung aus (281).

6.4 Einfluss auf hämostaseologische Parameter

Es ließen sich in den Untersuchungen zu den antiaggregatorischen Eigenschaften der neuen Substanz differente Ergebnisse beobachten. In den in vivo Untersuchungen (Blutungszeit), als allgemeiner Parameter der Funktionalität des Gerinnungssystems, konnte eine antiaggregatorische Wirkung von AEN (Abbildung 29) gezeigt werden. Die in vitro Untersuchung der ADP-induzierten Aggregation in humanem Plasma dagegen zeigten eine Hemmung der Aggregation durch die untersuchten Substanzen nur in hohen Konzentrationen. Insbesondere CLC-3000 und ISMN sowie CLC-1275 und AEN konnten eine potente Verminderung erst ab Konzentrationen

≥ 1 mM bewirken (Abbildung 30b). Die Thrombin- oder Tissuefaktor-induzierte Aggregation zeigte keinen signifikanten Einfluss durch AEN oder ISMN (Abbildung 30a). Diese Ambivalenz zwischen den Ergebnissen von in vitro und in vivo Ermittlungen hämostaseologischer Parameter könnte ihre Ursache darin haben, dass unter den in vitro Bedingungen (isoliertes plättchenreiches Plasma) die Bioaktivierung der organischen Nitrate beziehungsweise der freisetzen- den Verbindung unzureichend abläuft, da hierzu Gefäßzellen oder Lebergewebe nötig sind. Außerdem ist denkbar, dass die physiologischen Prozesse der Gerinnungskaskade in der Versuchsumgebung nur begrenzt ablaufen können, da das Zusammenspiel von Endothel und Thrombozyten beziehungsweise Gerinnungsfaktoren hierbei von entscheidender Bedeutung ist (Abbildung 36).

6.5 Limitationen der Studie

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit erläuterten Untersuchungen am Tiermodell unterstützen die theoretischen Überlegungen bezüglich der Eigenschaften und des Nebenwirkungsprofils eines neu entwickelten Hybridnitratmoleküls zur Behandlung von Diabetikern, die an KHK erkrankt sind. Allerdings sind bei der Interpretation der Studienergebnisse einige Einschränkungen der Arbeit zu berücksichtigen. Die Anzahl an behandelten Tieren in der Studie ist relativ gering. Pro untersuchter Gruppe wurden in der Regel fünf Tiere behandelt und anschließend ihr biologisches Material untersucht. Dabei wurden jeweils vier Aortenringe pro Tier verwendet. Der statistischen Auswertung dagegen wurden die Anzahl der Aortenringe beziehungsweise die Anzahl der durchgeführten unabhängigen Messungen zugrundegelegt. Sie spiegelt nicht die Anzahl der dosierten Tiere wider. Eine weitere Einschränkung stellt die Konzeption der zu untersuchenden Gruppen dar. Als Vergleichsgruppe zu den Behandlungsgruppen wurden unbehandelte Kontrolltiere gewählt, die in vivo nur die Trägersubstanz verabreicht bekommen haben, wie zum Beispiel DMSO oder mit Süßstoff versetztes Trinkwasser. In den in vitro Untersuchungen wurde zur Kontrolle eine Inkubation ohne Testsubstanz durchgeführt. Der Versuchsaufbau lässt dadurch nicht immer eine Unterscheidung zu, ob die beobachteten Effekte auf die bereits bekannte Pioglitazonkomponente oder die Nitratfunktion im neuen Hybridmolekül zurückzuführen sind. Um hier differenzieren zu können, müsste eine zusätzliche Kontrollgruppe, die mit Pioglitazon allein behandelt worden ist, mitgeführt werden. Desweiteren wurden für die langfristige Verabreichung der Testsubstanzen in vivo osmotische Minipumpen eingesetzt, die kontinuierlich und mit einer konstanten Rate (mg/kg Körpergewicht/Tag) die entsprechende Substanz ins Subkutangewebe der Tiere abgeben. Diese kontinuierliche Darreichung entspricht nicht dem derzeit etablierten Verabreichungsschema von organischen Nitraten. Diese werden,

um die Entwicklung einer Nitrattoleranz zu verhindern, nicht kontinuierlich, sondern mit einem sogenannten Nitrat-freien Intervall von mindestens zwölf Stunden dosiert. Diese Diskrepanz schränkt die Interpretierbarkeit der Ergebnisse bezogen auf die Anwendung im Menschen in gewisser Weise ein. Andererseits kann man diesen Aspekt des Versuchsaufbaus als besondere Stressbedingung betrachten. Unter diesen Bedingungen ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Entwicklung einer Nitrattoleranz kommt beziehungsweise zu den entsprechenden molekularen Prozessen wie der Vermehrung von oxidativem Stress, erhöht. Die Ergebnisse dagegen sprechen dafür, dass selbst unter solchen Stressbedingungen keine Toleranz entsteht. Zuletzt ist zu bedenken, dass bezüglich der genauen molekularen Prozesse bei der Bioaktivierung des Stickstoffmonoxids (NO) im neuen Hybridmolekül noch Unklarheit besteht. Es ist zwar gezeigt worden, dass der Linker CLC-1275, der die Nitratfunktion von Pioglitazonmononitrat enthält, *in vitro* eine Vasodilatation hervorruft, aber der genaue Mechanismus der Freisetzung von NO konnte bisher nicht bewiesen werden. Aufgrund der Kenntnis von bewiesenen Grundprinzipien chemischer Reaktionen ist es aber wahrscheinlich, dass der Linker wie vermutet durch Hydrolyse einer Carbamatstruktur von der Mutterkomponente CLC-3000 abgespalten wird und anschließend NO vom Linker freigesetzt wird. Trotz dieser Limitationen bestätigen die Ergebnisse die vorangegangenen theoretischen Überlegungen und geben vorläufige Hinweise zu Verhalten und Sicherheit der neuen Substanz CLC-3000. Wichtig wäre nun eine head-to-head Studie zur protektiven Wirkung von CLC-3000, dem Linker CLC-1275 bzw. AEN sowie Pioglitazon alleine in diabetischen Ratten durchzuführen, um die synergistischen protektiven Effekte des Hybridmoleküls zu belegen.

6.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Eine wichtige Komplikation der Diabetes mellitus Erkrankung ist die endotheliale Dysfunktion und nachfolgend atherosklerotische Veränderungen im kardiovaskulären System (9, 263). Mit der Entwicklung von CLC-3000 ist es gelungen, die antidiabetische Funktion des PPAR- γ -Rezeptor-Agonisten Pioglitazon zu kombinieren mit der Nitratfunktion des Linkers CLC-1275, die zum Ziel hat eine endotheliale Dysfunktion auszugleichen. Es ist allerdings bekannt, dass organische Nitrate selbst in der Lage sind, eine endotheliale Dysfunktion zu verursachen- unter anderem durch eine sogenannte „Entkopplung“ der eNOS (siehe 3.3.3), bei der anstelle von Stickstoffmonoxid das Radikal Superoxid gebildet wird (282, 283). Es war das Ziel, mit dem neuen Hybridmolekül die Stickstoffmonoxid-Level in diabetischen Systemen zu normalisieren, ohne dabei selbst zur Entkopplung der eNOS beziehungsweise der Entstehung von oxidativem Stress beizutragen. Sowohl in Tierversuchen (261, 284) als auch im Menschen (285-287)

konnten die Vorteile von Nitraten wie AEN oder PETN gezeigt werden, die weder oxidativen Stress, endotheliale Dysfunktion noch Nitrattoleranz begünstigen. Unsere Untersuchung konnte eindeutig feststellen, dass CLC-3000 vasodilatatorische Eigenschaften besitzt, die über die des Wirkstoffs Pioglitazon allein hinausgehen. Sein Potenzial, in vitro Vasodilatation hervorzurufen, ist nur geringfügig kleiner als das des Linkers CLC-1275 selbst. Dies impliziert, dass der Linker zügig vom Hybridmolekül abgespalten und wirksam wird. Bezüglich der Induktion von oxidativem Stress konnten in den in vitro Tests Hinweise gefunden werden, dass RONS begünstigt werden. Dies geschah durch einen ungeklärten Mechanismus, der in vivo nicht beobachtet werden konnte. Die Untersuchung der in vivo Therapie zeigte nur geringfügige Hinweise auf die Induktion von oxidativem Stress und keine Entwicklung einer Toleranz oder endothelialen Dysfunktion.

Die erlangten Ergebnisse legen nahe, dass die Kombination der beiden beschriebenen Funktionen zur Behandlung von Diabetikern mit KHK sinnvoll ist und das frei werdende AEN nur ein geringes Potenzial besitzt, selbst oxidativen Stress zu verursachen. Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich des prooxidativen Potenzials in vitro versus in vivo sowie die zugrundeliegenden, bislang unverstandenen Mechanismen müssten durch weitere Untersuchungen, am besten in diabetischen Tieren, geklärt werden. Aufgrund der Instabilität der Hybridmoleküle wurden von unserer Arbeitsgruppe bereits Nachfolgeuntersuchungen angestellt, die anstelle von Hybridmolekülen Formulierungen von festen Dosis-Kombinationen verschiedener Pharmaka erforschen. Außerdem ist Pioglitazon zu Lasten der GKV wegen erhöhter Inzidenz von Harnblasenkrebs inzwischen nicht mehr zu verordnen (3.4). Daher wurde hierbei das Prinzip beibehalten, das Nitrat AEN mit bewährten Medikamenten zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen wie pAVK, Herzinsuffizienz, KHK und Hypertonus zu kombinieren. Es wurde von *Oelze et al.* AEN in fester Dosis kombiniert mit dem Phosphodiesterase-3-Hemmer Cilostazol, dem Betablocker Metoprolol und dem AT-II Rezeptorblocker Valsartan. Auch hier konnte bestätigt werden, dass AEN (CLC-1011) einen potenten Vasodilatator darstellt. Außerdem zeigte das Ausmaß der gemessenen RONS-Produktion via Chemilumineszenz, dass CLC-1011, im Gegensatz zu GTN, keinen vermehrten oxidativen Stress verursacht. Es konnte seine potentiellen Vorteile einer kombinierten Verabreichung zusammen mit anderen kardiovaskulären Medikamenten beweisen. Diese Kombination könnte durch die synergistische Wirkweise beziehungsweise additive Effekte einen klinischen Vorteil für Patienten bringen, die beispielsweise von KHK, Hypertonus oder Herzinsuffizienz betroffen sind (278). Aufgrund der immens großen Anzahl von Diabetes Betroffenen und dem hohen Anteil seiner Folgeerkrankungen an der Gesamtsterblichkeit unserer Gesellschaft, ist es nötig, die Behandlung von unter anderem

Diabetikern mit KHK weiter zu entwickeln und effizienter zu gestalten. So sollten daher Kombinationen von anderen oralen Antidiabetika als Pioglitazon, wie zum Beispiel Metformin oder moderne Wirkstoffe wie Gliptine, GLP-1 Analoga oder SGLT2 Inhibitoren, mit AEN weiterentwickelt und bezüglich ihres Nebenwirkungsprofils untersucht werden.

7 Zusammenfassung

Die organischen Nitrate stellen eine Gruppe von vasodilatatorischen Substanzen dar, die in der Behandlung der Angina pectoris, als klinische Manifestation der koronaren Herzkrankheit, eine wichtige Rolle spielt. Diabetes mellitus wiederum ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung einer KHK und steigert die Morbidität und Mortalität für kardiovaskuläre Erkrankungen im Allgemeinen. Die Kombination der Nitratfunktion von AEN mit der antidiabetischen Wirkung des PPAR- γ -Rezeptor Agonisten Pioglitazon im neuen Molekül CLC-3000 hatte zum Ziel, ein Hybridmolekül zu entwickeln, das durch seine kombinierte Wirkung die Effizienz der Behandlung von Diabetikern mit KHK verbessert und ein günstiges Nebenwirkungsprofil zeigt. Um das Molekül zu charakterisieren wurden im Organbad die vasodilatativen Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* untersucht. Außerdem wurde mit verschiedenen Methoden das Ausmaß der Bildung von oxidativem Stress *in vitro* und *in vivo* bestimmt sowie die Auswirkungen der neuen Substanz auf verschiedene hämostaseologischer Parameter. In den *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei CLC-3000 um einen potenten Vasodilatator handelt, durch den schnell NO freigesetzt wird. Er erwies sich als wirkungsvoller als Pioglitazon allein sowie andere bewährte organische Nitrate. *In vitro* konnten teilweise Hinweise auf die Induktion von oxidativem Stress gefunden werden. Bezüglich der mitochondrialen RONS, gemessen durch Chemilumineszenz, beziehungsweise der ALDH-2-Aktivität konnte insbesondere nach längerer Inkubation und in hohen Konzentrationen ein Anstieg des oxidativen Stresses festgestellt werden. Sowohl AEN selbst als auch CLC-3000 und der AEN freisetzende Linker CLC-1275 wiesen in hohen Konzentrationen (≥ 1 mM) antiaggregatorische Effekte auf. Nach siebentägiger *in vivo* Behandlung mit CLC-3000 konnte im Organbad keine vaskuläre Dysfunktion, Toleranz oder Kreuztoleranz gegenüber GTN beobachtet werden. Außerdem konnten in der Fluoreszenzmikroskopie bis auf eine leichte Steigerung des Signals ausschließlich in der mittleren Dosisgruppe keine Hinweise auf vermehrten oxidativen Stress gefunden werden. Sowohl kurzfristige als auch chronische Behandlung mit AEN und in geringerem Maße mit ISMN bewirkten dosisabhängig eine verlängerte *in vivo* Blutungszeit der Schwanzvene von Mäusen, was auf eine effiziente Bioaktivierung der Substanzen auch nach wiederholter Behandlung hindeutet und damit gegen die Entwicklung einer Toleranz spricht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen trotz teilweise widersprüchlicher Ergebnisse die These, dass mit der Entwicklung des Moleküls CLC-3000 ein neues Hybridnitratmolekül entstanden ist, das ein günstiges Nebenwirkungsprofil zeigt. Da Pioglitazon derzeit nicht mehr zu Lasten der GKV verschreibungsfähig ist, ist die Beforschung anderer

Wirkstoffkombinationen der mit Pioglitazon vorzuziehen. Der Ansatz, das nebenwirkungsarme Nitrat AEN mit anderen Substanzen, wie oralen Antidiabetika, zu kombinieren, um die Effizienz der Therapie multimorbider Patienten zu steigern und synergistische Effekte zu nutzen, sollte weiter verfolgt werden. Hierbei ist die Entwicklung von Präparaten mit fester Dosis-Kombination der Wirkstoffe der von Hybridmolekülen vorzuziehen, da jene instabiler sind und dessen Bioaktivierungsprozess komplexer.

8 Literaturverzeichnis

1. Shepard D, VanderZanden A, Moran A, Naghavi M, Murray C, Roth G. Ischemic Heart Disease Worldwide, 1990-2013: Estimates from the Global Burden of Disease Study 2013. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes*. 2015;8(4):455-6.
2. Renz-Polster H, Krautzig S. *Basislehrbuch Innere Medizin*. München: Urban&Fischer; 2011: 63-69 p.
3. Schleicher E. Pathobiochemie der Makroangiopathie , Mikroangiopathie und Neuropathie. In: Schatz H, Pfeiffer AFH, editors. *Diabetologie Kompakt*. Berlin Heidelberg: Springer; 2014: 240.
4. Federation ID. IDF Diabetes Atlas2017. Available from: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html>.
5. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation*. 1979;59(1):8-13.
6. Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet (London, England)*. 2010;375(9733):2215-22.
7. Schulze MB. Epidemiologie des Diabetes mellitus: Häufigkeit, Lebenserwartung, Todesursachen. In: Schatz H, Pfeiffer AFH, editors. *Diabetologie Kompakt*. Berlin Heidelberg: Springer; 2014: 3-4.
8. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. 2010;107(9):1058-70.
9. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001;88(2):E14-22.
10. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(13):9889-97.
11. 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.
12. 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.
13. Münzel 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. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(1):187-94.
14. Martelli A, Rapposelli S, Calderone V. NO-releasing hybrids of cardiovascular drugs. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(6):609-25.
15. Imai S, Ushijima T, Nakazawa M, Nabata H, Sakai K. Mechanism of relaxant effects of nicorandil on the dog coronary artery. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*. 1983;265(2):274-82.
16. Sakai K, Akima M, Shiraki Y, Hoshino E. Effects of a new antianginal agent, nicorandil, on the cardiovascular system of the miniature pig: with special reference to coronary vasospasm. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1983;227(1):220-8.
17. Buccellati C, Sala A, Rossoni G, Capra V, Rovati GE, Di Gennaro A, et al. Pharmacological characterization of 2NTX-99 [4-methoxy-N1-(4-trans-

- nitrooxycyclohexyl)-N3-(3-pyridinylmethyl)-1,3-benzenedica rboxamide], a potential antiatherothrombotic agent with antithromboxane and nitric oxide donor activity in platelet and vascular preparations. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;317(2):830-7.
18. Knorr M, Hausding M, Schulz E, Oelze M, Rummeler R, Schuff A, et al. Characterization of new organic nitrate hybrid drugs covalently bound to valsartan and cilostazol. *Pharmacology*. 2012;90(3-4):193-204.
 19. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold Verlag; 2018: 238-241; 246-247 p.
 20. Gosswald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 2013;56(5-6):650-5.
 21. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation*. 1991;84(5):1984-92.
 22. Daiber A, Münzel T. *Pentaeritryltetranitrat -Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO Bioverfügbarkeit - physiologische und pathophysiologische Aspekte*. Darmstadt: Steinkopff Verlag; 2006.
 23. *Kardiologie DGf. Management der stabilen koronaren Herzkrankheit (KHK)*. Grünwald: Boern Bruckmeier Verlag GmbH; 2015.
 24. Ambepityia G, Kopelman PG, Ingram D, Swash M, Mills PG, Timmis AD. Exertional myocardial ischemia in diabetes: a quantitative analysis of angular perceptual threshold and the influence of autonomic function. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(1):72-7.
 25. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Tolonen H, Davidson M, Mendis S, Amouyel P, et al. *MONICA Monograph and Multimedia Sourcebook Geneva2002*.
 26. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013;368(14):1279-90.
 27. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(25):e34.
 28. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) . *Nationale Versorgungs- Leitlinie Chronische KHK-Langfassung 2016 [cited 2018 /09/03]*. Available from: www.khk.versorgungsleitlinien.de.
 29. Cheung BM, Lauder IJ, Lau CP, Kumana CR. Meta-analysis of large randomized controlled trials to evaluate the impact of statins on cardiovascular outcomes. *British journal of clinical pharmacology*. 2004;57(5):640-51.
 30. AntiplateletTrialists'Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Antiplatelet Trialists' Collaboration. BMJ (Clinical research ed)*. 1994;308(6921):81-106.
 31. Juul-Moller S, Edvardsson N, Jahnmatz B, Rosen A, Sorensen S, Omblus R. Double-blind trial of aspirin in primary prevention of myocardial infarction in patients with stable chronic angina pectoris. *The Swedish Angina Pectoris Aspirin Trial (SAPAT) Group. Lancet (London, England)*. 1992;340(8833):1421-5.
 32. Manson JE, Tosteson H, Ridker PM, Satterfield S, Hebert P, O'Connor GT, et al. The primary prevention of myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1992;326(21):1406-16.

33. Aung PP, Maxwell HG, Jepson RG, Price JF, Leng GC. Lipid-lowering for peripheral arterial disease of the lower limb. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2007(4):Cd000123.
34. Coppola G, Novo S. Statins and peripheral arterial disease: effects on claudication, disease progression, and prevention of cardiovascular events. *Archives of medical research*. 2007;38(5):479-88.
35. Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH. Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials. *Jama*. 1997;278(4):313-21.
36. Wilt TJ, Bloomfield HE, MacDonald R, Nelson D, Rutks I, Ho M, et al. Effectiveness of statin therapy in adults with coronary heart disease. *Archives of internal medicine*. 2004;164(13):1427-36.
37. Delahoy PJ, Magliano DJ, Webb K, Grobler M, Liew D. The relationship between reduction in low-density lipoprotein cholesterol by statins and reduction in risk of cardiovascular outcomes: an updated meta-analysis. *Clinical therapeutics*. 2009;31(2):236-44.
38. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2009;338:b1665.
39. Shibata MC, Flather MD, Wang D. Systematic review of the impact of beta blockers on mortality and hospital admissions in heart failure. *European journal of heart failure*. 2001;3(3):351-7.
40. Freemantle N, Cleland J, Young P, Mason J, Harrison J. beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 1999;318(7200):1730-7.
41. Olsson G, Wikstrand J, Warnold I, Manger Cats V, McBoyle D, Herlitz J, et al. Metoprolol-induced reduction in postinfarction mortality: pooled results from five double-blind randomized trials. *Eur Heart J*. 1992;13(1):28-32.
42. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2013;34(38):2949-3003.
43. Thadani U, Fung HL, Darke AC, Parker JO. Oral isosorbide dinitrate in angina pectoris: comparison of duration of action an dose-response relation during acute and sustained therapy. *The American journal of cardiology*. 1982;49(2):411-9.
44. Pursnani S, Korley F, Gopaul R, Kanade P, Chandra N, Shaw RE, et al. Percutaneous coronary intervention versus optimal medical therapy in stable coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Circulation Cardiovascular interventions*. 2012;5(4):476-90.
45. Stergiopoulos K, Boden WE, Hartigan P, Mobius-Winkler S, Hambrecht R, Hueb W, et al. Percutaneous coronary intervention outcomes in patients with stable obstructive coronary artery disease and myocardial ischemia: a collaborative meta-analysis of contemporary randomized clinical trials. *JAMA internal medicine*. 2014;174(2):232-40.
46. Thomas S, Gokhale R, Boden WE, Devereaux PJ. A meta-analysis of randomized controlled trials comparing percutaneous coronary intervention with medical therapy in stable angina pectoris. *The Canadian journal of cardiology*. 2013;29(4):472-82.
47. Hueb W, Lopes N, Gersh BJ, Soares PR, Ribeiro EE, Pereira AC, et al. Ten-year follow-up survival of the Medicine, Angioplasty, or Surgery Study (MASS II): a randomized

- controlled clinical trial of 3 therapeutic strategies for multivessel coronary artery disease. *Circulation*. 2010;122(10):949-57.
48. Müller-Wieland D, Petermann A, Nauck M, Heinemann L, Kerner W, Müller U, et al. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus 2016. 78-81 p.
 49. American Diabetes A. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33(Suppl 1):S62-S9.
 50. Mendis S, Armstrong T, Bettcher D, Branca F, Lauer J, Mace C, et al. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
 51. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2009;373(9677):1773-9.
 52. Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet (London, England)*. 2009;373(9677):1789-97.
 53. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1998;339(4):229-34.
 54. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mahonen M, Niemela M, Haffner SM, et al. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. *Diabetes Care*. 1998;21(1):69-75.
 55. Wong E, Backholer K, Gearon E, Harding J, Freak-Poli R, Stevenson C, et al. Diabetes and risk of physical disability in adults: a systematic review and meta-analysis. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2013;1(2):106-14.
 56. Böhm BO, Dreyer M, Fritsche A, Fuchtenbusch M, Gözl S, Martin S. Therapie des Typ-1-Diabetes Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG; 2011. Available from: http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Praxisleitlinien/2014/DuS_S2-14_DD_G_S135_Therapie-Typ1-Diabetes.pdf.
 57. Kelley DE, Wing R, Buonocore C, Sturis J, Polonsky K, Fitzsimmons M. Relative effects of calorie restriction and weight loss in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1993;77(5):1287-93.
 58. Wing RR. Long-term effects of a lifestyle intervention on weight and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes mellitus: four-year results of the Look AHEAD trial. *Archives of internal medicine*. 2010;170(17):1566-75.
 59. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) . Nationale Versorgungs-Leitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes- Langfassung 2013 [cited 2018 /02/20]. Available from: www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de.
 60. Sies H. Oxidative Stress: Introduction. In: Sies H, editor. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. London: Academic Press; 1991. p. xv-xxii.
 61. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*. 1997;82(2):291-5.
 62. Gomberg M. An Instance of trivalent carbon: Triphenylmethyl. *Journal of the American Chemical Society*. 1900;22(11):757-71.
 63. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature*. 1954;174(4432):689-91.
 64. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science (New York, NY)*. 1954;119(3097):623-6.

65. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 1956;11(3):298-300.
66. Babior BM, Curnutte JT, Kipnes RS. Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1975;85(2):235-44.
67. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
68. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
69. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;153(3):1251-6.
70. Hopkins RZ. Superoxide in Biology and Medicine: An Overview. *Reactive Oxygen Species*. 2016;1(2).
71. Luo S, Lei H, Qin H, Xia Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Current pharmaceutical design*. 2014;20(22):3548-53.
72. Schulz E, Wenzel P, Munzel T, Daiber A. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(2):308-24.
73. Endothelilale Faktoren. In: Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, editors. *Physiologie*. 5 ed. München: Urban&Fischer; 2008: 429-430.
74. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996;328(1):85-92.
75. Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biological chemistry*. 2002;383(3-4):401-9.
76. Daiber A, Ullrich V. Stickstoffmonoxid, Superoxid und Peroxynitrit: Radikalchemie im Organismus. *Chemie in unserer Zeit*. 2002;36(6):366-75.
77. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*. 2007;6(8):662-80.
78. Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics : integrated biometal science*. 2012;4(8):739-50.
79. Chen AF, Chen DD, Daiber A, Faraci FM, Li H, Rembold CM, et al. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2012;123(2):73-91.
80. Mironczuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*. 2018;63(1):68-78.
81. Muftuoglu M, Mori MP, de Souza-Pinto NC. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion*. 2014;17:164-81.
82. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(11):4651-5.
83. Mellion BT, Ignarro LJ, Myers CB, Ohlstein EH, Ballot BA, Hyman AL, et al. Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation. *Molecular pharmacology*. 1983;23(3):653-64.

84. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* (London, England). 1987;2(8567):1057-8.
85. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation*. 1989;83(5):1774-7.
86. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(11):2567-78.
87. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*. 2. ed. Stuttgart: Thieme; 2008, 166-177, 581-582, 621, 694 p.
88. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):9265-9.
89. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986;320(6061):454-6.
90. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(5):1788.
91. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, et al. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(23):10480.
92. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München: Urban&Fischer Verlag, Elsevier GmbH; 2005.
93. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annual review of physiology*. 1995;57:707-36.
94. Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 1998;100:1-32.
95. Pritchard KA, Jr., Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, Fontana JT, et al. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(21):17621-4.
96. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
97. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399(6736):597-601.
98. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular journal of Africa*. 2012;23(4):222-31.
99. Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 1993;88(6):2541-7.
100. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88(5 Pt 1):2149-55.

101. Miyata S, Noda A, Ito Y, Iizuka R, Shimokata K. Smoking acutely impaired endothelial function in healthy college students. *Acta cardiologica*. 2015;70(3):282-5.
102. Blackwell KA, Sorenson JP, Richardson DM, Smith LA, Suda O, Nath K, et al. Mechanisms of aging-induced impairment of endothelium-dependent relaxation: role of tetrahydrobiopterin. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;287(6):H2448-53.
103. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Komuro I. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenesescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Current vascular pharmacology*. 2004;2(2):141-8.
104. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *The New England journal of medicine*. 1990;323(1):22-7.
105. Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(6):2548-54.
106. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BSS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(16):9220-5.
107. Bune AJ, Shergill JK, Cammack R, Cook HT. L-Arginine depletion by arginase reduces nitric oxide production in endotoxic shock: an electron paramagnetic resonance study. *FEBS Letters*. 2000;366(2-3):127-30.
108. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):817-26.
109. Zweier JL, Chen C-A, Druhan LJ. S-Glutathionylation Reshapes Our Understanding of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species-Mediated Signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(10):1769-75.
110. Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res*. 1998;82(12):1298-305.
111. Zou MH. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2007;82(1-4):119-27.
112. Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A, et al. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovascular Research*. 1997;34(1):164-8.
113. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35(8):771-6.
114. Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 1986;132(1):75-8.
115. Sakamoto S, Minami K, Niwa Y, Ohnaka M, Nakaya Y, Mizuno A, et al. Effect of exercise training and food restriction on endothelium-dependent relaxation in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes*. 1998;47(1):82-6.
116. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(1):22-8.

117. Heinrich P, Müller M, Graeve L. Müller/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2014: 239-246 p.
118. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
119. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical journal*. 1980;191(2):421-7.
120. Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1985;237(2):408-14.
121. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free radical biology & medicine*. 2011;51(7):1289-301.
122. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006;29(6):1420-32.
123. Monnier VM, Nagaraj RH, Portero-Otin M, Glomb M, Elgawish AH, Sell DR, et al. Structure of advanced Maillard reaction products and their pathological role. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1996;11 Suppl 5:20-6.
124. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice*. 2005;67(1):3-21.
125. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2014;18(1):1-14.
126. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14998-5004.
127. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *The American journal of pathology*. 1993;143(6):1699-712.
128. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14987-97.
129. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(44):31740-9.
130. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996;382(6593):685-91.
131. Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, et al. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nature medicine*. 2000;6(6):643-51.
132. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999;97(7):889-901.
133. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(43):25752-61.

134. Huang JS, Guh JY, Hung WC, Yang ML, Lai YH, Chen HC, et al. Role of the Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) cascade in advanced glycation end-product-induced cellular mitogenesis in NRK-49F cells. *The Biochemical journal*. 1999;342 (Pt 1):231-8.
135. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(28):17810-4.
136. Wang L, Li S, Jungalwala FB. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) mediates neuronal differentiation and neurite outgrowth. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(6):1254-66.
137. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 2001;50(6):1495-504.
138. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 1991;87(2):432-8.
139. Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(6):1055-9.
140. Morigi M, Angioletti S, Imberti B, Donadelli R, Micheletti G, Figliuzzi M, et al. Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-kB-dependent fashion. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(9):1905-15.
141. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, et al. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(16):7742-6.
142. Wautier M-P, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier J-L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2001;280(5):E685-E94.
143. Cameron NE, Gibson TM, Nangle MR, Cotter MA. Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1043:784-92.
144. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(24):11555-8.
145. Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, et al. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes*. 1997;46(5):895-9.
146. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes*. 1991;40(10):1328-34.
147. Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, Leffler A, Babes A, Neacsu C, et al. Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nature medicine*. 2012;18:926.
148. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1986;548:87-99.

149. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *The Journal of biological chemistry*. 1969;244(14):3855-63.
150. Della Corte E, Gozzetti G, Novello F, Stirpe F. Properties of the xanthine oxidase from human liver. *Biochimica et biophysica acta*. 1969;191(1):164-6.
151. Nishino T, Nishino T. The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(47):29859-64.
152. Waud WR, Rajagopalan KV. Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1976;172(2):354-64.
153. Harris CM, Massey V. The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(13):8370-9.
154. Hille R, Massey V. Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *The Journal of biological chemistry*. 1981;256(17):9090-5.
155. Kelley EE, Khoo NKH, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen Peroxide is the Major Oxidant Product of Xanthine Oxidase. *Free radical biology & medicine*. 2010;48(4):493-8.
156. Matsumoto S, Koshiishi I, Inoguchi T, Nawata H, Utsumi H. Confirmation of Superoxide Generation via Xanthine Oxidase in Streptozotocin-induced Diabetic Mice. *Free radical research*. 2003;37(7):767-72.
157. Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension*. 2000;35(3):746-51.
158. Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1999;79(8):967-74.
159. Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*. 1981;25(1):67-82.
160. Rouquette M, Page S, Bryant R, Benboubetra M, Stevens CR, Blake DR, et al. Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Letters*. 1998;426(3):397-401.
161. Desco M-C, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV, et al. Xanthine Oxidase Is Involved in Free Radical Production in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2002;51(4):1118.
162. Adachi T, Fukushima T, Usami Y, Hirano K. Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *The Biochemical journal*. 1993;289 (Pt 2):523-7.
163. Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett*. 1998;427(2):225-8.
164. Zhang Z, Naughton D, Winyard PG, Benjamin N, Blake DR, Symons MCR. Generation of Nitric Oxide by a Nitrite Reductase Activity of Xanthine Oxidase: A Potential Pathway for Nitric Oxide Formation in the Absence of Nitric Oxide Synthase Activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;249(3):767-72.
165. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494-501.

166. Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *The FEBS journal*. 2008;275(13):3249-77.
167. Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Molecular interventions*. 2011;11(1):27-35.
168. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74(6):1141-8.
169. Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK. Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*. 1998;32(2):331-7.
170. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochemical Journal*. 1998;329(Pt 3):653-7.
171. Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation*. 1997;96(7):2361-7.
172. Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C, et al. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(28):19814-22.
173. Meier B. Regulation of the superoxide releasing system in human fibroblasts. *Advances in experimental medicine and biology*. 1996;387:113-6.
174. Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, et al. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochemical Journal*. 1989;263(2):539-45.
175. Kröller-Schön S, Steven S, Kossmann S, Scholz A, Daub S, Oelze M, et al. Molecular Mechanisms of the Crosstalk Between Mitochondria and NADPH Oxidase Through Reactive Oxygen Species—Studies in White Blood Cells and in Animal Models. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(2):247-66.
176. Castier Y, Brandes RP, Leseche G, Tedgui A, Lehoux S. p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res*. 2005;97(6):533-40.
177. Lee MY, San Martin A, Mehta PK, Dikalova AE, Garrido AM, Datla SR, et al. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(4):480-7.
178. Schroder K, Helmcke I, Palfi K, Krause KH, Busse R, Brandes RP. Nox1 mediates basic fibroblast growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(8):1736-43.
179. Wendt MC, Daiber A, Kleschyov AL, Mulsch A, Sydow K, Schulz E, et al. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free radical biology & medicine*. 2005;39(3):381-91.
180. Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2010;106(7):1253-64.
181. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*. 1994;43(9):1122-9.

182. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(22):11059-63.
183. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *The Journal of clinical investigation*. 1991;87(5):1643-8.
184. Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*. 2000;87(1):26-32.
185. Barnett AH, Bain SC, Bouter P, Karlberg B, Madsbad S, Jervell J, et al. Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *The New England journal of medicine*. 2004;351(19):1952-61.
186. Coppey LJ, Davidson EP, Rinehart TW, Gellett JS, Oltman CL, Lund DD, et al. ACE Inhibitor or Angiotensin II Receptor Antagonist Attenuates Diabetic Neuropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Diabetes*. 2006;55(2):341.
187. Oelze M, Schuhmacher S, Daiber A. Organic nitrates and nitrate resistance in diabetes: the role of vascular dysfunction and oxidative stress with emphasis on antioxidant properties of pentaerithrityl tetranitrate. *Experimental diabetes research*. 2010;2010:213176.
188. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47(6):859-66.
189. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(6779):787-90.
190. Geraldine P, King GL. Activation of Protein Kinase C Isoforms & Its Impact on Diabetic Complications. *Circulation research*. 2010;106(8):1319-31.
191. Hempel A, Maasch C, Heintze U, Lindschau C, Dietz R, Luft FC, et al. High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ Res*. 1997;81(3):363-71.
192. Lynch JJ, Ferro TJ, Blumenstock FA, Brockenauer AM, Malik AB. Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *The Journal of clinical investigation*. 1990;85(6):1991-8.
193. Cardillo C, Campia U, Bryant MB, Panza JA. Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. *Circulation*. 2002;106(14):1783-7.
194. Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 2003;107(7):1017-23.
195. Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK. Nitric oxide regulates the polyol pathway of glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. *The FASEB Journal*. 2003;17(3):417-25.
196. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(8 Suppl 3):S233-6.
197. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species 2002. 561-8 p.

198. Chen C-A, Wang T-Y, Varadharaj S, Reyes L, Hemann C, Talukder M, et al. S-Glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Circulation*. 2010;122(11):1115-8 p.
199. Morre DM, Lenaz G, Morre DJ. Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *The Journal of experimental biology*. 2000;203(Pt 10):1513-21.
200. Hodgson JM, Marshall JJ. Direct vasoconstriction and endothelium-dependent vasodilation. Mechanisms of acetylcholine effects on coronary flow and arterial diameter in patients with nonstenotic coronary arteries. *Circulation*. 1989;79(5):1043-51.
201. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *The New England journal of medicine*. 1986;315(17):1046-51.
202. Werns SW, Walton JA, Hsia HH, Nabel EG, Sanz ML, Pitt B. Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1989;79(2):287-91.
203. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)*. 1986;6(2):131-8.
204. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-26.
205. van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE. Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1989;61(2):166-70.
206. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(22):12953-6.
207. Goldstein BJ. Current views on the mechanism of action of thiazolidinedione insulin sensitizers. *Diabetes technology & therapeutics*. 1999;1(3):267-75.
208. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 1998;47(4):507-14.
209. Fujiwara T, Wada M, Fukuda K, Fukami M, Yoshioka S, Yoshioka T, et al. Characterization of CS-045, a new oral antidiabetic agent, II. Effects on glycemic control and pancreatic islet structure at a late stage of the diabetic syndrome in C 57 BL KsJ - db db mice. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 1991;40(11):1213-8.
210. Fujiwara T, Yoshioka S, Yoshioka T, Ushiyama I, Horikoshi H. Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. Studies in KK and ob/ob mice and Zucker fatty rats. *Diabetes*. 1988;37(11):1549-58.
211. Lee M-K, Miles PDG, Khoursheed M, Gao K-M, Moossa AR, Olefsky JM. Metabolic Effects of Troglitazone on Fructose-Induced Insulin Resistance in the Rat. *Diabetes*. 1994;43(12):1435.
212. Miles PD, Higo K, Romeo OM, Lee MK, Rafaat K, Olefsky JM. Troglitazone prevents hyperglycemia-induced but not glucosamine-induced insulin resistance. *Diabetes*. 1998;47(3):395.
213. Miles PDG, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Rafaat K, Olefsky JM. TNF- α -Induced Insulin Resistance In Vivo and Its Prevention by Troglitazone. *Diabetes*. 1997;46(11):1678.
214. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the

- PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* (London, England). 2005;366(9493):1279-89.
215. Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Nesto R, Kupfer S, Perez A, et al. Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial. *Jama*. 2008;299(13):1561-73.
216. IQWiG. Glitazone zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2, Abschlussbericht. Köln; 2008.
217. Strongman H, Christopher S, Majak M, Williams R, Bahmanyar S, Linder M, et al. Pioglitazone and cause-specific risk of mortality in patients with type 2 diabetes: extended analysis from a European multidatabase cohort study. *BMJ open diabetes research & care*. 2018;6(1):e000481.
218. Filipova E, Uzunova K, Kalinov K, Vekov T. Pioglitazone and the Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders*. 2017;8(4):705-26.
219. Mamtani R, Haynes K, Bilker WB, Vaughn DJ, Strom BL, Glanz K, et al. Association Between Longer Therapy With Thiazolidinediones and Risk of Bladder Cancer: A Cohort Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(18):1411-21.
220. Tang H, Shi W, Fu S, Wang T, Zhai S, Song Y, et al. Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer medicine*. 2018;7(4):1070-80.
221. Tuccori M, Filion KB, Yin H, Yu OH, Platt RW, Azoulay L. Pioglitazone use and risk of bladder cancer: population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2016;352:i1541.
222. EMA. European Medicines Agency recommends new contra-indications and warnings for pioglitazone to reduce small increased risk of bladder cancer. Benefit-risk balance remains positive in a limited population of type 2 diabetics 2011.
223. EMA. European Medicines Agency clarifies opinion on pioglitazone and the risk of bladder cancer. Positive benefit-risk balance confirmed as second and third line treatment. 2011.
224. Chaudhury A, Duvoor C, Reddy Dendi VS, Kraleti S, Chada A, Ravilla R, et al. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Frontiers in Endocrinology*. 2017;8(6).
225. Koenig A, Roegler C, Lange K, Daiber A, Glusa E, Lehmann J. NO donors. Part 16: investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2007;17(21):5881-5.
226. Knorr M, Hausding M, Pfeffer A, Jurk K, Jansen T, Schwierczek K, et al. In vitro and in vivo characterization of a new organic nitrate hybrid drug covalently bound to pioglitazone. *Pharmacology*. 2014;93(5-6):203-15.
227. Manner VW, Cawkwell MJ, Kober EM, Myers TW, Brown GW, Tian H, et al. Examining the chemical and structural properties that influence the sensitivity of energetic nitrate esters. *Chemical science*. 2018;9(15):3649-63.
228. Schuhmacher S, Schulz E, Oelze M, König A, Roegler C, Lange K, et al. A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena. *British Journal of Pharmacology*. 2009;158(2):510-20.
229. 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.

230. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(12):8306-11.
231. Munzel T, Daiber A, Gori T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance. *Circulation*. 2011;123(19):2132-44.
232. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res*. 2005;97(7):618-28.
233. Beretta M, Wolkart G, Schernthaner M, Griesberger M, Neubauer R, Schmidt K, et al. Vascular bioactivation of nitroglycerin is catalyzed by cytosolic aldehyde dehydrogenase-2. *Circ Res*. 2012;110(3):385-93.
234. Münzel T, Daiber A, Gori T. More answers to the still unresolved question of nitrate tolerance. *European Heart Journal*. 2013;34(34):2666-73.
235. 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.
236. 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.
237. Gori T, Parker JD. Nitrate tolerance: a unifying hypothesis. *Circulation*. 2002;106(19):2510-3.
238. 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.
239. [Available from: https://www.alzet.com/products/alzet_pumps/how-does-it-work/].
240. Rosenberger G, Fichtlscherer S. [Analysis of forearm circulation--a substitute for diagnosis of coronary atherosclerosis?]. *Herz*. 1998;23(2):130-4.
241. Schächinger V, Zeiher AM. Quantitative assessment of coronary vasoreactivity in humans in vivo. *Circulation*. 1995;92(8):2087-94.
242. 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. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(3):482-9.
243. Münzel T. Neue Erkenntnisse bei der Nitratwirkung, Nitratbioaktivierung und Toleranzentwicklung. *Dtsch med Wochenschr*. 2008;133(44):2277-82.
244. Eichmann C. Multimediale Simulationen physiologischer Grundprozesse und ihre Einbettung in interaktive Lernsysteme [Dissertation]. Marburg: Philipps-Universität; 1999.
245. McNaught AD, Wilkinson A. IUPAC: Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book"). Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997. Available from: <https://doi.org/10.1351/goldbook.C01045>.
246. Daiber A, Oelze M, August M, Wendt M, Sydow K, Wieboldt H, et al. Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012. *Free radical research*. 2004;38(3):259-69.
247. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
248. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*. 2000;86(9):E85-90.

249. 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.
250. Spasojevic I, Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin: redox potential in aqueous media and redox cycling with O₂⁽⁻⁾ production. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;373(2):447-50.
251. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA. Chemiluminescent Detection of Oxidants in Vascular Tissue. Lucigenin But Not Coelenterazine Enhances Superoxide Formation. 1999;84(10):1203-11.
252. Li Y, Zhu H, Kuppusamy P, Roubaud V, Zweier JL, Trush MA. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(4):2015-23.
253. Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mülsch 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.
254. Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, et al. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(34):12159-64.
255. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(1):792-9.
256. Wenzel P, Hink U, Oelze M, Seeling A, Isse T, Bruns K, et al. Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2(-/-) mice. *British Journal of Pharmacology*. 2007;150(4):526-33.
257. Gey MH. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. 3 ed. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2015: 130 p.
258. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of *Mycobacterium* Species. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):704.
259. Peshavariya HM, Disting GJ, Selemidis S. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free radical research*. 2007;41(6):699-712.
260. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free radical biology & medicine*. 2003;34(11):1359-68.
261. Schuhmacher S, Oelze M, Bollmann F, Kleinert H, Otto C, Heeren T, et al. Vascular Dysfunction in Experimental Diabetes Is Improved by Pentaerithrityl Tetranitrate but Not Isosorbide-5-Mononitrate Therapy. *Diabetes*. 2011;60(10):2608-16.
262. Wenzel P, Oelze M, Coldewey M, Hortmann M, Seeling A, Hink U, et al. Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(8):1729-35.
263. Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Müller J, Schuhmacher S, Alhamdani MS, et al. AT1-receptor blockade by telmisartan upregulates GTP-cyclohydrolase I and protects eNOS in diabetic rats. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(5):619-26.

264. Otto A, Fontaine D, Fontaine J, Berkenboom G. Rosuvastatin treatment protects against nitrate-induced oxidative stress. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2005;46(2):177-84.
265. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: Enhancement by angiotensin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(26):14483-8.
266. Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*. 2002;90(11):1205-13.
267. Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. 3 ed. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2012.
268. 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.
269. Smith BJ. *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 1984;1:41-55.
270. Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Beguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thrombosis and haemostasis*. 1993;70(4):617-24.
271. Kiefer P, Stief T. Endogenes Thrombinbildungspotential. In: Gressner AM, Arndt T, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2 ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013: 443.
272. Munzel T, Giaid A, Kurz S, Stewart DJ, Harrison DG. Evidence for a Role of Endothelin 1 and Protein Kinase C in Nitroglycerin Tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(11):5244-8.
273. Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, et al. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation*. 2002;105(10):1170-5.
274. Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *The American journal of physiology*. 1994;266(6 Pt 2):H2568-72.
275. Münzel 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. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;98(6):1465-70.
276. Wenzel P, Mollnau H, Oelze M, Schulz E, Wickramanayake JM, Muller J, et al. First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(8):1435-47.
277. Oelze M, Knorr M, Schell R, Kamuf J, Pautz A, Art J, et al. Regulation of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity by electrophiles in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(11):8893-900.
278. Oelze M, Welschhof P, Knorr M, Tran LP, Ullmann E, Stamm P, et al. Basic in vitro Characterization of the Vasodilatory Potential of 2-Aminoethyl Nitrate Fixed-Dose Combinations with Cilostazol, Metoprolol and Valsartan. *Pharmacology*. 2018;101(1-2):54-63.

279. Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free radical biology & medicine*. 2006;40(2):183-92.
280. 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.
281. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Zeitschrift für Kardiologie*. 2000;89(3):160-7.
282. 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.
283. Oelze M, Knorr M, Kroller-Schon S, Kossmann S, Gottschlich A, Rummler R, et al. Chronic therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction, oxidative stress, and a marked increase in vascular endothelin-1 expression. *Eur Heart J*. 2013;34(41):3206-16.
284. 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.
285. Dragoni S, Gori T, Lisi M, Di Stolfo G, Pautz A, Kleinert H, et al. Pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin, but not isosorbide mononitrate, prevent endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(9):1955-9.
286. 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. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2010;99(2):115-24.
287. 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.

9 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen meiner Tätigkeit als Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Molekulare Kardiologie der Kardiologie 1 der Johannes Gutenberg-Universität angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt [REDACTED], als Direktor der Kardiologie 1, für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Labors.

Ganz besonders und von Herzen möchte ich [REDACTED], Leiter des Labors für Molekulare Kardiologie, für seine Betreuung danken. Seine zuverlässige Erreichbarkeit und kompetente Unterstützung und die präzise Kritik haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Desweiteren gilt mein Dank allen anderen Mitarbeitern im Labor für ihre fachliche Expertise und Anleitung, sowie ihre Hilfsbereitschaft und den freundlichen und kollegialen Umgang. Insbesondere möchte ich [REDACTED] für ihre Motivation bei der Vollendung der Arbeit und für die unglaublich nette Zusammenarbeit danken. Dies gilt auch und ganz besonders für meinen Doktorandenkollegen [REDACTED], der darüber hinaus in technischen und praktischen Fragen geduldig für mich da war.

Zuletzt und aus tiefem Herzen möchte ich meiner Familie, ganz besonders meiner Mutter, danken; für die Förderung und bedingungslose Unterstützung auf diesem Bildungsweg und von Anfang an, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Dank gilt auch meinen engen Freunden, die mir an verschiedenen entscheidenden Stellen Motivation oder konkrete Hilfestellung geschenkt haben, insbesondere [REDACTED] sowie meiner Schwiegermutter [REDACTED] für ihren steten Zuspruch.

Meinem Ehemann [REDACTED] danke ich für seine Begleitung während des ganzen Studiums. Du warst ein verlässlicher Gefährte und oft mein Fels in der Brandung. Danke für Korrekturlesen, deine Liebe und deine dauernde moralische Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit.

10 Publikationen

1. Veröffentlichungen

- Knorr M, Hausding M, **Pfeffer A**, Jurk K, Jansen T, Schwierczek K, Oelze M, Kroller-Schon S, Schulz E, Wenzel P, Gori T, Burgin K, Sartor D, Scherhag A, Munzel T, Daiber, A: "In vitro and in vivo characterization of a new organic nitrate hybrid drug covalently bound to pioglitazone".

Pharmacology. 2014;93(5-6):203-15. doi: 10.1159/000361052. Epub 2014 Jun 7

- Steven S, Hausding M, Kroller-Schon S, Mader M, Mikhed Y, Stamm P, Zinssius E, **Pfeffer A**, Welschhof P, Agdauletova S, Sudowe S, Li H, Oelze M, Schulz E, Klein T, Munzel T, Daiber A: „Gliptin and GLP-1 analog treatment improves survival and vascular inflammation/dysfunction in animals with lipopolysaccharide-induced endotoxemia.“

Basic Research in Cardiology. 2015;110(2):6. doi: 10.1007/s00395-015-0465-x. Epub 2015 Jan 20

2. Teilnahme an internationalen Konferenzen, Postervortrag

- **Pfeffer A**, Knorr M, Hausding M, Jansen T, Oelze M, Kröller-Schön S, et al.: „Characterization of a New Organic Nitrate Hybrid Drug Covalently Bound to Pioglitazone.“

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2014 Volume 34, Supplement 1, Meeting Abstract 349, Published: May 2014

3. Tagungsbeiträge

- Mikhed Y, Oelze M, Kröller-Schön S, Zinssius E, Mader M, Stamm P, Horst P, **Pfeffer A**, Münzel T, Daiber A: „PSS160 - The Role of DNA Damage in the Pathogenesis of Nitrate Tolerance.“

Free Radical Biology and Medicine. 2013;65:S78. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.579

- Stamm P, Hausding M, Kröller-Schön S, Mader M, Agdauletova S, Mikhed Y, **Pfeffer A**, Welschof P, Steven S, Oelze M, Schulz E, Klein T, Münzel T, Daiber A: „Comparison of DPP-4 inhibition versus GLP-1 analogue supplementation on survival and vascular complications in experimental sepsis.“

The FASEB Journal. 2014, Volume 28, Issue 1, Supplement S, Meeting Abstract 145.2.,
Published: April 2014