

Aus der Klinik für Nephrologie und Endokrinologie – Campus  
Benjamin Franklin der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

*Der Einfluss der sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub> Typ IIa auf die  
endotheliale Funktion*

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Myriam Manuela Lallinger

aus Berlin

Gutachter:     1. Prof. Dr. med. M. Giet, van der  
                  2. Prof. Dr. med. W. M. Kübler  
                  3. Prof. Dr. med. K. Kisters

Datum der Promotion: 20. November 2009

*In Liebe*

*meiner Familie*

*„[...] und wenn ich alle Geheimnisse wüsste und alle Erkenntnis  
hätte, [...] hätte aber die Liebe nicht,  
wäre ich nichts.“*

*1 Korinther 13,2*

**Erlaubnis für die Durchführung von Tierexperimenten:**

Aktenzeichen: O 0086/ 01

Datum der behördlichen Genehmigung: 27.04.2001

# I. Inhaltsverzeichnis

---

## **I. Inhaltsverzeichnis**

<b><i>I. Inhaltsverzeichnis</i></b>	<b><i>I</i></b>
<b><i>II. Abbildungsverzeichnis</i></b>	<b><i>III</i></b>
<b><i>III. Tabellenverzeichnis</i></b>	<b><i>IV</i></b>
<b><i>1. Einleitung</i></b>	<b><i>1</i></b>
<b>1.1. Atherosklerose</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Endotheliale Dysfunktion</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> Typ IIa</b>	<b>8</b>
1.3.1. Familie und Wirkung der sPLA <sub>2</sub>	8
1.3.2. Verteilung und Induktion der sPLA <sub>2</sub> -IIa	9
1.3.3. Proatherogene Rolle der sPLA <sub>2</sub> -IIa	10
1.3.4. Sekretorische PLA <sub>2</sub> und bioaktive oxidierte Phospholipide	13
1.3.5. Die sPLA <sub>2</sub> -IIa und die COX-2-abhängige PG-Biosynthese	14
1.3.6. Prostaglandin E <sub>2</sub>	15
1.3.7. ROS und NADPH-Oxidase	16
<b>2. Material und Methode</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>19</b>
2.1.1. Thorakale Aorten von transgenen Mäusen und Kontrolltieren	19
2.1.2. Pufferlösungen und Hauptbestandteile	19
2.1.3. Substanzen	20
2.1.4. Geräte und Utensilien	21
2.1.5. Verbrauchsmaterial	21
2.1.6. Software	22
<b>2.2. Methode</b>	<b>22</b>
2.2.1. Der Kleingefäßmyograph	22
2.2.2. Physiologische Gesetzmäßigkeiten	23
2.2.3. Anordnung des Kleingefäßmyographen	23
2.2.4. Versuchsvorbereitung	26
2.2.5. Eichung des Kraftmessers	27
2.2.6. Festlegung des Gefäßlumendurchmessers	28
2.2.7. Überprüfung der Vitalität der eingespannten Gefäße	30
2.2.8. Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse	31
2.2.9. Statistik	31
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Dosisabhängige Vasokonstriktion an Aorten von WTM durch Phenylephrin</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Dosisabhängige Vasodilatation durch ACh und SNP an Aorten von WTM</b>	<b>34</b>
<b>3.3. Dosisabhängige Wirkung von ACh und SNP auf Aorten von sPLA<sub>2</sub>- und WTM</b>	<b>36</b>
<b>3.4. Dosisabhängige Vasodilatation unter COX-Inhibitoren an sPLA<sub>2</sub>- und WTM</b>	<b>38</b>
<b>3.5. Dosisabhängige Vasodilatation unter Tiron an sPLA<sub>2</sub>-Mäusen und WTM</b>	<b>44</b>

# I. Inhaltsverzeichnis

---

3.6. Dosisabhängige Vasodilatation unter Apocynin an sPLA <sub>2</sub> -Mäusen und WTM _____	46
3.7. Dosisabhängige Vasodilatation unter PGE <sub>2</sub> -Antagonisten an sPLA <sub>2</sub> - und WTM _____	48
3.8. Dosisabhängige Vasodilatation mit ACh unter PGE <sub>2</sub> an Aortenringen von WTM _____	52
4. <i>Diskussion</i> _____	53
5. <i>Zusammenfassung</i> _____	57
6. <i>Literaturverzeichnis</i> _____	58
7. <i>Selbständigkeitserklärung</i> _____	71
8. <i>Danksagung</i> _____	72
9. <i>Curriculum Vitae</i> _____	73

## II. Abbildungsverzeichnis

---

### II. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Entstehung einer atherosklerotischen Läsion.</i>	5
<i>Abbildung 2: Arachidonsäure-Stoffwechsel.</i>	9
<i>Abbildung 3: Produktion von sPLA<sub>2</sub>-IIa im Plasma.</i>	10
<i>Abbildung 4: Proatherogene Mechanismen von sPLA<sub>2</sub>-IIa.</i>	12
<i>Abbildung 5: Beitrag der sPLA<sub>2</sub> zur Entstehung bioaktiver oxidierter Phospholipide.</i>	14
<i>Abbildung 6: Wechselbeziehung der NADPH-Oxidase und anderer Quellen von ROS.</i>	18
<i>Abbildung 7: Versuchsanordnung eines Kleingefäßmyographen.</i>	25
<i>Abbildung 8: Darstellung der Kalibrierungswaage bei Eichung des Kraftmessers.</i>	27
<i>Abbildung 9: Darstellung eines Normalisierungsverfahrens am Kleingefäßmyographen.</i>	29
<i>Abbildung 10: Beziehung von Gefäßinnendurchmesser und Wandspannung eines Gefäßes.</i>	30
<i>Abbildung 11: Nicht kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve durch Phenylephrin.</i>	33
<i>Abbildung 12: DWK von ACh an thorakalen Aortenringen von WTM.</i>	34
<i>Abbildung 13: DWK von SNP an thorakalen Aortenringen von WTM.</i>	35
<i>Abbildung 14: DWK von ACh an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen und WTM.</i>	36
<i>Abbildung 15: DWK von SNP an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen und WTM.</i>	37
<i>Abbildung 16: DWK von ACh mit Indometacin an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.</i>	38
<i>Abbildung 17: DWK von ACh mit Indometacin an Gefäßen von WTM.</i>	39
<i>Abbildung 18: DWK von ACh mit SC-560 an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.</i>	40
<i>Abbildung 19: DWK von ACh mit SC-560 an Gefäßen von WTM.</i>	41
<i>Abbildung 20: DWK von ACh mit NS-398 an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.</i>	42
<i>Abbildung 21: DWK von ACh mit NS-398 an Gefäßen von WTM.</i>	43
<i>Abbildung 22: DWK von ACh mit Tiron an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.</i>	44
<i>Abbildung 23: DWK von ACh mit Tiron an Gefäßen von WTM.</i>	45
<i>Abbildung 24: DWK von ACh mit Apocynin an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.</i>	46
<i>Abbildung 25: DWK von ACh mit Apocynin an Gefäßen von WTM.</i>	47
<i>Abbildung 26: DWK von ACh mit AH-6809 an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.</i>	48
<i>Abbildung 27: DWK von ACh mit AH-6809 an Gefäßen von WTM.</i>	49
<i>Abbildung 28: DWK von ACh mit SC-19220 an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.</i>	50
<i>Abbildung 29: DWK von ACh mit SC-19220 an Gefäßen von WTM.</i>	51
<i>Abbildung 30: DWK von ACh an Gefäßen von WTM mit und ohne PGE<sub>2</sub>.</i>	52

### III. Tabellenverzeichnis

---

#### III. Tabellenverzeichnis

*Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung für den Kleingefäßmyographen..... 19*



# 1. Einleitung

---

## 1. Einleitung

### 1.1. Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine inflammatorische Erkrankung der Gefäße, die sich in verschiedene Stadien einteilen lässt. Diese werden von spezifischen zellulären und molekularen Prozessen unterhalten [1]. Spezielle Bereiche im arteriellen Gefäßsystem, wie z.B. Gefäßabzweigungen, Bifurkationen und Kurven verursachen charakteristische Veränderungen innerhalb des Blutflusses, vor allem erhöhte Scherkräfte durch verstärkte Turbulenzen [2]. An diesen Lokalisationen wird die Gefäßwand durch die Bildung spezifischer Moleküle verändert, die eine Adhäsion, Migration und Akkumulation von Monozyten und T-Zellen verursachen. Solche Adhäsionsmoleküle, die als Rezeptoren für Glykokonjugate und Integrine auf der Oberfläche von Monozyten und T-Zellen fungieren, sind z.B. bestimmte Selektine, interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) und vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle (VCAM) [3]. Diese Interaktionen zwischen Liganden und Rezeptoren aktivieren weitere mononukleäre Zellen, induzieren Zellproliferation und helfen der Entzündungsantwort sich in dem Bereich der Läsion zu definieren und zu lokalisieren (Abbildung 1A). Moleküle, die für die Migration von Leukozyten durch das Endothel bedeutend sind wie z.B. das Plättchen-Endothelzelladhäsionsmolekül (PECAM) [4], wirken zusammen mit von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Monozyten gebildeten chemotaktisch wirksamen Molekülen wie z.B. Monozyten-chemotaktisches Protein 1 (MCP-1), Osteopontin [5] und oxidativ modifiziertes LDL, die die Migration von Monozyten und T-Zellen in die Gefäßwand stimulieren (Abbildung 1B) [6]. Die Natur des Blutflusses – gleich ob Scherkräfte und Turbulenzen hoch oder niedrig sind – ist u.a. ausschlaggebend für die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen in diesen Gefäßabschnitten. Veränderungen des Blutflusses erhöhen die Expression von Genen, die in ihren Promotor-Regionen Elemente besitzen, die auf Scherkräfte antworten. So besitzen z.B. die Gene von Endothelzellen, die für ICAM-1 [7], die B-Kette des Plättchen-assoziierten Wachstumsfaktors (PDGF-B) [8] und für den Gewebefaktor [9] codieren, diese Elemente. Die Genexpression ist bei erhöhten Scherkräften erhöht [10]. Veränderungen des Blutflusses sind deshalb bedeutend für die Bestimmung welcher Gefäßbereich für eine Läsion anfälliger ist [11-13]. Einlagerung und Adhäsion von Monozyten und T-Zellen ereignen sich in diesen Bereichen aufgrund der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen sowohl auf Endothelzellen als auch auf Leukozyten. Neben der Art des Blutflusses ist eine hohe Plasmakonzentration von Cholesterin, vor allem von LDL (low-density lipoprotein), einer der Risikofaktoren erster Ordnung für Atherosklerose.

# 1. Einleitung

---

Obwohl Änderungen des Lebensstils und die Nutzung von neuen Pharmaka zur Senkung der Cholesterinwerte im Plasma [14] einen wichtigen präventiven Ansatz darstellen, sind kardiovaskuläre Erkrankungen weiterhin Todesursache Nummer eins in den USA, Europa und weiten Teilen Asiens [15, 16]. Die atherosklerotischen Läsionen entstehen prinzipiell in großen und mittelgroßen elastischen und muskulären Arterien und können zu Ischämien bis hin zum Infarkt von Herz, Gehirn oder Extremitäten führen. Sie können während der gesamten Lebenszeit einer Person vorhanden sein. Die früheste Form einer Läsion, auch „fatty streak“ genannt, kann schon bei Kindern und Jugendlichen beobachtet werden [17] und ist eine rein inflammatorische Läsion, bestehend aus von Monozyten abstammenden Makrophagen und T-Lymphozyten [18]. Chemokine sind für die Einwanderung und Akkumulation von Makrophagen in „fatty streak“ Läsionen verantwortlich (Abbildung 1B) [12, 19]. Im Rahmen der „response-to-injury“ Hypothese der Atherosklerose, wird davon ausgegangen, dass die endotheliale Dysfunktion ein wesentlicher Mechanismus der Atheroskleroseentstehung ist. Jede charakteristische Läsion der Atherosklerose repräsentiert ein anderes Stadium in einem chronisch entzündlichen Prozess in der Gefäßwand; wenn dieser Prozess unvermindert und exzessiv andauert, resultiert daraus eine fortgeschrittene und komplizierte Läsion.

Ursachen der endothelialen Dysfunktion, die zu Atherosklerose führt, sind:

- erhöhtes und modifiziertes LDL, wie z.B. die oxidierte Variante des LDL (oxLDL)
- durch u.a. das Rauchen von Zigaretten verursachte freie Radikale
- Hypertension
- Diabetes mellitus
- genetische Disposition
- erhöhte Plasmakonzentration von Homozystein
- infektiöse Mikroorganismen wie Herpesviren oder Chlamydia pneumoniae
- die Kombination aus diesen oder anderen Faktoren [20, 21].

Durch die endotheliale Dysfunktion wird die Gefäßwandpermeabilität und die Adhäsion von Leukozyten oder Thrombozyten an der Intima erhöht, weil antiaggregatorische Faktoren des Endothels, wie z.B. Prostacyclin, nicht mehr in ausreichendem Maße gebildet werden [22]. Die Läsion induziert im Endothel des Weiteren prokoagulatorische anstatt antikoagulatorische Eigenschaften sowie die Bildung von vasoaktiven Molekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren.

# 1. Einleitung

---

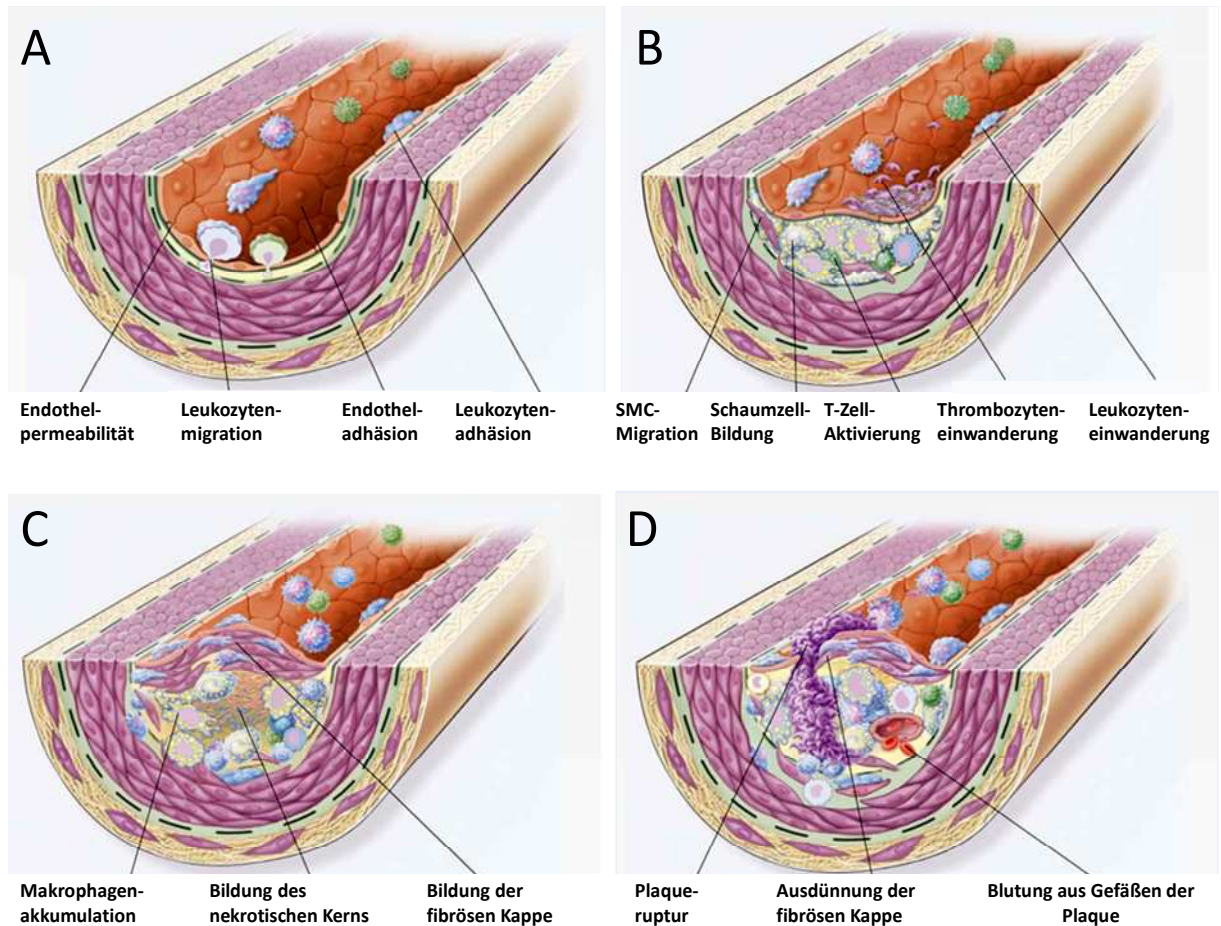
Wenn die inflammatorische Antwort die angreifenden Agenzien nicht effektiv neutralisiert oder zurückdrängt, kann sie für unbestimmte Zeit andauern. In diesem Fall stimuliert die inflammatorische Antwort die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen im Entzündungsgebiet, was eine intermediäre Läsion hervorruft. Wenn dieser Stimulus ungehindert andauert, kann sich die Arterienwand derart verdicken, dass es zur Einengung des Gefäßlumens kommt. Dieser Vorgang kann anfänglich bis zu einem gewissen Grad durch Vasodilatation kompensiert werden [23]. Dieses Phänomen wird „remodeling“ genannt und fällt daher in die Umbauphase. Während der Atherogenese sind nur wenige Granulozyten präsent, stattdessen besteht die Entzündungsantwort in den verschiedenen Stadien der Krankheit aus von Monozyten abstammenden Makrophagen und spezifischen Subtypen von T-Lymphozyten [24]. Eine fortwährende Entzündung führt zu wachsenden Zahlen von Makrophagen und Lymphozyten, welche aus dem Blut in die Läsion wandern um sich dort zu vervielfachen. Die Aktivierung dieser Zellen führt zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren [25, 26], welche weitere Schädigungen der Gefäßwand bis hin zur Ausbildung von fokalen Nekrosen zur Folge haben [27]. Die Kombination aus Akkumulation von mononukleären Zellen, Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Bildung von fibrösem Gewebe führt zu einer weiteren Vergrößerung und Formierung der Läsion mit Bildung einer fibrotischen Kappe, welche dem Entzündungskern aus Fetteinlagerung und Nekrose aufliegt. Es wird dann von der sogenannten fortgeschrittenen, komplizierten Läsion gesprochen (Abbildung 1C). Ab einem gewissen Grad kann das Gefäß diesen Vorgang nicht länger durch Vasodilatation kompensieren; die Läsion kann dann das Gefäßlumen einengen und den Blutfluss verändern. Bei den meisten Patienten tritt der Myokardinfarkt als ein plötzliches Ergebnis einer Erosion bei ungleicher Ausdünnung oder Ruptur der fibrösen Kappe auf, oft an einer prominenten Stelle der Läsion, in die Makrophagen einwandern, akkumulieren und aktiviert werden (Abbildung 1D) [28, 29]. Die Abtragung der fibrösen Kappe wird durch Metallproteinasen wie Kollagenasen, Elastasen und Stromelysine beeinflusst [30]. Aktivierte T-Zellen stimulieren die Produktion von Matrix-Metallproteinasen (MMPs) durch Makrophagen in den Läsionen, welches zur Instabilität der Plaque führt und eine Immunantwort zur Folge hat [31]. Diese Veränderungen werden des Weiteren begleitet von der Produktion prokoagulatorischer Gewebefaktoren [32, 33], die wiederum die Wahrscheinlichkeit einer Thrombose erhöhen. Thrombozytenadhäsion und wandständige Thrombose sind ubiquitär bei der Entstehung und der Bildung einer atherosklerotischen Läsion bei Tier und Mensch vorhanden (Abbildung 1B) [20].

# 1. Einleitung

---

Thrombozyten werden durch endotheliale Dysfunktion, Kollagen-Exposition und Makrophagen angezogen. Nach Aktivierung setzen Thrombozyten die in Granula gespeicherten Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die zusammen mit Thrombin für die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Monozyten in die Läsion verantwortlich sind [34]. Proinflammatorische Stimuli wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor (TNF) regulieren auch die Freisetzung von sekretorischer Phospholipase A<sub>2</sub> Typ IIa (sPLA<sub>2</sub>-IIa) dramatisch hoch [35-38]. Erhöhte Konzentrationen der sPLA<sub>2</sub>-IIa in entzündlichen Regionen legen nahe, dass dieses Enzym eine entscheidende Rolle in der Ausbreitung der Entzündungsantwort spielt [39-41], was durch verschiedene in-vivo-Studien bestätigt werden konnte [42]. Die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) repräsentiert eine wachsende Familie von Enzymen, die die sn-2-Ester-Bindung von Glycerophospholipiden von Zellmembranen und Lipoproteinen hydrolysieren und so Lysophospholipide und freie Fettsäuren freisetzen, einschließlich Arachidonsäure, die ein Vorläufer der bioaktiven Eikosanoide wie Prostaglandin E (PGE) ist [43]. Diese Hydrolyseprodukte können eine Vielzahl von proinflammatorischen Wirkungen auslösen, die zur Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque führen [44-47]. Klinische Studien besagen, dass eine erhöhte Konzentration von PLA<sub>2</sub> einen erheblichen unabhängigen Risikofaktor für koronare Herzkrankheit darstellt [48-50]. Die Hypothese der Beteiligung von sPLA<sub>2</sub>-IIa bei der Pathogenese der Atherosklerose wurde durch in-vivo-Daten verstärkt, die zeigten, dass sPLA<sub>2</sub>-transgene Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für Atherosklerose haben [37, 51].

# 1. Einleitung



**Abbildung 1: Entstehung einer atherosklerotischen Läsion [1].**

A) Faktoren, die für die frühesten Veränderungen einer atherosklerotischen Läsion verantwortlich sind: Erhöhte endotheliale Permeabilität, erhöhte Expression von Adhäsions-Molekülen und Migration von Leukozyten in die Arterienwand.

B) Faktoren, die für die Bildung von „fatty streaks“ verantwortlich sind: Einwanderung von glatten Gefäßmuskelzellen, Aktivierung von T-Zellen, Bildung von Schaumzellen, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten.

C) Faktoren, die für die Genese von komplizierten atherosklerotischen Läsionen verantwortlich sind: Bildung einer fibrösen Kappe, Bildung eines nekrotischen Kerns, Akkumulation von Makrophagen

D) Faktoren, die für die Bildung instabiler Plaques verantwortlich sind: Ruptur der fibrösen Kappe oder Ulzeration der fibrösen Plaque, Ausdünnung der fibrösen Kappe, Blutungen aus den vasa vasorum oder aus dem Lumen der Arterie sowie Bildung eines Thrombus mit konsekutivem Gefäßverschluss.

# 1. Einleitung

---

## **1.2. Endotheliale Dysfunktion**

Das Endothel besteht aus einer einlagigen Schicht von Zellen, die die Innenwand von allen Blutgefäßen und vom Herzen auskleidet und so eine wichtige Grenzfläche mit dem zirkulierenden Blut bildet. Das hoch spezialisierte, dynamische Gewebe hat wohlbekannt Funktionen in der kardiovaskulären Homöostase, einschließlich autokriner, parakriner, endokriner und immunologischer Funktionen, bei der Initiierung des Entzündungsprozesses durch Erhöhung der Zelladhäsion und Permeabilität sowie bei der Erhaltung der Fließeigenschaften des Blutes [52, 53]. Außerdem können Endothelzellen Veränderungen der örtlichen mit dem Blut übertragenen Signale, der hämodynamischen Kräfte und des Sauerstoffpartialdrucks erkennen und darauf antworten, indem sie das Gleichgewicht zwischen den folgenden potentiell gegensätzlich wirkenden Prozessen adäquat modulieren:

- (I) Vasodilatation und Vasokonstriktion, wodurch der Gefäßtonus reguliert wird
- (II) antithrombotische und prokoagulatorische Wirkungen, wodurch die Hämostase beeinflusst wird
- (III) Zellproliferation und Apoptose, wodurch das Wachstum und die Anzahl der Zellen in der Gefäßwand angepasst werden.

Diese endothelialen Funktionen werden durch die geregelte Produktion und Freisetzung von parakrinen Mediatoren wie, z.B. NO (Stickstoffmonoxid), ET-1 (Endothelin-1), Prostacyclin und Wachstumsfaktor vermittelt, sowie durch die Aktivität von Oberflächenenzymen wie ACE (Angiotensin-konvertierendes Enzym) und tPA (gewebespezifischer Plasminogenaktivator) und durch die Freisetzung von Oberflächenproteinen wie Adhäsionsmolekülen [52]. Wenn das Gefäßendothel nicht mehr in der Lage ist die physiologischen Mechanismen zur Regulation des Gefäßradius, der Blutgerinnung und der Produktion antiinflammatorischer Zytokine in der vorgesehenen Weise zu leisten, wird von endothelialer Dysfunktion gesprochen [45]. Bisweilen etwas unpräzise wird heute unter diesem Begriff eine verminderte Fähigkeit des Endothels, auf einen adäquaten Reiz hin mit einer NO-Freisetzung zu reagieren, verstanden. Die Bildung von NO, die durch eine spezifische Enzymklasse, die NO-Synthasen (NOS), katalysiert wird, stellt die qualitativ und quantitativ wichtigste vasodilatierende Komponente dar [54]. Den quantitativ bedeutendsten Anteil an der NO-Bildung in der Endothelzellschicht nimmt die endotheliale NOS (eNOS) ein [55]. Endotheliale Dysfunktion im Sinne einer verminderten Fähigkeit des Endothels, auf einen adäquaten Reiz hin mit einer NO-Freisetzung zu reagieren, konnte in Experimenten aufgrund der Reaktion von Gefäßen mit funktionseingeschränktem Endothel auf Acetylcholin (ACh) gezeigt werden [56].



# 1. Einleitung

---

Zum einen wirkt ACh über vaskuläre muskarinerge Rezeptoren vasokonstriktorisch, zum anderen unter physiologischen Bedingungen durch das Endothel vermittelt vasodilatatorisch, wobei es zur Aktivierung der eNOS kommt. Unter physiologischen Bedingungen dominieren die vasodilatatorischen Einflüsse über die vasokonstringierenden, während sich dieses Verhältnis unter pathophysiologischen Bedingungen umkehrt. So überwiegt in Bereichen von Endothelläsionen mit daraus folgender inadäquater NO-Freisetzung die über den muskarinergen Mechanismus vasokonstringierende Wirkung von ACh [56-58]. In-vivo-Experimente an hypercholesterinämischen Hasen und Affen mit endothelialer Dysfunktion bestätigten diesen Mechanismus [56, 57]. Bei Patienten mit Atherosklerose [59], koronarer Herzkrankheit [58, 60], Herzinsuffizienz [61], Hypertonie [52, 62], Hypercholesterinämie [52] oder Diabetes mellitus [63], bei deren Ätiologie eine endotheliale Dysfunktion hauptsächlich zugrunde liegt, werden ähnliche Beobachtungen gemacht. Dieser Mechanismus der veränderten endothelabhängigen Vasodilatation zeigt in den verschiedenen Krankheitsentitäten eine multifaktorielle Ätiologie, wobei die Veränderungen von spezifischen Manifestationen der geschädigten Gefäßregion und der Dauer der Schädigung abhängig sind. So scheint vermehrter oxidativer Stress einen wichtigen Mechanismus in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion im Rahmen vieler kardiovaskulärer Erkrankungen darzustellen, obgleich auch andere Mechanismen wie eine verminderte Ausschüttung oder Aktivität von NOS mitwirken dürften [52]. Durch eine Anzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass die hauptsächliche Quelle für reaktive Sauerstoffradikale (ROS) und somit für den erhöhten oxidativen Stress die vaskulären NADPH-Oxidasen sind. Dabei geht die erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität aus verschiedenen Zellen innerhalb der Gefäßwand hervor, wie z.B. von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten der Adventitia und Entzündungszellen [64]. Die traditionellen Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose, wie Dyslipidämie, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und das Rauchen von Zigaretten, sind alle mit endothelialer Dysfunktion assoziiert, die zumindest teilweise auf die erhöhte Produktion von ROS zurückzuführen ist [52]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass jeder einzelne dieser Faktoren die NADPH-Oxidase-Aktivität zu steigern und dadurch die endothelabhängige (NO-abhängige) Vasodilatation zu beeinträchtigen vermag [64-67]. Dieses Enzymsystem wird von einer Vielzahl von weiteren Stimuli aktiviert, wozu auch die sPLA<sub>2</sub> zählt [68].

# 1. Einleitung

---

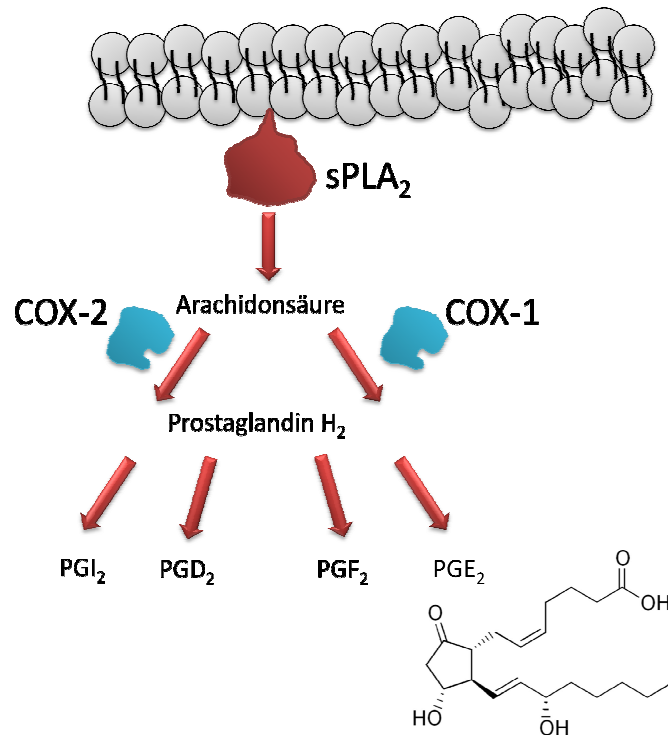
## **1.3. Sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> Typ IIa**

### **1.3.1. Familie und Wirkung der sPLA<sub>2</sub>**

Phospholipasen werden als Esterasen klassifiziert und kommen ubiquitär im Säugetierorganismus vor. Entsprechend der Positionen der Esterbindungen, welche hydrolytisch von Phospholipasen gespalten werden, können die Enzyme in die Acylhydrolasen PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>, PLB und in Lysophospholipasen sowie in die Phosphodiesterasen PLC und PLD eingeteilt werden [69]. Während des letzten Jahrzehnts wurden 20 unterschiedliche PLA<sub>2</sub> entdeckt, die sich bis jetzt in vier Hauptfamilien einteilen lassen: sekretorische PLA<sub>2</sub>, cytosolische PLA<sub>2</sub>, calciumunabhängige PLA<sub>2</sub> und PAF-Acetylhydrolase [70-72]. Die PLA<sub>2</sub> (anteilmäßig bedeutendste PL) setzt aus den Phospholipiduntereinheiten der Zellmembranen Arachidonsäure (mehrfach ungesättigte Fettsäure), die in der sn-2-position der Phospholipide gebunden ist, frei. Die freigesetzten Arachidonsäuren können durch die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und -2 (COX-2) in Prostaglandine (Abbildung 2), durch die 5-Lipoxygenase, die 12-Lipoxygenase oder die 15-Lipoxygenase in Leukotriene und durch die Einwirkung der Cytochrom-P450-Monooxygenasen in Epoxyeicotetraensäure umgewandelt werden [73]. Dadurch entstehen sowohl vasokonstringierende als auch vasodilatierende Mediatoren. Aufgrund der unterschiedlichen Expression dieser entsprechenden Enzymsysteme in den einzelnen Geweben entstehen spezifische Reaktionsmuster, die auf die Freisetzung der Arachidonsäure folgen. Eine der am besten charakterisierten Typen der PLA<sub>2</sub> ist die sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> der Gruppe IIa [74, 75], welche initial in der Synovialflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis isoliert wurde und ursprünglich als nicht-pankreatische oder Synovia-spezifische PLA<sub>2</sub> bezeichnet wurde [39, 40, 76]. Das Enzym wurde 1989 geklont und die Kristallstruktur wurde 1991 veröffentlicht [39, 77]. Die sPLA<sub>2</sub>-IIa hat ein niedriges Molekulargewicht (14 kDa), ist Histidin- und Calcium-abhängig, besteht aus wesentlichen Proteinen, die reich an Arginin und Lysin sind und besitzt 7 Disulfidbrücken, welche eine starre Struktur und Widerstandsfähigkeit gegenüber pH-Werten und thermaler und proteolytischer Denaturierung gewährleisten [71]. Die sPLA<sub>2</sub> von Säugern scheint in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen involviert zu sein. Dazu gehören die Verdauung von Lipiden, die Ausschüttung von potenten Lipidmediatoren als Antwort auf stimulierende Zytokine [75], die Zellproliferation [78], die Kontrolle von Infektionen durch Viren und Bakterien [79], die Beseitigung von apoptotischen und verletzten Zellen [80, 81], die Reparatur von Phospholipiden, der Lipoproteinkatabolismus [82-85] und der Einfluss auf die Tumorgenese und auf den Entzündungsprozess [86].



# 1. Einleitung



**Abbildung 2: Arachidonsäure-Stoffwechsel.**

Freisetzung von Arachidonsäure durch sPLA<sub>2</sub> und konsekutive Entstehung von Prostaglandinen durch COX-1 und COX-2.

## 1.3.2. Verteilung und Induktion der sPLA<sub>2</sub>-IIa

Die Enzymaktivität der sPLA<sub>2</sub> im Serum gesunder Individuen ist prinzipiell niedrig. Während eines akuten entzündlichen Geschehens wie bei einer Sepsis, einem septischen Schock [87-89], einer akuten Pankreatitis, Peritonitis [90, 91] oder Appendizitis [92], kann die Aktivität des Enzyms drastisch ansteigen. Außerdem scheint die sPLA<sub>2</sub> eine wichtige Rolle bei anderen mit entzündlichen Prozessen assoziierten Krankheiten zu spielen, wie z.B. der Ischämie [93, 94] und den neurodegenerativen Krankheiten, einschließlich Schlaganfällen und Morbus Alzheimer [95-97]. Die Herkunft der sPLA<sub>2</sub> im Serum ist weiterhin Gegenstand lebendiger Diskussionen. Zahlreiche Zellen und Organe werden als Syntheseort erwogen. So wurde herausgefunden, dass nach in-vitro-Induktion mit Lipopolysacchariden (LPS), IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) eine Expression des Enzyms in Chondrozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen (SMCs), Mesangiumzellen der Niere und in Astrozyten stattfindet [98-102]. Des Weiteren induzieren proinflammatorische Zytokine wie IL- $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  die Synthese und Sekretion von sPLA<sub>2</sub> in humanen HEpG2 Hepatozyten [103]. Deshalb wird neben aktivierten Leukozyten und glatten Muskelzellen die Leber als Syntheseort der im Serum beobachteten sPLA<sub>2</sub>-IIa diskutiert (Abbildung 3) und aus Gründen des rapiden Anstieges während lokaler und systemischer

# 1. Einleitung

Entzündungsreaktionen, wird sPLA<sub>2</sub>-IIa zu den Akute-Phase-Proteinen gezählt [104]. Passend dazu korreliert die Serumkonzentration der sPLA<sub>2</sub>-IIa mit der Konzentration von CRP in verschiedenen akuten und chronischen Krankheiten sowie postoperativ [105-108].

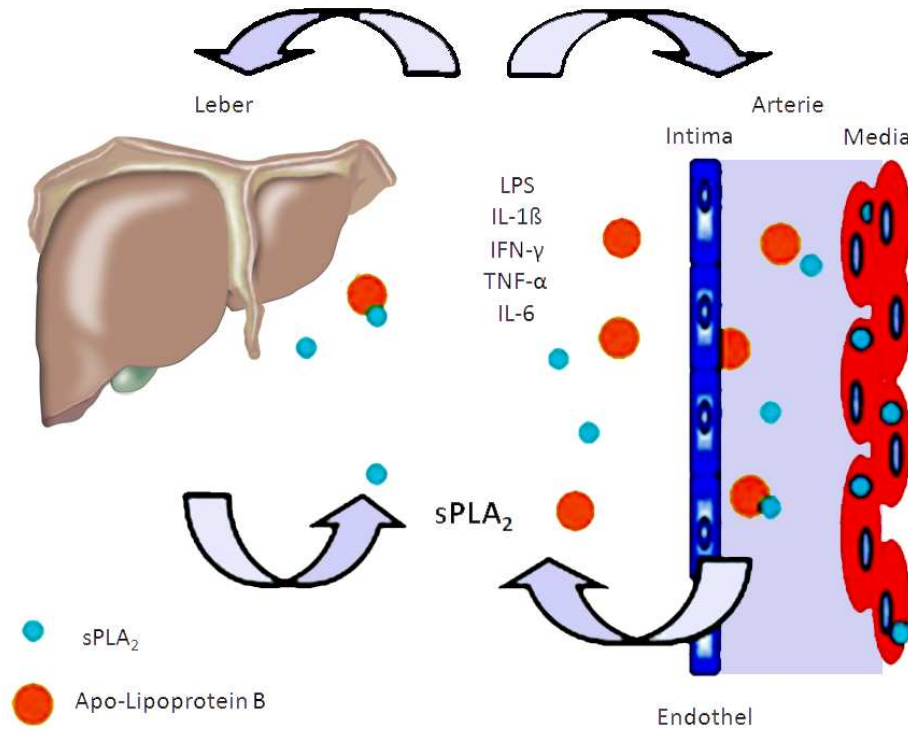


Abbildung 3: Produktion von sPLA<sub>2</sub>-IIa im Plasma [109].

### 1.3.3. Proatherogene Rolle der sPLA<sub>2</sub>-IIa

Ähnlich der Situation in anderen entzündeten Regionen wurde in einer Studie von Menschikowski die Expression der sPLA<sub>2</sub>-IIa in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen. Immunhistochemisch konnte in durch Endarterioektomie gewonnenen menschlichen Arterien sPLA<sub>2</sub>-IIa in atherosklerotischen Läsionen identifiziert werden. Die positive sPLA<sub>2</sub>-IIa-Reaktion war in dieser Studie auf Regionen begrenzt, die massive Lipidakkumulationen und Leukozyteninfiltrate, Zellnekrosen und Verkalkungen aufwiesen. Bereiche ohne atherosklerotische Läsionen und Zeichen inflammatorischer Reaktionen waren frei von sPLA<sub>2</sub>-IIa [41, 85, 110]. Obwohl eine sPLA<sub>2</sub>-IIa-Expression ex vivo weder in Monozyten noch in nicht stimulierten, von Monozyten stammenden Makrophagen gesunder Spender nachweisbar war, war die sPLA<sub>2</sub>-IIa-mRNA nach Exposition der Makrophagen mit minimal modifiziertem und leicht oxidiertem LDL stark induziert [111]. Dies legt nahe, dass die sPLA<sub>2</sub>-IIa-Expression in Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen durch modifiziertes LDL verursacht sein könnte.

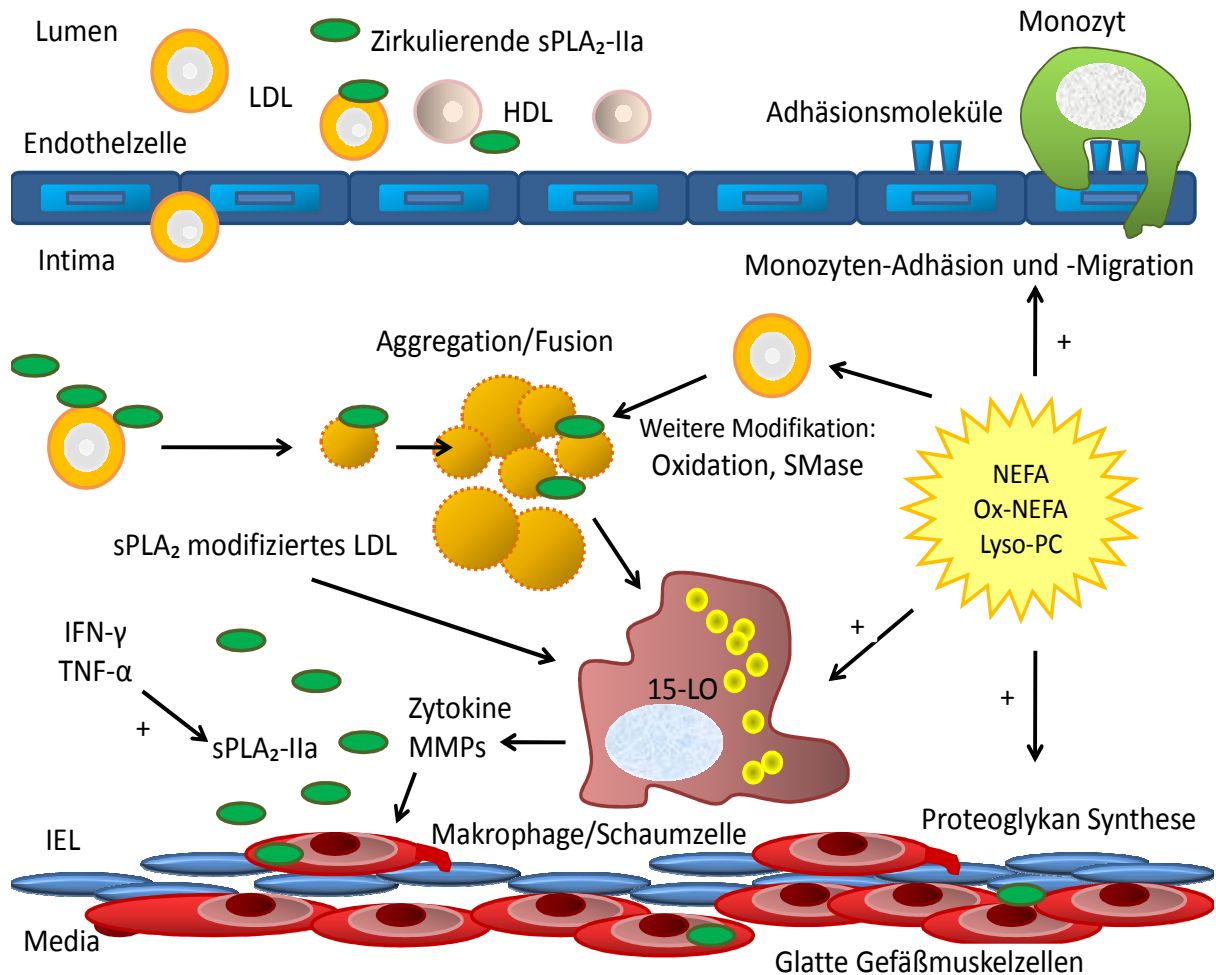
# 1. Einleitung

---

Derartig modifizierte Lipoproteine lassen sich im subendothelialen Raum während inflammatorischer Reaktionen finden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sPLA<sub>2</sub>-IIa, unterstützt vom natürlichen Promotor, auch in Makrophagen von sPLA<sub>2</sub>-IIa transgenen Mäusen exprimiert wird [112]. In einer Serie von Gewebepräparationen konnte sPLA<sub>2</sub>-IIa in der Adventitia und in glatten Gefäßmuskelzellen der äußeren Bereiche der Media deutlich nachgewiesen werden [41, 85]. Zusätzlich zum Nachweis von sPLA<sub>2</sub>-IIa in atherosklerotischen Läsionen konnten andere Studiengruppen auch in nicht atherosklerotisch veränderten Arterien verschiedener Proben eine positive Immunreaktion von sPLA<sub>2</sub>-IIa nachweisen [38, 113]. In diesen sPLA<sub>2</sub>-IIa positiven, nicht atherosklerotischen Geweben konnte demonstriert werden, dass zur gleichen Zeit proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  anwesend waren. Deren Präsenz führte zu der Annahme, dass trotz morphologischer Normalität inflammatorische Prozesse vorhanden waren. In gleicher Weise war in Gefäßen mit atherosklerotischen Plaques und massiver Infiltration von CD68-Makrophagen keine positive Immunreaktion von sPLA<sub>2</sub>-IIa vorzufinden. In diesen Präparationen waren gleichzeitig keine der analysierten proinflammatorischen Zytokine aufzufinden, was zu dem Schluss führte, dass die Expression von sPLA<sub>2</sub>-IIa sehr stark mit dem Aktivierungszustand der inflammatorischen Prozesse in der Gefäßwand korreliert [85]. Letztendlich konnte in prospektiven Studien mit Patienten mit koronarer Herzkrankheit die Serumkonzentration von sPLA<sub>2</sub>-IIa als prognostischer Parameter für koronare Ereignisse unabhängig von anderen Risikofaktoren identifiziert werden [48, 114-117]. Auch wenn der Ursprung der Serum-sPLA<sub>2</sub>-IIa der in den Studien analysierten Patienten noch unklar ist, werden die entzündeten Bereiche der Gefäßwand selbst und die Leber als Syntheseort diskutiert. Wenn die Quelle der Serum-sPLA<sub>2</sub>-IIa in der alterierten Gefäßwand selbst liegt, könnte die Konzentration der Serum-sPLA<sub>2</sub>-IIa eine wichtige diagnostische Hilfe bei der Einschätzung der Aktivität entzündlicher Reaktionen und in Verbindung hiermit der Vulnerabilität atherosklerotischer Plaques sein. Es wird angenommen, dass aufgrund einer verstärkten Synthese von Hydrolasen durch aktivierte Entzündungszellen die Plaqueformationen instabil werden und es durch den Kontakt von Plasmakomponenten mit subendothelialen und prokoagulatorischen Strukturen zu einer plötzlichen Okklusion eines Blutgefäßes kommt [118, 119]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sPLA<sub>2</sub> seine proatherogene Wirkung in der Arterienwand durch drei wesentliche Mechanismen ausübt, die in Abbildung 4 gezeigt werden. Erstens induziert es die Freisetzung von relativ hohen Konzentrationen von Lipidmediatoren wie unveresterten Fettsäuren (NEFAs), oxidierten NEFAs und Lysophospholipiden, welche die Funktionen und Eigenschaften von Gefäßzellen in Bereichen von akkumulierten Apo-Lipoproteinen B-100 beeinflussen [120, 121].

# 1. Einleitung

Zweitens modifiziert sPLA<sub>2</sub> Apo-Lipoproteine B-100, so dass diese verstärkt atherogen wirken, indem sie die Bindungsbereitschaft der Lipoproteine für Proteoglykane steigert und sie empfindlicher für weitere oxidative und enzymatische Modifizierungen macht [44, 83, 84, 122]. Drittens trägt das Enzym zur Akkumulation von Lipoproteinen bei, indem es die Aggregation und Fusion der an Proteoglykane gebundenen Apo-Lipoproteine B-100 induziert [123-125].



**Abbildung 4: Proatherogene Mechanismen von sPLA<sub>2</sub>-IIa [109].**

Apo-Lipoprotein B und sPLA<sub>2</sub>-IIa können durch Interaktion mit arteriellen Proteoglykanen die enzymatische Hydrolyse der Phospholipide von Lipoproteinen fördern. NEFAs, oxidierte NEFAs und Lysophosphatidylcholin (Lyso-PC) binden Albumin oder bleiben mit modifizierten Lipoproteinen verbunden. Dies induziert eine Aggregation und Fusion der Lipoproteine, Prozesse die durch die Proteoglykane der Intima gefördert werden. Durch sPLA<sub>2</sub>-IIa modifiziertes LDL kann durch Sphingomyelinase (SMase) und 15-Lipoxygenase (15-LO) weiter modifiziert werden. NEFAs, oxidierte NEFAs und Lyso-PC können proinflammatorische zelluläre Prozesse herbeiführen, wie z.B. die Freisetzung von Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen, die Einwanderung von Monozyten und deren Ausdifferenzierung in Makrophagen, wodurch die Sekretion von Proteoglykanen durch glatte

# 1. Einleitung

---

Gefäßmuskelzellen erhöht wird. Die lokale Freisetzung von Zytokinen kann die Synthese und die Sekretion von sPLA<sub>2</sub>-IIa stimulieren. Im Plasma zirkulierendes sPLA<sub>2</sub>-IIa vermag ebenfalls Lipoproteine zu hydrolysieren. Die genannten Mechanismen können eine lokale Entzündung auslösen und unterhalten [109].

## **1.3.4. Sekretorische PLA<sub>2</sub> und bioaktive oxidierte Phospholipide**

Die bereits erwähnten Studien konnten zeigen, dass in sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen eine verstärkte Atherosklerose vorzufinden ist und dass sPLA<sub>2</sub>-IIa in atherosklerotischen Läsionen nachweisbar ist. In einer Studie von Leitinger et al. von 1999 konnte außerdem nachgewiesen werden, dass sPLA<sub>2</sub> die Konzentration von bioaktiven oxidierten Phospholipiden erhöht, welche wiederum eine atherogene Wirkung haben wie in früheren Studien gezeigt werden konnte [126]. Die Bedeutung von bioaktiven Lipiden für die Entstehung der Atherosklerose wurde durch Untersuchungen verdeutlicht, in denen Tieren vor einer cholesterinreichen Diät oxidiertes LDL injiziert wurde und diese daraufhin Antikörper gegen die Lipide entwickelten, weshalb sie teilweise gegen die Entstehung atherogener Läsionen während der cholesterinreichen Diät geschützt waren [127]. Auch in anderen entzündlichen Prozessen wird den bioaktiven Phospholipiden eine Bedeutung zugeschrieben, da bei einer großen Anzahl von chronisch entzündlichen Erkrankungen Antikörper gegen bioaktive Phospholipide nachgewiesen werden konnten [128]. In erwähnter Studie wurden die Konzentrationen von bioaktiven Phospholipiden in der Leber von sPLA<sub>2</sub>-transgenen und C57BL/6-Mäusen verglichen, die eine hochkalorische Diät erhalten hatten. Die Konzentration der biologisch aktiven oxidierten Phospholipide war in den transgenen Mäusen im Vergleich zu den nicht transgenen signifikant erhöht. Es wird angenommen, dass sPLA<sub>2</sub> eine vermehrte Entstehung und einen verminderten Abbau von aktiven Lipiden begünstigt, was auf folgendem Erklärungsmodell fußt: die enzymatische Reaktion der sPLA<sub>2</sub> befreit mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) aus der sn-2-Position von Phospholipiden, hauptsächlich Phosphatidylethanolamine aufgrund der Substratspezifität des Enzyms. Es wird angenommen, dass die Bildung von ROS in der Leber und in Zellen der Arterienwand aufgrund der Akute-Phase-Bedingungen, verursacht durch die hochkalorische Diät, erhöht ist. Mechanismen, durch die ROS freigesetzt werden, scheinen u.a. auch Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen einzuschließen. Sauerstoffradikale scheinen die freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren anzugreifen und Lipidhydroperoxide zu produzieren, welche die Bildung von bioaktiven Phospholipiden über eine vermehrte Oxidation von PUFAs fördern. Außerdem wird angenommen, dass sPLA<sub>2</sub> die Konzentration von bioaktiven oxidierten Phospholipiden auch durch Veränderung von HDL erhöht.

# 1. Einleitung

Aus sPLA<sub>2</sub>-transgenen Tieren isoliertes HDL hat seine protektive Wirkung verloren und steigert vielmehr die durch minimal oxidiertes LDL induzierte Monozyteneinwanderung in das Endothel. HDL von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen verfügt über eine geringere Konzentration des Enzyms Paraoxonase (PON), welches bioaktive Phospholipide abbaut. Die erniedrigte Paraoxonase scheint somit ein Mechanismus zu sein, der die protektive Wirkung von HDL aufhebt und eine Akkumulation von bioaktiven Phospholipiden in verschiedenen Geweben und im Plasma zur Folge hat. Die durch bioaktive oxidierte Phospholipide induzierte Monozytenadhäsion an Endothelzellen führt schließlich zu der Entstehung von entzündlichen Gefäßwandläsionen (fatty streak) wie in Abbildung 5 nachzuvollziehen ist [51].

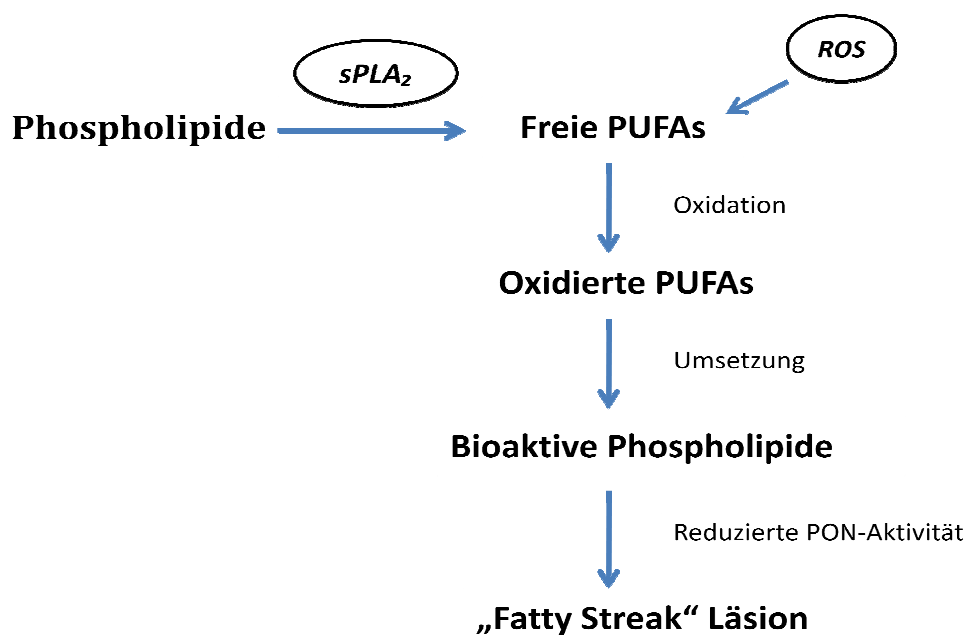


Abbildung 5: Beitrag der sPLA<sub>2</sub> zur Entstehung bioaktiver oxidierter Phospholipide.

## 1.3.5. Die sPLA<sub>2</sub>-IIa und die COX-2-abhängige PG-Biosynthese

Die sekretorische PLA<sub>2</sub>-IIa ist imstande die durch einen Stimulus initiierte unmittelbare und verzögerte Phase des Arachidonsäure-Metabolismus durch autokrine, parakrine und juxtakrine Mechanismen zu verstärken [129-132]. Die Funktionen der sPLA<sub>2</sub>-IIa sind von deren Fähigkeit Proteoglykane an der Zelloberfläche zu binden abhängig [75, 131, 133]. Die Freisetzung von Arachidonsäure durch sPLA<sub>2</sub>-IIa findet gewöhnlich in aktivierten, jedoch nicht in ruhenden Zellen statt [75, 133]. Dies deutet darauf hin, dass Störungen an der Membran während der Zellaktivierung eine Voraussetzung für die Hydrolysierung von Membranphospholipiden durch sPLA<sub>2</sub>-IIa darstellen. Die Biosynthese von Prostaglandinen (PG) ereignet sich generell in zwei verschiedenen Phasen, der unmittelbaren und der verzögerten Antwort [75, 129, 131, 133-136].

# 1. Einleitung

---

Agonisten, die rasch die cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen anheben, lösen die unmittelbare Antwort aus, welche innerhalb von Minuten stattfindet und eine funktionelle Kopplung zwischen schon vorher vorhandenen Enzymen der PG-Biosynthese voraussetzt.  $\text{PLA}_2$ , einschließlich  $\text{cPLA}_2$  und  $\text{sPLA}_2\text{-IIa}$ , können Arachidonsäure der konstitutiven Cyclooxygenase-1 (COX-1) oder der induzierbaren COX-2 zuführen. Welche Cyclooxygenase genutzt wird, scheint von der Art der Zelle, dem Stimulus und der Menge an freigesetzter Arachidonsäure zum Zeitpunkt der PG-Bildung abzuhängen [131, 137]. Die verzögerte PG-Bildung, die mehrere Stunden dauert, wird von einem kontinuierlichen Angebot an Arachidonsäure über lange Kulturperioden begleitet. Die induzierbare COX-2 ist eine Voraussetzung für diese anhaltende Antwort, in der  $\text{cPLA}_2$  entsprechend als Initiator und  $\text{sPLA}_2\text{-IIa}$  als Verstärker fungieren [75, 129, 131, 132, 136, 138]. Die  $\text{sPLA}_2\text{-IIa}$  hat also die Fähigkeit die durch Zytokine induzierte COX-2-Expression zu erhöhen, welches zu einer effizienten PG-Biosynthese vom verzögerten Typ führt.

## 1.3.6. Prostaglandin $\text{E}_2$

Prostaglandine, einschließlich verschiedener Prostaglandine und Thromboxane, sind Reaktionsprodukte der Cyclooxygenase, freigesetzt aus C20-ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure. Diese Substanzen werden als Antwort auf verschiedene Stimuli von verschiedenen Zellen synthetisiert und sogleich nach der Synthese freigesetzt um in der Umgebung ihres Synthesortes zu agieren und die lokale Homöostase aufrechtzuerhalten [139]. Prostaglandin E, im Besonderen  $\text{PGE}_2$ , ein Derivat der Arachidonsäure, wird von allen Prostaglandinen am meisten gebildet, am häufigsten in Tierspezies gefunden und zeigt die vielfältigsten Wirkungen. Durch pharmakologische Analysen wurden die Rezeptoren, über die Prostaglandine ihre Wirkung entfalten, erstmals beschrieben, wonach für jedes Prostaglandin jeweils ein Rezeptor existiert: DP, FP, IP und TP entsprechend für PGD, PGF, PGI und TXA und vier verschiedene Rezeptoren namens EP1, EP2, EP3 und EP4 entsprechend für den Typ E der Prostaglandine [140]. Untersuchungen auf molekularer Ebene zeigten, dass Prostaglandinrezeptoren G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR) sind und dass es tatsächlich eine Familie von acht GPCRs gibt, die den pharmakologisch definierten Rezeptoren entsprechen. Die Wirkungen von  $\text{PGE}_2$  werden also über vier GPCRs, die als Subtypen EP1, EP2, EP3 und EP4 bezeichnet werden, sowie über mehrere Isoformen des Subtyps EP3, vermittelt. Die EP-Subtypen zeigen Unterschiede in der Signaltransduktion, in der Gewebelokalisation und in der Regulierung ihrer Expression. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist der EP2-Rezeptor, der an  $\text{G}_s$  gekoppelt ist und eine Erhöhung der cAMP-Konzentration vermittelt.



# 1. Einleitung

---

Prostaglandine, im Besonderen  $\text{PGE}_2$ , spielen eine entscheidende Rolle bei akuten Entzündungen, indem sie in der peripheren Zirkulation agieren und Hyperämie und Schwellung induzieren, zeigen aber auch antiinflammatorische Wirkungen [141, 142]. Übereinstimmend mit den antiinflammatorischen und antiarthritischen Wirkungen von Nicht-Steroidalen-Anti-Rheumatika (NSAIDs) wird über den EP2-Rezeptor die Entstehung einer kollageninduzierten Arthritis vermittelt [143]. Demnach moduliert  $\text{PGE}_2$  zusammen mit anderen Prostaglandinen verschiedene Schritte der Entzündung in einer vom Kontext abhängigen Art und Weise und koordiniert den gesamten Prozess mit einer sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Ausrichtung. Hingegen ist seit langem bekannt, dass  $\text{PGE}_2$  die Veresterung von Cholesterin inhibiert und die Synthese von Cholesterin durch ein negatives Feedback erhöhen kann [144]. Des Weiteren steigert  $\text{PGE}_2$  die Expression von Matrix-Metallproteinasen in Makrophagen und damit von Enzymen, die für die Entwicklung von instabilen Plaques als entscheidend angesehen werden [145].

## 1.3.7. ROS und NADPH-Oxidase

ROS umfassen freie Radikale wie  $\text{O}_2^\ominus$  (Superoxidanion), NO (Stickstoffmonoxid),  $\text{ONOO}^\ominus$  (Peroxynitrit) und  $\text{OH}^\ominus$  (Hydroxyl-Radikal) sowie  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hydrogenperoxid), das per se kein Radikal darstellt, aber als solches reagiert [146]. Aufgrund ihrer Instabilität sind sie extrem reaktiv und können ihre Reaktionspartner beschädigen. Obgleich alle Zellen über Antioxidantien verfügen um diese Beschädigungen zu vermeiden oder zu reduzieren, kann eine Situation auftreten, in der ROS überwiegen, welches als oxidativer Stress bezeichnet wird. Oxidativer Stress führt zu Gewebeschäden gefolgt von Irradiation und Hyperoxie und scheint eine Ursache für neurodegenerative Erkrankungen wie M. Alzheimer zu sein [147]. Seitdem bekannt ist, dass die Oxidation von LDL im Endothel eine Vorstufe für die Plaquebildung ist, wird davon ausgegangen, dass oxidativer Stress im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen steht und dass die erhöhte Bildung von ROS in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion spielt [65].  $\text{O}_2^\ominus$  wird durch einmalige Reduktion von molekularem Sauerstoff gebildet, hat eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden und wird rasch in  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt, wobei dieser Vorgang durch Isoenzyme der Superoxiddismutase (SOD) beschleunigt wird. Während  $\text{O}_2^\ominus$  generell aufgrund seiner schwachen Permeabilität durch Zellmembranen auf seinen Entstehungsort beschränkt ist, ist  $\text{H}_2\text{O}_2$  ungehindert in seiner Diffusionsfähigkeit und kann daher sehr viel leichter Fernwirkungen ausüben.



# 1. Einleitung

---

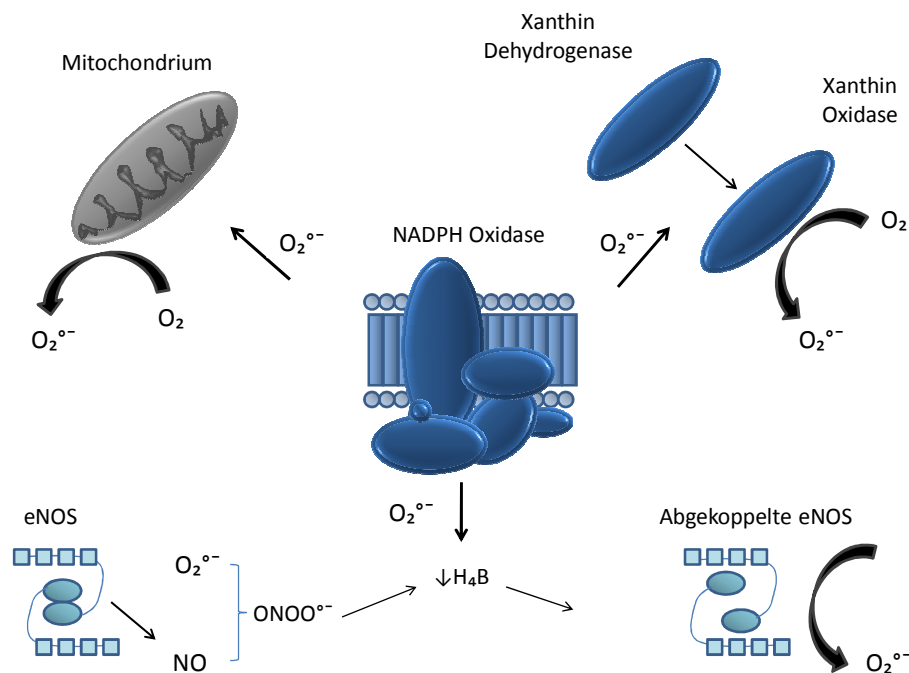
$O_2^{\circ-}$  geht mit NO viel schneller eine Reaktion ein als mit SOD, weshalb es bei hohen nanomolaren Konzentrationen von  $O_2^{\circ-}$  und NO als erstes zu einer Bildung von  $ONOO^{\circ-}$  bei gleichzeitiger Inaktivierung von NO kommt [65, 146, 148]. ROS wurden ursprünglich als zufällige Nebenprodukte des Metabolismus mit gewöhnlich schädigender Wirkung durch ihre Reaktion mit Membranen, DNA, Makromolekülen und Proteinen angesehen [149]. Dieser Mechanismus gilt als wichtig im Rahmen gewisser Erkrankungen wie z.B. bei Reperfusionsschäden, die die Bildung von vermehrt toxischen Radikalen zur Folge haben. In letzter Zeit wurde erkannt, dass ROS (im Besonderen  $O_2^{\circ-}$ ,  $H_2O_2$  und NO) weitaus feinere Wirkungen auf die Zellfunktion ausüben, indem sie sowohl physiologische als auch pathophysiologische Regulatoren von intrazellulären Signalkaskaden darstellen [65, 146]. Wesentlich für die Endothelforschung ist die durch  $O_2^{\circ-}$  hervorgerufene rasche Inaktivierung von NO, die eine endotheliale Dysfunktion zur Folge hat. Von den verschiedenen Herkunftsmöglichkeiten von  $O_2^{\circ-}$  scheint die NADPH-Oxidase eine entscheidende Rolle zu spielen, zumal die aus der NADPH-Oxidase hervorgehenden ROS möglicherweise auch andere Quellen von  $O_2^{\circ-}$  (wie z.B. abgekoppelte NOS) modulieren (Abbildung 6). So bilden NO-Synthasen gewöhnlich NO, können aber im Zusammenhang mit einem Mangel an NOS-Kofaktor  $H_4B$  (Tetrahydrobiopterin) „abgekoppelt“ werden [52]. In diesem Fall wird eNOS zu einer signifikanten Quelle für  $O_2^{\circ-}$ .  $H_4B$  ist hochempfindlich gegenüber oxidativem Abbau durch  $O_2^{\circ-}$  oder  $ONOO^{\circ-}$ , so dass der initiale Abbau von  $H_4B$  durch anderweitig entstandene ROS wiederum das Abkoppeln von NOS und eine Verstärkung von oxidativem Stress herbeiführen kann [150, 151]. Experimentell konnte demonstriert werden, dass die Bildung von ROS durch NADPH-Oxidase zu einer Abkoppelung von NOS und damit zu einer weiteren Erhöhung der ROS-Produktion führt [151]. Der NADPH-Oxidase-Komplex wurde ursprünglich in Phagozyten identifiziert und beschrieben, wo er eine essentielle Rolle bei der unspezifischen Wirtsabwehr gegen mikrobielle Organismen spielt [152]. Es wurde berichtet, dass allgemein vergleichbare Enzyme in einer Anzahl nicht phagozytierender Zellen, einschließlich Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten und Fibroblasten existieren, wo sie mit anderen Funktionen in Erscheinung treten [64, 153-157]. Die Erkenntnis, dass die endotheliale (oder allgemein vaskuläre) NADPH-Oxidase-Aktivität durch eine große Auswahl (patho)physiologisch relevanter Faktoren reguliert wird, hat das Interesse an diesem Enzym in den letzten Jahren wachsen lassen. Derartige Stimuli sind:

- (I) G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Agonisten wie Angiotensin II und ET-1 [158-160]

# 1. Einleitung

- (II) Wachstumsfaktoren wie Thrombin und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) [161]
- (III) Zytokine wie TNF- $\alpha$  [158, 162]
- (IV) Stoffwechselfaktoren wie erhöhte Glukose, Insulin oder NEFAs wie durch sPLA<sub>2</sub> freigesetzte Arachidonsäure [163, 164]
- (V) oxidierte Lipide wie oxLDL [165]
- (VI) Scherkräfte [166]
- (VII) Hypoxie/ Reoxygenierung [167]
- (VIII) Ernährungsmangel [168].

Die bereits genannten Eigenschaften der sPLA<sub>2</sub>-IIa führten zu der Hypothese, dass die sPLA<sub>2</sub>-IIa einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der endothelialen Dysfunktion hat.



**Abbildung 6: Wechselbeziehung der NADPH-Oxidase und anderer Quellen von ROS.**

(modifiziert nach Robin Ray, Clinical Science, 2005).

Das durch NADPH-Oxidase gebildete O<sub>2</sub><sup>•-</sup> kann die Produktion von ROS aus anderen enzymatischen Quellen von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> beeinflussen. So wird z.B. die Xanthindehydrogenase durch Oxidation in eine O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-bildende Xanthinoxidase umgewandelt, woraus eine erhöhte Produktion von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> resultiert. Ähnlich sind auch die Mitochondrien empfindlich gegenüber oxidativer Schädigung, so dass es zu einer erhöhten ROS-Produktion durch Mitochondrien kommen kann. Schließlich können O<sub>2</sub><sup>•-</sup> und ONOO<sup>•-</sup> den für NOS essentiellen Kofaktor H<sub>4</sub>B abbauen und die Abkopplung von NOS begünstigen, was zur Produktion von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> durch das Enzym führt.

## 2. Material und Methoden

---

### 2. Material und Methode

#### 2.1. Material

##### 2.1.1. Thorakale Aorten von transgenen Mäusen und Kontrolltieren

Für die Versuche wurden männlichen C57BL/6-Mäusen (WTM) und altersgleichen sPLA<sub>2</sub>-IIa-transgenen Mäusen, wobei im Folgenden nur noch von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen gesprochen wird, die thorakale Aorta entnommen. Die WTM von der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) haben ein Durchschnittsalter von 54 Tagen (48 – 65 Tage) und ein Durchschnittsgewicht von 27 g (23 – 34 g). Die sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäuse, die eine freundliche Gabe von Herrn Professor Uwe Tietge (Universität Groningen, Groningen, Niederlande) sind, haben ein Durchschnittsalter von 58 Tagen (45 - 69 Tage) und ein Durchschnittsgewicht von 24 g (20 – 28 g). Bei einer Raumtemperatur zwischen 19 und 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 70 % werden die Tiere in Kolonien in Käfigen gehalten, deren Einstreu aus entstaubten und entkeimten Weichholzfasern (Firma Altromin, Soest, Deutschland) besteht, die zweimal pro Woche erneuert wird. Zusätzlich zum Trinkwasser und Trockenfutter (Firma Altromin), das den Tieren pausenlos zur Verfügung steht, werden ihnen dreimal pro Woche Körner und Obst angeboten. In dem fensterlosen Raum wird ein Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden durch ein Zeitschaltprogramm simuliert, indem zwischen 6 Uhr und 18 Uhr eine Dauerbeleuchtung einsetzt. Zur Gewährleistung einer adäquaten Akklimatisierung der Tiere finden frühestens am sechsten Tag nach ihrer Anlieferung Versuche statt. Die für die in-vitro-Versuche benötigten Aorten wurden zwischen 6 Uhr und 18 Uhr explantiert.

##### 2.1.2. Pufferlösungen und Hauptbestandteile

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung für den Kleingefäßmyographen.**

	Konzentration (mmol/l)
NaCl	119,54
KCl	4,69
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,22
CaCl <sub>2</sub>	1,61
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,17
NaHCO <sub>3</sub>	25,01
Glukose	10,98
EDTA	0,024

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1.3. Substanzen

Acetylcholin	Merck, Darmstadt/D
AH-6809	Tocris, Ellisville /USA
Apocynin	Calbiochem, Frankfurt a.M./ D
Bidestilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Fluka, Buchs/CH
Dinatriumethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt/D
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck, Darmstadt/D
Ethanol	Merck, Darmstadt/D
Glukose	Merck, Darmstadt/D
Indometacin	Sigma, St. Louis/USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma, St. Louis/USA
Kaliumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma, St. Louis/USA
Ketamin	Sigma, St. Louis/USA
L-NAME	Sigma, St. Louis/USA
Magnesiumsulfat (Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Sigma, St. Louis/USA
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt/D
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt/D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, St. Louis/USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt/D
Natriumnitroprussid	Sigma, St. Louis/USA
Norepinephrin	Sigma, St. Louis/USA
NS-398	Cayman, Ann Arbor/USA
Phenylephrin	Sigma, St. Louis/USA
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Sigma, St. Louis/USA
SC-19220	Sigma, St. Louis/USA
SC-560	Cayman, Ann Arbor/USA
Stickstoff	Linde, Wiesbaden/ D
Sylgaard	Merck, Darmstadt/D
Tiron	Merck, Darmstadt/D
Urethan	Sigma, St. Louis/USA
Xylazin	Sigma, St. Louis/USA

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1.4. Geräte und Utensilien

Analysewaage	Sartorius, Göttingen/D
Computer	Fujitsu Siemens, Sunnyvale/USA Compaq/HP, Berlin/D
Gefrierschränke	- 80 °C Heraeus, Osterode/D Forma Scientific, Marietta/USA
	- 20 °C Liebherr, Biberach an der Riß/D Bosch, Stuttgart/D
Glaswaren (Kolben, Pipetten etc.)	Brand, Wertheim/D
Kleingefäßmyographmodell 410A	DMT Danish Myo Technology (früher: JP Trading), Aarhus/ DK
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart/D Liebherr, Biberach an der Riß/D
Magnetrührer	IKA-Werk, Staufen im Breisgau/D
Mehrkanalpipette	Biohit, Helsinki/SN
Mikroskope	Zeiss, Jena/D
Monitor	LG, Seoul/Ko
pH-Messgeräte	Beckman, Palo Alto/USA
pH-Messgerät PHM210	Radiometer, Kopenhagen/DK
pH-Messelektrode MI-410	Microelectrodes, Bedford/USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg/D
Schüttler	New Brunswick Scientific New Jersey/USA
Vortex	Roth, Karlsruhe/D
Wasserbäder	Haake, Karlsruhe/D Julabo, Seelbach/D
Vakuumpumpe Laboport	KNF, Freiburg/D
Zentrifugen	Heraeus, Osterode/D

### 2.1.5. Verbrauchsmaterial

Einwegskalpelle	Rüttgers, Solingen/D
Pipettenspitzen	Süd Laborbedarf, Gauting/D
Präparationsbesteck	FST, Foster City/USA

## 2. Material und Methoden

---

Reaktionsgefäße	0.5 ml	Sarstedt, Nürnberg/D
	1.5 ml 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg/D
	15 ml 20 ml	Falcon, Oxnard/USA
		Greiner, Nürtingen/D
Schläuche		VWR, Darmstadt/D
Spritzen und Kanülen (Sterican)		Braun Melsungen, Melsungen/D

### 2.1.6. Software

Adobe Acrobat 7.0 Professional	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
Endnote X2	ISI ResearchSoft, Berkeley/USA
MS Office 2007 Profession	Microsoft Corp., Redmond/USA
Windows XP (SP3)	Microsoft Corp., Redmond/USA
MS Explorer 6.0	Microsoft Corp., Redmond/USA
Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego/USA
Myodaq und Myodata 2.02	DMT Danish Myo Technology

## 2.2. Methode

### 2.2.1. Der Kleingefäßmyograph

Im Jahr 1976 formulierten Michael J. Mulvany und William Halpern erstmals die Methode des Kleingefäßmyographen. Hierbei werden aus größeren und kleineren elastischen Gefäßen, wie z.B. der thorakalen Aorta von Ratten und Mäusen oder aus kleinen Widerstandsgefäßen gewonnene Gefäßsegmente in Form einer Ringpräparation in den Myographen eingespannt. Diese Methodik macht die Ermittlung von Messdaten über morphologische, mechanische, aber vor allem auch pharmakologische Eigenschaften größerer als auch kleinerer Gefäße möglich und erlaubt es die Gefäße nach einer annähernd atraumatischen Explantation und Präparation in den Myographen einzuspannen. Ein weiterer beachtlicher Gewinn dieser Methode besteht darin, pharmakologische Messungen unter festgesetzten isometrischen Bedingungen vornehmen zu können. Im Gegensatz zu den klassischen Perfusionsmethoden, bei denen durch Erfassung aller Widerstandsgefäße der Gesamtwiderstand gemessen wird, hat der Kleingefäßmyograph die pharmakologische Charakterisierung eines einzelnen Widerstandsgefäßes möglich gemacht.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2.2. Physiologische Gesetzmäßigkeiten

Gefäßinnendruckmessungen in verschiedenen Gefäßbettsystemen zeigen in einigen Gefäßregionen einen präkapillären Druckverlust von über 50 % in Gefäßen mit einem Lumendurchmesser von mehr als 100  $\mu\text{m}$ . Diese Gefäßabschnitte werden als proximale Widerstandsgefäße bezeichnet und haben neben dem Aufbau und der Erhaltung des peripheren Widerstandes die Aufgabe den Blutfluss durch die einzelnen Organe auf den benötigten Bedarf abzugleichen, während die distal gelegenen Gefäßabschnitte den Blutfluss entsprechend der jeweiligen Stoffwechsellage zu den einzelnen Zellen eines Organs leiten. Mit der hier beschriebenen Methode des Kleingefäßmyographen können Aussagen über proximale Widerstandsgefäße mit einem Lumendurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  bis 2 mm gemacht werden, nicht aber über die distalen Gefäßabschnitte. Zu beachten ist, dass Gefäße aus verschiedenen Gefäßregionen der gleichen Spezies sowie Gefäße der gleichen Gefäßregion verschiedener Spezies unterschiedlich reagieren. So antworten z.B. die proximalen renalen, mesenterialen und femoralen Widerstandsgefäße der Ratte auf Norepinephrin mit einer Vasokonstriktion, die zerebralen und koronaren Widerstandsgefäße dahingegen mit einer Vasodilatation [169]. Aus diesem Grund lässt diese Methodik nur Aussagen über die jeweils untersuchten Gefäße einer Spezies zu und nur nach weiteren physiologischen Untersuchungen lassen sich diese auch auf andere Gefäßregionen der gleichen Spezies oder auf die gleichen Gefäßregionen anderer Spezies übertragen.

### 2.2.3. Anordnung des Kleingefäßmyographen

In der Abbildung 7 ist eine Übersicht über den Aufbau des Kleingefäßmyographenmodells 410A der Firma JP Trading zu sehen, mit dessen Hilfe zwei Gefäßringpräparate gleichzeitig getestet werden können. Der Myograph besteht aus einem Gehäuse, in das ein Kraftmesser und eine Heizung integriert sind sowie ein rostfreies Edelstahlwasserbad mit einem Kammervolumen von ca. 15ml. Innerhalb der Kammer befinden sich für die beiden Gefäßringpräparate jeweils zwei Trägerbacken zwischen die die Gefäßringe eingespannt werden. Ein Begasungssystem, ein Vakuumsystem, ein Myo-Interface und ein Computersystem sind als externe Geräte an den Kleingefäßmyographen angeschlossen. Zur Reduzierung einer Evaporation des Kammerinhalts und zur Aufrechterhaltung eines konstanten Sauerstoffpartialdrucks wird die Edelstahlkammer mit einer dafür vorgesehenen Abdeckung verschlossen, welche über verschiedene Zugänge verfügt. Zum einen können über diese Zugänge der Kammer Lösungen und Testsubstanzen sowohl zugefügt als auch entzogen werden, zum anderen gewährleisten sie eine kontinuierliche Begasung der Kammer.

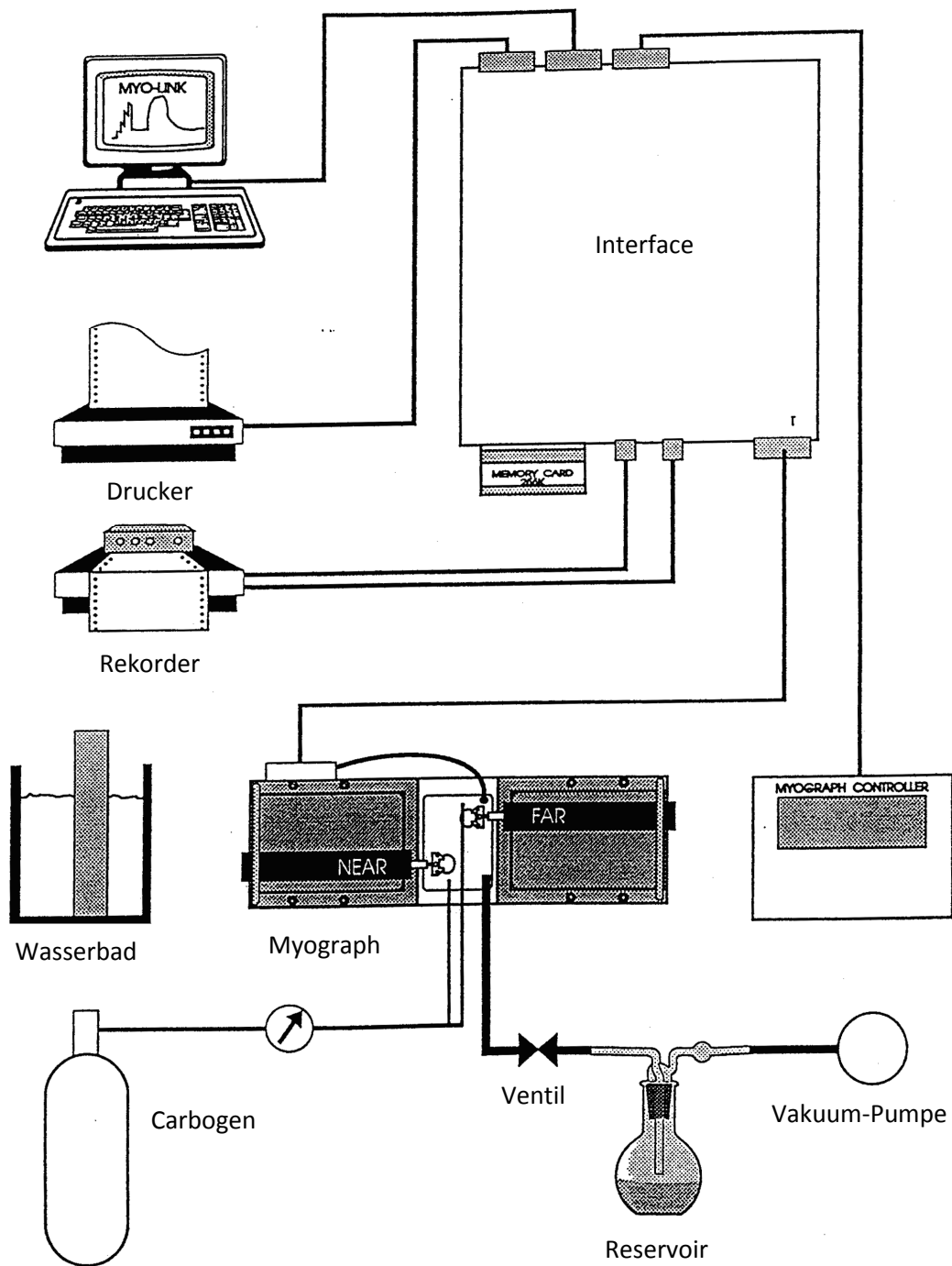
## 2. Material und Methoden

---

Für die Begasung wird Carbogen (95% O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>) verwendet, wodurch in der Kammer über den gesamten Versuchsablauf ein physiologischer pH-Wert von 7,40 aufrechterhalten wird, der während eines Versuches mehrfach mittels einer an ein pH-Meter angeschlossenen pH-Elektrode kontrolliert wird. Das Vakuumsystem, zusammengesetzt aus einer Vakuumpumpe, die über ein Vakuumventil mit einer Auffangflasche verbunden ist, dient der Elimination von Flüssigkeiten. Eine beständige Temperaturkontrolle wird durch ein Thermometer gewährleistet, das über einen eigenen Zugang in der Kammerabdeckung mit dem Medium in Verbindung steht. Mit einem Auflösungsvermögen von 0,1 °C misst jener Temperatursensor die Kammertemperatur, die über die Myographenheizung beliebig zwischen 0 und 50 °C eingestellt werden kann. Durch Anpassung der Heizkraft an sich wandelnde Umgebungseinflüsse kann eine beständige Wasserbadtemperatur von 37 °C über die gesamte Dauer des Experimentes aufrechterhalten werden. Damit beim Wechseln des Kammerinhaltes keine relevanten Temperaturschwankungen auftreten, die den Kraftmesser thermisch beeinflussen könnten, werden die zugeführten Lösungen und Testsubstanzen zuvor in einem externen Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die innerhalb der Kammer jeweils ein Paar bildenden Trägerbacken kommunizieren mit Bestandteilen des Myographengehäuses, so dass die eine Trägerbacke mit einem Kraftmesser und die andere mit einer Mikrometerschraube verbunden ist. Mit Hilfe der Mikrometerschraube können die Trägerbacken in µm-Schritten einander angenähert und voneinander entfernt werden, wodurch der Raum zwischen den Trägerbacken entsprechend verändert werden kann. Der aus einem hochsensitiven Piezo-gesteuerten Widerstandssensor bestehende Kraftmesser misst in einem Bereich von 250 mN und mit einem Auflösungsvermögen von 0,01 mN, so dass minimale durch Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur hervorgerufene Kraftänderungen detektierbar werden. Der Widerstandssensor ist über ein Kabel mit dem extern gelegenen Myo-Interface verbunden, das wiederum an ein Computersystem angeschlossen ist, welches die digitale Speicherung und Auswertung der gesammelten Messdaten ermöglicht. Der Datenerhebung dient das Programm Myodaq 2.02, das parallel auf verschiedenen Kanälen sowohl die Messdaten des Kraftmessers als auch die Daten des Temperatursensors transferiert und speichert, welche schließlich durch das Analyseprogramm Myodata 2.02 verarbeitet werden können.



## 2. Material und Methoden



**Abbildung 7: Versuchsanordnung eines Kleingefäßmyographen.**

(aus „Procedures for investigation of small vessel using small vessel myograph“, Mulvany MJ, 1996)“.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2.4. Versuchsvorbereitung

In den Experimenten werden Messungen an thorakalen Aorten von männlichen Mäusen der oben erwähnten Stämme vorgenommen, wobei der Fähigkeit zur Vasokonstriktion und noch mehr zur Vasodilatation besonderes Interesse entgegengebracht wird. Die Anästhesierung der Tiere erfolgt mit Hilfe intraperitonealer Applikation von Ketamin/Xylazin in einer Dosierung von (80/12 mg/kg Körpergewicht). Nach Freilegung der abdominalen Aorta durch eine mediane Laparotomie folgt die Darstellung der thorakalen Aorta durch Eröffnen des Brustkorbes durch eine mediane Sternotomie und die behutsame Mobilisierung der Aorta unter Zuhilfenahme einer Mikroschere. Mit dieser wird das Gefäß im Übergangsbereich von der Aorta thoracalis in die Aorta abdominalis auf Zwerchfellhöhe durchschnitten und der thorakale Abschnitt der Aorta sorgfältig von seinem Untergrund getrennt. Damit es zu keinen strukturellen und nachfolgenden funktionellen Schäden kommt, darf das Gefäß bei diesem Manöver weder in longitudinaler noch in transversaler Ebene gedehnt werden. Nach ihrer vollständigen Explantation wird die Aorta in ein Becherglas mit Tyrodelösung (physiologische Kochsalzlösung) gegeben, die im Vorfeld im Kühlschrank auf 4 °C gekühlt und über 10 Minuten mit Carbogen begast wurde. Die weitere Präparation der Aorta findet unter einem binokulären Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung in einer Petrischale statt, deren Boden mit einer ca. 5 mm dicken Schicht eines Polymers (Sylgaard) ausgekleidet ist, das die Aorta ohne mechanische Hilfsmittel auf dem Boden der Petrischale fixiert und so durch optimale Schonung eine Feinpräparation ohne Strukturbeschädigungen ermöglicht. Schließlich wird ein 2 mm langes Gefäßstück von der nun vollständig von periadventitiellem Bindegewebe befreiten Aorta abgeschnitten, durch deren Lumen zwei 40 µm durchmessende Drähte geführt werden, die an den Schrauben der beiden Trägerbacken fixiert werden. Der nun in den Myographen eingespannte Aortenring muss den beiden Drähten mobil aufliegen ohne dass ein Gefäßbereich zwischen dem Draht und den Trägerbacken festklemmt. Die Trägerbacken werden anschließend durch Drehen der Mikrometerschrauben voneinander entfernt bis das Gefäßstück eine spannungsfreie Position auf den Drähten einnimmt, bei der die Einstellung der Trägerbacken als Ausgangsstellung definiert und die Kraftanzeige am Myo-Interface auf Null tariert werden kann.

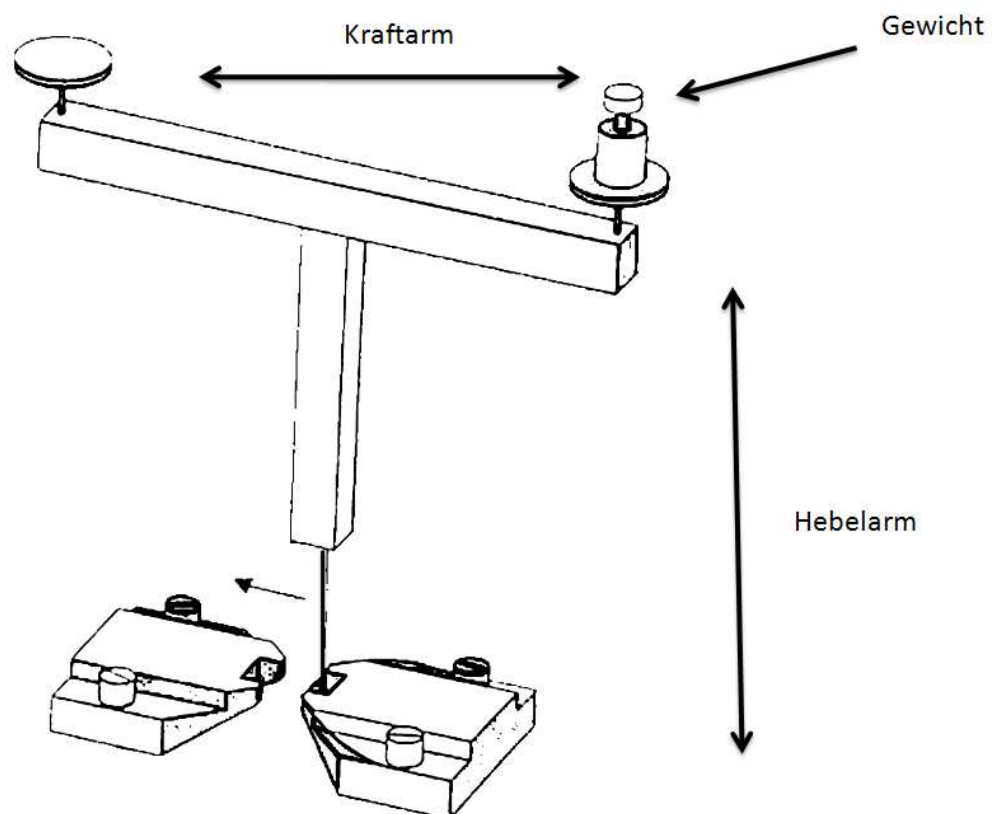
## 2. Material und Methoden

### 2.2.5. Eichung des Kraftmessers

Die Kraftanzeige des Kraftmessers wird in regelmäßigen Abständen mittels einer für den Kleingefäßmyographen hergestellten Kalibrierungswaage auf 9,81 mN/g geeicht (Abbildung 8). Hierzu wird ein Draht auf bereits erläuterte Weise an der Trägerbacke eingespannt, die in Verbindung mit dem Kraftmesser steht. Durch Positionierung des Hebelarmes der Kalibrierungswaage genau in den Raum zwischen Trägerbacke und eingespanntem Draht werden ein Kontakt des Hebelarmes mit dem Draht und ein Ausschlag des Kraftmessers verhindert. Der Kraftarm der Kalibrierungswaage wird anschließend mit einem Gewicht von 2 g beladen. Das Verhältnis zwischen Kraftarm und Hebelarm der Waage ergibt 2 cm zu 4 cm. Entsprechend der Gleichung:

$$F_{\text{Kraftmesser}} = W * g * (\text{Kraftarmlänge} / \text{Hebelarmlänge}),$$

wobei  $g$  der Gravitationskonstanten ( $g = 9,81 \text{ mN/g}$ ) entspricht, wirkt somit eine Kraft von 9,81 mN auf den Kraftmesser ein.



**Abbildung 8: Darstellung der Kalibrierungswaage bei Eichung des Kraftmessers.**

(aus „Procedures for investigation of small vessel using small vessel myograph“, Mulvany MJ, 1996)“.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2.6. Festlegung des Gefäßlumendurchmessers

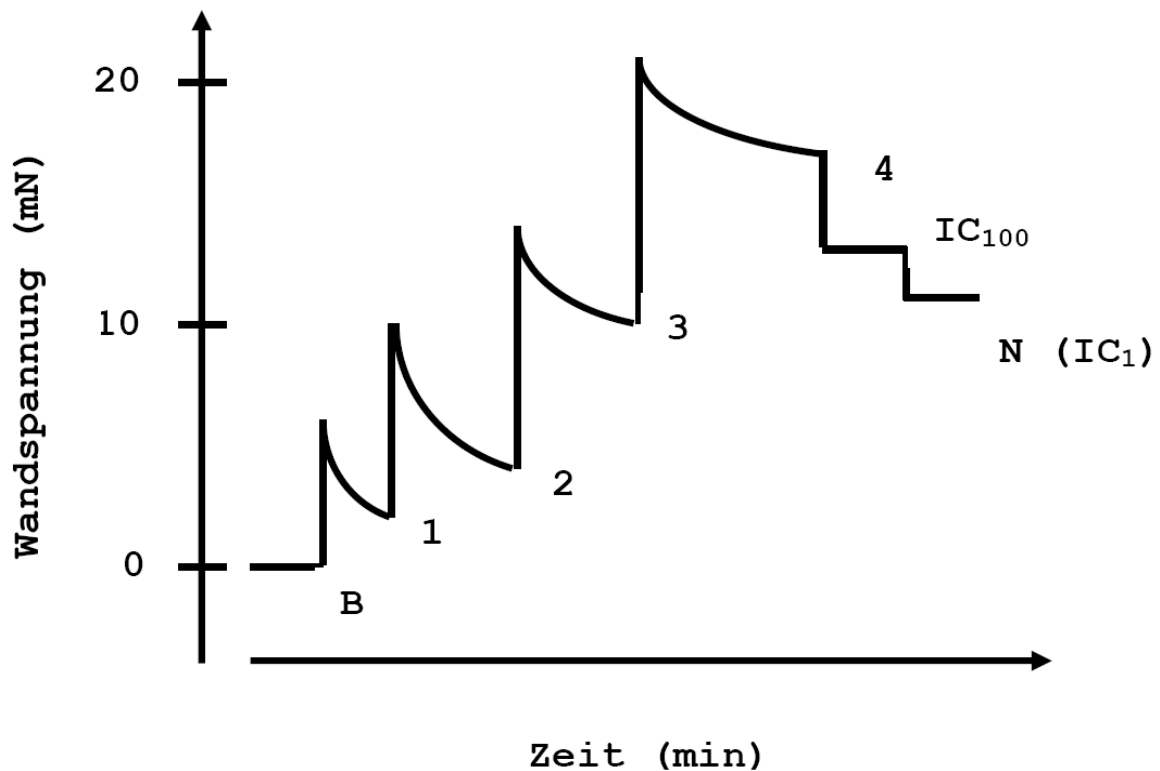
Eine Festlegung des Gefäßlumendurchmessers ist nötig um vergleichbare Messungen an verschiedenen Gefäßen durchzuführen. Das Reaktionsvermögen der präparierten Gefäße auf Agonisten ist vom Ausmaß ihrer Vorspannung abhängig, weshalb definierte Gegebenheiten zur Durchführung pharmakologischer Versuche erforderlich sind. Erklären lässt sich dieses Verhalten u.a. durch die kontraktile Elemente der glatten Gefäßmuskulatur Aktin und Myosin, die nur dann optimal interagieren können, wenn sie durch eine entsprechende Vorspannung ideal gegeneinander ausgerichtet werden, was die Wechselbeziehung zwischen aktiver Wandspannung und dem Lumendurchmesser verdeutlicht. Ein vollständig relaxiertes Gefäß, das einem transmuralen Druck von 100 mmHg ausgesetzt ist, besitzt den optimalen Lumendurchmesser [170], auf den das eingespannte Gefäßsegment im Normalisierungsprozess eingestellt werden soll und der nachstehend als  $IC_{100}$  angegeben wird. Beim Normalisierungsvorgang wird die Wandspannung des Gefäßes stufenweise erhöht, indem die beiden Träger, zwischen die der Gefäßring eingespannt ist, in  $\mu\text{m}$ -Schritten voneinander entfernt werden, wobei sowohl die Mikrometerveränderung als auch die durch die einzelnen Distensionsschritte hervorgerufene Kraft gemessen wird (Abbildung 9). Durch Kenntnis der Stärke der verwendeten Drähte und des Abstandes der sich gegenüberliegenden Träger lässt sich der interne Gefäßumfang errechnen, wohingegen die Gefäßlänge mittels eines auf das binokkuläre Mikroskop aufgesetzten, kalibrierten Objektivs ermittelt wird. Der Quotient aus gemessener Kraft und Gefäßlänge entspricht der Wandspannung. Unter Verwendung der Gleichung nach Laplace kann der effektiv wirkende Druck  $P_i$  ermittelt werden [170]. Hierbei gilt:

$$P_i = \text{Wandspannung} / (\text{Innerer Gefäßumfang} / (2 * \pi)).$$

Der effektive Druck stellt eine Kalkulation jenes Druckes dar, der vorliegen müsste um das Gefäß auf den gemessenen inneren Umfang auszudehnen. Das Normalisierungsprogramm von Myodaq erlaubt die Registrierung jedes Datenpaares aus Wandspannung und innerem Gefäßumfang sowie die simultane Berechnung des sich daraus ergebenden effektiven Gefäßinnendruckes. Bei Überschreiten eines effektiven Druckes von 100 mmHg wird die Gefäßextension abgeschlossen. Anhand der erfassten Messdaten wird eine exponentielle Kurve entworfen, bei der der Gefäßinnendurchmesser gegen die dabei entstehende Wandspannung aufgetragen wird. Die Laplace'sche Relation zwischen Wandspannung und Gefäßinnendurchmesser lässt die Ermittlung jenes Gefäßinnendurchmessers innerhalb der entsprechenden Kurve zu, bei dem die Wandspannung 100 mmHg ( $IC_{100}$ ) beträgt (Abbildung 10).

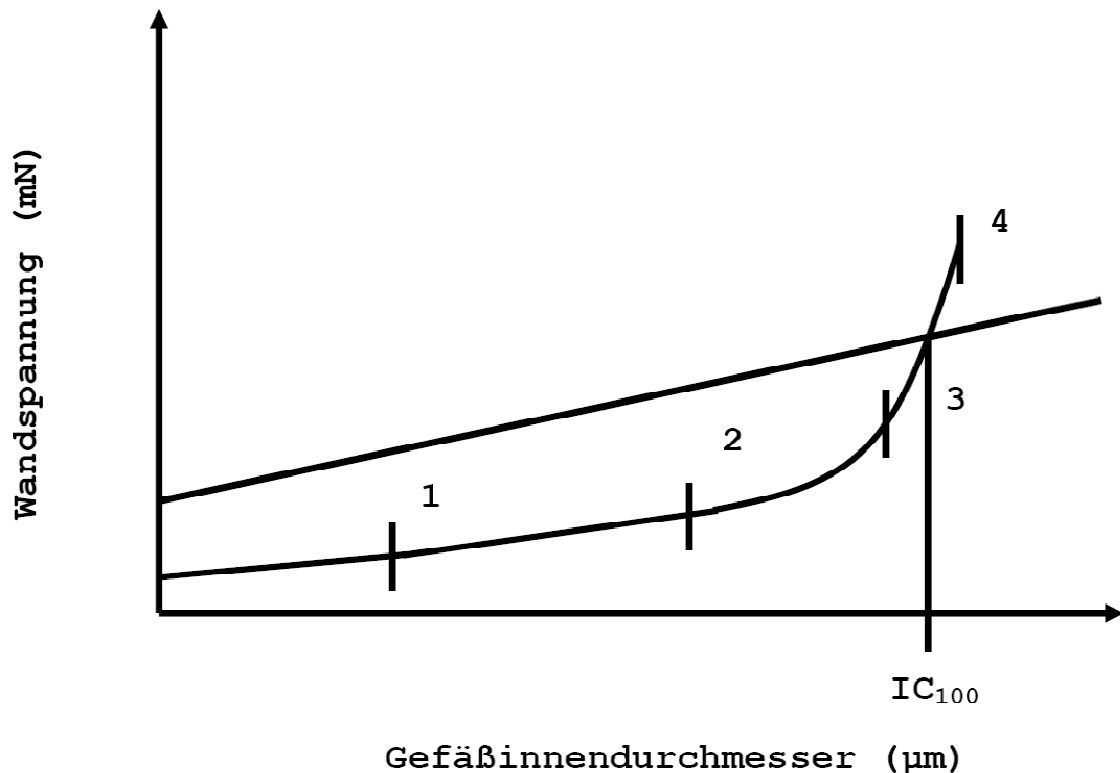
## 2. Material und Methoden

Experimentellen Studien zufolge ist die aktive Kraftproduktion der Gefäße bei einem Gefäßinnendurchmesser von 90 % des  $IC_{100}$  maximal, welcher im folgenden als  $IC_1$  angegeben wird [170]. Da alle in den Experimenten verwendeten Gefäße somit über einen Gefäßinnendurchmesser von  $IC_1 = 0.9 * IC_{100}$  verfügen, lassen sich die ermittelten Daten der einzelnen Gefäße miteinander vergleichen.



**Abbildung 9: Darstellung eines Normalisierungsverfahrens am Kleingefäßmyographen.**

Der Messpunkt B veranschaulicht die tarierte Nullwandspannung. Die Messpunkte 1, 2, 3 und 4 geben die Wandspannung eine Minute nach manueller Dehnung um einige Mikrometer wieder. Bei Messpunkt 4 ist die Wandspannung größer als 100 mmHg, infolgedessen die Ruhespannung um einen definierten Betrag reduziert wird bis die Gefäße die  $IC_{100}$  aufweisen. Messpunkt N zeigt die Anpassung der Gefäße auf den endgültigen Innendurchmesser  $IC_1$ .



**Abbildung 10: Beziehung von Gefäßinnendurchmesser und Wandspannung eines Gefäßes.**

Beim Normalisierungsvorgang mit variablen Druckverhältnissen kommt es zu einem exponentiellen Kurvenverlauf, bei einem konstanten transmuralen Druck von 100 mmHg zu einem linearen Kurvenverlauf. Der Schnittpunkt der beiden Kurven zeigt den Gefäßinnendurchmesser, bei dem das Gefäß einem transmuralen Druck von 100 mmHg ( $IC_{100}$ ) ausgesetzt ist.

### 2.2.7. Überprüfung der Vitalität der eingespannten Gefäße

Bei jedem Versuch findet eine Vitalitätsprüfung der in den Myographen eingespannten Gefäße statt um ggf. struktur- und funktionsgeschädigte Präparate auszusondern und durch neue zu ersetzen. Zur Überprüfung der rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion und Dilatation werden konstringierende Stimulatoren wie Kaliumchlorid (KCl, 130 mmol/l) und dilatierende Stimulatoren wie Natriumnitroprussid (SNP, 1 µmol/l) verwendet, während die rezeptorabhängige Vasokonstriktion und Dilatation durch entsprechende Agonisten wie Phenylephrin (PE, 1 µmol/l) und Acetylcholin (ACh, 10 µmol/l) getestet wird. Nach Einstellung des optimalen Gefäßinnendurchmessers durchläuft jedes Gefäß vor dem eigentlichen Versuch nachstehende Vorkaskade zur Überprüfung der Gefäßeigenschaften:

## 2. Material und Methoden

---

01. Kaliumchlorid (130 mmol/l) bis zwei vergleichbare Kontraktionen gemessen werden
02. PE (1  $\mu\text{mol/l}$ ) bis zwei vergleichbare Kontraktionen gemessen werden
03. nach PE-induzierter (1  $\mu\text{mol/l}$ ) Kontraktion Dilatation durch Acetylcholin (10  $\mu\text{mol/l}$ )
04. am Versuchsende nach PE-induzierter (1  $\mu\text{mol/l}$ ) Kontraktion Dilatation durch SNP (1  $\mu\text{mol/l}$ )

Im Fall einer nicht konstanten oder zu schwachen Vasokonstriktion ( $< 5 \text{ mN}$ ) unter PE (1  $\mu\text{mol/l}$ ) oder einer mangelhaften endothelvermittelten Vasodilatation unter Acetylcholin, werden die geschädigten Aortenringe durch neue ausgetauscht, so dass lediglich die Gefäßpräparate in den Versuchen Verwendung finden, die die zuvor erläuterten Vorbedingungen erfüllen. In den Versuchen beweisen ca. 70 % der eingespannten Gefäßsegmente reproduzierbare vasokonstringierende und dilatierende Eigenschaften, während die restlichen 30 % der Präparate nicht verwertbar sind. Jedes Experiment wird an mindestens sechs Aortenringpräparaten von jeweils verschiedenen Tieren der gleichen Spezies wiederholt.

### 2.2.8. Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse

Aufgrund der bis zu 9 Stunden dauernden Experimente wurde die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse für Maximalkontraktionen und Dosis-Wirkungs-Kurven der verschiedenen vasokonstringierenden Substanzen kontrolliert, indem durch repetitive Erzeugung einer Maximalkontraktion oder Dosis-Wirkungs-Kurve die kontraktile Eigenschaften der Gefäße und ihre Antwort auf die einzelnen Agonisten über diesen Zeitraum untersucht wurden. Hierbei wurden keine signifikanten Veränderungen im Ausmaß der Gefäßkontraktionen über die mehrstündigen Versuche registriert.

### 2.2.9. Statistik

Die Resultate sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angeführt. Die Reaktionen wurden als Kraftänderungen in mN erfasst. Die über Myodaq gespeicherten Daten wurden unter Zuhilfenahme des Analyseprogrammes Myodata 2.01 statistisch ausgewertet, wobei ein Wert von  $P < 0.05$  als statistisch signifikant gilt. Die erhobenen Resultate beschreiben Gruppen von unverbundenen Stichproben mit potenziell unterschiedlicher Standardabweichung. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde aus diesem Grund der verteilungsunabhängige U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney angewendet.

## 2. Material und Methoden

---

Als Nullhypothese  $H_0$  wurde angenommen, dass die Mittelwerte aus den Kraftänderungen unter Zugabe von Agonisten und Antagonisten denen bei Zugabe von Tyrode entsprechen. Als Alternativhypothese  $H_1$  wurde angenommen, dass unter der Zugabe der genannten Substanzen die entsprechenden Mittelwerte größer oder kleiner als unter Tyrode wären.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 > \mu_2 \text{ oder } \mu_1 < \mu_2$$

$\mu_1$  = Mittelwert der Kraftänderung nach Applikation einer Testsubstanz unter Tyrode

$\mu_2$  = Mittelwert der Kraftänderung nach Applikation von Indometacin und L-NAME

Der Stichprobenumfang über Tyrode betrug  $n_1$  und über der jeweiligen Substanz  $n_2$ . Für die gemessenen Werte wurde eine Rangordnung erstellt und jeder Messwert bekam eine Rangzahl zugeordnet. Die Summe der Rangzahlen der Messwerte über Tyrode war  $R_1$  und die Summe der Rangzahlen über der jeweiligen Antagonisierung war  $R_2$ . Die in diesem Test verwendeten Prüfgrößen  $U_1$  und  $U_2$  werden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$U_1 = n_1 \times n_2 + 0,5 \times n_1 \times (n_1 + 1) - R_1$$

$$U_2 = n_1 \times n_2 + 0,5 \times n_2 \times (n_2 + 1) - R_2$$

Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn  $U$  als der kleinere Wert von  $U_1$  und  $U_2$  kleiner als der tabellierte kritische Wert  $U(n_1, n_2)$  war. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $P < 0,05$  wurde im verwendeten Test als signifikant erachtet.

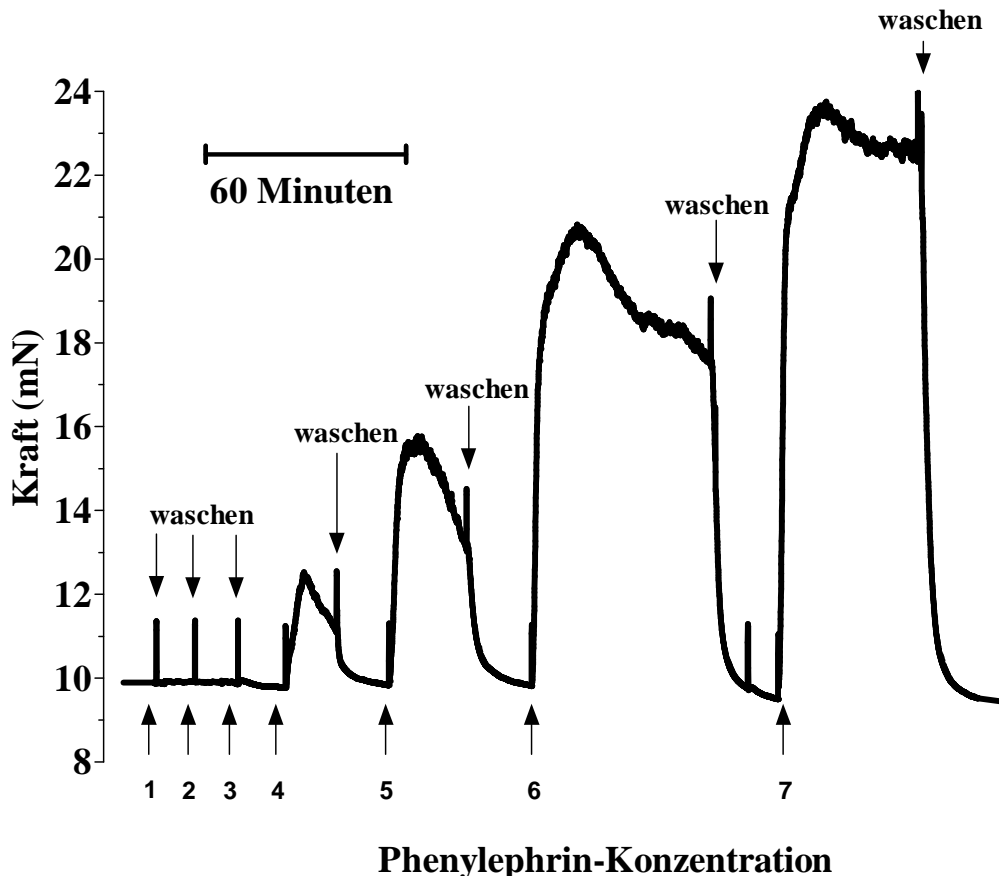


## 3. Ergebnisse

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Dosisabhängige Vasokonstriktion an Aorten von WTM durch Phenylephrin

Diese Versuchsreihe zeigt die durch Phenylephrin (PE) ausgelöste Vasokonstriktion an thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen (WTM) über eine Aktivierung des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors. Die Höhe der Vasokonstriktion hängt von der PE-Dosis ab, wobei die maximale Vasokonstriktion ( $V_{\max}$ ) ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  erreicht wird (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Nicht kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve durch Phenylephrin.**

Abgebildet ist die nicht kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) von PE an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt ist eine repräsentative Originalabbildung von minimal 6 unabhängigen ( $n \geq 6$ ) Versuchen am Kleingefäßmyographen, die eine dosisabhängige Steigerung der PE induzierten Vasokonstriktion erkennen lässt. Durch Waschvorgänge vor jeder Konzentrationserhöhung wurde die Baseline wieder erreicht. Die gemessene Kraft in mN ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von PE auf der Abszisse aufgetragen. Es fanden Applikationen ansteigender PE-Konzentrationen in folgenden Schritten statt: 1: 3 nmol/l; 2: 10 nmol/l; 3: 30 nmol/l; 4: 100 nmol/l; 5: 300 nmol/l; 6: 1  $\mu\text{mol/l}$ ; 7: 10  $\mu\text{mol/l}$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.2. Dosisabhängige Vasodilatation durch ACh und SNP an Aorten von WTM

Diese Versuchsreihe zeigt eine Acetylcholin (ACh) und eine Natriumnitroprussid (SNP) vermittelte Vasodilatation an thorakalen Aorten von WTM, die mittels PE vorkontrahiert wurden. Das Ausmaß der Vasodilatation ist von der ACh-Dosis bzw. SNP-Dosis abhängig, wobei die maximale Vasodilatation durch ACh ( $V_{\max}$ ) ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  erreicht wird (Abbildung 12) bzw. ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  durch SNP (Abbildung 13). Um die Endothelabhängigkeit der ACh induzierten Vasorelaxation zu untersuchen, wurden Versuche mit dem spezifischen eNOS Inhibitor L-NAME (100  $\mu\text{mol/l}$ ) durchgeführt. Diese Versuche zeigten eine vollständige Blockade der ACh induzierten Vasodilatation unter eNOS Inhibition (Abbildung 12).

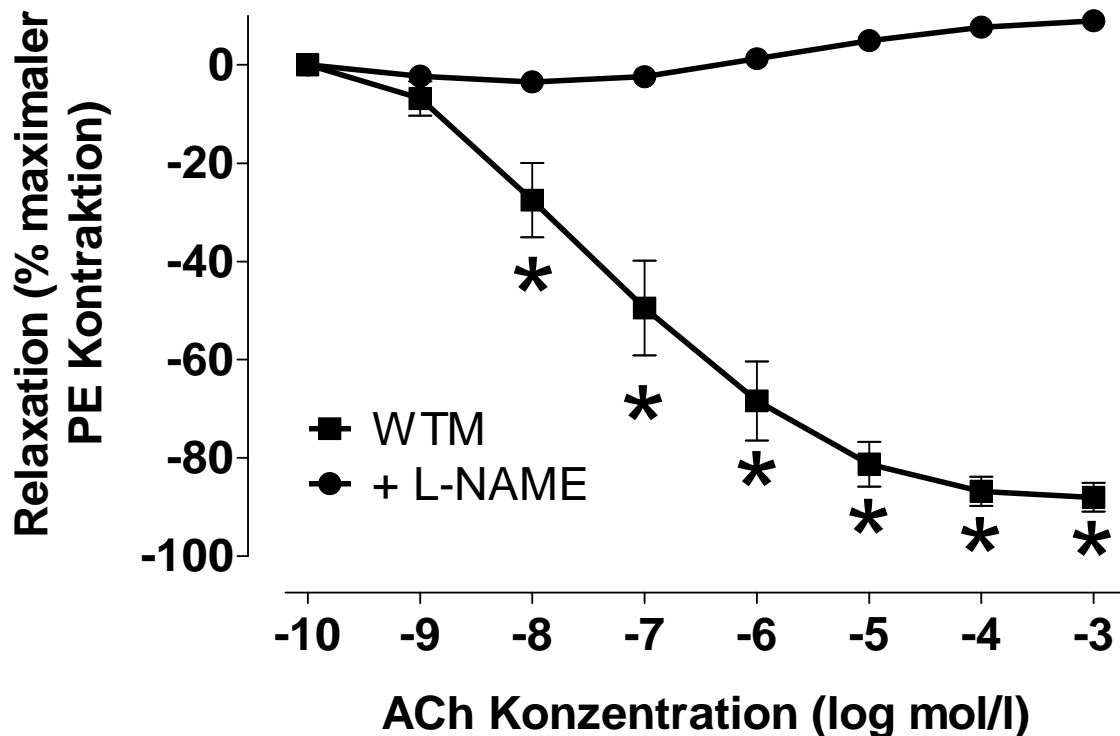
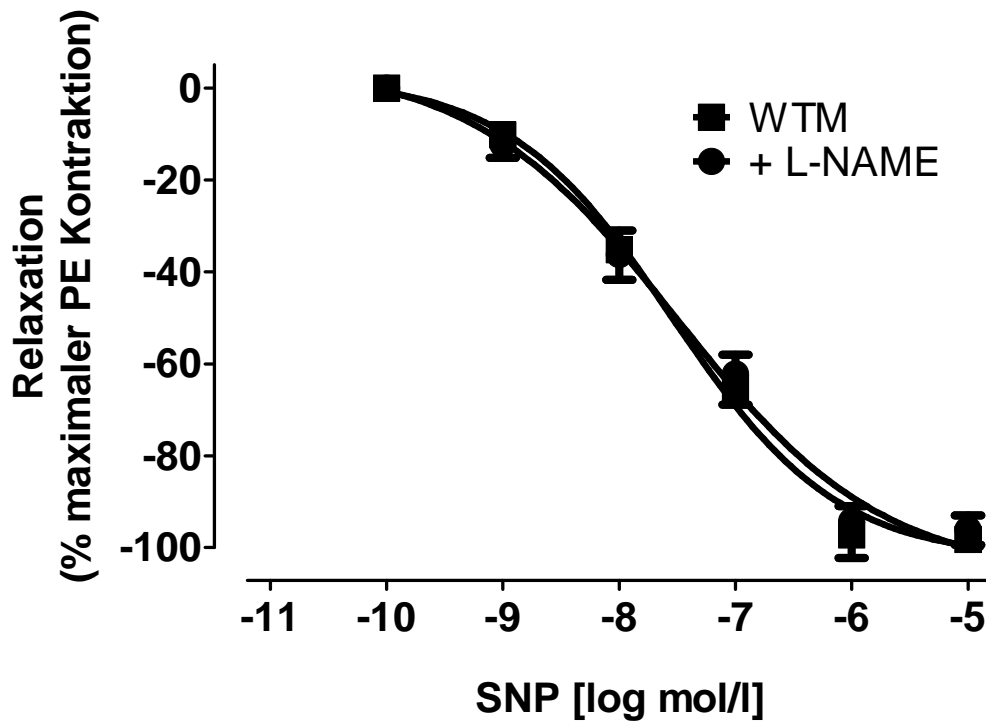


Abbildung 12: DWK von ACh an thorakalen Aortenringen von WTM.

Das Ausmaß der Vasorelaxation (in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion) ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh (in log mol/l) auf der Abszisse aufgetragen. Man erkennt eine dosisabhängige ACh induzierte Vasorelaxation, die durch eNOS-Hemmung durch L-NAME vollständig aufgehoben werden kann. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus mindestens sechs verschiedenen Experimenten ( $n \geq 6$ ). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* =  $P < 0,05$  WTM vs. L-NAME.

### 3. Ergebnisse

Im Gegensatz dazu wurde die SNP induzierte Vasorelaxation durch die mittels L-NAME verursachte eNOS Blockade nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 13).



**Abbildung 13: DWK von SNP an thorakalen Aortenringen von WTM.**

Das Ausmaß der Vasorelaxation (in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion) ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von SNP (in log mol/l) auf der Abszisse aufgetragen. Man erkennt eine dosisabhängige SNP induzierte Vasorelaxation, die durch eNOS-Hemmung durch L-NAME nicht beeinflusst wird. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus mindestens sechs verschiedenen Experimenten ( $n \geq 6$ ). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.3. Dosisabhängige Wirkung von ACh und SNP auf Aorten von sPLA<sub>2</sub>- und WTM

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurde die endotheliale Funktion thorakaler Aortenringe von WTM und sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen untersucht. Zuerst wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von ACh (zur Testung der endothelabhängigen Vasodilatation) und SNP (zur Testung der endothelunabhängigen Vasodilatation) in aufsteigender Dosis an thorakalen Aortenringen durchgeführt, die mit Phenylephrin (PE 1µmol/l; maximale Vasokonstriktion  $8.1 \pm 0.8\text{mN}$ ,  $p > 0,05$   $n=16$ ) vorkontrahiert wurden. Die maximal erreichte Vasokonstriktion auf 1µmol/l PE der Aortenringe von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen und WTM war nicht signifikant unterschiedlich. Die durch ACh erreichte maximale Vasodilatation der thorakalen Aorten der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen war im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erniedrigt, was eine schwere endotheliale Dysfunktion der Gefäße von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen aufzeigt (sPLA<sub>2</sub>-transgen:  $[EC_{50}] = -6,2 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-33,8 \pm 5,0 \%$ ,  $n > 6$ ; WTM:  $[EC_{50}] = -6,1 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-83,2 \pm 2,3 \%$ ,  $n > 6$ ) (Abbildung 14).

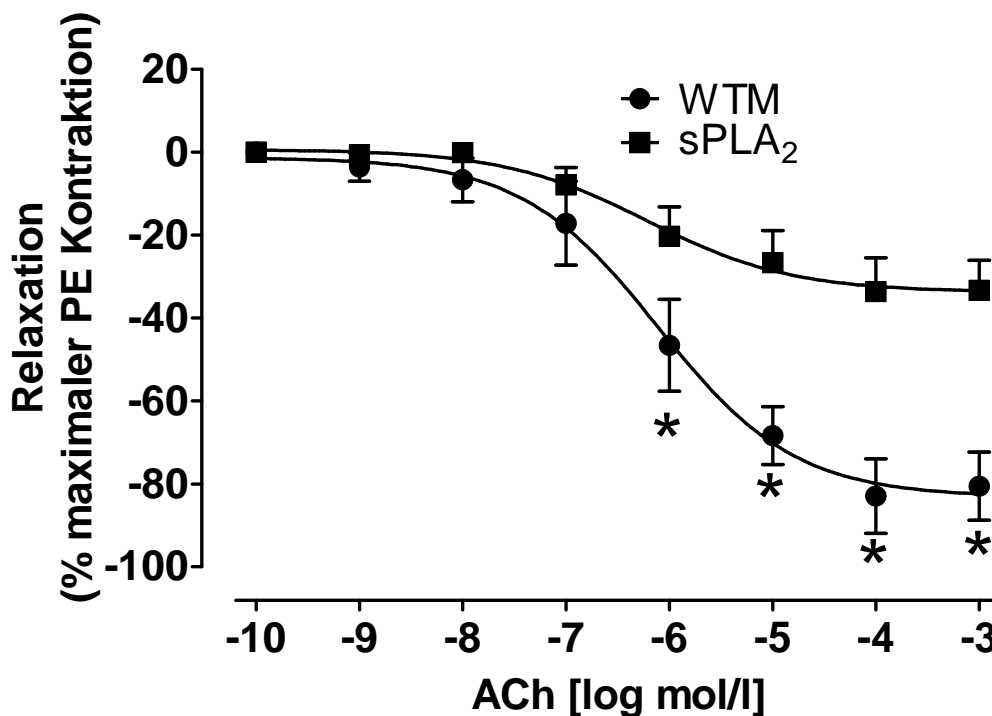
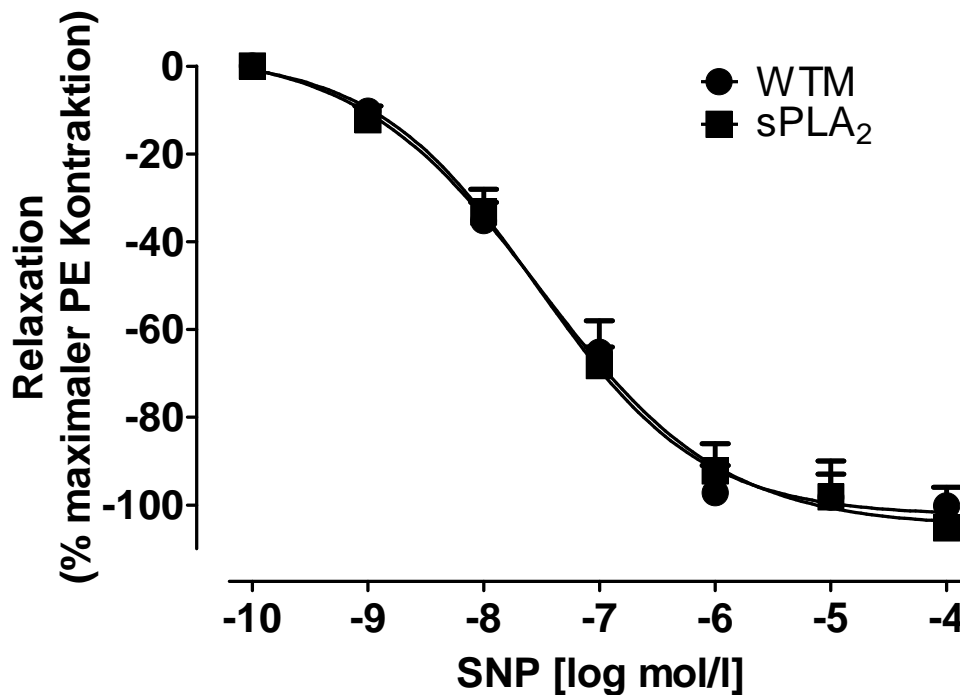


Abbildung 14: DWK von ACh an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen und WTM.

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* =  $P < 0,05$  WTM vs. sPLA<sub>2</sub>.

### 3. Ergebnisse

Die SNP induzierte maximale Vasodilatation der thorakalen Aorten von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen und Kontrolltieren war nicht signifikant unterschiedlich, was auf eine normale endothelunabhängige vaskuläre Funktion von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen schließen lässt. (sPLA<sub>2</sub>-transgen: [EC<sub>50</sub>] =  $-7,5 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-105,6 \pm 4,5$  %, n > 6; WTM: [EC<sub>50</sub>] =  $-7,5 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-102,4 \pm 4,1$  %, n > 6) (Abbildung 15).



**Abbildung 15: DWK von SNP an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen und WTM.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von SNP an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige (n ≥ 6) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von SNP in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.4. Dosisabhängige Vasodilatation unter COX-Inhibitoren an sPLA<sub>2</sub>- und WTM

In dieser Versuchsreihe wurde die ACh induzierte endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aortenringe von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen und Kontrolltieren untersucht, die vorher mit selektiven und nicht selektiven Cyclooxygenase-Inhibitoren vorbehandelt und mit PE vorkontrahiert wurden. Unter Vorbehandlung mit dem nicht selektiven COX-1/2-Inhibitor Indometacin (10µmol/l) konnte die schwer gestörte endotheliale Funktion sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse nahezu vollständig entsprechend dem Niveau der Kontrolltiere wiederhergestellt werden (sPLA<sub>2</sub>-transgen ohne Indometacin: [EC<sub>50</sub>] = -6,2 ± 0,1, max. Dilatation = -33,8 ± 5,0 %, n > 6; sPLA<sub>2</sub>-transgen mit Indometacin: [EC<sub>50</sub>] = -6,3 ± 0,1, max. Dilatation = -79,0 ± 8,3 %, n > 6, Abbildung 16).

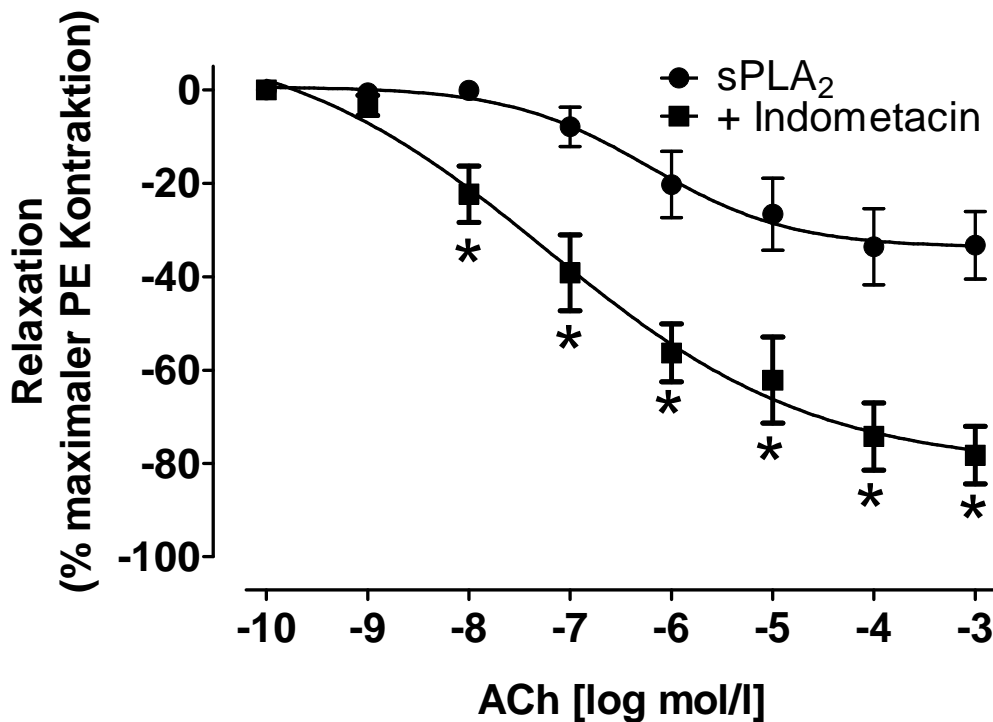
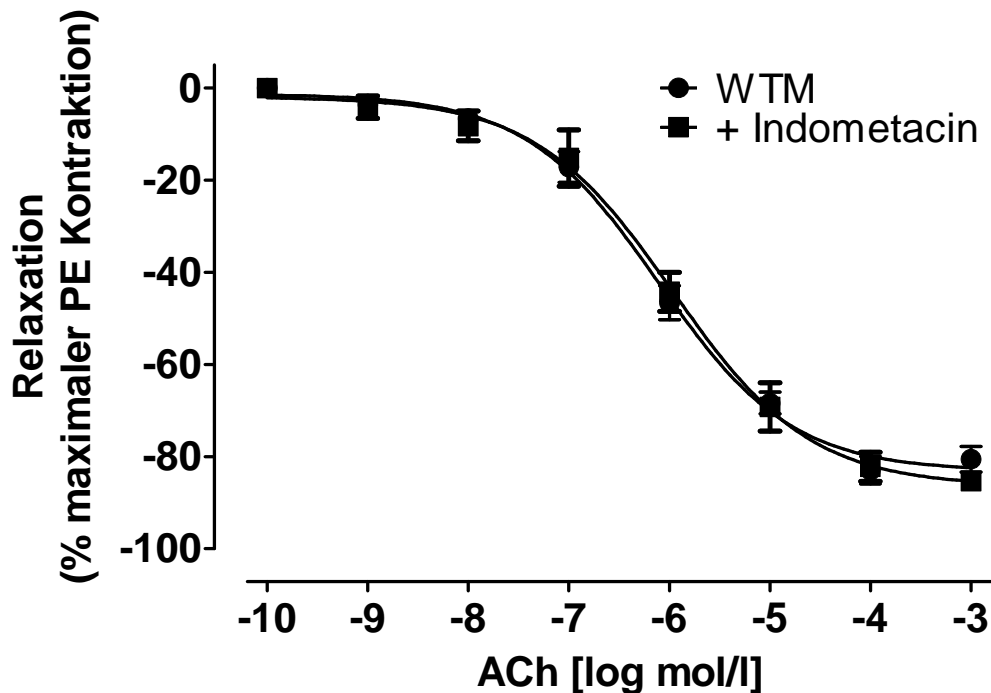


Abbildung 16: DWK von ACh mit Indometacin an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu mit Indometacin vorbehandelten thorakalen Aortenringen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige (n ≥ 6) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* = P < 0,05 sPLA<sub>2</sub> vs. Indometacin.

### 3. Ergebnisse

Die Anwesenheit von Indometacin hatte keinen Einfluss auf die durch ACh vermittelte Dilatation der thorakalen Aorten der WTM (WTM ohne Indometacin:  $[EC_{50}] = -6,1 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-83,2 \pm 2,3$  %,  $n > 6$ ; WTM mit Indometacin:  $[EC_{50}] = -6,0 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-86,5 \pm 3,6$  %,  $n > 6$ , Abbildung 17).

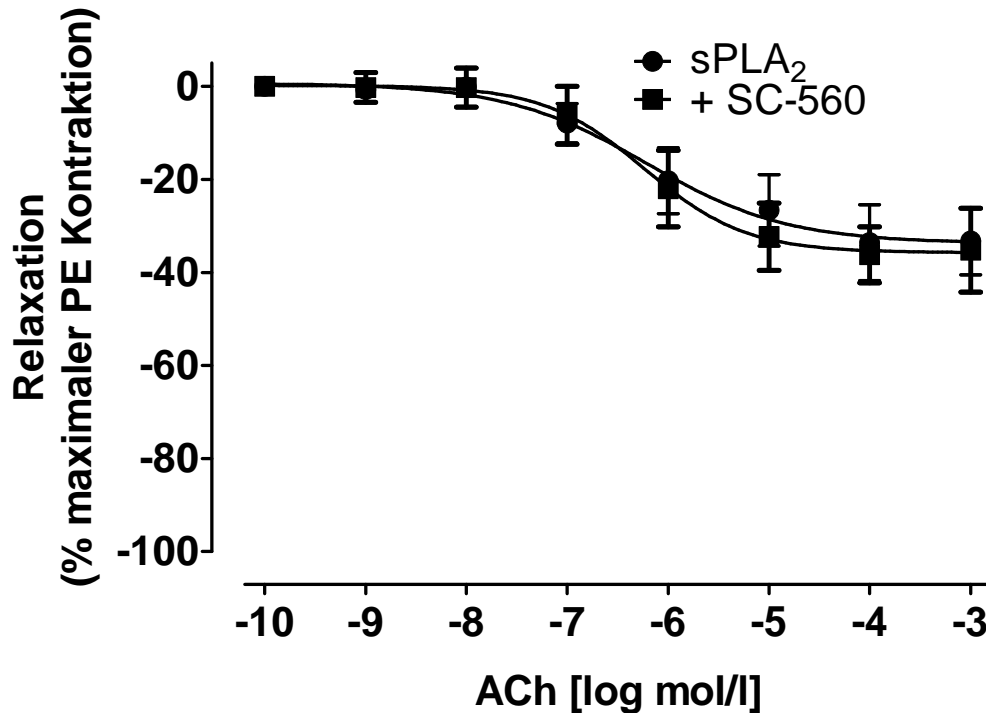


**Abbildung 17: DWK von ACh mit Indometacin an Gefäßen von WTM.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WTM im Vergleich zu mit Indometacin vorbehandelten thorakalen Aortenringen von WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3. Ergebnisse

In Anwesenheit des selektiven COX-1-Inhibitors SC-560 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) änderte sich die endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aorten der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäuse nicht (sPLA<sub>2</sub>-transgen ohne SC-560:  $[\text{EC}_{50}] = -6,2 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-33,8 \pm 5,0 \%$ ,  $n > 6$ ; sPLA<sub>2</sub>-transgen mit SC-560:  $[\text{EC}_{50}] = -6,2 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-35,7 \pm 4,3 \%$ ,  $n > 6$ , Abbildung 18).



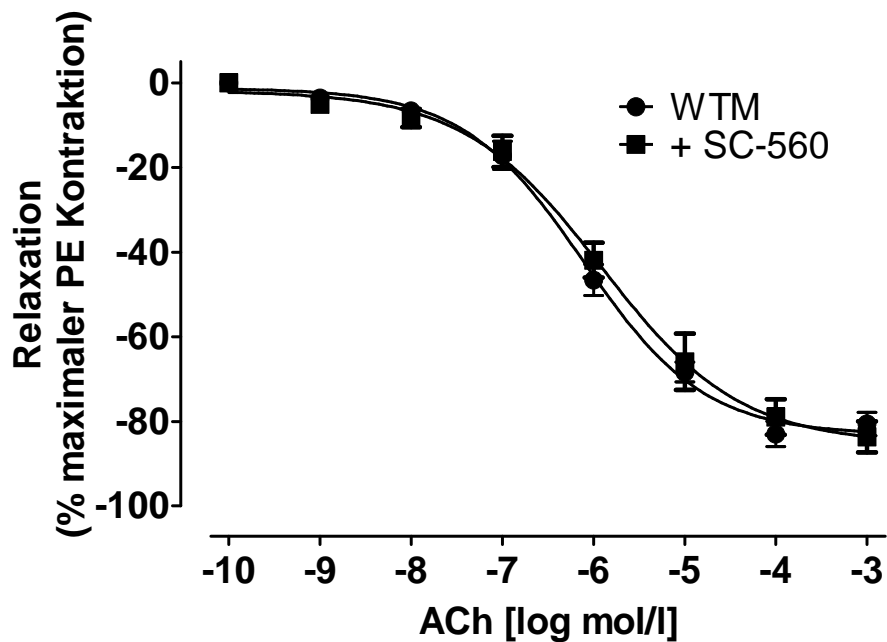
**Abbildung 18: DWK von ACh mit SC-560 an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu mit SC-560 vorbehandelten thorakalen Aortenringen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.



### 3. Ergebnisse

Der selektive COX-1-Inhibitor SC-560 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) hatte auch keinen Einfluss auf die endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aorten der WTM (WTM ohne SC-560:  $[\text{EC}_{50}] = -6,1 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-83,2 \pm 2,3$  %,  $n > 6$ ; WTM mit SC-560:  $[\text{EC}_{50}] = -6,0 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-85,3 \pm 4,1$  %,  $n > 6$ , Abbildung 19).

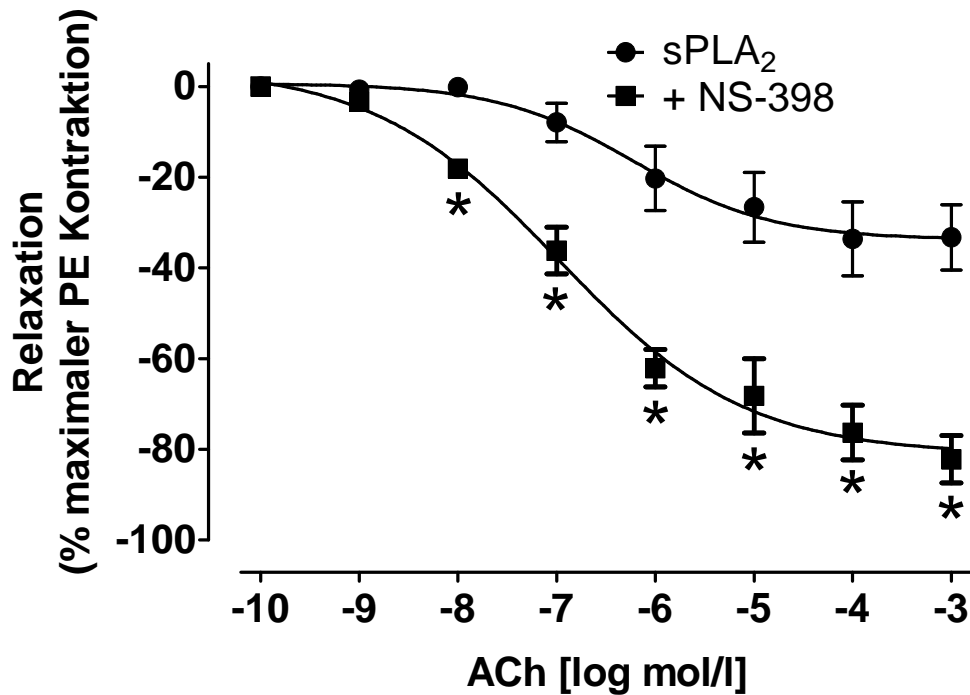


**Abbildung 19: DWK von ACh mit SC-560 an Gefäßen von WTM.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WTM im Vergleich zu mit SC-560 vorbehandelten thorakalen Aortenringen von WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3. Ergebnisse

Im Gegensatz dazu verbesserte sich in Anwesenheit des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 (20  $\mu\text{mol/l}$ ) die endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aorten der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Tiere signifikant (sPLA<sub>2</sub>-transgen ohne NS-398:  $[\text{EC}_{50}] = -6,2 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-33,8 \pm 5,0 \%$ ,  $n > 6$ ; sPLA<sub>2</sub>-transgen mit NS-398:  $[\text{EC}_{50}] = -6,9 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-81,1 \pm 4,6 \%$ ,  $n > 6$ , Abbildung 20).

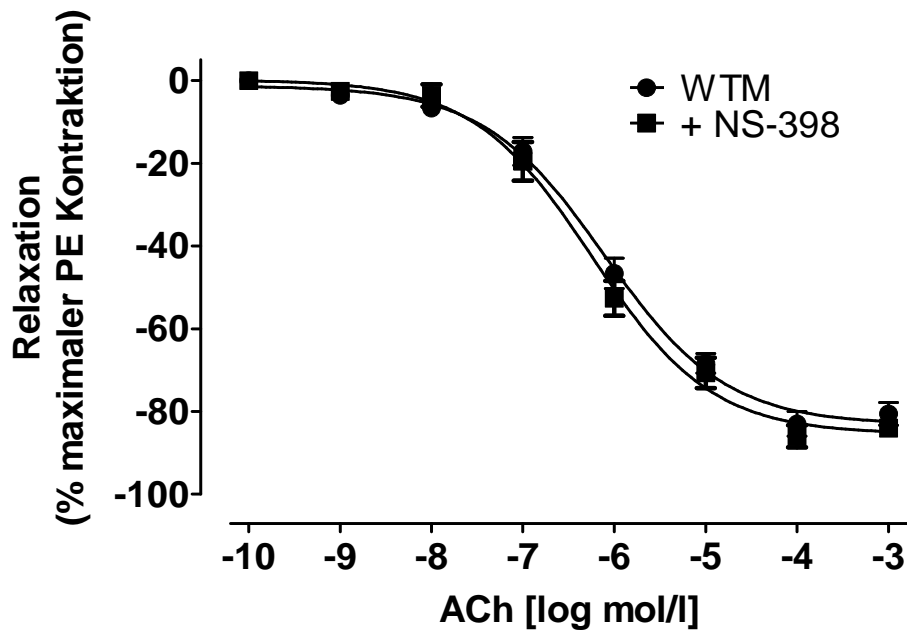


**Abbildung 20: DWK von ACh mit NS-398 an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu mit NS-398 vorbehandelten thorakalen Aortenringen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* =  $P < 0,05$  sPLA<sub>2</sub> vs. NS-398.

### 3. Ergebnisse

Die durch ACh vermittelte Dilatation der thorakalen Aorten der WTM änderte sich unter NS-398 nicht signifikant (WTM ohne NS-398:  $[EC_{50}] = -6,1 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-83,2 \pm 2,3$  %,  $n > 6$ ; WTM mit NS-398:  $[EC_{50}] = -6,3 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-85,4 \pm 2,9$  %,  $n > 6$ , Abbildung 21). Diese Daten demonstrieren, dass die schwere endotheliale Dysfunktion in Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen von einer erhöhten vaskulären COX-2 Aktivität abhängig ist.



**Abbildung 21: DWK von ACh mit NS-398 an Gefäßen von WTM.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WTM im Vergleich zu mit NS-398 vorbehandelten thorakalen Aortenringen von WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.5. Dosisabhängige Vasodilatation unter Tiron an sPLA<sub>2</sub>-Mäusen und WTM

Als nächstes wurde der Effekt des Sauerstoffradikalfängers Tiron (10mmol/l) auf die endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aortenringe von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen und Kontrolltieren untersucht. In Anwesenheit von Tiron verbesserte sich die durch steigende Konzentrationen von ACh vermittelte endothelabhängige Vasodilatation der Gefäße der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäuse signifikant (sPLA<sub>2</sub>-transgen ohne Tiron: [EC<sub>50</sub>] = -6,2 ± 0,1, max. Dilatation = -33,8 ± 5,0 %, n > 6; sPLA<sub>2</sub>-transgen mit Tiron: [EC<sub>50</sub>] = -7,3 ± 0,2, max. Dilatation = -76,8 ± 14,3 %, n > 6, Abbildung 22).

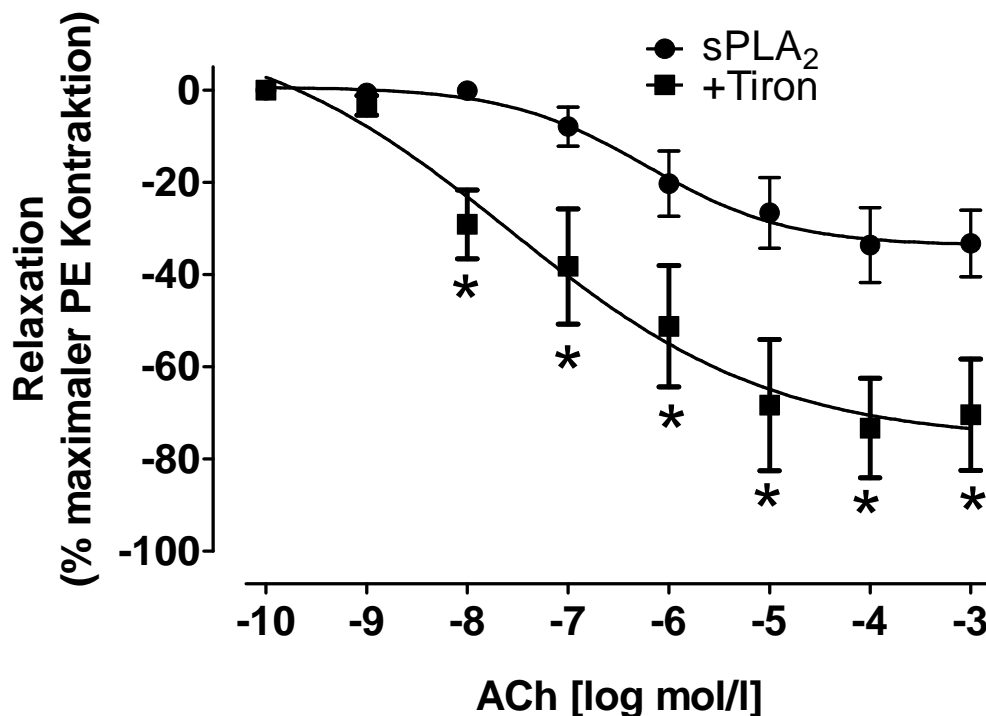
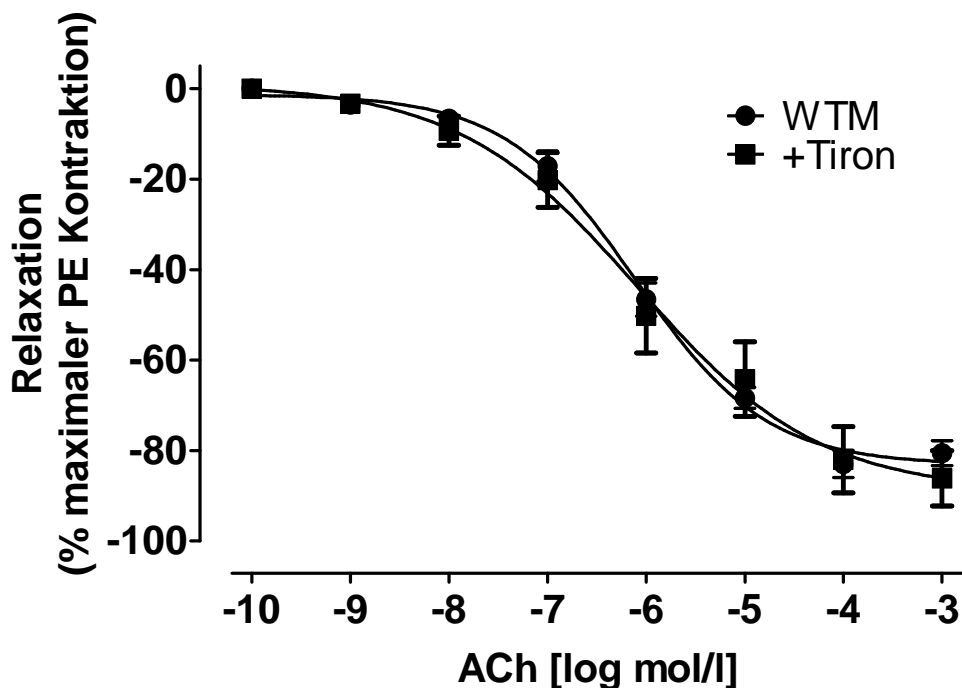


Abbildung 22: DWK von ACh mit Tiron an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu mit Tiron vorbehandelten thorakalen Aortenringen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige (n ≥ 6) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* = P < 0,05 sPLA<sub>2</sub> vs. Tiron.

### 3. Ergebnisse

Im Gegensatz dazu wurde die durch ACh induzierte endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aortenringe der WTM nicht signifikant durch Tiron (10mmol/l) beeinflusst (WTM ohne Tiron:  $[EC_{50}] = -6,1 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-83,2 \pm 2,3$  %,  $n > 6$ ; WTM mit Tiron:  $[EC_{50}] = -6,2 \pm 0,2$ , max. Dilatation =  $-89,4 \pm 7,6$  %,  $n > 6$ , Abbildung 23). Diese Daten demonstrieren, dass erhöhter vaskulärer oxidativer Stress zur schweren endothelialen Dysfunktion in Gefäßen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse beiträgt.



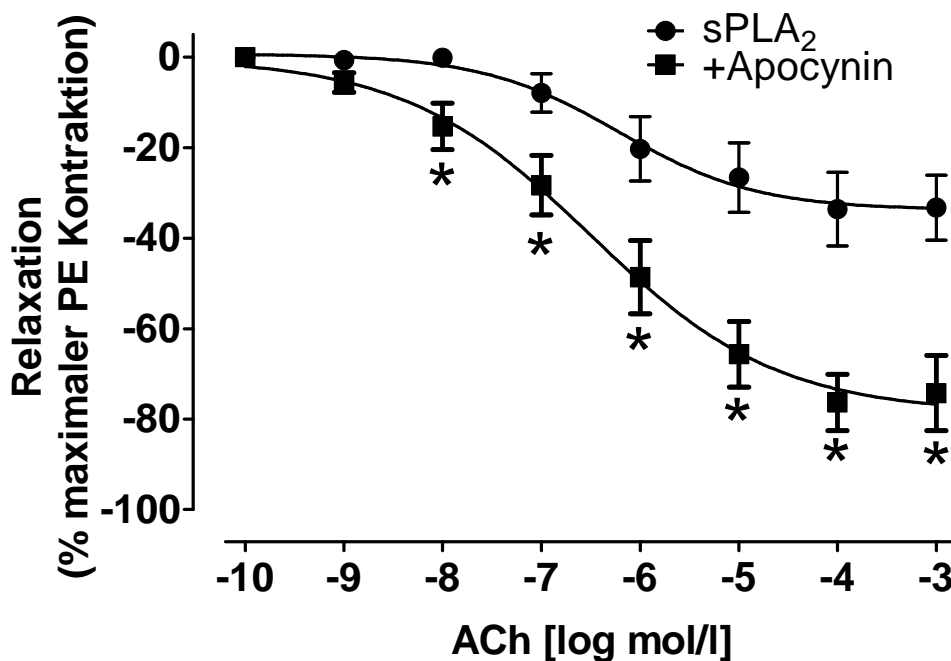
**Abbildung 23: DWK von ACh mit Tiron an Gefäßen von WTM.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WTM im Vergleich zu mit Tiron vorbehandelten thorakalen Aortenringen von WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.6. Dosisabhängige Vasodilatation unter Apocynin an sPLA<sub>2</sub>-Mäusen und WTM

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Effekt des NADPH-Oxidase-Inhibitors Apocynin auf die endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aortenringe von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen und Kontrolltieren untersucht. In Anwesenheit von Apocynin (100 µmol/l) verbesserte sich die durch steigende Konzentrationen von ACh vermittelte endothelabhängige Vasodilatation der Gefäße der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäuse signifikant (sPLA<sub>2</sub>-transgen ohne Apocynin: [EC<sub>50</sub>] = -6,2 ± 0,1, max. Dilatation = -33,8 ± 5,0 %, n > 6; sPLA<sub>2</sub>-transgen mit Apocynin: [EC<sub>50</sub>] = -6,5 ± 0,2, max. Dilatation = -78,6 ± 7,4 %, n > 6, Abbildung 24).

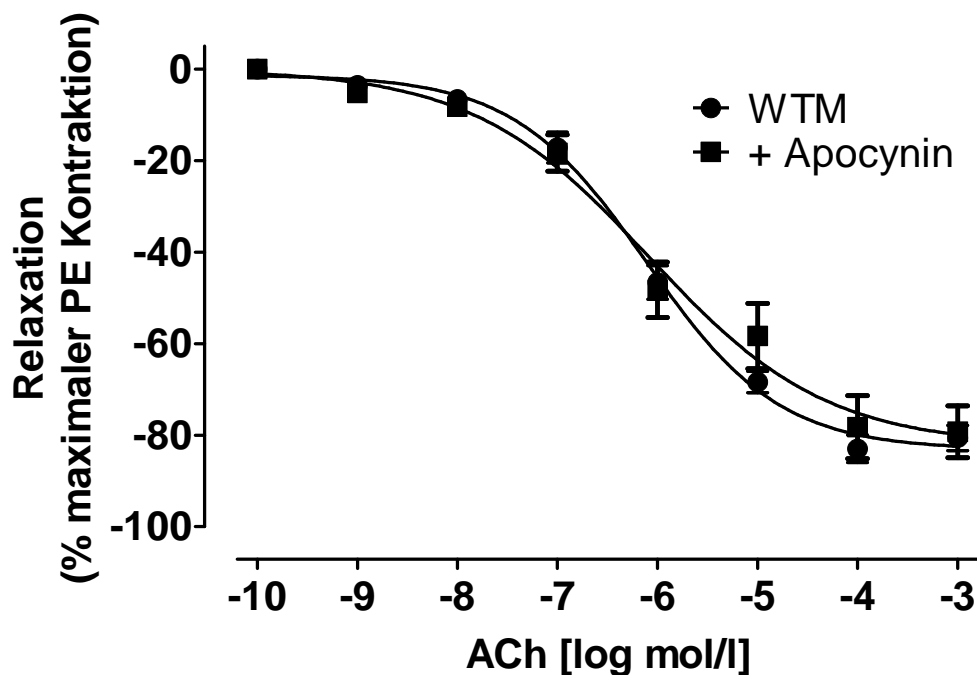


**Abbildung 24: DWK von ACh mit Apocynin an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu mit Apocynin vorbehandelten thorakalen Aortenringen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige (n ≥ 6) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* = P < 0,05 sPLA<sub>2</sub> vs. Apocynin.

### 3. Ergebnisse

Die ACh induzierte endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aortenringe der Kontrolltiere wurde hingegen nicht signifikant durch Apocynin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) beeinflusst (WTM ohne Apocynin:  $[\text{EC}_{50}] = -6,1 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-83,2 \pm 2,3 \%$ ,  $n > 6$ ; WTM mit Apocynin:  $[\text{EC}_{50}] = -6,1 \pm 0,2$ , max. Dilatation =  $-82,3 \pm 6,1 \%$ ,  $n > 6$ , Abbildung 25). Diese Daten demonstrieren, dass eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität zu einer schweren endothelialen Dysfunktion in Gefäßen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse beiträgt.



**Abbildung 25: DWK von ACh mit Apocynin an Gefäßen von WTM.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WTM im Vergleich zu mit Apocynin vorbehandelten thorakalen Aortenringen von WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.7. Dosisabhängige Vasodilatation unter PGE<sub>2</sub>-Antagonisten an sPLA<sub>2</sub>- und WTM

Schließlich wurde auch die Wirkung von PGE<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten auf die endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aortenringe von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen und Kontrolltieren untersucht. In Anwesenheit des EP1/2-Rezeptorantagonisten AH-6809 (10 µmol/l) verbesserte sich die durch steigende Konzentrationen von ACh vermittelte endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aorten der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäuse signifikant (sPLA<sub>2</sub>-transgen ohne AH-6809: [EC<sub>50</sub>] = -6,2 ± 0,1, max. Dilatation = -33,8 ± 5,0 %, n > 6; sPLA<sub>2</sub>-transgen mit AH-6809: [EC<sub>50</sub>] = -7,0 ± 0,1, max. Dilatation = -67,6 ± 3,3 %, n > 6, Abbildung 26).

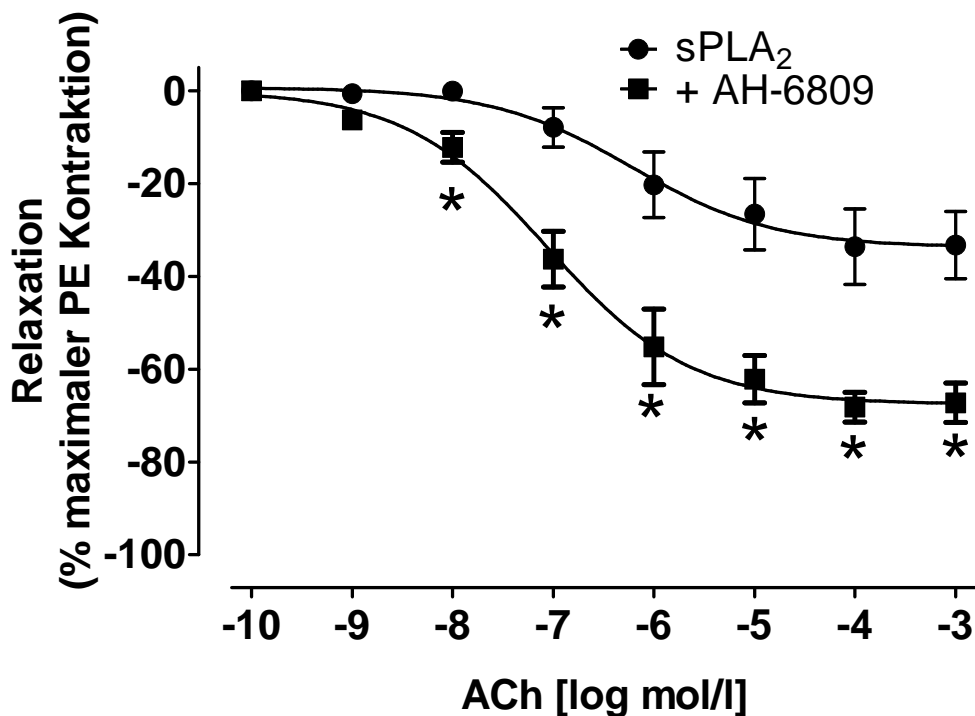


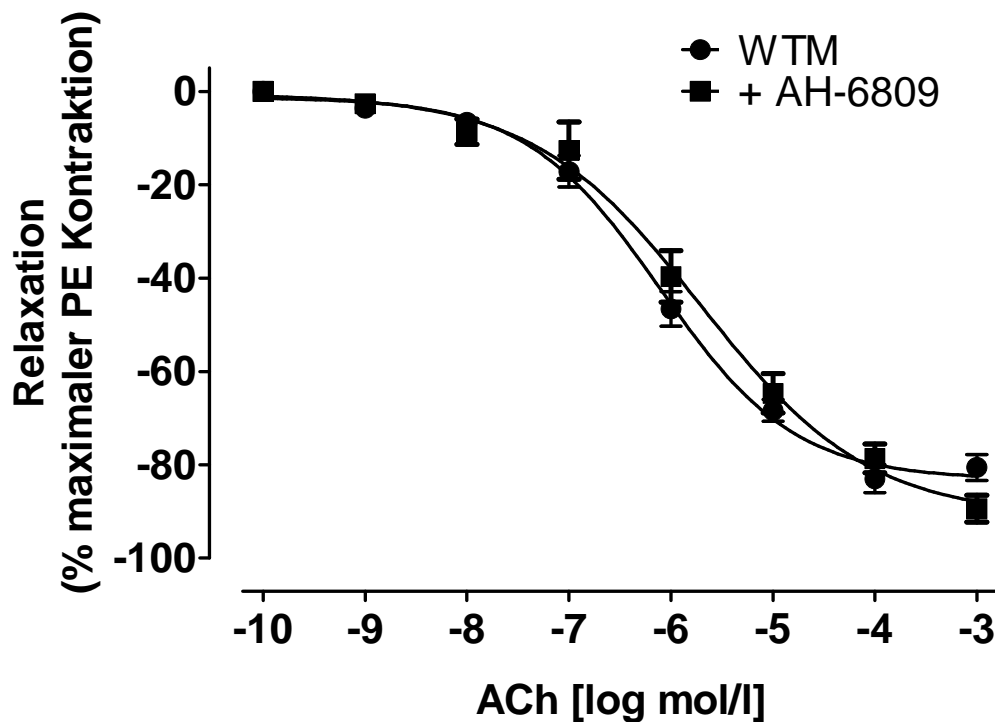
Abbildung 26: DWK von ACh mit AH-6809 an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu mit AH-6809 vorbehandelten thorakalen Aortenringen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige (n ≥ 6) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* = P < 0,05 sPLA<sub>2</sub> vs. AH-6809.



### 3. Ergebnisse

Demgegenüber übte der EP1/2-Rezeptorantagonist AH-6809 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) keinen Einfluss auf die ACh induzierte endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aortenringe der WTM aus (WTM ohne AH-6809:  $[\text{EC}_{50}] = -6,1 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-83,2 \pm 2,3 \%$ ,  $n > 6$ ; WTM mit AH-6809:  $[\text{EC}_{50}] = -6,0 \pm 0,2$ , max. Dilatation =  $-91,5 \pm 5,9 \%$ ,  $n > 6$ , Abbildung 27).

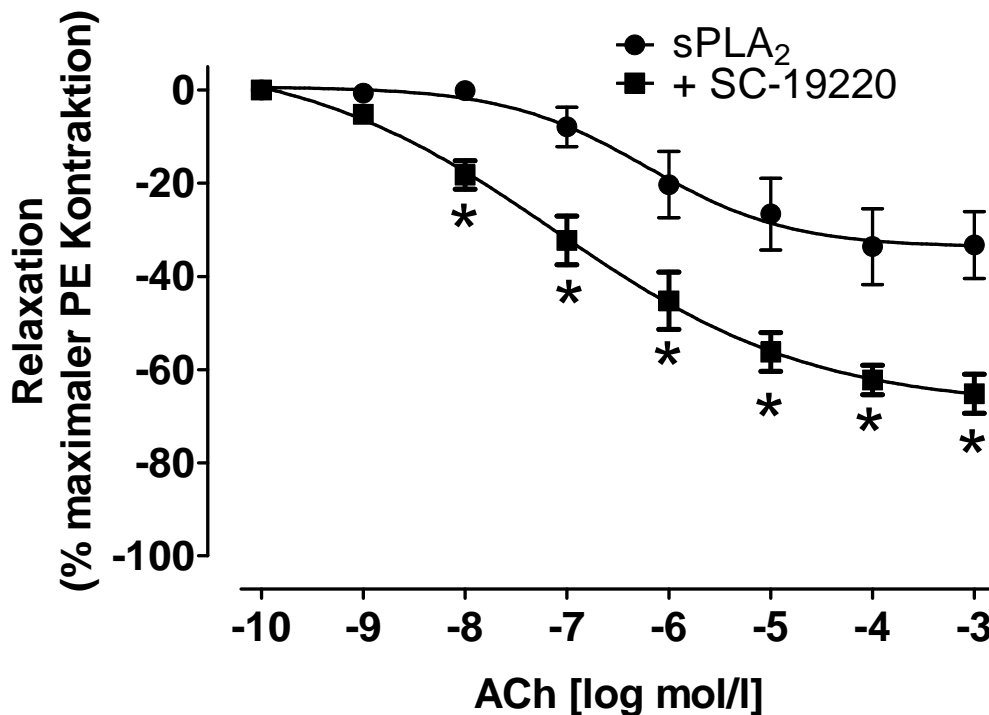


**Abbildung 27: DWK von ACh mit AH-6809 an Gefäßen von WTM.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WTM im Vergleich zu mit AH-6809 vorbehandelten thorakalen Aortenringen von WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3. Ergebnisse

Ebenso verbesserte sich die durch ACh induzierte endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aorten der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäuse signifikant unter dem Einfluss des EP1/2-Rezeptorantagonisten SC-19220 (10 µmol/l) (sPLA<sub>2</sub>-transgen ohne SC-19220: [EC<sub>50</sub>] = -6,2 ± 0,1, max. Dilatation = -33,8 ± 5,0 %, n > 6; sPLA<sub>2</sub>-transgen mit SC-19220: [EC<sub>50</sub>] = -7,1 ± 0,3, max. Dilatation = -68, ± 5,5 %, n > 6, Abbildung 28).

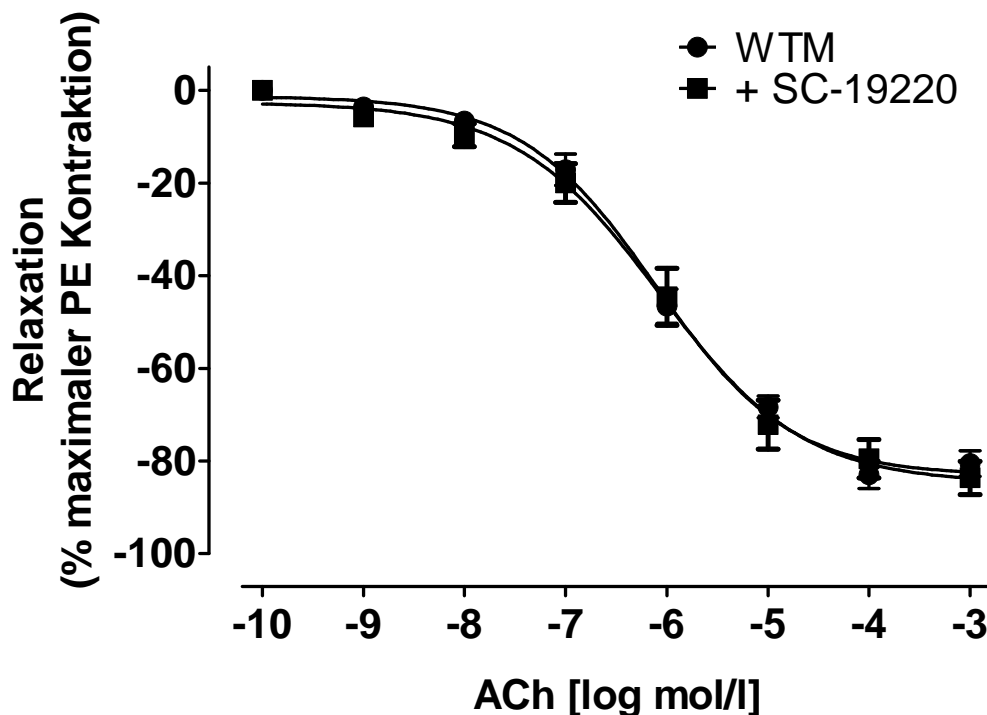


**Abbildung 28: DWK von ACh mit SC-19220 an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-Mäusen.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu mit SC-19220 vorbehandelten thorakalen Aortenringen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige (n ≥ 6) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* = P < 0,05 sPLA<sub>2</sub> vs. SC-19220.

### 3. Ergebnisse

Auch dieser EP1/2-Rezeptorantagonist SC-19220 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) hatte keinen Einfluss auf die ACh induzierte endothelabhängige Vasodilatation der WTM (WTM ohne SC-19220:  $[\text{EC}_{50}] = -6,1 \pm 0,1$ , max. Dilatation =  $-83,2 \pm 2,3 \%$ ,  $n > 6$ ; WTM mit SC-19220:  $[\text{EC}_{50}] = -6,1 \pm 0,2$ , max. Dilatation =  $-84,8 \pm 3,8 \%$ ,  $n > 6$ , Abbildung 29). Diese Daten demonstrieren, dass erhöhte Konzentrationen von  $\text{PGE}_2$  ebenfalls zur schweren endothelialen Dysfunktion in Gefäßen von  $\text{sPLA}_2$ -transgenen Mäusen beitragen.



**Abbildung 29: DWK von ACh mit SC-19220 an Gefäßen von WTM.**

Die Abbildung zeigt die kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WTM im Vergleich zu mit SC-19220 vorbehandelten thorakalen Aortenringen von WTM am Kleingefäßmyographen. Dargestellt sind minimal 6 unabhängige ( $n \geq 6$ ) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.8. Dosisabhängige Vasodilatation mit ACh unter PGE<sub>2</sub> an Aortenringen von WTM

Um den Zusammenhang zwischen PGE<sub>2</sub> und einer endothelialen Dysfunktion zu überprüfen, wurde in der folgenden Versuchsreihe der Einfluss verschiedener Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> auf die endothelabhängige Vasodilatation der thorakalen Aorten von WTM untersucht. In Anwesenheit aufsteigender Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> verschlechterte sich die ACh induzierte endothelabhängige Vasodilatation der Gefäße im Vergleich zu den unbehandelten signifikant (WTM ohne PGE<sub>2</sub>: [EC<sub>50</sub>] = -6,1 ± 0,1, max. Dilatation = -83,2 ± 2,3 %, n > 6; WTM mit PGE<sub>2</sub> [100 nmol/l]: [EC<sub>50</sub>] = -6,0 ± 0,1, max. Dilatation = -80,5 ± 2,9 %, n > 6; WTM mit PGE<sub>2</sub> [1 µmol/l]: [EC<sub>50</sub>] = -6,0 ± 0,1, max. Dilatation = -72,9 ± 3,0 %, n > 6; WTM mit PGE<sub>2</sub> [10 µmol/l]: [EC<sub>50</sub>] = -5,9 ± 0,1, max. Dilatation = -64,5 ± 2,8 %, n > 6) (Abbildung 30). Anhand dieser Ergebnisse bestätigt sich der Verdacht, dass erhöhte Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> zur endothelialen Dysfunktion in Gefäßen sPLA<sub>2</sub>-transgener Mäuse beitragen.

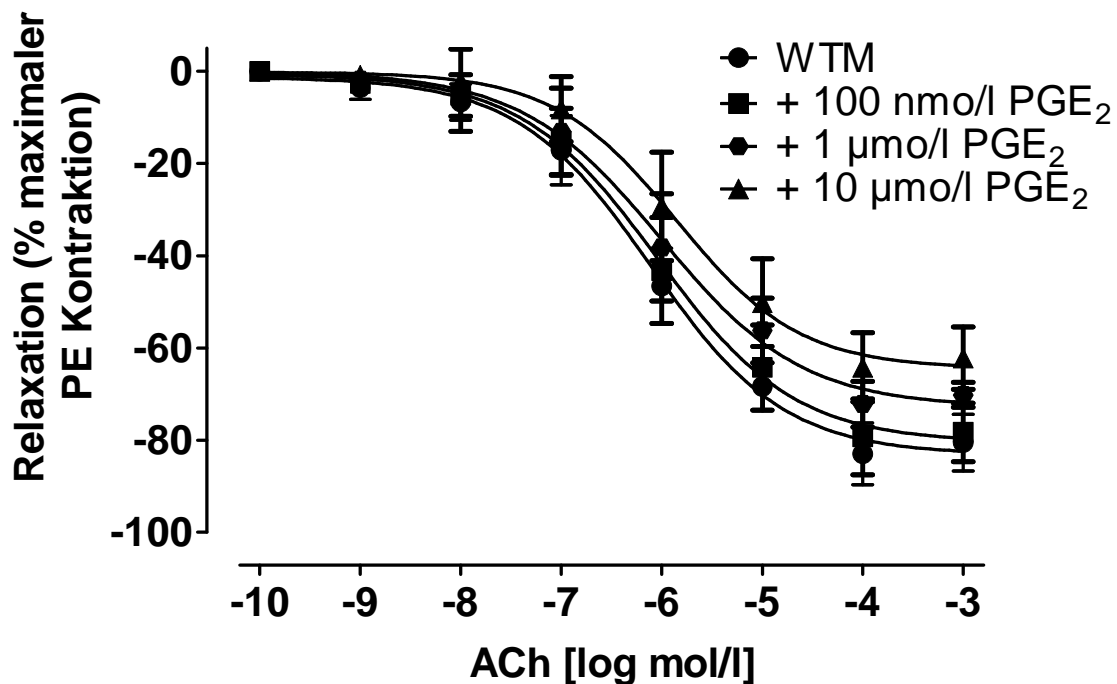


Abbildung 30: DWK von ACh an Gefäßen von WTM mit und ohne PGE<sub>2</sub>.

Abgebildet sind verschiedene kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von ACh an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WTM am Kleingefäßmyographen mit und ohne Vorbehandlung mit PGE<sub>2</sub> in unterschiedlichen Konzentrationen (100 nmol/l, 1 µmol/l und 10 µmol/l). Dargestellt sind jeweils minimal 6 unabhängige (n ≥ 6) Versuche am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh in log mol/l auf der Abszisse aufgetragen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

## 4. Diskussion

---

### 4. Diskussion

Es ist bekannt, dass Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion ein sehr hohes Maß an kardiovaskulären Erkrankungen haben. Die Ursache ist sicherlich in der vorhandenen Anhäufung von sogenannten Urämietoxinen zu sehen. Urämietoxine sind Moleküle, die sich im Rahmen einer Niereninsuffizienz vermehrt im Plasma ansammeln. Einer dieser Faktoren ist die sPLA<sub>2</sub> Typ IIa, die im Vergleich zum Kontrollkollektiv um den Faktor 6-10 bei Dialysepatienten erhöht ist (nicht publizierte Daten mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Tietge, Groningen, Niederlande). Die Hypothese in dieser Doktorarbeit ist, dass die erhöhte Menge an sPLA<sub>2</sub>-IIa zu einer gesteigerten Bildung von Prostaglandinen führt, über die eine endotheliale Dysfunktion ausgelöst wird. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche bestätigten diese Hypothese. Die endotheliale Dysfunktion scheint eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen zu spielen und unabhängige prognostische Auswirkungen zu haben [171, 172]. Die sPLA<sub>2</sub>-IIa ist ein kardiovaskulärer Risikofaktor mit intrinsischer proatherosklerotischer biologischer Aktivität. Patienten mit atherosklerotischen, kardiovaskulären Erkrankungen weisen erhöhte sPLA<sub>2</sub>-IIa-Plasmakonzentrationen auf [48, 114], außerdem korreliert der sPLA<sub>2</sub>-IIa-Plasmaspiegel mit dem Risiko für zukünftige koronare Ereignisse [48, 117].

Es sind bisher verschiedene proatherogene Eigenschaften der sPLA<sub>2</sub>-IIa beschrieben worden:

- (I) Die sPLA<sub>2</sub>-IIa erniedrigt die Plasmakonzentration von HDL-Cholesterin, indem es den Katabolismus von HDL-Cholesterin-Ester sowie von ApoA-I in sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen, die eine Überexpression von humanem sPLA<sub>2</sub> aufweisen, erhöht [173, 174].
- (II) Die sPLA<sub>2</sub>-IIa induziert die Bildung von aggregierten/fusionierten LDL-Partikeln [175, 176]. Aggregiertes/ fusioniertes LDL ist ein bedeutendes Merkmal atherosklerotischer Läsionen. Diese Modifizierung von LDL erhöht die Affinität von LDL-Partikeln für Proteoglykane und fördert die Bildung von Schaumzellen und die Ablagerung von Lipiden innerhalb der Gefäßwand.
- (III) Durch sPLA<sub>2</sub>-IIa-modifiziertes HDL verliert seine schützenden Eigenschaften gegenüber einer LDL-Oxidation. In-vitro-Studien mit Zellkulturen von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen zeigten, dass mit sPLA<sub>2</sub>-IIa behandeltes HDL nicht mehr vor einer LDL-Oxidation schützt, was auf eine erniedrigte Paraoxonase-Aktivität des sPLA<sub>2</sub>-IIa-modifizierten HDLs zurückgeführt wird [51].
- (IV) Durch Makrophagen freigesetzte sPLA<sub>2</sub>-IIa erhöht signifikant die Oxidation von LDL in Abwesenheit von HDL-Partikeln [177].

## 4. Diskussion

---

(V) Die Überexpression von sPLA<sub>2</sub>-IIa in transgenen Mäusen führt bereits unter einer normalen, nicht hochkalorischen Diät zu einer verstärkten Bildung von atherosklerotischen Läsionen [37].

(VI) Des Weiteren wurde demonstriert, dass die makrophagenspezifische Überexpression von sPLA<sub>2</sub>-IIa ausreicht um eine verstärkte Atherogenese zu induzieren [177, 112, 178].

Die gegenwärtige Arbeit baut auf diesen Beobachtungen auf. Nachdem nun bekannt ist, dass die sPLA<sub>2</sub>-IIa deutliche proatherogene Eigenschaften hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss einer erhöhten sPLA<sub>2</sub>-IIa- Expression und -Aktivität in Bezug auf eine direkte endotheliale Dysfunktion und die dahinter liegenden Mechanismen untersucht [177]. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass in isolierten thorakalen Aorten von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6 Mäusen die Gabe von ACh zu einer signifikant schlechteren dosisabhängigen Vasodilatation führte.

Die sPLA<sub>2</sub>-IIa ist eine extrazelluläre Phospholipase, die Phospholipide an der sn-2-Position spaltet. Diese Reaktion produziert hauptsächlich Arachidonsäure, die dann als Vorläufer für die Produktion von Prostaglandinen zur Verfügung steht [72]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Produkt des Arachidonsäuremetabolismus, das über eine Cyclooxygenase-abhängige Reaktion entsteht, die Verschlechterung der endothelialen Funktion bewirkt. Die Gabe des unselektiven COX-Inhibitors Indometacin, der sowohl die COX-1 als auch die COX-2 inhibiert, konnte die bei den sPLA<sub>2</sub>-transgenen Tieren beobachtete schlechtere endotheliale Funktion signifikant verbessern. Also scheinen die Reaktionsprodukte der COX eine wichtige Rolle im Zusammenhang der endothelialen Dysfunktion zu spielen. Um die Frage beantworten zu können, welche COX an der Produktion dieser Metabolite beteiligt ist, wurden Versuche mit spezifischen Inhibitoren der COX-1 und COX-2 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass nicht die konstitutiv exprimierte COX-1, sondern die unter inflammatorischen Bedingungen erhöht exprimierte COX-2 die Produktion dieser Metabolite katalysiert, da deren spezifische Inhibition mittels NS-398 die endotheliale Dysfunktion der Gefäße der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäuse signifikant verbesserte. Die spezifische Inhibition der COX-1 mittels SC-560 hingegen konnte keine signifikante Verbesserung der endothelialen Funktion bewirken. Bei den jeweiligen Kontrollmäusen zeigten sich unter den jeweiligen COX-Inhibitoren keine signifikanten Veränderungen der endothelialen Funktion auf ACh.

## 4. Diskussion

---

Es ist bekannt, dass über die Aktivierung der COX-2 die Produktion von Sauerstoffradikalen induziert wird. So weiß man seit langem, dass Sauerstoffradikale (ROS) zu einer deutlichen Verschlechterung der endothelialen Funktion beitragen. Dies konnte in einer Versuchsreihe bestätigt werden, in der sich die endotheliale Funktion der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäuse unter dem Einfluss des Sauerstoffradikalfängers Tiron signifikant verbesserte. Tiron ist ein unspezifischer Sauerstoffradikalfänger [179, 180]. Ein wesentliches ROS produzierendes Enzym innerhalb der Gefäßregulation ist die NADPH-Oxidase [153]. Über die Aktivierung dieses Enzyms, insbesondere aus Entzündungszellen, wie Makrophagen oder Monozyten, aber auch aus vaskulären Zellen, wie glatten Gefäßmuskelzellen oder insbesondere auch Endothelzellen, werden hauptsächlich Superoxidanionen produziert. Diese Superoxidanionen reagieren sehr schnell mit einem anderen Radikal, dem Stickstoffmonoxid (NO). Diese beiden Radikale bilden zusammen das Peroxynitrit (ONOO<sup>o-</sup>), das selbst ein starkes Oxidanz ist und potente Nitrosylierungen induziert [181]. Da Peroxynitrit selbst ein potenter Vasokonstriktor ist, wird die biologische Verfügbarkeit von NO stark reduziert, was in einer ausgeprägten endothelialen Dysfunktion mündet. In dem in dieser Arbeit verwendeten sPLA<sub>2</sub>-transgenen Tiermodell konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die spezifische Inhibition der NADPH-Oxidase mittels Apocynin zu einer signifikanten Verbesserung der endothelialen Funktion führte, ein Beweis für die pathophysiologische Relevanz der ROS in diesem Modell. Diese Daten sind kongruent mit vielen klinischen Studien, die gezeigt haben, dass eine endotheliale Dysfunktion beispielsweise bei Patienten mit KHK oder Niereninsuffizienz zu einem großen Anteil durch die Produktion von ROS induziert wird. In den oben dargestellten Studien zum Einfluss der sPLA<sub>2</sub>-IIa auf die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität von Patienten mit einer KHK konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die sPLA<sub>2</sub> einen eigenständigen Risikofaktor darstellt [117, 182]. Dieser Zusammenhang zwischen sPLA<sub>2</sub>, COX-2 und NADPH- Oxidase könnte eine Erklärung für die vermehrt anfallenden ROS bei diesen Patienten sein.

Wie bereits beschrieben spielen die Reaktionsprodukte der COX-2 eine wichtige Rolle in der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion, zu diesen Reaktionsprodukten gehört insbesondere das PGE<sub>2</sub>. Um den Einfluss von PGE<sub>2</sub> in diesem Zusammenhang zu prüfen, wurde in einer anderen Versuchsreihe die Wirkung von PGE<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten untersucht. Die pharmakologisch nicht selektive Hemmung von EP1- und EP2- Rezeptoren durch die unspezifischen EP1- und EP2- Rezeptorantagonisten AH-6809 [183] und SC-19220 [183] führte zu einer Normalisierung der eingeschränkten endothelialen Funktion der Gefäße von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen.

## 4. Diskussion

---

Die endotheliale Funktion der Kontrolltiere änderte sich nicht unter dem Einfluss der PGE<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten, ein Zeichen für den spezifischen Einfluss von PGE<sub>2</sub> auf die endotheliale Funktion der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Tiere. Um den Einfluss von PGE<sub>2</sub> weiter zu untersuchen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluss aufsteigender Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> auf die endotheliale Funktion von Gefäßen gesunder C57BL/6-Kontrollmäuse untersucht. Unter ansteigenden PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen kam es auch in diesem Modell zu einer deutlichen Minderung der endothelialen Funktion. Diese Ergebnisse verdeutlichen wiederum die Bedeutung von COX-2 und deren Spaltprodukt PGE<sub>2</sub> im Zusammenhang der endothelialen Dysfunktion unter Einfluss von sPLA<sub>2</sub>-IIa. Interessanterweise wurde von einem positiven Feedback-Mechanismus bezüglich COX-2 durch PGE<sub>2</sub> berichtet [184], was zu der Überlegung veranlasst, ob dies auch zu der Verbindung zwischen der Expression von sPLA<sub>2</sub>-IIa und COX-2 in dieser experimentellen Arbeit beiträgt.

Diese an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäusen erhobenen Daten demonstrieren, dass die Expression von sPLA<sub>2</sub>-IIa zu einer endothelialen Dysfunktion führt, indem sie die Bildung von oxidativem Stress innerhalb der Gefäßwand in Abhängigkeit von COX-2, NADPH-Oxidase und PGE<sub>2</sub> erhöht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Hinblick auf diese Ergebnisse die pharmakologische Inhibition der sPLA<sub>2</sub>-IIa eine mögliche therapeutische Strategie darstellen könnte, der endothelialen Dysfunktion und der daraus resultierenden Entwicklung atherosklerotischer Läsionen entgegenzuwirken. Im Anschluss an diese Untersuchung wurden bei ca. 800 Peritonealdialysepatienten die sPLA<sub>2</sub>-IIa-Mengen und -Aktivitäten bestimmt. Die Auswertungen bezüglich kardiovaskulärer Mortalität und Morbidität laufen zurzeit noch und werden mit Spannung erwartet.



## 5. Zusammenfassung

---

### 5. Zusammenfassung

Zur Atherogenese tragen lokale und systemische Entzündungsreaktionen bei. Die sPLA<sub>2</sub>-IIa ist ein ubiquitäres Enzym, das die sn-2-Esterbindung der Phospholipide von Zellmembranen und Lipoproteinen hydrolysiert und dadurch freie Fettsäuren und Lysophospholipide freisetzt, die wiederum Vorläufer von verschiedenen proinflammatorischen Mediatoren, vor allem Prostaglandinen, sind. Studien haben gezeigt, dass die sPLA<sub>2</sub>-IIa entscheidend zur Pathogenese vieler Entzündungskrankheiten beiträgt, sowie auf verschiedenen Wegen zur Atherogenese. Da die endotheliale Dysfunktion eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen spielt und die proatherogenen Wirkungen der sPLA<sub>2</sub>-IIa bekannt sind, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der sPLA<sub>2</sub>-IIa auf die endotheliale Funktion untersucht. Hierzu wurden thorakale Aortenringe von sPLA<sub>2</sub>-IIa-transgenen Mäusen und von Kontrolltieren in einen Kleingefäßmyographen eingespannt, mit dessen Hilfe die endotheliale Funktion beider Spezies anhand ihrer Fähigkeit zur endothelabhängigen Vasodilatation durch ACh geprüft werden konnte. Durch verschiedene Versuchsreihen an Gefäßen von sPLA<sub>2</sub>-IIa-transgenen Mäusen, die eine Überexpression von humanem sPLA<sub>2</sub>-IIa aufweisen, konnte gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von sPLA<sub>2</sub>-IIa und dessen Spaltprodukten zu einer signifikanten Verschlechterung der endothelabhängigen Vasodilatation im Vergleich zu den Kontrolltieren kommt. Die Daten dieser Arbeit demonstrieren, dass die erhöhte Expression von sPLA<sub>2</sub>-IIa zu einer endothelialen Dysfunktion führt, indem sie die Bildung von oxidativem Stress innerhalb der Gefäßwand in Abhängigkeit von COX-2, NADPH-Oxidase und PGE<sub>2</sub> erhöht. Unter dem Einfluss der entsprechenden spezifischen Inhibitoren wie dem COX-2-Inhibitor NS-398, dem Sauerstoffradikalfänger Tiron, dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin und den unspezifischen PGE<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten AH-6809 und SC-19220 verbesserte sich die endothelabhängige Vasodilatation der Gefäße der sPLA<sub>2</sub>-transgenen Mäuse signifikant, während es bei den Kontrolltieren zu keinen bedeutsamen Veränderungen der endothelabhängigen Vasodilatation kam. Dass erhöhte Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> einen negativen Einfluss auf die endotheliale Funktion haben, konnte durch Versuche verdeutlicht werden, in denen sich die endothelabhängige Vasodilatation der Gefäße von Kontrolltieren unter dem Einfluss aufsteigender Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> stark verschlechterte.

Die Arbeit unterstreicht die atherogenen Eigenschaften der sPLA<sub>2</sub>-IIa und weist auf deren pharmakologische Inhibition als eine mögliche Therapie der endothelialen Dysfunktion im Rahmen atherosklerotischer Erkrankungen hin.

## 6. Literaturverzeichnis

---

### 6. Literaturverzeichnis

1. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. 340(2): p. 115-26.
2. Vyalov, S., B.L. Langille, and A.I. Gotlieb, *Decreased blood flow rate disrupts endothelial repair in vivo*. Am J Pathol, 1996. 149(6): p. 2107-18.
3. Klickstein, L.B., et al., *Localization of the binding site on intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)*. J Biol Chem, 1996. 271(39): p. 23920-7.
4. Muller, W.A., et al., *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes*. J Exp Med, 1993. 178(2): p. 449-60.
5. Giachelli, C.M., et al., *Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo*. Am J Pathol, 1998. 152(2): p. 353-8.
6. Rajavashisth, T.B., et al., *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins*. Nature, 1990. 344(6263): p. 254-7.
7. Nagel, T., et al., *Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells*. J Clin Invest, 1994. 94(2): p. 885-91.
8. Resnick, N., et al., *Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(16): p. 7908.
9. Lin, M.C., et al., *Shear stress induction of the tissue factor gene*. J Clin Invest, 1997. 99(4): p. 737-44.
10. Mondy, J.S., et al., *Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo*. Circ Res, 1997. 81(3): p. 320-7.
11. Nakashima, Y., et al., *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. 18(5): p. 842-51.
12. Boring, L., et al., *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice*. J Clin Invest, 1997. 100(10): p. 2552-61.
13. McMillan, D.E., *Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques*. Stroke, 1985. 16(4): p. 582-7.
14. Shepherd, J., et al., *Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia*. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. N Engl J Med, 1995. 333(20): p. 1301-7.
15. Breslow, J.L., *Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases*. Nat Med, 1997. 3(6): p. 600-1.
16. Braunwald, E., *Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities*. N Engl J Med, 1997. 337(19): p. 1360-9.

## 6. Literaturverzeichnis

---

17. Napoli, C., et al., *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions.* J Clin Invest, 1997. 100(11): p. 2680-90.
18. Stary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.* Circulation, 1994. 89(5): p. 2462-78.
19. Boisvert, W.A., et al., *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice.* J Clin Invest, 1998. 101(2): p. 353-63.
20. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature, 1993. 362(6423): p. 801-9.
21. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis--an update.* N Engl J Med, 1986. 314(8): p. 488-500.
22. Sachais, B.S., *Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis.* Curr Atheroscler Rep, 2001. 3(5): p. 412-6.
23. Glagov, S., et al., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries.* N Engl J Med, 1987. 316(22): p. 1371-5.
24. van der Wal, A.C., et al., *Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response.* Lab Invest, 1989. 61(2): p. 166-70.
25. Libby, P., *Atheroma: more than mush.* Lancet, 1996. 348 Suppl 1: p. s4-7.
26. Raines, E.W. and R. Ross, *Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy?* Bioessays, 1996. 18(4): p. 271-82.
27. Falk, E., *[Plaque vulnerability and disruption].* Rev Clin Esp, 1996. 196(4 Monografico): p. 6-12.
28. Fuster, V., *Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology.* Circulation, 1994. 90(4): p. 2126-46.
29. Lee, R.T. and P. Libby, *The unstable atheroma.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. 17(10): p. 1859-67.
30. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.* J Clin Invest, 1994. 94(6): p. 2493-503.
31. Schonbeck, U., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture?* Circ Res, 1997. 81(3): p. 448-54.

## 6. Literaturverzeichnis

---

32. Mach, F., et al., *Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor.* *Circulation*, 1997. 96(2): p. 396-9.
33. Thompson, S.G., et al., *Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group.* *N Engl J Med*, 1995. 332(10): p. 635-41.
34. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIbalpha.* *J Exp Med*, 1998. 187(3): p. 329-39.
35. Tailleux, A., et al., *Immunological properties of apoB-containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries.* *J Lipid Res*, 1993. 34(5): p. 719-28.
36. Keaney, J.F., Jr., et al., *Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation.* *J Clin Invest*, 1995. 95(6): p. 2520-9.
37. Ivandic, B., et al., *Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(5): p. 1284-90.
38. Hurt-Camejo, E. and G. Camejo, *Potential involvement of type II phospholipase A2 in atherosclerosis.* *Atherosclerosis*, 1997. 132(1): p. 1-8.
39. Kramer, R.M., et al., *Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2.* *J Biol Chem*, 1989. 264(10): p. 5768-75.
40. Seilhamer, J.J., et al., *Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid.* *J Biol Chem*, 1989. 264(10): p. 5335-8.
41. Menschikowski, M., et al., *Secretory group II phospholipase A2 in human atherosclerotic plaques.* *Atherosclerosis*, 1995. 118(2): p. 173-81.
42. Takasaki, J., et al., *Antibodies against type II phospholipase A2 prevent renal injury due to ischemia and reperfusion in rats.* *FEBS Lett*, 1998. 440(3): p. 377-81.
43. Dennis, E.A., *Phospholipase A2 in eicosanoid generation.* *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(2 Pt 2): p. S32-5.
44. Sparrow, C.P., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimics cell-mediated oxidative modification.* *J Lipid Res*, 1988. 29(6): p. 745-53.
45. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis.* *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 748: p. 122-31; discussion 131-2.
46. Berliner, J., et al., *Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action.* *Thromb Haemost*, 1997. 78(1): p. 195-9.

## 6. Literaturverzeichnis

---

47. Olsson, U., G. Bondjers, and G. Camejo, *Fatty acids modulate the composition of extracellular matrix in cultured human arterial smooth muscle cells by altering the expression of genes for proteoglycan core proteins*. *Diabetes*, 1999. 48(3): p. 616-22.
48. Kugiyama, K., et al., *Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease*. *Circulation*, 1999. 100(12): p. 1280-4.
49. Packard, C.J., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group*. *N Engl J Med*, 2000. 343(16): p. 1148-55.
50. Porela, P., et al., *Level of circulating phospholipase A2 in prediction of the prognosis of patients with suspected myocardial infarction*. *Basic Res Cardiol*, 2000. 95(5): p. 413-7.
51. Leitinger, N., et al., *Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 2. Potential involvement of biologically active oxidized phospholipids*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(5): p. 1291-8.
52. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. *Circ Res*, 2000. 87(10): p. 840-4.
53. Shah, A.M., *Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells*. *Cardiovasc Res*, 1996. 31(6): p. 847-67.
54. Vanhoutte, P.M., *Endothelial dysfunction and atherosclerosis*. *Eur Heart J*, 1997. 18 Suppl E: p. E19-29.
55. Geiger, M., et al., *Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells*. *Am J Physiol*, 1997. 273(1 Pt 1): p. L275-81.
56. Jayakody, R.L., et al., *Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1985. 63(9): p. 1206-9.
57. Freiman, P.C., et al., *Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates*. *Circ Res*, 1986. 58(6): p. 783-9.
58. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. *N Engl J Med*, 1986. 315(17): p. 1046-51.
59. Zeiher, A.M., et al., *Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension*. *J Clin Invest*, 1993. 92(2): p. 652-62.
60. Golino, P., *[Clinical significance of endothelial dysfunction: studies of human coronary circulation in vivo]*. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 1993. 82(42): p. 1177-81.
61. Fish, N.M. and M. Hoare, *Recovery of protein inclusion bodies*. *Biochem Soc Trans*, 1988. 16(2): p. 102-4.
62. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. *Pharmacol Rev*, 1991. 43(2): p. 109-42.

## 6. Literaturverzeichnis

---

63. Stehouwer, C.D., et al., *Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy*. Cardiovasc Res, 1997. 34(1): p. 55-68.
64. Lassegue, B. and R.E. Clempus, *Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. 285(2): p. R277-97.
65. Li, J.M. and A.M. Shah, *Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. 287(5): p. R1014-30.
66. Warnholtz, A., et al., *Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system*. Circulation, 1999. 99(15): p. 2027-33.
67. Hink, U., et al., *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Circ Res, 2001. 88(2): p. E14-22.
68. Bonventre, J.V., *Phospholipase A2 and signal transduction*. J Am Soc Nephrol, 1992. 3(2): p. 128-50.
69. Waite, M., et al., *Conversion of phosphatidylglycerol to lyso(bis)phosphatidic acid by alveolar macrophages*. FASEB J, 1987. 1(4): p. 318-25.
70. Valentin, E. and G. Lambeau, *Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1488(1-2): p. 59-70.
71. Six, D.A. and E.A. Dennis, *The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1488(1-2): p. 1-19.
72. Kudo, I. and M. Murakami, *Phospholipase A2 enzymes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. 68-69: p. 3-58.
73. Maclouf, J., G. Folco, and C. Patrono, *Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease*. Thromb Haemost, 1998. 79(4): p. 691-705.
74. Dennis, E.A., *The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes*. Trends Biochem Sci, 1997. 22(1): p. 1-2.
75. Murakami, M., et al., *The functions of five distinct mammalian phospholipase A2S in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A2S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A2*. J Biol Chem, 1998. 273(23): p. 14411-23.
76. Chang, H.W., et al., *Purification and characterization of extracellular phospholipase A2 from peritoneal cavity of caseinate-treated rat*. J Biochem, 1987. 102(1): p. 147-54.
77. Wery, J.P., et al., *Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A2 at 2.2 Å resolution*. Nature, 1991. 352(6330): p. 79-82.



## 6. Literaturverzeichnis

---

78. Hernandez, M., et al., *Secretory phospholipase A2 activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2 in the human astrocytoma cell line 1321N1*. *J Biol Chem*, 1998. 273(1): p. 606-12.
79. Laine, V.J., D.S. Grass, and T.J. Nevalainen, *Protection by group II phospholipase A2 against Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 1999. 162(12): p. 7402-8.
80. Hack, C.E., et al., *A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells*. *Immunol Today*, 1997. 18(3): p. 111-5.
81. Cummings, B.S., J. McHowat, and R.G. Schnellmann, *Phospholipase A(2)s in cell injury and death*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. 294(3): p. 793-9.
82. de Beer, F.C., et al., *Secretory non-pancreatic phospholipase A2: influence on lipoprotein metabolism*. *J Lipid Res*, 1997. 38(11): p. 2232-9.
83. Sartipy, P., et al., *Phospholipase A(2) modification of low density lipoproteins forms small high density particles with increased affinity for proteoglycans and glycosaminoglycans*. *J Biol Chem*, 1999. 274(36): p. 25913-20.
84. Sartipy, P. and E. Hurt-Camejo, *Modification of plasma lipoproteins by group IIA phospholipase A(2): possible implications for atherogenesis*. *Trends Cardiovasc Med*, 1999. 9(8): p. 232-8.
85. Menschikowski, M., et al., *Expression of secretory group IIA phospholipase A(2) in relation to the presence of microbial agents, macrophage infiltrates, and transcripts of proinflammatory cytokines in human aortic tissues*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(3): p. 751-62.
86. Uhl, W., et al., *Pathophysiological role of secretory type I and II phospholipase A2 in acute pancreatitis: an experimental study in rats*. *Gut*, 1997. 40(3): p. 386-92.
87. Vadas, P., *Elevated plasma phospholipase A2 levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock*. *J Lab Clin Med*, 1984. 104(6): p. 873-81.
88. Vadas, P. and W. Pruzanski, *Induction of group II phospholipase A2 expression and pathogenesis of the sepsis syndrome*. *Circ Shock*, 1993. 39(2): p. 160-7.
89. Green, J.A., et al., *Circulating phospholipase A2 activity associated with sepsis and septic shock is indistinguishable from that associated with rheumatoid arthritis*. *Inflammation*, 1991. 15(5): p. 355-67.
90. Buchler, M., et al., *Serum phospholipase A2 in intensive care patients with peritonitis, multiple injury, and necrotizing pancreatitis*. *Klin Wochenschr*, 1989. 67(3): p. 217-21.
91. Buchler, M., et al., *Role of phospholipase A2 in human acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, 1989. 97(6): p. 1521-6.
92. Gronroos, J.M., et al., *Phospholipase A2, C-reactive protein, and white blood cell count in the diagnosis of acute appendicitis*. *Clin Chem*, 1994. 40(9): p. 1757-60.

## 6. Literaturverzeichnis

---

93. Niessen, H.W., et al., *Type II secretory phospholipase A2 in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes?* Cardiovasc Res, 2003. 60(1): p. 68-77.
94. Nijmeijer, R., et al., *Type II secretory phospholipase A2 binds to ischemic flip-flopped cardiomyocytes and subsequently induces cell death.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 285(5): p. H2218-24.
95. Sun, G.Y., et al., *Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases.* J Lipid Res, 2004. 45(2): p. 205-13.
96. Sun, G.Y., et al., *Phospholipase A2 in astrocytes: responses to oxidative stress, inflammation, and G protein-coupled receptor agonists.* Mol Neurobiol, 2005. 31(1-3): p. 27-41.
97. Farooqui, A.A., W.Y. Ong, and L.A. Horrocks, *Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2.* Neurochem Res, 2004. 29(11): p. 1961-77.
98. Nakazato, Y., et al., *Interleukin-1 alpha stimulates prostaglandin biosynthesis in serum-activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (type II) phospholipase A2.* J Biol Chem, 1991. 266(21): p. 14119-27.
99. Oka, S. and H. Arita, *Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression.* J Biol Chem, 1991. 266(15): p. 9956-60.
100. Pfeilschifter, J., et al., *Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A2 by rat mesangial cells. Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by cultured rat glomerular cells.* J Clin Invest, 1993. 92(5): p. 2516-23.
101. Kudo, I., et al., *Mammalian non-pancreatic phospholipases A2.* Biochim Biophys Acta, 1993. 1170(3): p. 217-31.
102. Murakami, M., I. Kudo, and K. Inoue, *Secretory phospholipases A2.* J Lipid Mediat Cell Signal, 1995. 12(2-3): p. 119-30.
103. Crowl, R.M., et al., *Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response.* J Biol Chem, 1991. 266(4): p. 2647-51.
104. Nevalainen, T.J., V.J. Laine, and D.S. Grass, *Expression of human group II phospholipase A2 in transgenic mice.* J Histochem Cytochem, 1997. 45(8): p. 1109-19.
105. Nevalainen, T.J., et al., *Immunochemical detection of group I and group II phospholipases A2 in human serum.* Clin Chem, 1992. 38(9): p. 1824-9.
106. Matsuda, Y., et al., *Development of a radioimmunoassay for human group-II phospholipase A2 and demonstration of postoperative elevation.* Enzyme, 1991. 45(4): p. 200-8.
107. Sakamoto, K., et al., *Membrane-associated phospholipase A2 detected by a radioimmunoassay is a sensitive marker of inflammation in rheumatoid arthritis.* Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1992. 76(3): p. 279-85.



## 6. Literaturverzeichnis

---

108. Gronroos, J.M., K. Kuttilla, and T.J. Nevalainen, *Group II phospholipase A2 in serum in critically ill surgical patients*. Crit Care Med, 1994. 22(6): p. 956-9.
109. Hurt-Camejo, E., et al., *Phospholipase A(2) in vascular disease*. Circ Res, 2001. 89(4): p. 298-304.
110. Schiering, A., et al., *Analysis of secretory group II phospholipase A2 expression in human aortic tissue in dependence on the degree of atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1999. 144(1): p. 73-8.
111. Anthonsen, M.W., et al., *Mildly oxidized LDL induces expression of group IIa secretory phospholipase A(2) in human monocyte-derived macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. 20(5): p. 1276-82.
112. Webb, N.R., et al., *Macrophage-expressed group IIA secretory phospholipase A2 increases atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. 23(2): p. 263-8.
113. Elinder, L.S., et al., *Expression of phospholipase A2 isoforms in human normal and atherosclerotic arterial wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. 17(10): p. 2257-63.
114. Kugiyama, K., et al., *Increase in plasma levels of secretory type II phospholipase A(2) in patients with coronary spastic angina*. Cardiovasc Res, 2000. 47(1): p. 159-65.
115. Kugiyama, K., et al., *Prognostic value of plasma levels of secretory type II phospholipase A2 in patients with unstable angina pectoris*. Am J Cardiol, 2000. 86(7): p. 718-22.
116. Liu, P.Y., et al., *Prognostic value and the changes of plasma levels of secretory type II phospholipase A2 in patients with coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention*. Eur Heart J, 2003. 24(20): p. 1824-32.
117. Boekholdt, S.M., et al., *Serum levels of type II secretory phospholipase A2 and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(4): p. 839-46.
118. Naghavi, M., et al., *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I*. Circulation, 2003. 108(14): p. 1664-72.
119. Naghavi, M., et al., *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II*. Circulation, 2003. 108(15): p. 1772-8.
120. Camejo, G., et al., *Lipid mediators that modulate the extracellular matrix structure and function in vascular cells*. Curr Atheroscler Rep, 1999. 1(2): p. 142-9.
121. Hurt-Camejo, E., et al., *Localization of nonpancreatic secretory phospholipase A2 in normal and atherosclerotic arteries. Activity of the isolated enzyme on low-density lipoproteins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. 17(2): p. 300-9.
122. Neuzil, J., et al., *Secretory phospholipase A2 and lipoprotein lipase enhance 15-lipoxygenase-induced enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in low-density lipoproteins*. Biochemistry, 1998. 37(25): p. 9203-10.

## 6. Literaturverzeichnis

---

123. Hurt-Camejo, E., G. Camejo, and P. Sartipy, *Phospholipase A2 and small, dense low-density lipoprotein*. *Curr Opin Lipidol*, 2000. 11(5): p. 465-71.
124. Oorni, K., et al., *Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions*. *J Lipid Res*, 2000. 41(11): p. 1703-14.
125. Pentikainen, M.O., et al., *Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima*. *J Intern Med*, 2000. 247(3): p. 359-70.
126. Watson, A.D., et al., *Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo*. *J Biol Chem*, 1997. 272(21): p. 13597-607.
127. Ameli, S., et al., *Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. 16(8): p. 1074-9.
128. Palinski, W., et al., *Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma*. *J Clin Invest*, 1996. 98(3): p. 800-14.
129. Kuwata, H., et al., *Cytosolic phospholipase A2 is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A2 that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in rat 3Y1 fibroblasts*. *J Biol Chem*, 1998. 273(3): p. 1733-40.
130. Sawada, H., et al., *Regulation of type V phospholipase A2 expression and function by proinflammatory stimuli*. *Eur J Biochem*, 1999. 263(3): p. 826-35.
131. Murakami, M., et al., *Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways*. *J Biol Chem*, 1999. 274(5): p. 3103-15.
132. Tada, K., et al., *Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A2 in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions*. *J Immunol*, 1998. 161(9): p. 5008-15.
133. Murakami, M., et al., *Regulatory functions of phospholipase A2*. *Crit Rev Immunol*, 1997. 17(3-4): p. 225-83.
134. Tischfield, J.A., *A reassessment of the low molecular weight phospholipase A2 gene family in mammals*. *J Biol Chem*, 1997. 272(28): p. 17247-50.
135. Balboa, M.A., et al., *Novel group V phospholipase A2 involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages*. *J Biol Chem*, 1996. 271(50): p. 32381-4.
136. Reddy, S.T., et al., *Analysis of the secretory phospholipase A2 that mediates prostaglandin production in mast cells*. *J Biol Chem*, 1997. 272(21): p. 13591-6.

## 6. Literaturverzeichnis

---

137. Reddy, S.T. and H.R. Herschman, *Prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for the generation of prostaglandin D2 in activated mast cells*. J Biol Chem, 1997. 272(6): p. 3231-7.
138. Murakami, M., Y. Nakatani, and I. Kudo, *Type II secretory phospholipase A2 associated with cell surfaces via C-terminal heparin-binding lysine residues augments stimulus-initiated delayed prostaglandin generation*. J Biol Chem, 1996. 271(47): p. 30041-51.
139. Smith, W.L. and R. Langenbach, *Why there are two cyclooxygenase isozymes*. J Clin Invest, 2001. 107(12): p. 1491-5.
140. Coleman, R.A., W.L. Smith, and S. Narumiya, *International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes*. Pharmacol Rev, 1994. 46(2): p. 205-29.
141. Matsuoka, T., et al., *Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma*. Science, 2000. 287(5460): p. 2013-7.
142. Kunikata, T., et al., *Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3*. Nat Immunol, 2005. 6(5): p. 524-31.
143. Honda, T., et al., *Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis*. J Exp Med, 2006. 203(2): p. 325-35.
144. Berberian, P.A., V.A. Ziboh, and S.L. Hsia, *Inhibition of cholesterol esterification in rabbit aorta by prostaglandin E2*. Atherosclerosis, 1977. 27(2): p. 213-20.
145. Corcoran, M.L., et al., *Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes*. J Biol Chem, 1992. 267(1): p. 515-9.
146. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. 82(1): p. 47-95.
147. Colton, C.A., et al., *Microglial contribution to oxidative stress in Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2000. 899: p. 292-307.
148. Dhalla, N.S., R.M. Temsah, and T. Netticadan, *Role of oxidative stress in cardiovascular diseases*. J Hypertens, 2000. 18(6): p. 655-73.
149. Beckman, K.B. and B.N. Ames, *The free radical theory of aging matures*. Physiol Rev, 1998. 78(2): p. 547-81.
150. Channon, K.M. and T.J. Guzik, *Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors*. J Physiol Pharmacol, 2002. 53(4 Pt 1): p. 515-24.
151. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. J Clin Invest, 2003. 111(8): p. 1201-9.

## 6. Literaturverzeichnis

---

152. Babior, B.M., J.D. Lambeth, and W. Nauseef, *The neutrophil NADPH oxidase*. Arch Biochem Biophys, 2002. 397(2): p. 342-4.
153. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. 74(6): p. 1141-8.
154. Bayraktutan, U., L. Blayney, and A.M. Shah, *Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. 20(8): p. 1903-11.
155. Gorlach, A., et al., *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): p. 26-32.
156. Pagano, P.J., *Vascular gp91(phox): beyond the endothelium*. Circ Res, 2000. 87(1): p. 1-3.
157. Bendall, J.K., et al., *Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice*. Circulation, 2002. 105(3): p. 293-6.
158. Li, J.M., et al., *Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha*. Circ Res, 2002. 90(2): p. 143-50.
159. Ago, T., et al., *Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase*. Circulation, 2004. 109(2): p. 227-33.
160. Li, J.M. and A.M. Shah, *Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit*. J Biol Chem, 2003. 278(14): p. 12094-100.
161. Ushio-Fukai, M., et al., *Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis*. Circ Res, 2002. 91(12): p. 1160-7.
162. Frey, R.S., et al., *PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells*. Circ Res, 2002. 90(9): p. 1012-9.
163. Kashiwagi, A., et al., *Endothelium-specific activation of NAD(P)H oxidase in aortas of exogenously hyperinsulinemic rats*. Am J Physiol, 1999. 277(6 Pt 1): p. E976-83.
164. Inoguchi, T., et al., *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells*. Diabetes, 2000. 49(11): p. 1939-45.
165. Rueckschloss, U., et al., *Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy*. Circulation, 2001. 104(15): p. 1767-72.
166. Hwang, J., et al., *Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation*. Circ Res, 2003. 93(12): p. 1225-32.
167. Kim, K.S., et al., *Protection from reoxygenation injury by inhibition of rac1*. J Clin Invest, 1998. 101(9): p. 1821-6.

## 6. Literaturverzeichnis

---

168. Lopes, N.H., et al., *Rac-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production is induced by nutrient deprivation*. *Circ Res*, 2002. 91(9): p. 798-805.
169. Nyborg, N.C., et al., *Active, passive and myogenic characteristics of isolated rat intramural coronary resistance arteries*. *Pflugers Arch*, 1987. 410(6): p. 664-70.
170. Mulvany, M.J. and W. Halpern, *Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ*. *Nature*, 1976. 260(5552): p. 617-9.
171. Landmesser, U. and H. Drexler, *The clinical significance of endothelial dysfunction*. *Curr Opin Cardiol*, 2005. 20(6): p. 547-51.
172. Lerman, A. and A.M. Zeiher, *Endothelial function: cardiac events*. *Circulation*, 2005. 111(3): p. 363-8.
173. Tietge, U.J., et al., *Overexpression of secretory phospholipase A(2) causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester and apolipoprotein A-I*. *J Biol Chem*, 2000. 275(14): p. 10077-84.
174. de Beer, F.C., et al., *HDL modification by secretory phospholipase A(2) promotes scavenger receptor class B type I interaction and accelerates HDL catabolism*. *J Lipid Res*, 2000. 41(11): p. 1849-57.
175. Hakala, J.K., et al., *Lipolytic modification of LDL by phospholipase A2 induces particle aggregation in the absence and fusion in the presence of heparin*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(5): p. 1276-83.
176. Hakala, J.K., et al., *Lipolysis of LDL by human secretory phospholipase A(2) induces particle fusion and enhances the retention of LDL to human aortic proteoglycans*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(6): p. 1053-8.
177. Tietge, U.J., et al., *Macrophage-specific expression of group IIA sPLA2 results in accelerated atherogenesis by increasing oxidative stress*. *J Lipid Res*, 2005. 46(8): p. 1604-14.
178. Ghesquiere, S.A., et al., *Macrophage-specific overexpression of group IIA sPLA2 increases atherosclerosis and enhances collagen deposition*. *J Lipid Res*, 2005. 46(2): p. 201-10.
179. Papaharalambus, C.A. and K.K. Griendling, *Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury*. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. 17(2): p. 48-54.
180. Ghosh, M., H.D. Wang, and J.R. McNeill, *Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats*. *Br J Pharmacol*, 2004. 141(4): p. 562-73.
181. Escobales, N. and M.J. Crespo, *Oxidative-nitrosative stress in hypertension*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005. 3(3): p. 231-46.
182. Mallat, Z., et al., *Circulating secretory phospholipase A2 activity predicts recurrent events in patients with severe acute coronary syndromes*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(7): p. 1249-57.

## 6. Literaturverzeichnis

---

183. Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi, *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions*. *Physiol Rev*, 1999. 79(4): p. 1193-226.
184. Vichai, V., et al., *Positive feedback regulation of COX-2 expression by prostaglandin metabolites*. *Inflamm Res*, 2005. 54(4): p. 163-72.

## 7. Selbständigkeitserklärung

---

### 7. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Myriam Lallinger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss der sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub> Typ IIa auf die endotheliale Funktion“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 01.03.2009

Myriam Lallinger



## 8. Danksagung

---

### 8. Danksagung

Im Besonderen gilt mein Dank Herrn Dr. Markus Tölle, der mich in die filigrane Arbeit am Kleingefäßmyographen einführte und trotz seiner vielen Verpflichtungen in der Klinik und im Dienst der Wissenschaft ansprechbar für anfallende Fragen und Probleme blieb.

Herrn Prof. Dr. van der Giet möchte ich für die Vergabe des Themas danken sowie für seine kollegiale Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Walter Zidek sei Dank für die Bereitstellung aller notwendigen Materialien ausgesprochen, die für die Erstellung dieser Arbeit unabdingbar waren.

Herrn Prof. Dr. Tietge danke ich für die Bereitstellung der transgenen Mäuse. An dieser Stelle sei auch der vielen Mäuse gedacht, ohne die diese Arbeit sowie so viele andere Arbeiten gar nicht existieren würden! Martin und Martina, ihr habt Leben ins Labor gebracht.

Meinen Kommilitonen Susanne Schwarz, Laura Hannemann, Anissa Habib, Kurban Tanis und Antonjas Tozman möchte ich herzlich für die inspirierende und stets fröhliche Zusammenarbeit im Labor danken. Suse, danke für jede in der Kitteltasche versteckte Praline, danke für die Freundschaft.

Meinen Freunden - allen voran Stephan - danke ich für die ausdauernden Aufmunterungen am Ball zu bleiben und für die Bereitstellung seines Computers, wenn der meinige wieder einmal den Geist aufgab.

Alejandro, ich danke dir von ganzem Herzen für deine mentale und liebevolle Unterstützung und für den Erwerb der Nutzungsrechte der Bücherei der New York University, so dass ich auch in den USA an dieser Arbeit unter Nutzung der nötigen Internetzugänge arbeiten konnte.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich mit ihrer Liebe in allen Situationen unterstützen und stärken, sowie bei meinen geliebten Geschwistern Robert, David und Franziska, die Geduld mit ihrer großen bzw. kleinen Schwester zeigten, wenn diese aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes nicht so viel Zeit hatte. Robert und Greti, die Nachricht, dass ich bald Tante sein werde, hat mich in meinem Endspurt gestärkt und beflügelt.



### **9. Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 9. Curriculum vitae

---

### Literaturverzeichnis

1. Increased Type IIA secretory phospholipase A<sub>2</sub> expression contributes to oxidative stress in end-stage renal disease.

Markus van der Giet<sup>1,#</sup>, Markus Tölle<sup>1,#</sup>, Domenico Pratico<sup>2</sup>, Volkmar Luft<sup>3</sup>, Myriam Lallinger<sup>1</sup>, Mirjam Schuchardt<sup>1</sup>, Matthias P. Hörl<sup>1</sup>, Walter Zidek<sup>1</sup>, and Uwe J.F. Tietge<sup>1,4,\*</sup>

Kidney International. **Manuskript eingereicht.**