

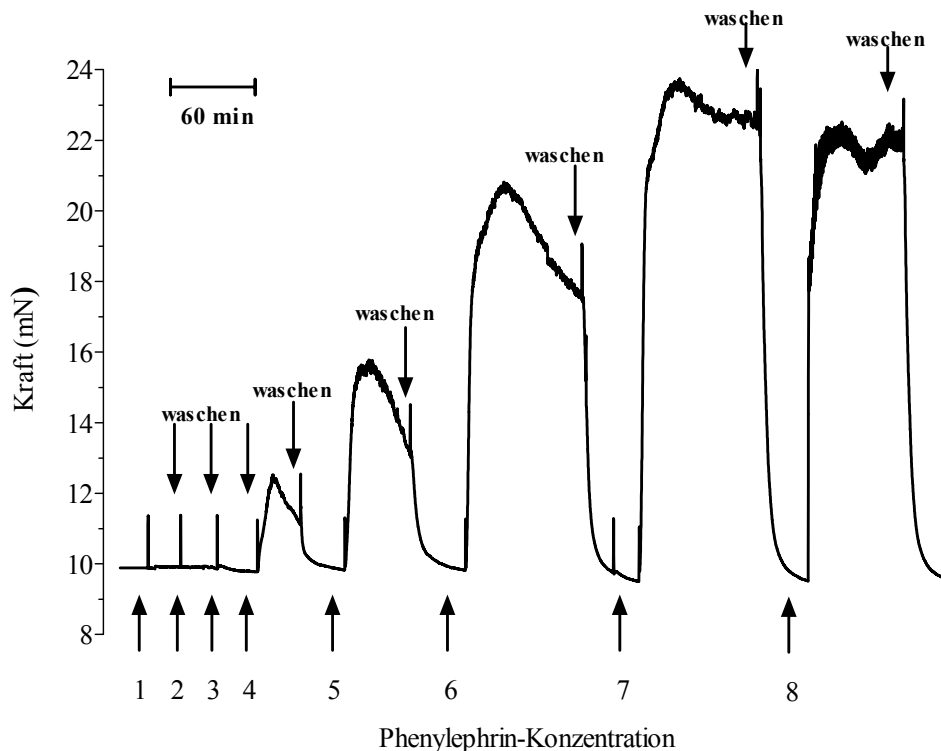
3. Ergebnisse**3.1. Dosisabhängige Vasokonstriktion an thorakalen Aorten von WKY Ratten durch Phenylephrin**

Abbildung 4: Dargestellt ist die nicht kumulative DWK von PE in der Anwendung an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Es handelt es sich um eine repräsentative Originalabbildung von 8 unabhängigen ($n=8$) Versuchen an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen am Kleingefäßmyographen. Dabei ist ein dosisabhängiger Anstieg der PE induzierten Vasokonstriktion zu verzeichnen. Vor jeder Konzentrationserhöhung wurde ein Waschvorgang durchgeführt, bis die Baseline wieder erreicht wurde. Die gemessene Kraft in mN ist auf der Ordinate gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen. Es wurden Applikationen ansteigender PE-Konzentrationen vorgenommen und zwar in den Schritten: Pfeil 1: 3 nmol/l; Pfeil 2: 10 nmol/l; Pfeil 3: 30 nmol/l; Pfeil 4: 100 nmol/l; Pfeil 5: 300 nmol/l; Pfeil 6: 1 μ mol/l; Pfeil 7: 3 μ mol/l und Pfeil 8: 10 μ mol/l.

In Abbildung 4 kommt eine durch Phenylephrin (PE) über die Aktivierung des α_1 – Adrenozeptors ausgelöste Vasokonstriktion an thorakalen Aorten von WKY-Ratten zur

Darstellung, die von der Dosis des PE abhängt. Dabei wird die maximale Vasokonstriktion (V_{\max}) ab einer Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ (Pfeil 8) erreicht.

3.2 Dosisabhängige Vasodilatation durch Acetylcholin an vorkontrahierten thorakalen Aorten von WKY-Ratten

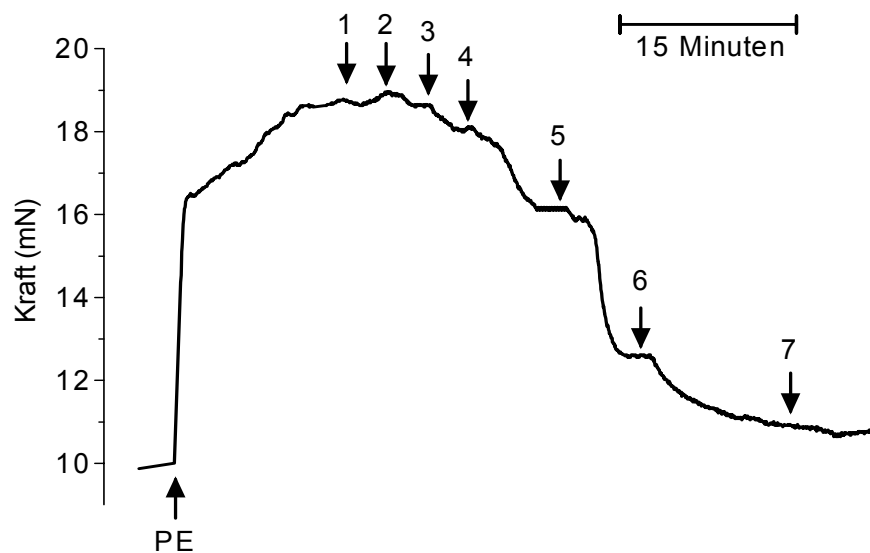


Abbildung 5: Dargestellt ist eine kumulative DWK von ACh an durch PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Es handelt sich um eine repräsentative Originalabbildung von 8 unabhängigen ($n=8$) Versuchsabläufen an mehreren thorakalen Aortenringen am Kleingefäßmyographen. Zuerst erfolgte eine Applikation von PE in Höhe von $1 \mu\text{mol/l}$, dies bewirkte eine Vorkontraktion der thorakalen Aorta. Es folgte die kumulative Applikation von ACh, einem potenter Vasodilatator, daraus resultierte eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation. Die gemessene Kraft in mN ist auf der Ordinate gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen. Es wurden Applikationen ansteigender Acetylcholin-Konzentrationen vorgenommen: Pfeil 1: 100 pmol/l ; Pfeil 2: 1 nmol/l ; Pfeil 3: 10 nmol/l ; Pfeil 4: 100 nmol/l ; Pfeil 5: $1 \mu\text{mol/l}$; Pfeil 6: $10 \mu\text{mol/l}$; Pfeil 7: $100 \mu\text{mol/l}$.

In Abbildung 5 ist eine Originalabbildung einer Acetylcholin (ACh) vermittelten Vasodilatation an thorakalen Aorten von WKY-Ratten, die mit PE vorkontrahiert waren, dargestellt. Die Höhe der Vasodilatation ist von der ACh-Dosis abhängig. Dabei wurde die maximale Vasokonstriktion (V_{\max}) ab einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ (Pfeil 7) erreicht.

3.3. Dosisabhängige Vasodilatation an vorkontrahierten thorakalen Aorten von WKY-Ratten durch SNP

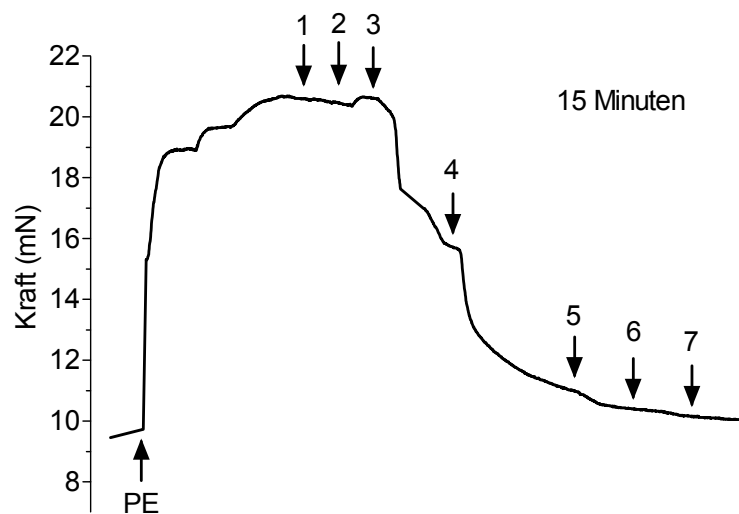


Abbildung 6: Dargestellt ist die kumulative DWK von SNP an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratte am Kleingefäßmyographen.

Gezeigt wird eine repräsentative Originalabbildung von 8 unabhängigen ($n=8$) Versuchen an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen am Kleingefäßmyographen. Dabei erfolgte zuerst eine durch PE in Höhe von $1 \mu\text{mol/l}$ induzierte Vorkontraktion der thorakalen Aorta. Danach erfolgte die kumulative Applikation von SNP, einem sehr potenten NO-Donor, die zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation führte. Die gemessene Kraft in mN ist auf der Ordinate gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen. Es wurden Applikationen ansteigender Natriumnitroprussitkonzentrationen vorgenommen: Pfeil 1: 100 pmol/l ; Pfeil 2: 1 nmol/l ; Pfeil 3: 10 nmol/l ; Pfeil 4: 100 nmol/l ; Pfeil 5: $1 \mu\text{mol/l}$; Pfeil 6: $10 \mu\text{mol/l}$; Pfeil 7: $100 \mu\text{mol/l}$.

In Abbildung 6 wird die Wirkung von Natriumnitroprussit (Sodium Nitroprussid, SNP) an vorkontrahierten thorakalen Aorten von WKY-Ratten gezeigt. Es wird eine dosisabhängige Vasodilatation durch SNP induziert. Die maximale Vasokonstriktion (V_{max}) wurde ab einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ (Pfeil 7) erreicht.

3.4. Vasodilatation an mit L-NAME vorbehandelten und PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten mittels ACh und SNP

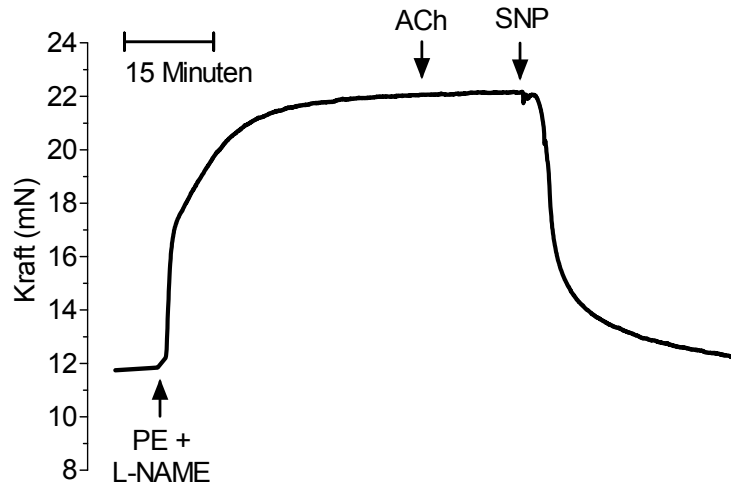


Abbildung 7: Dargestellt ist die Wirkung von ACh und SNP auf mit PE vorkontrahierte thorakale Aortenringe von WKY-Ratten, sowie nach eNOS Inhibition durch L-NAME am Kleingefäßmyographen.

Abgebildet ist eine repräsentative Originalabbildung von 6 unabhängigen (n=6) Versuchen am Kleingefäßmyographen. Die gemessene Kraft in mN ist auf der Ordinate gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen.

In Abbildung 7 ist in einer Originalabbildung eines Versuches am Kleingefäßmyographen die Wirkung von ACh und SNP nach vorangegangener Inkubation des Aortenringes mit L-NAME, einem spezifischen irreversiblen eNOS-Antagonisten, in der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ über 20 Minuten zu erkennen. Nach Vorkontraktion durch PE in der Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ wird durch ACh in der Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ keine Vasorelaxation ausgelöst, wohingegen SNP, als NO-Donor, eine potente Vasorelaxation induziert. Die Wirkung des SNP ist also unabhängig von der Funktionalität der eNOS.

3.5. Dosisabhängige Wirkung von ACh und SNP auf vorkontrahierte Aortenringe der in dieser Arbeit eingesetzten Tierstämme

Im ersten Ansatz dieser Doktorarbeit wurde die endotheliale Kapazität der thorakalen Aortenringe der jeweils zum Einsatz kommenden Tierstämme, WKY-Ratte (Abbildung 8), C57BL/6 Maus (Abbildung 9), eNOS defiziente Maus (Abbildung 10) und S1P₃-Rezeptor defiziente Maus (Abbildung 11) untersucht. Es wurden zuerst Versuche an unbehandelten thorakalen Aortenringen mit intaktem Endothel durchgeführt und dabei DWK von ACh und SNP in aufsteigender Dosis durchgeführt. Im nächsten Versuch wurde die eNOS mit dem spezifischen Antagonisten L-NAME inhibiert und im Anschluss daran DWK von ACh und SNP appliziert. In einem weiteren Versuch wurden durch chemische Prozesse die thorakalen Aortenringe deendothelialisiert und erneut DWK von ACh und SNP in aufsteigender Dosierung angefertigt.

An den thorakalen Aorten von WKY-Ratten konnte eine dosisabhängige Vasorelaxation durch ACh ($\log EC_{50} -6,79 \pm 0,18$, $V_{\max} 68,28 \pm 11,47$ %) induziert werden, die durch L-NAME ($\log EC_{50} -5,22 \pm 0,38$, $V_{\max} -7,69 \pm 2,97$ %; $p < 0,05$) und Deendothelialisierung ($\log EC_{50} -7,03 \pm 0,24$, $V_{\max} -6,67 \pm 0,41$ %) aufzuheben war. Die durch den NO-Donor SNP induzierte Vasorelaxation ($\log EC_{50} -7,72 \pm 0,08$, $V_{\max} 96,16 \pm 2,22$ %) konnte nicht durch L-NAME ($\log EC_{50} -7,86 \pm 0,05$, $V_{\max} 95,32 \pm 1,51$ %; $p = 0,99$) und Deendothelialisierung ($\log EC_{50} -7,54 \pm 0,11$, $V_{\max} 100,00 \pm 3,10$ %; $p = 0,85$) gehemmt werden.

An den thorakalen Aorten von C57Bl/6 Mäusen konnte eine dosisabhängige Vasorelaxation durch ACh ($\log EC_{50} -7,25 \pm 0,14$; $V_{\max} 82,15 \pm 2,95$ %, $p < 0,05$) induziert werden, die durch L-NAME ($\log EC_{50} -5,35 \pm 0,25$; $V_{\max} -8,46 \pm 0,93$ %, $p < 0,05$) und Deendothelialisierung ($\log EC_{50} -5,84 \pm 0,49$; $V_{\max} -9,52 \pm 1,64$ mN; $p < 0,05$) aufzuheben war. Die durch den NO-Donor SNP induzierte Vasorelaxation ($\log EC_{50} -8,01 \pm 0,06$; $V_{\max} 96,33 \pm 1,65$ %, $p < 0,05$) konnte nicht durch L-NAME ($\log EC_{50} -7,95 \pm 0,06$; $V_{\max} 96,17 \pm 1,62$ %, $p = 0,92$) und Deendothelialisierung ($\log EC_{50} -7,90 \pm 0,06$; $V_{\max} 97,43 \pm 1,64$ %, $p = 0,73$) beeinflusst werden.

An den thorakalen Aorten von S1P₃-defizienten Mäusen konnte eine dosisabhängige Vasorelaxation durch ACh ($\log EC_{50} -7,24 \pm 0,10$; $V_{\max} 82,97 \pm 2,23$ %) induziert werden, die durch L-NAME ($\log EC_{50} -5,38 \pm 0,25$; $V_{\max} -8,28 \pm 0,91$ %; $p < 0,05$) und Deendothelialisierung ($\log EC_{50} -5,70 \pm 0,38$; $V_{\max} -9,23 \pm 1,36$ %; $p < 0,05$) aufzuheben war. Die durch den NO-Donor SNP induzierte Vasorelaxation ($\log EC_{50} -8,05 \pm 0,05$; V_{\max}

97,34 ± 1,50 %) konnte nicht durch L-NAME (logEC50 -7,90 ± 0,05; V_{max} 96,84 ± 1,49 %; p = 0,38) und Deendothelialisierung (logEC50 -8,07 ± 0,06; V_{max} 96,99 ± 1,56 %; p = 0,86) inhibiert werden.

An den thorakalen Aorten von eNOS-defizienten Mäusen konnte keine dosisabhängige Vasorelaxation durch ACh (logEC50 -5,72 ± 0,18; V_{max} -12,27 ± 0,72 %) induziert werden, die durch L-NAME (logEC50 -5,39 ± 0,18; V_{max} -16,25 ± 0,97 %; p = 0,64) und Deendothelialisierung (logEC50 -5,94 ± 0,19; V_{max} -13,98 ± 0,83 %; p = 0,94) nicht beeinflussbar war. Die durch den NO-Donor SNP induzierte Vasorelaxation (logEC50 -8,04 ± 0,06; V_{max} 94,73 ± 1,64 %) konnte ebenfalls nicht durch L-NAME (logEC50 -8,05 ± 0,06; V_{max} 96,51 ± 1,64 %; p = 0,70) und Deendothelialisierung (logEC50 -8,19 ± 0,06; V_{max} 97,30 ± 1,57 %; p = 0,45) inhibiert werden.

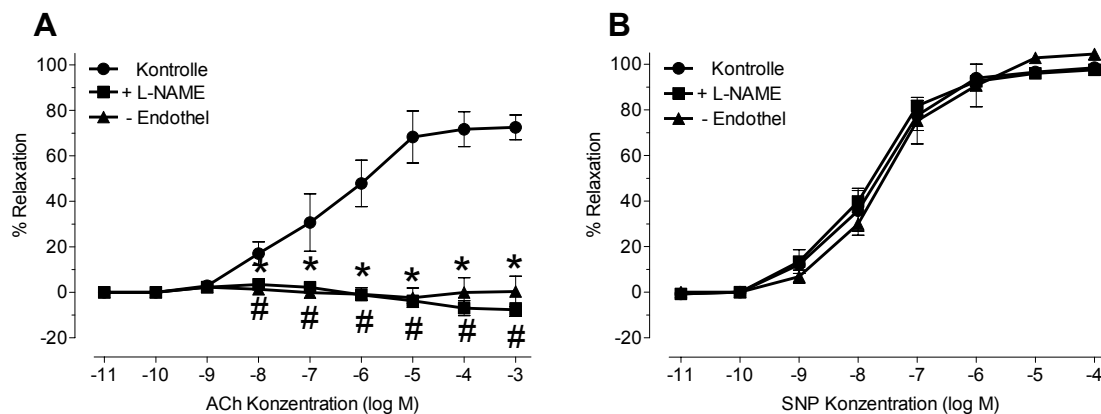


Abbildung 8: Dargestellt sind kumulative Dosis-Wirkungskurven von ACh und SNP an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Abgebildet ist eine repräsentative Originalabbildung von 6 unabhängigen (n ≥ 6) Versuchen am Kleingefäßmyographen. Der Umfang der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh und SNP in log M auf der Abszisse aufgetragen.

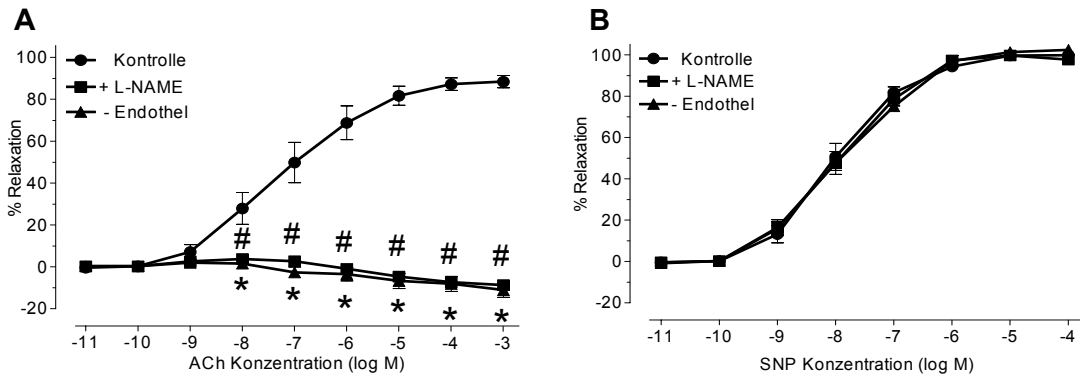


Abbildung 9: Dargestellt sind kumulative DWK von ACh und SNP an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von C57BL/6-Mäusen am Kleingefäßmyographen.

Abgebildet ist eine repräsentative Originalabbildung von 6 unabhängigen ($n \geq 6$) Versuchen am Kleingefäßmyographen. Das Ausmaß der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh und SNP in log M auf der Abszisse aufgetragen.

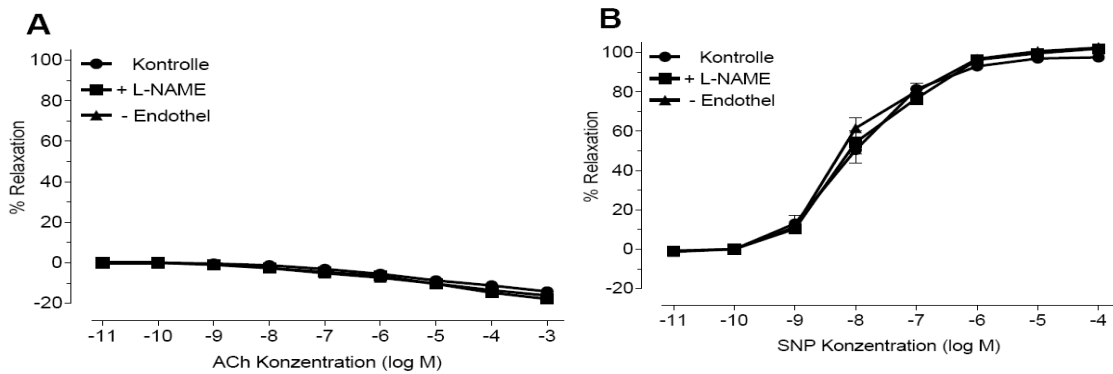


Abbildung 10: Dargestellt sind kumulative Dosiswirkungskurven von ACh und SNP an thorakalen Aortenringen von eNOS defizienten-Mäusen am Kleingefäßmyographen.

Abgebildet ist eine repräsentative Originalabbildung von mindestens 6 unabhängigen ($n \geq 6$) Versuchen am Kleingefäßmyographen. Der Umfang der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh und SNP in log M auf der Abszisse aufgetragen.

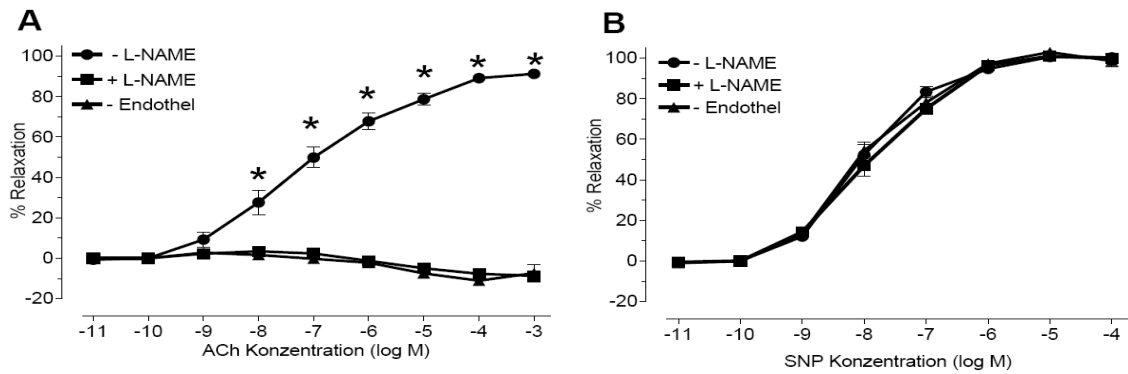


Abbildung 11: DWK von ACh und SNP an thorakalen Aortenringpräparaten von SIP_3 defizienten Mäusen am Kleingefäßmyographen.

Abgebildet ist eine repräsentative Originalabbildung von mindestens 6 unabhängigen ($n \geq 6$) Versuchen am Kleingefäßmyographen. Der Umfang der Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion ist auf der Ordinate gegen die jeweilige Konzentration von ACh und SNP in log M auf der Abszisse aufgetragen.

3.6. Wirkung einzelner HDL-Komponenten auf den Vasotonus von thorakalen Aortenringen von WKY-Ratte

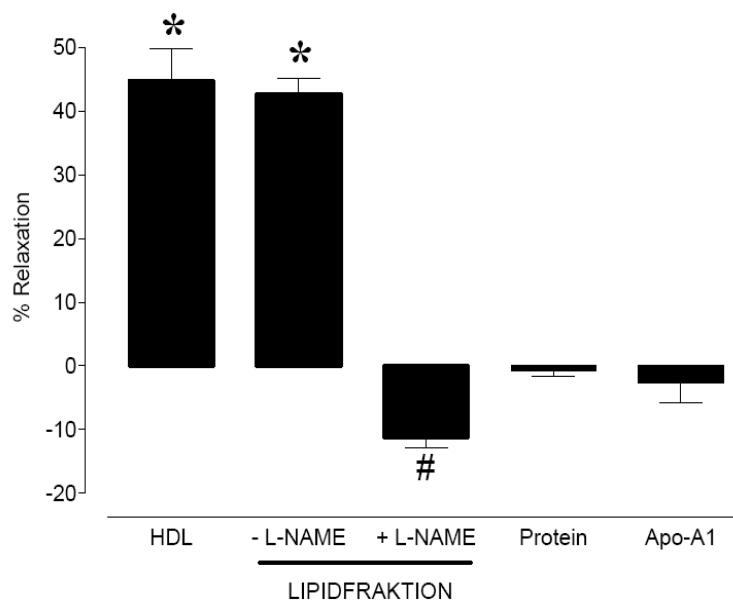


Abbildung 12: Wirkung der aufgereinigten Lipid- und Proteinfraction des HDL-Moleküls auf den Gefäßtonus thorakaler Aortenringe von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Zu erkennen ist, dass die Lipidfraction aus dem HDL-Komplex zu einer signifikanten Vasodilatation führt, die selektiv durch L-NAME (100 μ M) gehemmt werden kann. Die Proteinfraction und insbesondere das Apolipoprotein A-1 zeigen keinen Einfluss auf den Gefäßtonus. Jede Säule

repräsentiert den Mittelwert aus mindestens acht verschiedenen Experimenten ($n \geq 8$). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. * = $P < 0,01$ vs. Kontrolle, # $p < 0,01$ vs. Lipidfraktion.

Im nächsten Ansatz wurden die isolierten HDL-Moleküle in die beiden größten Unterfraktionen, die Protein- und die Lipidfraktion, aufgespalten und unabhängig von einander untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 wiedergegeben. Dabei konnte gezeigt werden, dass die isolierte Proteinfraction und insbesondere das mengenmäßig wichtigste Apolipoprotein A-1 aus 1mg HDL keine Beeinflussung der Vorkontraktion induziert. Die Lipidfraktion aus 1 mg HDL hingegen, induziert eine dem HDL vergleichbare Vasorelaxation, die durch die pharmakologische Inhibition der eNOS zu unterdrücken war.

3.7. Vasodilatation an PE vorkontahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten mittels SPC

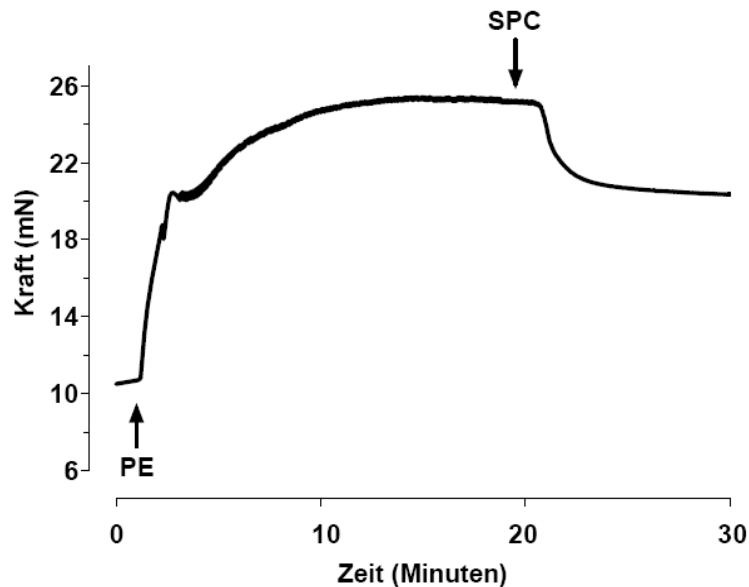


Abbildung 13: Dargestellt ist der Einfluss von SPC auf den Gefäßtonus von verschiedenen vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Abgebildet ist eine repräsentative Originalabbildung von mindestens 8 unabhängigen ($n \geq 8$) Versuchen am Kleingefäßmyographen. Die gemessene Kraft in mN ist auf der Ordinate gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen.

Im Anschluss wurde der Einfluss von SPC auf den Vasotonus von isolierten Aortenringen von WKY-Ratten untersucht. Nach einer Vorkontraktion durch PE in der Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ erfolgt eine Applikation von SPC in der Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$. Es konnte in diesen Versuchen eine signifikante, lang anhaltende Vasodilatation ausgelöst werden. Das Lysophospholipid SPC vermittelt eine signifikante Vasodilatation an PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten.

3.8. Dosisabhängige Wirkung von SPC auf thorakale Aortenringe von eNOS defizienten-Mäusen und C57BL/6-Mäusen

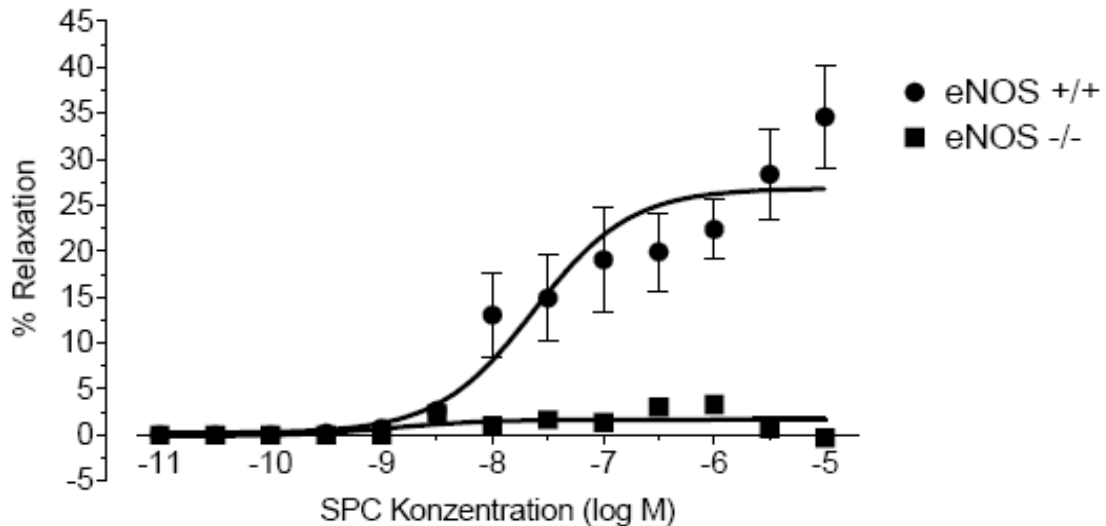


Abbildung 14: Dargestellt sind kumulative DWK des HDL-assoziierten Sphingolipids SPC an verschiedenen vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von eNOS defiziente-Mäusen und C57BL/6-Mäusen am Kleingefäßmyographen.

In Abgebildet 14 ist die DWK von SPC von mindestens 7 unabhängigen Versuchen an verschiedenen thorakalen Aortenringen ($n \geq 7$) von C57BL/6 und eNOS defizienten Mäusen wiedergegeben. Dabei wird deutlich, dass die vasodilatative Wirkung des SPC dosisabhängig ist ($EC_{50} -7,63 \pm 0,08$ M; $V_{max} 33,14 \pm 2,44$), und zum anderen von der Anwesenheit der endothelialen NO-Synthase abhängt. Bei eNOS suffizienten Mäusen kommt es zu einer signifikanten Vasodilatation, bei den eNOS defizienten Tieren wird dagegen keine relevante Vasodilatation erzielt. SPC besitzt keine vasodilatierende Wirkung bei eNOS defizienten Tieren.

3.9. Wirkung von SPC und ACh auf die Vasodilatation unter eNOS Inhibition durch L-NAME und chemischer Endothelentfernung von thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten

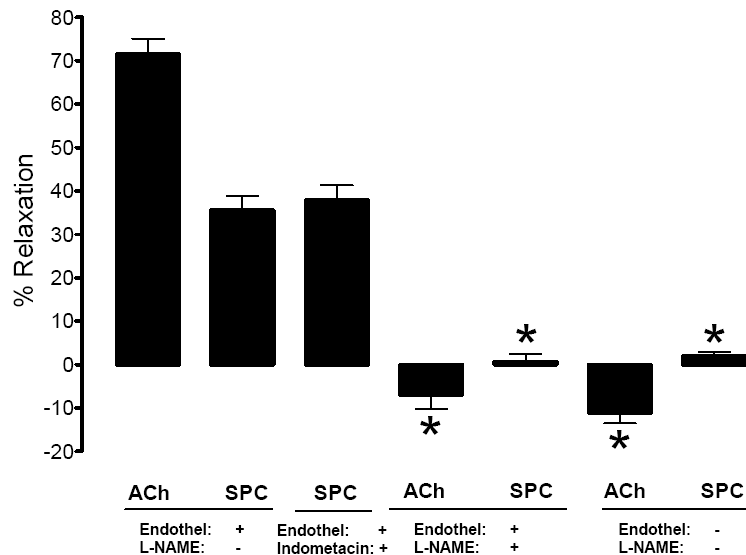


Abbildung 15: Wirkung von SPC auf thorakale Aorten von WKY-Ratten unter verschiedenen Bedingungen

Dargestellt sind die Wirkung des Lysophospholipids SPC sowie von ACh auf den Gefäßtonus von unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen mit und ohne Hemmung der eNOS durch L-NAME und mit und ohne chemischer Endothelentfernung.

Im nächsten Ansatz wurde zuerst ACh auf thorakale Aortenringe mit intaktem Endothel von C57BL/6 Mäusen appliziert, diese Aortenringe wurden nicht mit L-NAME vorbehandelt. Es kam zu einer signifikanten Vasorelaxation. Ebenfalls an unbehandelten Aortenringen mit intaktem Endothel wurde eine Applikation von SPC vorgenommen. Auch hier konnte eine signifikante Vasodilatation nachgewiesen werden. Um die Ursache der Vasorelaxation zu untersuchen wurde die Cyclooxygenase durch Indometacin und die eNOS durch L-NAME pharmakologisch inhibiert. Die Inhibition der Cyclooxygenase durch Indometacin hatte keinen Einfluss auf die SPC induzierte Vasorelaxation. Die Inhibition der eNOS durch L-NAME führte zu einer aufgehobenen Vasorelaxation durch ACh und SPC. Um die Abhängigkeit der SPC induzierten Vasorelaxation vom Endothel zu untersuchen, wurden die thorakalen Aorten von C57BL/6 Mäusen chemisch durch Saponin deendothelialisiert. Nach Deendothelialisierung konnte ebenfalls keine ACh oder SPC induzierte Vasorelaxation erkannt werden.

3.10. Die SPC induzierte Vasorelaxation verläuft über eine S1P₃-Rezeptor abhängigen Signaltransduktionsweg

Um die Frage nach dem vermittelnden Rezeptor zu beantworten, wurden Versuche am Kleingefäßmyographen an thorakalen Aortenringen von S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen durchgeführt. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse wiedergegeben. An thorakalen Aortenringen von C57BL/6 Mäusen induzierte SPC in einer Konzentration von 1 µmol/l eine signifikante Vasorelaxation. An thorakalen Aortenringen von S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen hingegen konnte durch SPC keine signifikante Veränderung der Vorkontraktion durch SPC induziert werden.

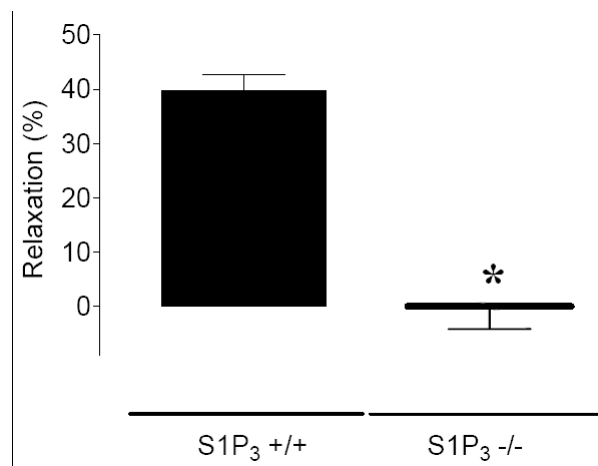


Abbildung 16: Wirkung von SPC auf die thorakalen Aortenringe von S1P₃-Rezeptor +/+ und S1P₃-Rezeptor -/- Mäusen am Kleingefäßmyographen.

3.13. Dosisabhängige Wirkung des Lysosphospholipids SPC an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten unter basalen Bedingungen

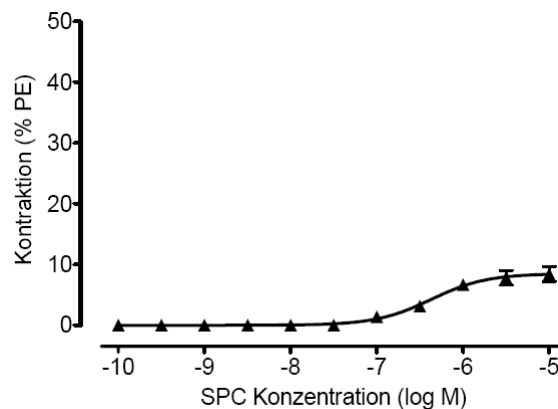


Abbildung 17: Dargestellt ist eine kumulative DWK der Wirkung des Lysosphospholipides SPC ohne Vorkontraktionsbedingungen an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten.

Um die Charakterisierung der Wirkung von SPC an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten vollständig zu erheben, wurden Untersuchungen unter basalen, nichtvorkontrahierten Bedingungen durchgeführt. Hier zeigt sich, dass SPC eine geringgradige, dosisabhängige Vasokonstriktion bewirkt. Diese Vasokonstriktion ist ebenfalls unter basalen Bedingungen bei S1P₃-Rezeptor defizienten Aorten messbar (Daten nicht dargestellt).