

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Interaktion von VLDL mit adrenergen Rezeptoren bei der
flussabhängigen Dilatation an Koronararterien des Menschen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Janna Lendner

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt in Deutsch und Englisch.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung.....	10
1.1. Die glatte Muskulatur der Gefäßwand.....	10
1.1.1. Elektromechanische Kopplung in der glatten Muskelzelle.....	10
1.1.2. Signaltransduktion in der glatten Muskelzelle.....	11
1.2. Regulation des Gefäßtonus.....	12
1.2.1. Flussabhängige Dilatation.....	12
1.2.2. Wirkung des Vegetativums auf den Gefäßtonus.....	13
1.2.3. Signaltransduktion über Adrenorezeptoren.....	14
1.2.4. Sonderfall Koronararterien.....	15
1.3. Lipoproteine.....	16
1.3.1. Very Low Density Lipoprotein.....	17
1.4. Zusammenhänge und Herleitung der Fragestellung.....	18
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1. Studiendesign.....	20
2.2. Präparation der Kononararterien.....	20
2.2.1. Entnahme.....	20
2.2.2. Aufbereitung und Äquibrierung.....	21
2.3. Lösungen und Substanzen.....	21
2.3.1. Krebslösung.....	21
2.3.2. Lipidlösungen.....	21
2.3.3. Blockeransätze.....	22
2.4. Messung der Kraftentwicklung.....	22
2.4.1. Messung des Gefäßtonus.....	23
2.4.2. Flussraten.....	23
2.4.3. Vorbereitung und Einspannen des Präparates.....	23
2.4.4. Versuchsdurchführung.....	23
2.5. Intrazelluläre Membranpotentialableitung.....	24
2.5.1. Mikroelektroden.....	24

Inhaltsverzeichnis

2.5.2. Einstich und Elektrodensitz.....	24
2.5.3. Versuchsdurchführung.....	25
2.6. Bestimmung der Konzentrationen der zyklischen Nukleotide.....	25
2.6.1. Gewebsaufschluss.....	26
2.6.2. Bestimmung der cAMP-Konzentration.....	26
2.6.3. Bestimmung der cGMP-Konzentration.....	27
2.6.4. Rechnerische Auswertung.....	27
2.7. Auswertung und statistische Analyse.....	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1. Kraft- und Potentialentwicklung.....	29
3.1.1. Krebslösung.....	29
3.1.2. Gepooltes VLDL.....	35
3.1.3. Auswirkung der adrenerge Blockade.....	40
3.2. Konzentrationen der zyklischen Nukleotide.....	43
3.2.1. Krebslösung.....	43
3.2.2. Gepooltes VLDL.....	43
3.2.3. Auswirkung der adrenergen Blockade.....	46
3.3. Betrachtung des Gesamtmodells.....	47
3.3.1. Elektromechanische Kopplung.....	47
3.3.2. Chemomechanische Kopplung.....	48
4. Diskussion.....	50
4.1. VLDL und flussabhängige Dilatation.....	50
4.1.1. Beeinflussung des Gefäßtonus und Membranspotentials durch VLDL.....	50
4.1.2. Beeinflussung der Konzentration der zyklischen Nukleotide durch VLDL..	51
4.2. Auswirkung der Antagonisierung von Adrenorezeptoren.....	53
4.2.1. Intrinsische Aktivität der Adrenorezeptor-Blocker.....	53
4.2.2. Kombinierte Blockade des α - und β -Adrenoezeptors.....	54
4.2.3. Blockade des α -Adrenorezeptors.....	55
4.2.4. Blockade des β -Adrenorezeptors.....	56
4.3. Betrachtung des Gesamtmodells.....	57
4.4. Limitationen.....	57

Inhaltsverzeichnis

Literaturverzeichnis.....	60
Eidesstattliche Versicherung.....	68
Lebenslauf.....	69
Publikationen.....	70
Danksagung.....	71

Abstrakt

Einleitung: Die Pathogenese von Arteriosklerose ist Gegenstand aktueller Forschung. Während die Auswirkungen von Lipoproteinen wie LDL und HDL gut untersucht sind, ist das Wissen über VLDL lückenhaft. Diese Arbeit untersucht den Einfluss physiologischer Konzentrationen von VLDL auf die flussabhängige Dilatation von Koronararterien des Menschen, und ob seine Wirkung zum Teil über eine Interaktion mit adrenergen Rezeptoren vermittelt wird.

Methodik: Die Entwicklung des Gefäßtonus von Präparaten 16 menschlicher Koronarien wurde unter steigenden Flussraten (3 – 100 mL/min) in einem induktiven Kraftaufnehmer registriert. Die Präparate wurden mit Krebs- bzw. VLDL-Lösung (30 mg/dL) ohne Blocker, mit α -Blocker (Phentolamin, 10^{-4} mmol/L), β -Blocker (Propranolol, 10^{-4} mmol/L) bzw. beiden Blockern umspült. Analog zur Kraftmessung wurden Membranpotentiale intrazellulär abgeleitet, und die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP bestimmt.

Ergebnisse: In Krebslösung zeigten sich durch Zugabe der Blockersubstanzen keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung von Kraft und Potential, so dass ein intrinsischer Effekt der Blockersubstanzen ausgeschlossen werden konnte. Der Gefäßtonus unter Krebslösung reduzierte sich flussabhängig um im Mittel 432 mg, in VLDL-Lösung nur um 366 mg. Das entspricht einer Reduktion der Nettorelaxation um 15,3%. Setzt man die Differenz zwischen Krebs und VLDL gleich 100%, zeigte sich unter gleichzeitiger Blockade von α - und β -Rezeptoren eine Einschränkung der gesamten VLDL-Wirkung von im Mittel $65 \pm 6\%$. Dieses Ergebnis zeigt, dass mehr als die Hälfte der vasokonstriktorisches VLDL-Wirkung über eine Interaktion mit adrenergen Rezeptoren zustande kommt. Die Zugabe eines α -Blockers zeigte eine ähnlich große Wirkung auf die gesamte VLDL-Wirkung wie eine kombinierte α/β -Blockade (ca. $67 \pm 11\%$). Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Großteil der vasokonstriktorisches Wirkung von VLDL vermutlich auf eine Stimulation von α -Rezeptoren zurückzuführen ist. Unter β -Blockade zeigte sich eine Reduktion der gesamten VLDL-Wirkung um ca. $49 \pm 8\%$. Sie ließe sich mit einer Inhibition von β -Rezeptoren durch VLDL erklären. Die Ergebnisse spiegelten sich in der Potentialentwicklung und der Konzentration der zyklischen Nukleotide wider.

Schlussfolgerung: Der genaue Mechanismus, über den VLDL die flussabhängige Dilatation herabsetzt, ist noch unbekannt. Möglicherweise kann VLDL ähnlich wie LDL an den Flussensor binden und diesen für eine Signaltransduktion teilweise blockieren. Andererseits

legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass ein Großteil der vasokonstriktiven VLDL-Wirkung zudem über eine Interaktion mit sympathischen Adrenorezeptoren zustande kommt (bis zu 65%). Wir konnten somit zum ersten Mal zeigen, dass Blutfette in die Blutdruckregulation eingreifen und den Gefäßtonus über eine Interaktion mit sympathischen Rezeptoren beeinflussen können. Diese Erkenntnis eröffnet neue Perspektiven auf die Behandlung sowohl von Hypertonie als auch Hyperlipidämie.

Abstract

Introduction: The pathogenesis of arteriosclerosis is an important topic of current research. The influence of LDL and HDL is well established, but so far the impact of VLDL has not been thoroughly researched. Therefore, we investigated the influence of physiological concentrations of VLDL on flow-dependent dilatation without and with α - and β -blockers to see if VLDL has an effect on the vascular tone of human coronary arteries and whether it is partly due to an interaction with the α - and/or β -adrenergic receptor.

Methods: For this study we used 98 vascular strips of 16 human coronaries from heart transplantations. Isometric tension was recorded with increasing flow rates (3 to 100 mL/min) of Krebs solution with or without VLDL (30 mg/dL) in the presence of α -blocker (phentolamine 10^{-7} mol/L), β -blocker (propranolol 10^{-7} mol/L) or both blockers. Intracellularly recorded membrane potential and the concentration of cAMP/ cGMP were also measured in these segments.

Results: The tension, membrane potential and concentration of cyclic nucleotides showed no significant differences between Krebs solution with or without blockers. Therefore, an intrinsic effect of the blocker substances could be ruled out. Flow-dependent relaxation of 0.432 g in Krebs solution was reduced under VLDL by 15.3% to 0.366 g. Setting the difference between Krebs and VLDL equal to 100%, leads to an average change in difference of $64.7 \pm 6\%$ under α/β -blockers. Corresponding experiments with blockade of the α -receptor alone resulted in a comparable reduction of $67.6 \pm 11\%$ whereas the blockade of β -receptors alone reduced the VLDL effect by $49 \pm 8\%$. This effect was mirrored in the development of the corresponding membrane potentials and the concentration of the cyclic nucleotides.

Abstrakt

Conclusion: VLDL leads to a 15.3% reduced flow-dependent relaxation of human coronaries. The exact mechanism has to be subject of further research. It is possible that VLDL binds to the endothelial flow sensor like LDL and blocks the signal pathway. The results of this study imply that a significant part of the flow-dependent constricting VLDL-effect (up to 65%) is due to a direct VLDL stimulation of the α -adrenergic receptor and/or inhibition of the β -adrenergic receptor. Herewith, we prove for the first time that blood lipoproteins exert their influence on arterial vascular tone also via a direct interaction with the autonomic nervous system. This unveiling could help in navigating the treatment options of both hypertension and hypercholesterolemia.

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
ApoB100	Apolipoprotein B100
ApoCI	Apolipoprotein CI
ApoCII	Apolipoprotein CII
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	ionisiertes Calcium
Ca-CAM	Ca ²⁺ - Calmodulin - Complex
cAMP	zyklisches Adenosin 3', 5' – monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin 3', 5' – monophosphat
CICR	calcium-induced calcium release
Cl ⁻	ionisiertes Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	1,2-Diacylglycerin
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EIA	Enzymimmunoassay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
FFS	freie Fettsäuren
G-Protein	Guanylnucleotid-Protein
G ₀	G-Protein, das mit Ionenkanälen interagiert
G _i	G-Protein, das die Adenylatzyklase inhibiert
G _q	G-Protein, das die PLC aktiviert
G _s	G-Proteine, das die Adenylatzyklase stimuliert
GTP	Guanosintriphosphat
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HDL	high density lipoprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ PO ₄ ⁻	Dihydrogenphosphat

Abkürzungsverzeichnis

IDL	intermediate density lipoprotein
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K ⁺	ionisiertes Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acetyltransferase
LDL	low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
Mg ²⁺	ionisiertes Magnesium
MLCK	Myosin-Light-Chain-Kinase
MLCP	Myosin-Light-Chain-Phosphatase
Na ⁺	ionisiertes Natrium
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthetase
NSB	nichtspezifische Bindung (ELISA)
O ₂	Sauerstoff
PGI ₂	Prostazyklin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK-A	Proteinkinase A
PK-C	Proteinkinase C
PK-G	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
SEM	standard error of the mean
TAG	Triacylglycerin
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
VLDL	very low density lipoprotein

1. Einleitung

Das kardiovaskuläre System entwickelt sich bereits in der dritten Entwicklungswoche des Embryos, wenn eine Diffusion nicht mehr zu seiner Ernährung ausreicht [87]. Es dient der Homöostase, d.h. einerseits dem Transport von lebenswichtigen Substanzen und andererseits dem Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Von nun an ist die Durchblutung Voraussetzung für Wachstum und Überleben der Zellverbände und wird vom wachsenden Organismus genauestens reguliert. Laut dem Ohm'schen Gesetz ist die Durchblutung der Quotient aus Perfusionsdruck und Strömungswiderstand; letzterer wiederum hängt nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille ganz entscheidend vom Gefäßradius ab, der in seiner vierten Potenz ins Gewicht fällt [87, 91].

Der Durchmesser des Gefäßes wird vom Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen bestimmt, der Angriffspunkt für verschiedenste Regulationsmechanismen ist.

1.1. Die glatte Muskulatur der Gefäßwand

Die Eigenschaften von glatter Muskulatur unterscheiden sich von denen der quergestreiften Muskulatur. Die kontraktile Filamente, im glatten Muskel vor allem Isoformen von F-Aktin-Tropomyosin und Myosin-II, sind zu einem losen Kontraktionsapparat in Längsrichtung der Zelle angeordnet und verbinden über Intermediärfilamente und Anheftungsplaques die glatten Muskelzellen untereinander mechanisch. Zusätzlich sind sie über *gap junctions*, stets offenen Ionenkanälen, elektrisch miteinander verbunden und bilden ein sogenanntes funktionelles Synzytium [87, 91].

1.1.1. Elektromechanische Kopplung in der glatten Muskelzelle

Für die glatte Muskulatur der Gefäßwand gilt wie auch für die Skelettmuskulatur, dass eine Depolarisation der Membranen zu einer Kontraktion führt und eine Hyperpolarisation gleichbedeutend mit einer Relaxation ist (elektromechanische Kopplung).

Die Kraft-Potential-Kurve nimmt einen sigmoiden Verlauf, wobei 80 % der möglichen Kraftentwicklung in einem Potentialbereich zwischen -60 und -20 mV stattfindet [65, 87]. Das Ruhepotential liegt um -48 mV im Bereich des linearen Kurvenverlaufs. Die Muskelzellen der Widerstandsgefäße sind also normalerweise bereits in einem leicht depolarisierten Zustand und sorgen für einen Ruhetonus der Gefäße [41, 65].

Während das Ruhepotential überwiegend über den Ein- und Ausfluss von Kaliumionen (K^+) reguliert ist, hängt eine Depolarisation vor allem von dem Öffnungszustand

Einleitung

spannungsabhängiger Calcium (Ca^{2+})-Kanäle ab [41, 65]. Die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle zeigt eine exponentielle Beziehung zum Membranpotential – schon eine Depolarisation um 2-3 mV im sensiblen Bereich führt zu einer stark erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der Ca^{2+} -Kanäle und resultiert in einer Steigerung des Gefäßtonus um 50 % [87]. Da wiederum eine Änderung des Radius nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz den größten Einfluss auf den Fluss hat, verursachen bereits kleine Änderungen desselben eine große Veränderung im Durchfluss und damit letztendlich am systemischen Blutdruck [91].

1.1.2. Signaltransduktion in der glatten Muskelzelle

Zu einer Steigerung des Gefäßtonus führen Vorgänge, die in einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} über eine Konzentration von 10^{-6} mol/L resultieren [91]. Eine Depolarisation führt zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und dem Einstrom der Kationen in die Zelle [32, 65]. Ca^{2+} unterscheidet sich in seiner Wirkung auf die Zelle von anderen Kationen wie Na^+ oder K^+ . Neben seiner direkten Wirkung auf das Membranpotential, dient es selbst als *second messenger* für weitere Reaktionen.

Intrazellulär werden vier Ca^{2+} -Ionen an Calmodulin gebunden. Dieser Calcium-Calmodulin-Komplex (Ca-CAM) führt über zwei unterschiedliche Wege zu einer Förderung der Kontraktion: Einerseits führt er zur Aktivierung von Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), die Myosin an einer regulatorischen Kette phosphoryliert und es damit auf eine Interaktion mit Aktin vorbereitet [93]. Andererseits bindet Ca-CAM an Caldesmon, das sich daraufhin vom Aktin-Tropomyosin-Komplex löst und ihn für die Reaktion freigibt [67]. Sind beide Voraussetzungen erfüllt, kann eine Interaktion von Aktin und Myosin erfolgen, welche zu einer Verkürzung der Sarkomere und damit zu einer Kontraktion der Zelle führt. Dieser Zyklus besteht aus einer Bindung, Rotation und Lösung des Myosinköpfchens vom Aktin und benötigt ein Molekül Adenosintriphosphat (ATP) pro Zyklus [87].

Während der Relaxation werden zyttoplasmatische Ca^{2+} -Ionen passiv über einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder aktiv über eine ATPase nach extrazellulär transportiert und – soweit vorhanden – in das rudimentäre sarkoplasmatische Retikulum gepumpt. Sinkt das Ca^{2+} unter eine Konzentration von 10^{-6} mol/l, verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen MLCK und der stets aktiven Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP), die Myosin an der regulatorischen Kette dephosphoryliert und damit inaktiviert. Das Absinken der Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Aufhebung der Inhibition von Caldesmon, das wieder an den Aktin-Tropomyosin-Komplex bindet [87,91].

Einleitung

Zusätzlich führt Ca^{2+} zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit von Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanälen, woraufhin mehr K^{+} aus der Zelle ausströmt und das Membranpotential re- oder hyperpolarisiert [12, 87].

1.2. Regulation des Gefäßtonus

Durch ein feines Gleichgewicht zwischen Vasokonstriktion und -dilatation wird die Durchblutung an den Bedarf angepasst und ein Schaden der Gefäßwand z.B. durch zu hohe mechanische Beanspruchung vermieden. Zahlreiche metabolische, mechanische oder neurohumorale Faktoren haben einen Einfluss auf den lokalen Gefäßtonus. Das Gefäßendothel nimmt eine zentrale Stellung in der Registrierung dieser Reize wahr und leitet Signale an die glatten Muskelzellen weiter [52].

Für die Verarbeitung von neurohumoralen und lokal metabolischen Reizen besitzt das Endothel zahlreiche membranständige Rezeptoren z.B. für Katecholamine, Acetylcholin, Bradykinin, ATP oder Adenosin. Ihre Bindung löst intrazelluläre Signalkaskaden aus und kann so letztendlich den Kontraktionszustand der Muskelzellen beeinflussen. Weiterhin synthetisieren die Endothelzellen selbst verschiedene vasoaktive Autohormone wie z.B. Endothelin-1(ET-1), endothelium-derived-hyperpolarizing-factor (EDHF), Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandin I_2 (PGI_2) [19, 87, 91]. Beim EDHF ist nachwievor unklar, ob es sich um ein chemisches Molekül oder einen durch gap-junctions fortgeleiteten Ionenstrom handelt [18, 53].

Hämodynamische Reize können direkt am Endothel angreifen und den Gefäßtonus beeinflussen. Neben dem intravasalen Druck auf die Gefäßwand sind hier vor allem die durch Fluss hervorgerufenen tangentialen Scherkräfte von Bedeutung. Bayliss beschrieb bereits 1902 das Phänomen einer Gefäßkonstriktion durch Wanddehnung (nach ihm heute auch Bayliss-Effekt genannt), das vor allem in Gefäßen des Magen-Darm-Trakts, der Niere und des Gehirns eine Rolle spielt [8, 11, 40]. 1932 entdeckten Schretzenmayr et al. an der menschlichen Femoralarterie eine mit zunehmender Flussrate auftretende Dilatation [82]. Furchgott et al. postulierten daraufhin einen für die flussabhängige Dilatation verantwortlichen endothelium-derived relaxing factor (EDRF) [38], der später als Stickstoffmonoxid identifiziert wurde [46, 70].

1.2.1. Flussabhängige Dilatation

Vorbeifließende Flüssigkeit übt tangentiale Scherkräfte auf das Gefäßendothel aus, den sog. *shear stress*, der mit einer flussabhängigen Dilatation einhergeht [16, 17, 52, 63, 75]. Dieser ist umso größer, je stärker der Fluss und je höher die Viskosität der vorbeiströmenden Flüssigkeit

Einleitung

ist. Die flussabhängige Dilatation sorgt für eine gute Versorgung der stromabwärtsliegenden Gewebe und schützt das Endothel vor mechanischen Schäden [25, 44]. Zudem kann *shear stress* in die Genregulation eingreifen und so z.B. die Zellproliferation der Endothelzellen beeinflussen [27, 35, 45, 55].

Während die myogene Autoregulation durch Druck kein Endothel benötigt, spielt seine Intaktheit für die flussvermittelte Relaxation eine große Rolle [52, 75, 76]. Bevan, Joyce und Wellmann zeigten 1988, dass auch die Media in die flussabhängige Dilatation involviert ist, denn auch nach Entfernen des Endothels erfolgte eine Relaxation um ca. 30% [10]. Für die Messung des Flusses werden Proteoglykane und saure Glykoproteine verantwortlich gemacht, die in den Membranen der Endothel- und Muskelzellen sowie der Extrazellulärmatrix verankert sind. Der Fluss ändert die Konformation dieser Makromoleküle mechanisch so, dass sie Na^+ binden und über eine elektrische Transduktion zu einem Einstrom von Ca^{2+} führen [88]. Vier Ca^{2+} -Moleküle binden an CAM und aktivieren die endotheliale Stickstoffsynthase (eNOS) [13]. Diese stellt aus der Aminosäure L-Arginin unter Zuhilfenahme von Sauerstoff (O_2) und Nikotinamid-adenin dinucleotidphosphat (NADPH) ein flüchtiges Stickstoffradikal (NO) her. Dabei entsteht Citrullin als Abfallprodukt. NO diffundiert aus dem Endothel in die benachbarten glatten Muskelzellen und aktiviert dort die Guanylatzyklase, die Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt [78, 91]. Dieses wiederum aktiviert die Proteinkinase G (PK-G), die über drei Wege zu einer Dilatation des Gefäßes führt: Sie fördert Ca^{2+} -ATPasen (Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration), hemmt spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und stimuliert K^+ -Kanäle (Hyperpolarisation) [19, 34, 87]. cGMP wird anschließend von Phosphodiesterasen abgebaut.

Die Wirkung von Wanddehnung und Scherkräften ergeben gemeinsam die Antwort des Gefäßmuskels, die wiederum von vielen Faktoren wie Stoffwechselprodukten oder Transmittern in Richtung Konstriktion oder Dilatation beeinflusst wird. Da der Fluss selbst die Konzentration dieser Stoffe vor Ort beeinflusst, kann er als primärer Regulator des Gefäßtonus angesehen werden [87].

1.2.2. Wirkung des Vegetativums auf den Gefäßtonus

Für die Regulation des Gefäßtonus spielen vor allem zwei Katecholamine eine Rolle: Adrenalin gelangt aus dem Nebennierenmark über den Blutstrom an seinen Zielort, während Noradrenalin aus postganglionären sympathischen Nervenendigungen direkt am Wirkungsort freigesetzt wird. Beide Katecholamine binden an alle Typen adrenerger Rezeptoren. Ihre Wirkung hängt einerseits von der Anzahl und dem Verteilungsmuster der Rezeptoren vor Ort ab und

andererseits von der Konzentration und Affinität der Katecholamine zu den jeweiligen Rezeptoren [62, 87, 91].

Den größten Einfluss auf den systemischen Blutdruck haben die kleinen Arterien und Arteriolen in der Peripherie, auch Widerstandsgefäße genannt [87, 91]. Hier wird der Gefäßtonus praktisch nur über den Sympathikus und damit Noradrenalin reguliert. Eine Ausschüttung des Transmitters aus den Nervenendigungen führt über α_1 -Rezeptoren zu einer Konstriktion, ein Nachlassen des Sympathikotonus zu einer relativen Dilatation [91]. Während postsynaptische α_2 -Rezeptoren ebenfalls eine Vasokonstriktion besonders in kleinen peripheren Gefäßen zur Folge haben [48, 49], hemmen präsynaptische α_2 -Rezeptoren die Ausschüttung von Noradrenalin und damit seine konstringierende Wirkung auf die Gefäße [3, 62, 87].

1.2.3. Signaltransduktion über Adrenorezeptoren

Die Katecholamine können über insgesamt vier Typen von Rezeptoren ihre Wirkungen entfalten. Dabei handelt es sich um α_1 -, α_2 -, β_1 - und β_2 -Adrenorezeptoren, die an Guanylnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine) gekoppelt sind [54]. Die G-Proteine kommen in verschiedenen Varianten vor und können entweder eine Adenylatzyklase stimulieren oder inhibieren (G_s bzw. G_i), eine Phospholipase C (PLC) aktivieren (G_q) oder auch direkt mit Ionenkanälen interagieren (G_0) [54, 91].

Die beiden α -Adrenorezeptoren unterscheiden sich in ihrem Signaltransduktionsweg. Der α_1 -Rezeptor ist an ein G_q -Protein gekoppelt. Dieses G-Protein aktiviert die PLC, die aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) die second messengers Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) herstellt. IP_3 ist hydrophil und diffundiert ins Innere der Zelle, wo es an Ca^{2+} -Kanäle an internen Calciumspeichern bindet und diese in einen offenen Zustand überführt. Das einströmende Ca^{2+} löst selbst nun einen weiteren Ausstrom von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR)-Kanäle aus und verstärkt das zelluläre Signal [12]. DAG verbleibt auf Grund seiner Lipophilie in der Zellmembran und wird dort einerseits durch Lipasen gespalten und zur Produktion von Eikosanoiden verwendet [54] oder es aktiviert andererseits die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C (PK-C), die spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle phosphoryliert und damit ihre Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht [79]. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} führt in den Bronchien und Blutgefäßen zu einer Kontraktion [91]. Andererseits aktiviert der Rezeptor über G_q in anderen Zellen auch Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle, die zur einer Hyperpolarisation und damit einer Relaxation, z.B. von der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Trakts, führt [91].

Einleitung

Der α_2 -Rezeptor führt über ein G_i -Protein zu einer Senkung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Die Wirkung hängt von der Zielzelle ab. Während die erniedrigte Konzentration von cAMP bei postsynaptischen Rezeptoren in kleinen peripheren Gefäßen zu einer Vasokonstriktion führt [71], zeigt sich bei präsynaptischen α_2 -Rezeptoren eine verminderte Ausschüttung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen [48, 49, 87]. Dort hemmt die α -Untereinheit des G_i -Protein die Adenylatzyklase, während die β, γ -Untereinheiten spannungsabhängige K^+ -Kanäle sensitivieren und die Wahrscheinlichkeit für eine Hyperpolarisation erhöhen [54, 91]. Zusätzlich kann α_2 auch über ein G_0 -Protein spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle direkt hemmen und so in verschiedenen endokrinen Geweben und Speicheldrüsen die Exkretion vermindern [91].

Sowohl β_1 - als auch β_2 -Adrenorezeptoren sind an ein G_s -Protein gekoppelt und erhöhen damit die intrazelluläre cAMP-Konzentration [54]. β_1 -Rezeptoren finden sich vor allem am Herzmuskel, wo sie zu einer Öffnung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und zu einer erhöhten Empfindlichkeit der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle führen [91]. β_2 -Rezeptoren können über mehrere Mechanismen zu einer cAMP-vermittelten Relaxation von Gefäßen und Bronchien beitragen [19, 91]. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PK-A), die verschiedene Proteine phosphoryliert und sie in ihrer Aktivität beeinflusst. Die Phosphorylierung stimuliert Ca^{2+} -ATPasen (sowohl in der Zellmembran als auch in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums), die das intrazelluläre Ca^{2+} reduzieren; sie vermindert die Enzymaktivität der MLCK, inhibiert die Öffnung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle und fördert die der K^+ -Kanäle [12, 87].

1.2.4. Sonderfall Koronararterien

Die O_2 -Ausschöpfung des Koronarbluts durch den Herzmuskel beträgt in Ruhe bereits ca. 60 %, sodass ein erhöhter Sauerstoffbedarf durch eine Dilatation der Konorargefäße gedeckt werden muss, die sog. Koronarreserve [91]. Diese Regulation des Blutflusses geht wie in allen Blutgefäßen neben metabolisch- und endothel-vermittelten Faktoren auch auf die Wirkung von Katecholaminen zurück. Auch hier gilt allgemein, dass α -Rezeptoren eine Vasokonstriktion und β -Rezeptoren eine Vasodilatation bedingen. Während sich die beiden Typen des α -Rezeptors in praktisch allen Gefäßen des Körpers finden, beschränken sich die Rezeptoren des β_2 -Subtyps vor allem auf die Herzkranzgefäße und die Gefäße des Skelettmuskels, wo sie in ungefähr gleicher Anzahl wie die α -Rezeptoren vorkommen [87]. Die Typen des α -Rezeptors sind zudem ungleichmäßig auf den glatten Muskelzellen im Koronarsystem verteilt: α_1 -Rezeptoren

Einleitung

dominieren in größeren Gefäßen; α_2 -Rezeptoren finden sich überwiegend in der Mikrozirkulation [20].

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die α -Rezeptoren in Ruhe einen vernachlässigbaren Einfluss auf den Gefäßtonus der Herzkranzgefäße *in vivo* haben [42, 47]. Hodgson et al. fanden bei gesunden und herztransplantierten Patienten keine relevanten Änderungen des koronaren Blutflusses unter einer α -Blockade mit Phentolamin; auch konnte diese die relaxierende Wirkung von Papaverin nicht vermindern [42]. Eine lokale Infusion mit dem α_1 -Agonisten Methoxamine, wie Baumgart et al. zeigten, hatte nur geringe Auswirkungen auf den koronaren Blutfluss [7]. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation mit α_2 -Agonisten zu einer signifikanten Änderung, so dass von einem Einfluss der α_2 -Rezeptoren bei der sympathischen Aktivierung ausgegangen werden kann [5, 7, 47].

Von den β -Rezeptoren sind alle drei Subtypen vertreten, deren Dichte sich mit abnehmender Größe des Gefäßes steigert. So sind in den Arteriolen im Vergleich zu mittelgroßen Gefäßen fünfmal so viele, im Vergleich zur linken Koronararterie sogar 34-mal so viele β -Rezeptoren vorhanden, von denen die meisten (ca. 85%) β_2 -Rezeptoren sind [5]. β_1 und β_2 finden sich sowohl auf der glatten Muskulatur als auch auf den Endothelzellen; diese Verteilung bringt mit sich, dass auch nach der experimentellen Entfernung des Endothels eine Vasodilatation über β_2 möglich ist [5]. Nach neueren Erkenntnissen sind auch β_3 -Rezeptoren auf dem Endothel vorhanden; sie bewirken eine NO-vermittelte Hyperpolarisation [26].

Für die β -Rezeptoren beobachteten Hodgson et al. eine Zunahme des Gefäßwiderstands nach Blockade von 10-15%. Da die epikardialen Gefäße nahezu unbeeinträchtigt von der Blockade blieben, führten sie den Effekt auf einen verminderten β_2 -Ruhetonus in den kleinen kardialen Widerstandsgefäßen zurück [5, 42]. Diese Theorie wird von der Studie von Barbato et al. unterstützt, in der die intrakoronare Gabe des β_2 -Agonisten Salbutamol eine signifikante Zunahme des Blutflusses bewirkte, vor allem durch eine Dilatation der Gefäße in der Mikrozirkulation [4].

Die Anzahl der Rezeptoren ist nicht immer gleich; vielmehr ist auch sie ein Angriffspunkt für Regulation. Für den Kliniker spielt insbesondere die vermehrte Expression von β_2 -Rezeptoren unter einer Therapie mit Betablockern, Steroiden oder Schilddrüsenhormonen eine Rolle [23].

1.3. Lipoproteine

Lipoproteine dienen dem Körper zum Transport von hydrophoben Lipiden in den Körperflüssigkeiten. Um eine Lösung in Blut oder Lymphe zu erreichen, sind sie mit einer Hülle aus amphiphilen Phospholipiden und Cholesterin ausgestattet. Sie enthalten Triacylglyceride und

Einleitung

Cholesterinester in unterschiedlicher Zusammensetzung und variieren in Größe, Dichte und ihren Apolipoproteinen. Diese sind Angriffsort für Rezeptoren und Enzyme und geben den Lipoproteinen ihre Struktur [91].

Bei der Resorption von Triacylglyceriden (TAG) werden diese in Chylomikronen, den größten Lipoproteinen, verpackt. Das randständige Apolipoprotein CII (ApoCII) aktiviert die Lipoproteinlipase (LPL) des Endothels und führt nach Spaltung der TAG in freie Fettsäuren (FFS) zu deren Aufnahme ins Gewebe. Dort werden sie über β -Oxidation in den Mitochondrien zur Energiegewinnung herangezogen oder erneut als TAG gespeichert. Die Reste der Chylomikronen (sog. Chylomikronen-remnants) werden über Apolipoprotein E (ApoE)-Rezeptoren in der Leber endozytiert und abgebaut [91].

Diese restlichen TAG, Cholesterin und Cholesterinester werden in den Hepatozyten gemeinsam mit neu synthetisierten TAG und Cholesterin zu einem neuen Lipoprotein, dem Very Low Density Lipoprotein (VLDL), zusammgebaut und erneut in die Peripherie geschickt. Dort aktivieren sie genau wie die Chylomikronen über ApoCII die LPL und geben FFS ab. Das ApoCII geht dabei verloren und ApoE wird exprimiert. Das dabei entstandene Lipoprotein wird Intermediate Density Lipoprotein (IDL) genannt und kehrt in der Hälfte der Fälle in die Leber zurück, um dort erneut mit Fetten beladen zu werden und als VLDL exportiert zu werden. Die andere Hälfte wird über eine leberständige Lipase in Low Density Lipoprotein (LDL) umgewandelt. Dieses LDL enthält vor allem Cholesterin und wird über sein neu hinzugefügtes Apolipoprotein B100 (ApoB100) über den LDL-Rezeptor in die Hepatozyten aufgenommen und zum größten Teil abgebaut. Etwa ein Drittel gelangt jedoch erneut in die Peripherie und wird dort über LDL-Rezeptoren endozytiert [91].

High Density Lipoprotein (HDL) stellt den Rücktransport von überflüssigem Cholesterin aus der Peripherie in die Leber sicher. Unterwegs aktiviert HDL im Plasma über Apolipoprotein CI (ApoCI) die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), die das Cholesterin zum Teil acetyliert. Es wird in der Leber und steroidhormonproduzierenden Zellen über HDL-Rezeptoren aufgenommen [91].

1.3.1. Very Low Density Lipoprotein

VLDL hat eine Dichte von $<1,006$ g/mL, eine Größe von ca. 50 nm und setzt sich zu 55 % aus TAG zusammen. Phospholipide stellen mit 18 % die nächstgrößere Gruppe dar, gefolgt von Cholesterin-Estern (12 %), Proteinen (8 %) und Cholesterin (7 %). Es enthält als Apolipoproteine B100, CII, CIII und E [91].

Takahashi et al. entdeckten 1992 einen spezifischen VLDL-Rezeptor, der im Aufbau dem LDL-Rezeptor ähnlich war [96]. Oka et al. konnten hohe Konzentrationen der mRNA dieses Rezeptors in Muskelzellen und im Herzen nachweisen. Auch andere Gewebe wie Gehirn, Nieren, Hoden, Ovarien und Adipozyten exprimieren den VLDL-Rezeptor, während er in Leber und Darm praktisch nicht vorkommt [69]. VLDL bindet über ApoE an diesen Rezeptor und wird endozytiert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Rezeptor neben der LPL eine Rolle in Zellen spielt, die Fett speichern oder verstoffwechseln [103].

VLDL und andere Lipoproteine können zusätzlich zu ihren spezifischen Rezeptoren an Heparansulfat-Proteoglykane binden [58]. Die Bindung an die polyanionischen Proteoglykane geschieht über positiv geladene Aminosäurereste der Apolipoproteine [89].

1.4. Zusammenhänge und Herleitung der Fragestellung

Die flussabhängige Dilatation ist seit vielen Jahren der Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchung. Ihre Beeinträchtigung insbesondere in Koronararterien durch Arteriosklerose wurde sowohl in unserer eigenen Arbeitsgruppe als auch in anderen Studien gezeigt [15, 24, 63, 86]. Sie zeigt sich bereits in angiographisch normalen Herzkranzgefäßen beim bloßen Vorhandensein von Risikofaktoren für eine endotheliale Dysfunktion wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie und Rauchen [36, 83, 105]. Die Hinweise aus klinischen Studien, dass Hypertriglyceridämie einen unabhängigen Risikofaktor darstellt, verdichten sich zunehmend. Triglyceride werden im menschlichen Körper überwiegend über Chylomikronen und VLDL transportiert. Lewis et al. konnten zeigen, dass hohe Konzentrationen von TAG auch in Patienten mit normalen Plasmacholesterolspiegeln die Acetylcholin-vermittelte Vasorelaxation einschränken [56] und längerfristig über eine dauerhafte Störung der Endothelfunktion zu Arteriosklerose führen [72, 73]. Der Mechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Patch et al. führen diesen Effekt auf einen Einbau von HDL in TAG-reiche Lipoproteine und die damit einhergehende Reduktion des antiatherogenen HDL zurück [72]. Andere Studien wiesen nach, dass Chylomikronen- und VLDL-remnants die endothelabhängige Vasodilatation vermindern [28, 51] und direkt über scavenger-Rezeptoren in Makrophagen aufgenommen werden. Diese lagern sich in der Subintima und Media als Schaumzellen ab und führen über mehrere Mechanismen zur Entstehung von Arteriosklerose [30].

Ob die TAG-haltigen Lipoproteine einen Teil ihrer vasokonstriktorischen Wirkung über eine Interaktion mit den adrenergen Rezeptoren entfalten, ist bisher noch nicht Gegenstand von Untersuchungen gewesen.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob VLDL über eine Interaktion mit α - und/oder β -adrenergen Rezeptoren einen Einfluss auf die flussabhängige Dilatation von Koronararterien entfaltet. Für eine bessere klinische Anwendbarkeit der Ergebnisse entschieden wir uns für menschliche Herzkranzgefäße aus explantierten Herzen. Zuerst sollte die flussabhängige Dilatation unter reiner Krebslösung, mit α -, β - und gleichzeitiger α - und β -Blockade gemessen werden, um eine mögliche intrinsische Wirkung der Blocker auszuschließen. Anschließend wurden die so gewonnenen Kontrollen mit Versuchen in reiner VLDL-Lösung, VLDL mit α -, β - und gleichzeitiger α - und β -Blockade verglichen. Unter den gleichen Bedingungen wurden die entsprechenden Potentiale der glatten Muskelzellen gemessen und die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide in denselben Gefäßpräparaten bestimmt.

2. Material und Methoden

An Gefäßpräparaten menschlicher Koronararterien wurden Tonus, Membranpotential und die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide flussabhängig unter verschiedenen Krebs- und VLDL-Lösungen gemessen.

2.1. Studiendesign

Verwendet wurden Koronararterien explantierter Herzen von Patienten, die zwischen 2009 und 2011 am Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) operiert wurden.

Eingeschlossen wurden Patienten unabhängig von ihrem Alter, Geschlecht, Vormedikation, kardialer Vorerkrankung oder Nebendiagnosen. Patienten wurden ebenfalls in die Studie einbezogen, wenn deren Herzfunktion mit einem mechanischen Unterstützungssystem (Left Ventricular oder Biventricular Assist Device) oder einem implantierten Schrittmacher/Defibrillator verbessert wurde.

Die Präparation, der Transport und der Versuch im Labor des Instituts für Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurden von den Doktoranden der Studie eigenhändig durchgeführt.

2.2. Präparation der Koronararterien

2.2.1. Entnahme

Die Koronararterien wurden im Rahmen von Herztransplantationen im Deutschen Herzzentrum Berlin aus explantierten Herzen gewonnen. Um eine kurze Ischämiezeit zu gewährleisten, wurden sie schon während der Transplantation unter sterilen Bedingungen im Operationssaal entnommen, und das Empfängerherz wurde währenddessen in kalter isotoner Kochsalzlösung gelagert. Störendes perikardiales Fettgewebe wurde entfernt, die *Arteria coronaria sinistra* und *dextra* ausgehend vom Sinus aortae aufgesucht und mit ihren Abgängen vorsichtig freipräpariert. Dabei wurde auf eine schonende Präparation geachtet und mechanische Beanspruchung durch Zug oder Druck vermieden. Zur Schonung des Epithels und der Klappen wurde nicht sondiert und ein Sicherheitsabstand vom Sinus von 1 cm eingehalten. Repräsentative Gefäßstücke von mindestens 3 cm Länge wurden aus dem *Ramus circumflexus* und *interventricularis anterior* der *Arteria coronaria sinistra* bzw. *Ramus interventricularis posterior* und *marginalis dexter* der rechten Koronarie entnommen. Gefäßabschnitte, die direkt an eine Bypass-Gefäßanastomose angrenzten, makroskopisch stark arteriosklerotisch oder mit Stents versehen waren, wurden

verworfen. Nach der Präparation wurden die Gefäße sofort in 2-8°C kalter, modifizierter Krebslösung gelagert und schnellstmöglich lichtgeschützt ins Labor transportiert.

2.2.2. Aufbereitung und Äquilibration

Im Labor wurden die Koronarien in 37°C warmer Krebslösung von perivasalem Fettgewebe sowie lockerer Adventitia befreit. Anschließend wurden sie mindestens zwei Stunden lang in carbogenisierter Krebslösung (s. 2.3.1.) äquilibriert, um den physiologischen Ionengradienten wiederherzustellen.

2.3. Lösungen und Substanzen

2.3.1. Krebslösung

Krebslösung wurde als isotone Blutersatzlösung gekühlt für den Transport und auf eine Temperatur von 37°C erwärmt, für die Äquilibration sowie die Kontrollversuche benutzt. Dafür wurde sie mit einem Gasgemisch von 95% O₂ und 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) durchperlt (Carbogen) und ihr pH bei 7,35 konstant gehalten. Die Elektrolyte setzten sich folgendermaßen zusammen (in mmol/L): Natrium (Na⁺) 151,16; Kalium (K⁺) 4,69; Calcium (Ca²⁺) 2,52; Magnesium (Mg²⁺) 1,1; Chlorid (Cl⁻) 145,4; Bikarbonat (HCO₃⁻) 16,31; Dihydrogenphosphat (H₂PO₄⁻) 1,38; Glucose 7,77.

2.3.2. Lipidlösungen

Gesunden freiwilligen Probanden, die keine antioxidativen Vitamine oder Lipidsenker eingenommen hatten, wurde im Institut für Klinische Chemie der Universität Freiburg Blut entnommen. Dieses wurde mit 1 mg/dL Ethylendiamintetraacetat (EDTA) versetzt und bei 2 500 x g 6 min zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde im nächsten Schritt in einer OptimaTM TLX Ultrazentrifuge mit Rotor TLA 120.2 (Beckmann Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA) bei 18°C und 120 000 rpm (625 000 x g) ultrazentrifugiert. Die gewonnene Lipidfraktion wurde 1:1 mit Dichtemedien versetzt, die vorher zur völligen Deoxygenierung und Reinigung mit Argon entgast wurden.

Mittels unterschiedlicher Zentrifugationsdauer und Dichtemedien wurden die einzelnen Lipoproteinfraktionen isoliert – 30 min und 1,006 kg/L für VLDL, 150 min und 1,063 kg/L für LDL, 260 min und 1,21 kg/L für HDL.

Um eine Oxidation zu verhindern, wurden die einzelnen Lipoproteinfraktionen unter ständiger Begasung mit Stickstoff abpipettiert und anschließend durch Gelelektrophorese von EDTA-Resten gereinigt.

Entsprechend der physiologischen Blutkonzentration der Blutfette wurden die Lipoproteine mit entgaster Krebslösung bei pH 7,35 auf folgende Konzentrationen verdünnt (in mg/dL): VLDL 30, LDL 100 und HDL 50.

Für die Versuche wurden die Fette verschiedener Probanden gepoolt, um Unterschiede in den ApoE-Polymorphismen auszugleichen.

2.3.3. Blockeransätze

Als Alphablocker verwendeten wir Phentolaminhydrochlorid der Firma Sigma Aldrich. Er wirkt nichtselektiv sowohl auf α_1 - als auch α_2 -Rezeptoren. Phentolamin wurde mit Krebslösung auf eine Konzentration von 10^{-4} mmol/L verdünnt.

Als Betablocker nutzten wir Propranololhydrochlorid der Firma Sigma Aldrich, der nicht kardioselektiv ist und sowohl auf β_1 - als auch β_2 -Rezeptoren wirkt. Propranolol wurde mit Krebslösung auf eine Konzentration von 10^{-4} mmol/L verdünnt.

2.4. Messung der Kraftentwicklung

Die Kraftmessung erfolgte in zwei Versuchsreihen. Die erste Reihe bestand aus Messungen der flussabhängigen Gefäßspannung unter Krebslösung ohne Blocker, mit α -, β - oder beiden Blockern. An jedem der acht Versuchstage wurden zwei komplette Messreihen durchgeführt, wobei die Reihenfolge der Teilversuche verändert wurde, um die Möglichkeit eines systematischen Fehlers im Versuchsablauf zu minimieren. Für jeden Teilversuch wurde ein neues Präparat verwendet, so dass für die Versuche mit Krebslösung insgesamt 62 koronare Gefäßstreifen von 8 Patienten verwendet wurden.

Die zweite Versuchsreihe bestand aus Messungen der flussabhängigen Kraftentwicklung unter LDL, HDL und VLDL jeweils ohne, mit α -, β - oder beiden Blockern. Analog zu den Versuchen unter Krebslösung wurden an insgesamt 9 Versuchstagen zwei komplette Messreihen durchgeführt, für jeden Teilversuch ein neues Gefäßstück verwendet und die Abfolge der Versuche variiert. Hier wurden 24 Gefäßpräparate von ebenfalls 8 Patienten gemessen. Insgesamt wurden für diese Dissertation Daten von Messungen an 86 Koronargefäßstreifen von 16 Patienten berücksichtigt.

2.4.1. Messung des Gefäßtonus

Für die Versuche wurde ein isometrischer Kraftaufnehmer (Dehnungsmessstreifen, KWS 522.C, K 52 C; Hottinger-Baldwin, Darmstadt, Deutschland) verwendet, dessen Messwert nach digitaler Verstärkung als Tonuswert in g direkt abgelesen werden konnte. Eine isometrische Messung konnte angenommen werden, da der Messweg auch bei maximaler Verkürzung des Präparates 100 µm nicht überschreitet. Der Kraftaufnehmer wurde regelmäßig über eine Umlenkrolle mit Gewichten von 1 bis 10 g geeicht.

2.4.2. Flussraten

Die unterschiedlichen Flussraten von 3, 5, 20, 40 und 100 mL/min konnten anhand eines mechanischen Schraubventils direkt an der Messkammer eingestellt werden. Die erfolgreiche Einstellung wurde manuell mittels eines Messzylinders und Stoppuhr kontrolliert.

2.4.3. Vorbereitung und Einspannen des Präparates

Für den Versuch wurde unmittelbar vor Beginn ein ca. 5 mm langes Stück von der Koronararterie im 37°C warmen Krebslösungsbad abgetrennt und längs aufgeschnitten. Dieser Gefäßstreifen wurde mit den Schnittflächen in warmer Krebslösung und einem Fluss von 3 mL/min in die Kammer des Kraftaufnehmers eingespannt, sodass er in Längsausrichtung seiner glatten Muskelzellen und mit der Epithelseite nach oben fixiert wurde. Aus einer Dilatation des Gefäßstreifens resultierte demnach eine Längenänderung, die zu einer Reduktion der Kraft führte. Eine Seite wurde in einer feststehenden Schraubklemme fixiert, während die andere direkt in die Klemme des isometrischen Kraftaufnehmers eingespannt wurde. Um ein intaktes Endothel zu gewährleisten, wurde das Präparat während dieser Prozedur nur an den Stellen mit Pinzetten berührt, die später von den Klemmen des Kraftaufnehmers verdeckt waren. Der korrekte Sitz des Gefäßstreifens wurde durch ein über der Messkammer installiertes Mikroskop überprüft.

2.4.4. Versuchsdurchführung

Vor jedem Versuch wurde die Messkammer zur Entfernung etwaiger Verunreinigungen mit verdünnter Schwefelsäure gereinigt und die gesamte Versuchsanlage gründlich mit Aqua bidest gespült.

Während des Versuches wurden die Flüssigkeiten in lichtgeschützten Flaschen aufbewahrt und zirkulierten über ein Schlauchsystem in einem Wärmeaustauschkreislauf, um ihre Temperatur

Material und Methoden

mittels eines Haake-Thermostats konstant bei 37°C zu halten. Ihr pH-Wert wurde durch eine ständige Durchperlung mit Carbogen zwischen 7,3 und 7,4 gehalten.

Um die physiologische Spannung der Gefäßwand durch den arteriellen Blutdruck zu simulieren, wurden alle Präparate nach einem standardisierten Protokoll über 10 min in 37°C warmer Krebslösung bei einem Fluss von 3 mL/min vorgedehnt: Über 5 min wurde die Spannung kontinuierlich um 0,4 g pro Minute erhöht bis eine Spannung von 2 g erreicht wurde, entsprechend einem arteriellen Mitteldruck von 100 mmHg [100]. Diese wurde weitere 5 min gehalten.

Nach dem Vorspannen wurde auf die jeweilige Versuchslösung umgestellt; in diesem Fall reine Krebslösung, reine VLDL-Lösung (30 mg/dL) sowie beide Lösungen jeweils mit α -, β - oder mit beiden Blockern. Alle fünf Minuten wurde der Tonuswert handschriftlich protokolliert. Zusätzlich wurden die Messwerte nach Umwandlung über einen Analog/Digital – Digital/Analog-Wandler (DT 2821, Data Translation, Marlboro, Massachusetts, USA) an einen Computer (80486 DX-66, Highscreen, Vobis, Aachen) übermittelt und mit WinADDA (V.1.3, Mikrotaurus, Software, Berlin) gespeichert. Nach 10 min wurde die Flussrate auf die jeweils nächsthöhere, 5, 20, 40 und als letztes auf 100 mL/min, geändert.

Nach dem Versuch wurden die Präparate bei dem höchsten Fluss ausgespannt und für die Bestimmung der cAMP- und cGMP-Konzentration sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.5. Intrazelluläre Membranpotentialableitung

2.5.1. Mikroelektroden

Die Mikroelektroden wurden aus einem Spezialglasröhrchen (Pyrex Brand K2916, Corning Glass Works, New York; Innen-/Außendurchmesser 1,8/3,0 mm) mit einem Horizontalpuller (T. Chowdhury Pipette Puller, ISEW, Kalkutta) in 2 min bei einem Heizstrom von 6,8 A ausgezogen.

Nach der Überprüfung der Durchgängigkeit und Größe (Widerstand 60-100 M Ω , Spitzendurchmesser kleiner als 1 μ m) wurden die Mikroelektroden mit 3 mol/L Kaliumchloridlösung (KCl) gefüllt und die *Tip*-Potentiale kontrolliert (-40 bis -80 mV).

2.5.2. Einstich und Elektrodensitz

Mithilfe eines Mikromanipulators wurde die Elektrode über der luminalen Seite des Gefäßstreifens positioniert und über Klopfen an dem Antivibrationstisch Epithel und Basalmembran durchstoßen. Auf dem Bildschirm eines Großbildoszilloskops (SGM 43 BN901

s/N293, Knott, München) wurde der korrekte Sitz in der Muskelzelle durch einen steilen Potentialabfall auf -50 bis -80 mV bestätigt. Wurden positivere Werte als -50 mV gemessen, wurde dies als Potential der Epithelzelle interpretiert und die Elektrode neu positioniert.

2.5.3. Versuchsdurchführung

Der gesamte Versuchsaufbau wurde mit einem großen Faraday-Käfig sowie jede Elektrode separat bis zu ihrer Spitze von Störungen abgeschirmt.

Als indifferente Elektrode diente eine mit 3 mol/L KCl-Lösung gefüllte Agar-Brücke, die mit einem Zylinder mit ebenfalls 3-molarer KCl-Lösung verbunden war. Diesen verband eine Ag/AgCl/Platin-Elektrode mit einem Messverstärker, der das Potential 10-fach verstärkt an das Großbildoszilloskop weiterleitete.

Die Messung der Potentiale wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Messung des Gefäßtonus durchgeführt (vgl. 2.4.4.).

Nach dem Einspannen des Präparates wurden zunächst Potentiale in Krebslösung abgeleitet, daraufhin auf die Versuchslösung gewechselt und nach 10 min mit einer Flussrate wieder abgeleitet, da sich dann die Kraftentwicklung in einem steady state befand. Um möglichst repräsentative Werte für das gesamte Präparat zu bekommen, wurde der Sitz der Elektrode in kleinen Schritten per Horizontalverschiebung eines Mikromanipulators verändert. Die n-Werte beziehen sich auf Einzeleinstiche.

Die Daten wurden neben der handschriftlichen Dokumentation ebenfalls kontinuierlich über einen Wandler und eine Computersoftware digital protokolliert (vgl. 2.4.4.). Nach jeder Messserie wurden Widerstand und *Tip*-Potential überprüft, und die Elektrode wurde nur bei unveränderten Parametern weiter verwendet.

2.6. Bestimmung der Konzentrationen der zyklischen Nukleotide

Die Konzentrationsmessung der zyklischen Nukleotide erfolgte an denselben Gefäßpräparaten wie die Bestimmung des Tonus. Dazu wurden diese direkt nach den Versuchen bei dem zuletzt gemessenen Fluss von 100 mL/min ausgespannt und sofort in flüssigem Stickstoff bei -196 °C kryokonserviert. Die Bestimmung der Konzentrationen von cAMP und cGMP erfolgte mittels Protokoll 4 des Amersham Enzymimmunoassay Biotrak (EIA) Systems.

2.6.1. Gewebsaufschluss

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Gefäßstreifen wurden in auf -80 °C vorgekühlten 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen eingewogen und weiterhin in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Der Gewebsaufschluss der Präparate erfolgte in einem gekühlten Glasmörser. Dem Gewebe wurden 200 µL der mitgelieferten Lyselösung 1 (0,25 % Dodecyltrimethylammoniumbromid) zugefügt. Durch einen anschließenden Homogenisierungsvorgang wurden Epithel- und Muskelzellmembranen zerstört und der Überstand in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß abpipettiert. Dieses wurde mit weiteren 200 µL Lyselösung 1 nachgespült und der Überstand erneut in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.6.2. Bestimmung der cAMP-Konzentration

Für die Konzentrationsbestimmung von cAMP nutzten wir 96-well ELISA-Platten mit Anti-Kaninchen IgG und Biotrak ELISA Reagenzien von Amersham Pharmacia Biotech (ohne Acetylierung).

Dieses Verfahren beruht auf der Kompetition des cAMP aus der zu analysierenden Probe mit dem cAMP-Peroxidase-Molekül in einem immobilisierten cAMP-spezifischen Antiserum. Die Konzentration der gebundenen cAMP-Peroxidase in den Proben wird dann über durch Zusatz von 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und dessen Umsetzung durch die Peroxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) photometrisch bestimmt.

Sowohl das mit Testpuffer 1:2 verdünnte Antiserum als auch das cAMP-Peroxidase-Konjugat wurden vor Beginn in jeweils 11 mL Testpuffer gelöst.

Für die Herstellung der Standardlösungen wurde eine Verdünnungsreihe einer 32 nmol/L Stammlösung angefertigt (fmol/100 µL): 0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1 600 und 3 200.

100 µL der Standardlösungen oder 80 µL Testpuffer und 20 µL der zu analysierenden Proben wurden in die wells der ELISA pipettiert (ggf. musste bei hohen cAMP-Konzentrationen in der Probe ihre Menge entsprechend reduziert werden) und anschließend mit jeweils 100 µL Antiserum versetzt. Von allen Proben und Standards wurden Duplikate erstellt.

Neben den Proben und Standardlösungen wurden einige wells mit 200 µL Kontrolllösung zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung (NSB) befüllt.

Die Platten wurden 120 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde den wells jeweils 50 µL cAMP-Peroxidase-Konjugat zugegeben, und die Platten wurden weitere 60 min inkubiert. Anschließend wurden diese fünfmal mit einem Waschpuffer (Testpuffer mit 0,05% Tween 20) gespült und getrocknet. In jeden well wurde 150 µL TMB-H₂O₂-Lösung gegeben und der blaue Farbumschlag der Standardlösung beobachtet. Entgegen den Herstellerangaben wurden

die Reaktionszeiten mit TMB so gewählt, dass eine Absorption von 1,5 – 1,7 Absorptionseinheiten nicht überstiegen wurde; die Reaktionszeiten variierten dadurch erheblich (zwischen 10 und 120 min). Erreichte die Blaufärbung der Nullwerte den optimalen Bereich, wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µL 1 M Schwefelsäure gestoppt und die dadurch entstehende, bis zu einer Stunde stabile, Gelbfärbung zur Absorptionsmessung genutzt. Diese erfolgte in einem Perkin-Elmer Victor ELISA-Platten Photometer bei 450 nm.

2.6.3. Bestimmung der cGMP-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von cGMP erfolgte analog der von cAMP, allerdings wurde hier wegen der um den Faktor 10 verbesserten Sensitivität eine Acetylierung der Proben und Standards bevorzugt. Für die Acetylierung wurde eine Mischung aus 1 Teil Essigsäureanhydrid zu 2 Teilen Triäthylamin verwendet und diese in einem Verhältnis 1:10 mit Proben oder Standard ca. 5 min inkubiert: 100 µL Probe mit 10 µL Testpuffer (s. 2.5.1.) wurden insgesamt 11 µL des Acetylierungsreagenz zugeführt, während 500 µL Standard mit 50 µL dieses Reagenz versetzt wurden.

Das Antiserum wurde ebenfalls in 11 mL Testpuffer gelöst, aber im Gegensatz zur cAMP-Bestimmung vorher nicht 1:2 verdünnt. Die Standards enthielten folgende Konzentrationen (fmol/ 50 µL): 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 und 512.

100 µL Antiserum wurde in den *wells* mit jeweils 50 µL Probe oder Standard aufgefüllt. Von allen Proben und Standards wurden Duplikate erstellt. Neben den Proben und Standards wurden einige *wells* mit 150 µL Kontrolllösung zur Bestimmung der NSB befüllt.

Die Ansätze wurden analog zur cAMP-Bestimmung 120 min bei 4°C auf einem Schüttler und, nach Zugabe von 100 µL cGMP-Peroxidase-Konjugat, weitere 60 min inkubiert. Nach der fünfmaligen Spülung mit Waschpuffer (Testpuffer mit 0,05% Tween 20) wurden 200 µL TMB-H₂O₂-Reagenz zugegeben, die Reaktionszeit wie unter 2.5.2. beschrieben angepasst und die Reaktion mit 100 µL 1 M Schwefelsäure gestoppt. Darauf erfolgte die Absorptionsmessung im Photometer analog zur cAMP-Konzentrationsbestimmung.

2.6.4. Rechnerische Auswertung

Eine parallel angelegte Eichkurve an die cAMP-Konzentration von 0 und 3200 fmol/Ansatz wurde für die Auswertung herangezogen. Durch den Fit der Absorption an die Funktionsgleichung $y = \frac{(a*b)}{(b+x)} + c$ wurden die Standardkurven erstellt; x ist die Konzentration des Standards. Die Fitparameter a, b und c wurden zur Berechnung der cAMP-Konzentration in (fmol/L) über folgende Formel benutzt $x = \frac{(a*b)}{(y-c)} - b$. Das Ergebnis

wurde mit Faktor F (Gesamtvolumen/eingesetztes Probenvolumen) multipliziert und durch das Gewebsgewicht (in mg) dividiert – das Ergebnis war die Konzentration in nmol/kg.

2.7. Auswertung und statistische Analyse

Für die Auswertung der Tonusmessungen, der Potentialmessungen sowie der Messungen der zyklischen Nukleotide wurden die arithmetischen Mittelwerte und der Standard Error of the Mean (SEM) berechnet und als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Für die Errechnung der statistischen Signifikanz benutzen wir den zweiseitigen *t*-Test nach Student für unverbundene Zufallsstichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

Für die Studie mit HDL, LDL und VLDL wurden insgesamt die Koronararterien von 23 Patienten genutzt, die zwischen dem 13.02.2009 und dem 01.01.2012 im Deutschen Herzzentrum herztransplantiert wurden.

An insgesamt 23 Versuchstagen wurden die flussabhängige Kraft- und Potentialentwicklung an den Herzkranzgefäßen von jeweils einem Patienten gemessen. In einigem zeitlichen Abstand wurden an weiteren Versuchstagen die Messungen der zyklischen Nukleotide an den kryokonservierten Gewebspräparaten durchgeführt.

An 8 Versuchstagen wurden im ersten Block die flussabhängige Gefäßspannung unter Krebslösung ohne Blocker, mit α -, β - oder beiden Blockern gemessen. Insgesamt wurden an 62 Gefäßpräparaten von 8 Patienten Versuche gemacht.

Anschließend wurden an 9 weiteren Versuchstagen im zweiten Block die flussabhängige Kraftentwicklung unter reiner Krebslösung, LDL, HDL und VLDL jeweils ohne, mit α -, β - oder beiden Blockern bestimmt. An 6 von den o.g. 9 Versuchstagen wurden VLDL-Versuche an 24 Gefäßstreifen von 8 Patienten durchgeführt.

An 6 weiteren Versuchstagen wurden die flussabhängige Potentialentwicklung unter Krebslösung, LDL, HDL und VLDL mit den jeweiligen Blockerkombinationen gemessen.

Für diese Dissertation wurden 16 der insgesamt 23 Patienten berücksichtigt, die sich zwischen 13.02.2009 und 07.06.2011 im Deutschen Herzzentrum Berlin einer Herztransplantation unterzogen hatten. An ihren Koronarien wurden Einzelmessungen von Kraft und Potential an insgesamt 98 Gefäßstreifen durchgeführt.

3.1. Kraft- und Potentialentwicklung

3.1.1. Krebslösung

An jedem der acht Versuchstage wurden ein Kontrollversuch mit reiner Krebslösung sowie jeweils zwei mit α -, β - sowie beiden Blockern durchgeführt. An den Versuchstagen mit den verschiedenen Lipoproteinen wurde ebenfalls ein Kontrollversuch mit reiner Krebslösung durchgeführt. Für die Auswertung wurden nur die 6 Tage berücksichtigt, an denen auch gleichzeitig mit VLDL experimentiert wurde. Eine Messung von Krebslösung mit α - und β -Blocker musste wegen eines Messfehlers ausgeschlossen werden, sodass sich die Versuchszahl auf $n = 15$ reduzierte.

Ergebnisse

Bei reiner Krebslösung stellte sich nach einer 10-minütigen Vorspannphase und einem Fluss von 3 mL/min im Mittel ein Ausgangstonus von $1,794 \pm 0,036$ g ein. Dieser reduzierte sich unter steigenden Flussraten bis zur maximalen Flussrate von 100 mL/min auf einen Tonus von im Mittel $1,362 \pm 0,024$ g ($p < 0,0001$). Der Nettokraftverlust betrug insgesamt 0,432 g, entsprechend einer Reduktion um 24,1% mit der stärksten Tonusabnahme zwischen 3 und 20 mL/min. Die Muskelzellen der Koronargefäße hyperpolarisierten unter reiner Krebslösung im Mittel von $-47,1 \pm 0,2$ auf $-50,2 \pm 0,2$ mV (vgl. Abb. 1).

Die Tonuswerte der mit Blockern versetzten Krebslösung verhielten sich im Vergleich zur reinen Krebslösung annähernd gleich (vgl. Abb.5): Die Lösung mit α -Blocker zeigte im Mittel einen Ausgangstonus bei 3 mL/min von $1,799 \pm 0,060$ g und fiel netto um 0,416 g (23,1%) auf $1,383 \pm 0,015$ g bei 100 mL/min (vgl. Abb.2b). Die Lösung mit β -Blocker fiel von $1,819 \pm 0,040$ um 0,460 g (25,3%) auf $1,359 \pm 0,008$ g (vgl. Abb.3b). Auch die Lösung mit beiden Blockern zeigte eine ähnliche Reduktion von $1,779 \pm 0,041$ bei 3 mL/min um 0,384 (21,6%) auf $1,395 \pm 0,013$ g bei 100 mL/min (vgl. Abb.4b). Bei allen Krebslösungen mit Blockern fand sich eine signifikante flussabhängige Dilatation zwischen einem Fluss von 3 bis 100 mL/min mit p-Werten $< 0,0001$.

Die gemessenen Muskelpotentiale unter Krebslösung mit Blockern verhielten sich ähnlich denen unter reiner Krebslösung (vgl. Abb.1a, 2a, 3a und 4a). Unter α -Blockade fiel das Potential von $-46,9 \pm 0,1$ auf $-50,2 \pm 0,1$ mV, unter β -Blockade von $-47,0 \pm 0,1$ auf $-50,8 \pm 0,2$ mV und unter kombinierter α - und β -Blockade von $-46,8 \pm 0,1$ auf $-50,1 \pm 0,1$ mV.

Im Vergleich reine Krebslösung zu allen Krebslösungen mit Blockern fand sich für jede einzelne Flussrate kein signifikanter Unterschied.

Ergebnisse

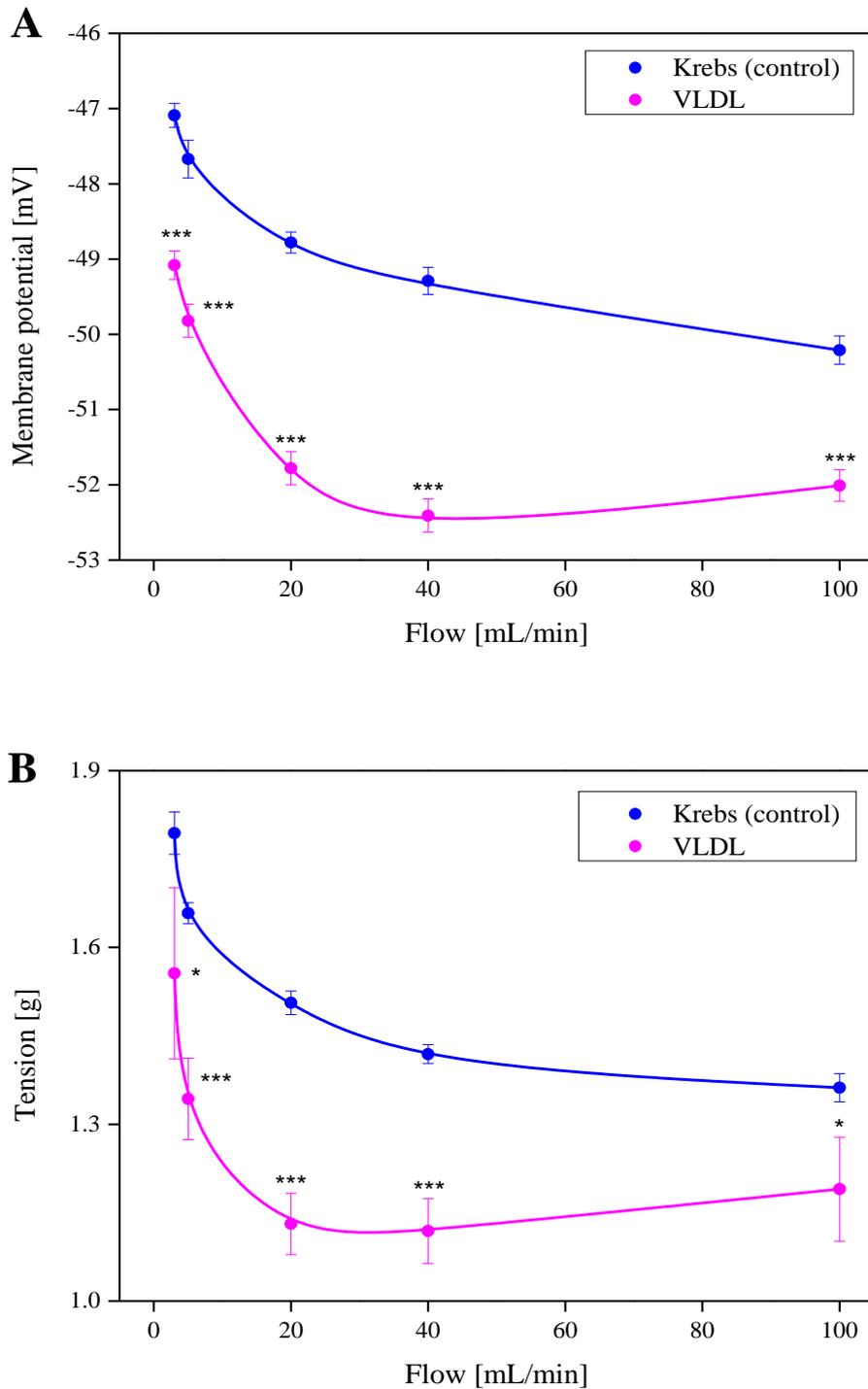


Abb. 1. Membranpotential und Tonus in Krebslösung (●) und gepooltem VLDL (●), Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A) Membranpotential in Krebs- ($n_3=51$, $n_5=51$, $n_{20}=46$, $n_{40}=71$, $n_{100}=57$) und VLDL-Lösung ($n_3=100$, $n_5=75$, $n_{20}=90$, $n_{40}=85$, $n_{100}=90$);

B) Gefäßtonus in Krebs- ($n=14$) und VLDL-Lösung ($n=6$).

Ergebnisse

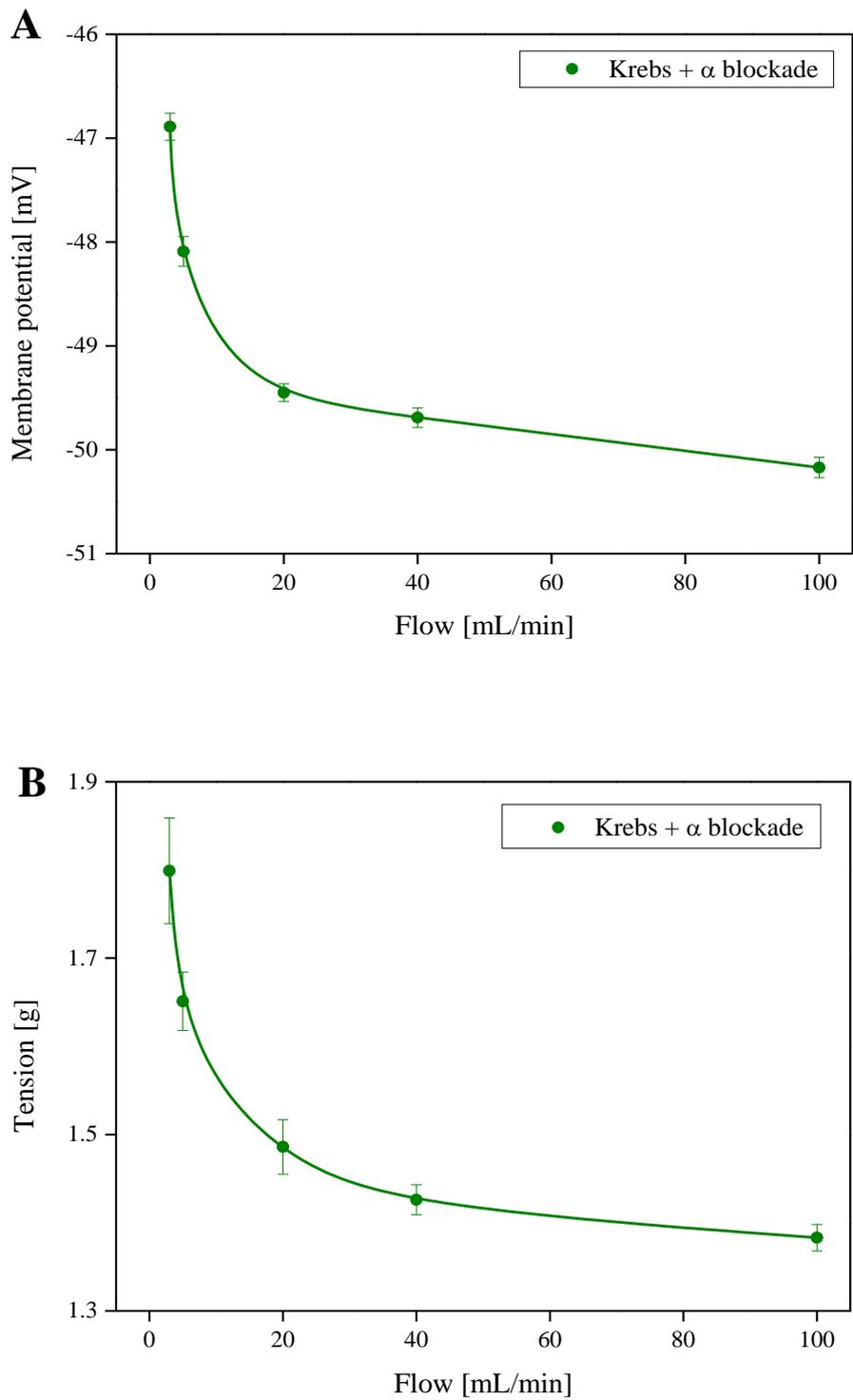


Abb. 2. Membranpotential und Tonus in Krebslösung unter α -Blockade (●), Mittelwerte \pm SEM.

B

A) Membranpotential in Krebslösung unter α -Blockade ($n_3=27$, $n_5=22$, $n_{20}=28$, $n_{40}=21$, $n_{100}=33$);

B) Gefäßtonus in Krebslösung unter α -Blockade ($n=16$).

Ergebnisse

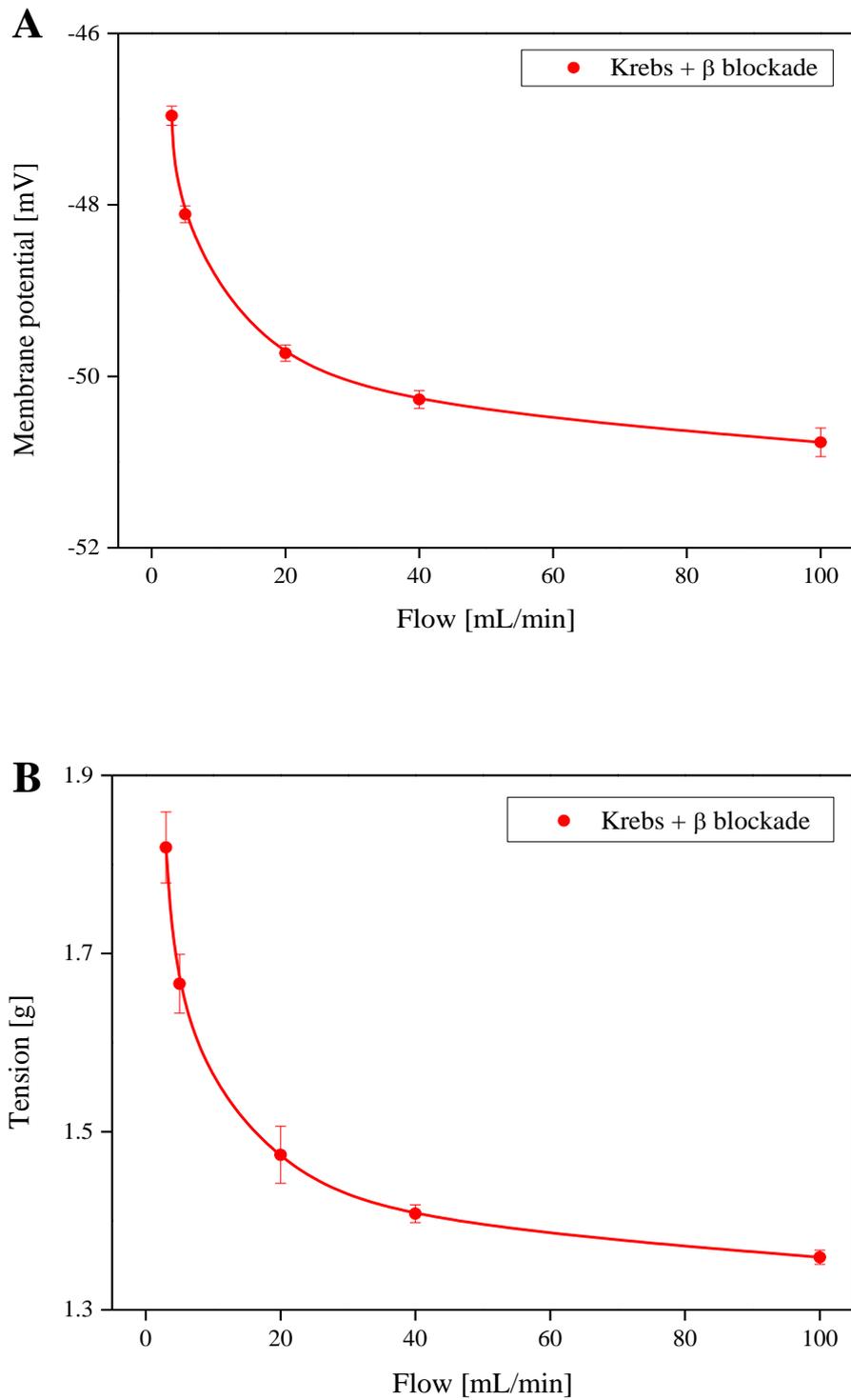


Abb. 3. Membranpotential und Tonus in Krebslösung unter β -Blockade (●), Mittelwerte \pm SEM.

A) Membranpotential in Krebslösung unter β -Blockade ($n_3=21$, $n_5=24$, $n_{20}=24$, $n_{40}=23$, $n_{100}=9$);

B) Gefäßtonus in Krebslösung unter β -Blockade ($n=16$).

Ergebnisse

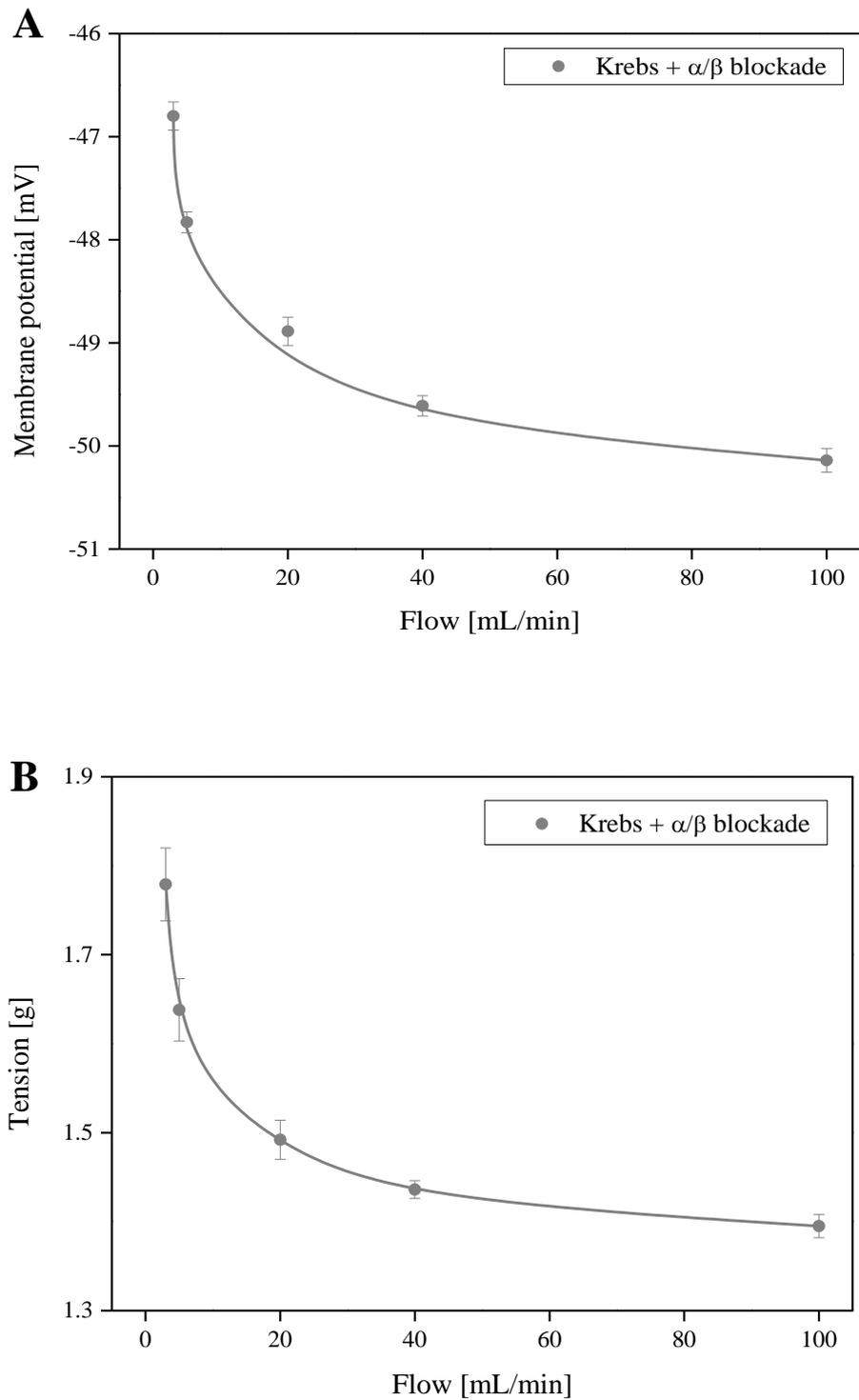


Abb. 4. Membranpotential und Tonus in Krebslösung unter α/β -Blockade (●), Mittelwerte \pm SEM.

A) Membranpotential in Krebslösung unter α/β -Blockade ($n_3=38$, $n_5=27$, $n_{20}=23$, $n_{40}=27$, $n_{100}=20$);

B) Gefäßtonus in Krebslösung unter α/β -Blockade ($n=15$).

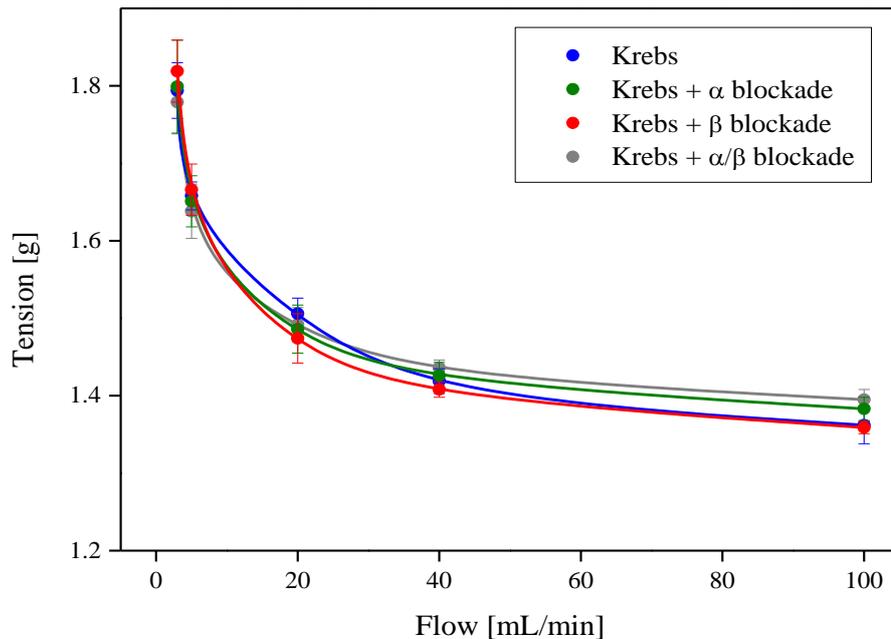


Abb. 5. Gefäßtonus in reiner Krebslösung (●, n=14) im Vergleich zu Krebslösung unter α - (●, n=16), β - (●, n=16) und α/β -Blockade (●, n=15), Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.1.2. Gepooltes VLDL

An jedem der sechs Versuchstage mit VLDL wurde die Kraftentwicklung ohne Blocker, mit α -, β - und beiden Blockern gemessen. Die Koronarien zeigten in VLDL-Lösung nach der Vorspannphase im Mittel einen Ausgangstonus von $1,556 \pm 0,145$ g, der auf $1,190 \pm 0,088$ g unter 100 mL/min abnahm ($p = 0,056$). Obwohl die absoluten Tonuswerte in VLDL stets signifikant geringer waren als die in Krebslösung, zeigte sich eine eingeschränkte Nettoerelaxation, die bei VLDL nur 0,366 g (-15,3%) im Vergleich zu 0,432 g in Krebslösung betrug. In Hinsicht auf die einzelnen Flussraten zeigt sich in VLDL bei 5 und 20 mL/min eine größere Differenz zum vorangegangenen Tonuswert als in Krebslösung. Ab Flüssen von 40 mL/min kehrt sich dieser Effekt jedoch zu Gunsten von Krebslösung um: Die Gefäße in VLDL-Lösung können nicht mehr so effektiv relaxieren wie die unter Krebslösung und schließlich kommt es bei 100 mL/min sogar zu einer Kontraktion (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Differenzen im Gefäßtonus bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten im Vergleich zwischen Krebs- und VLDL-Lösung (Mittelwerte).

Differenz Lösung	3/5 [mL/min]	5/20 mL/min	20/40 mL/min	40/100 mL/min
Krebs [g]	0,137	0,152	0,087	0,080
VLDL [g]	0,213	0,212	0,012	-0,070

Die Muskelpotentiale unter VLDL verringerten sich im Mittel flussabhängig von $-49,1 \pm 0,2$ mV auf $-52,0 \pm 0,2$ mV. Sie lagen ebenfalls immer signifikant unter denen der Muskelzellen in Krebslösung ($p < 0,0001$). Die Netto-Hyperpolarisation fiel jedoch unter VLDL mit 2,9 mV im Vergleich zu 3,1 mV unter Krebslösung geringer aus (vgl. Abb. 1).

Unter α -Blockade nahm die Kraft von $1,699 \pm 0,039$ g um 0,324 g (19,1%) auf $1,375 \pm 0,068$ g ab ($p = 0,002$), während sich der Gefäßtonus unter β -Blockade von $1,678 \pm 0,162$ g um 0,383 (22,8%) auf $1,295 \pm 0,055$ g reduzierte ($p = 0,049$). Unter α - und β -Blockade fielen die Tonuswerte im Mittel von $1,686 \pm 0,136$ g um 0,345 g (20,5%) auf $1,341 \pm 0,048$ g ($p = 0,037$). Im Vergleich der Kraftentwicklung unter reinem VLDL zu VLDL mit den Blockerkombinationen, fielen die Tonuswerte bei Blockade der sympathischen Rezeptoren stets höher aus als unter reiner VLDL-Lösung (vgl. Abb. 10). Unter α -Blockade liegt die Tonuskurve um 0,143 bis 0,200 g höher; dieser Effekt macht sich vor allem zwischen den Flussraten von 5 und 40 mL/min bemerkbar. Statistisch signifikant zu VLDL unterschied sich die Lösung mit α -Blocker jedoch nur bei einem Fluss von 20 mL/min ($p = 0,04$). Auch eine Blockade des β -Rezeptors erhöht den Tonus zwischen 0,105 und 0,148 g, zeigte aber keine zu VLDL statistisch signifikanten Unterschiede. Bei einer Blockade beider adrenerger Rezeptoren in VLDL-Lösung scheint sich der Effekt der einzelnen Rezeptorblockade jedoch nicht wie erwartet zu addieren, sondern weitestgehend dem der α -Blockade zu entsprechen. In der Lösung mit α - und β -Blocker lag der Tonus um 0,130 - 0,210 g höher und zeigte zu VLDL statistisch signifikante Unterschiede zwischen 5 und 40 mL/min.

Der Kurvenverlauf der Muskelpotentiale ähnelte erwartungsgemäß dem jeweils dazugehörigen Kraftdiagramm (elektromechanische Kopplung). Die Potentialwerte lagen unter VLDL mit α -, β -, α - und β -Blockern stets über denen von reinem VLDL (vgl. Abb. 1, 6, 7, 8). Unter α -Blockade fiel das Muskelpotential flussabhängig von $-47,8 \pm 0,2$ mV auf $-50,4 \pm 0,1$ mV, bei Blockade der β -Rezeptoren von $-47,8 \pm 0,1$ mV auf $-51,0 \pm 0,1$ mV und bei α - und gleichzeitiger β -Blockade von $-47,8 \pm 0,1$ mV auf $-50,5 \pm 0,1$ mV.

Ergebnisse

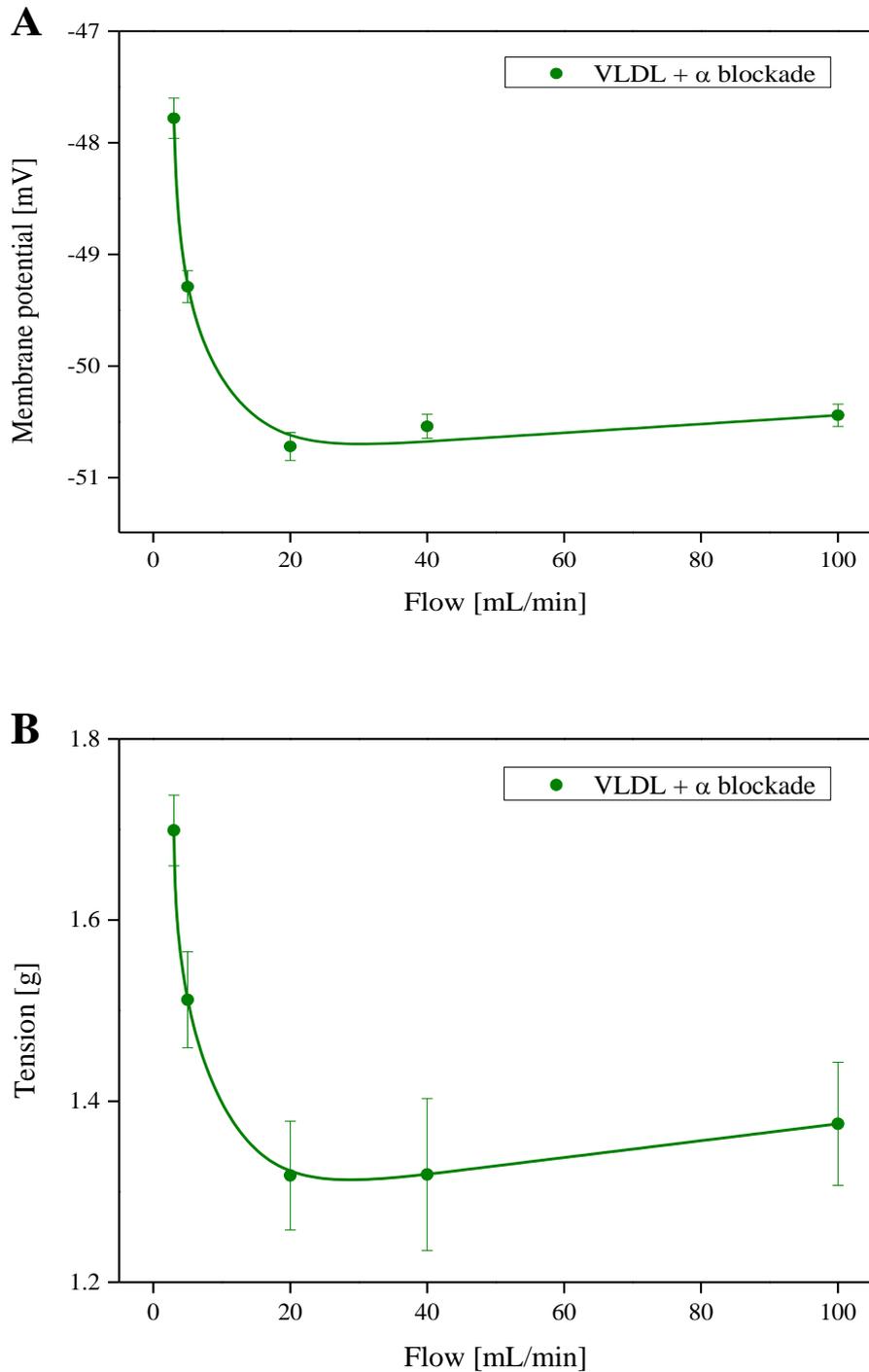


Abb. 6. Membranpotential und Tonus in VLDL unter α -Blockade (●), Mittelwerte \pm SEM.

A) Membranpotential in VLDL unter α -Blockade ($n_3=34$, $n_5=19$, $n_{20}=16$, $n_{40}=15$, $n_{100}=10$);

B) Gefäßtonus in VLDL unter α -Blockade ($n=6$).

Ergebnisse

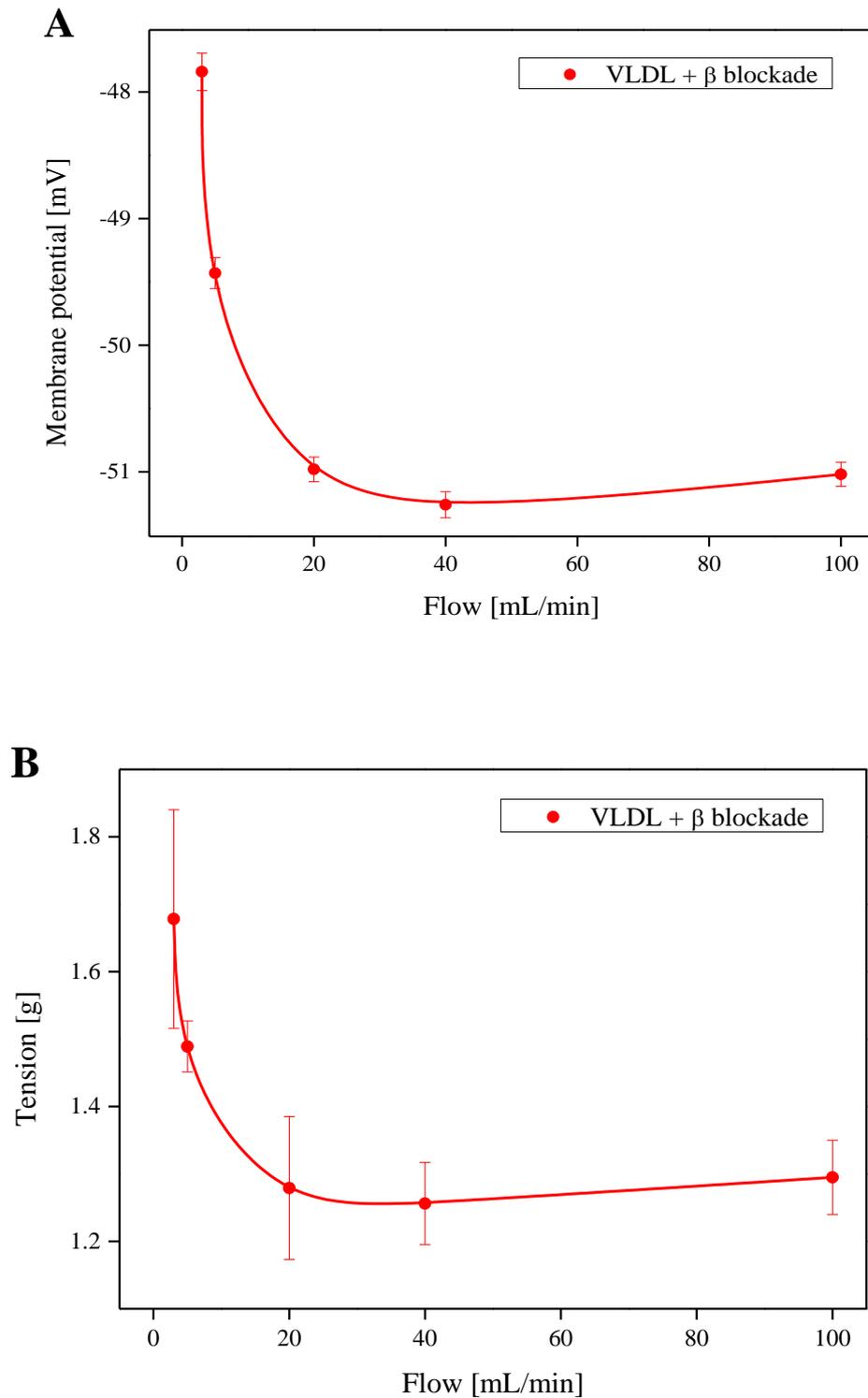


Abb. 7. Membranpotential und Tonus in VLDL unter β -Blockade (●), Mittelwerte \pm SEM.

A) Membranpotential bei VLDL unter β -Blockade ($n_3=14$, $n_5=17$, $n_{20}=14$, $n_{40}=24$, $n_{100}=17$);

B) Gefäßtonus bei VLDL unter β -Blockade ($n=6$).

Ergebnisse

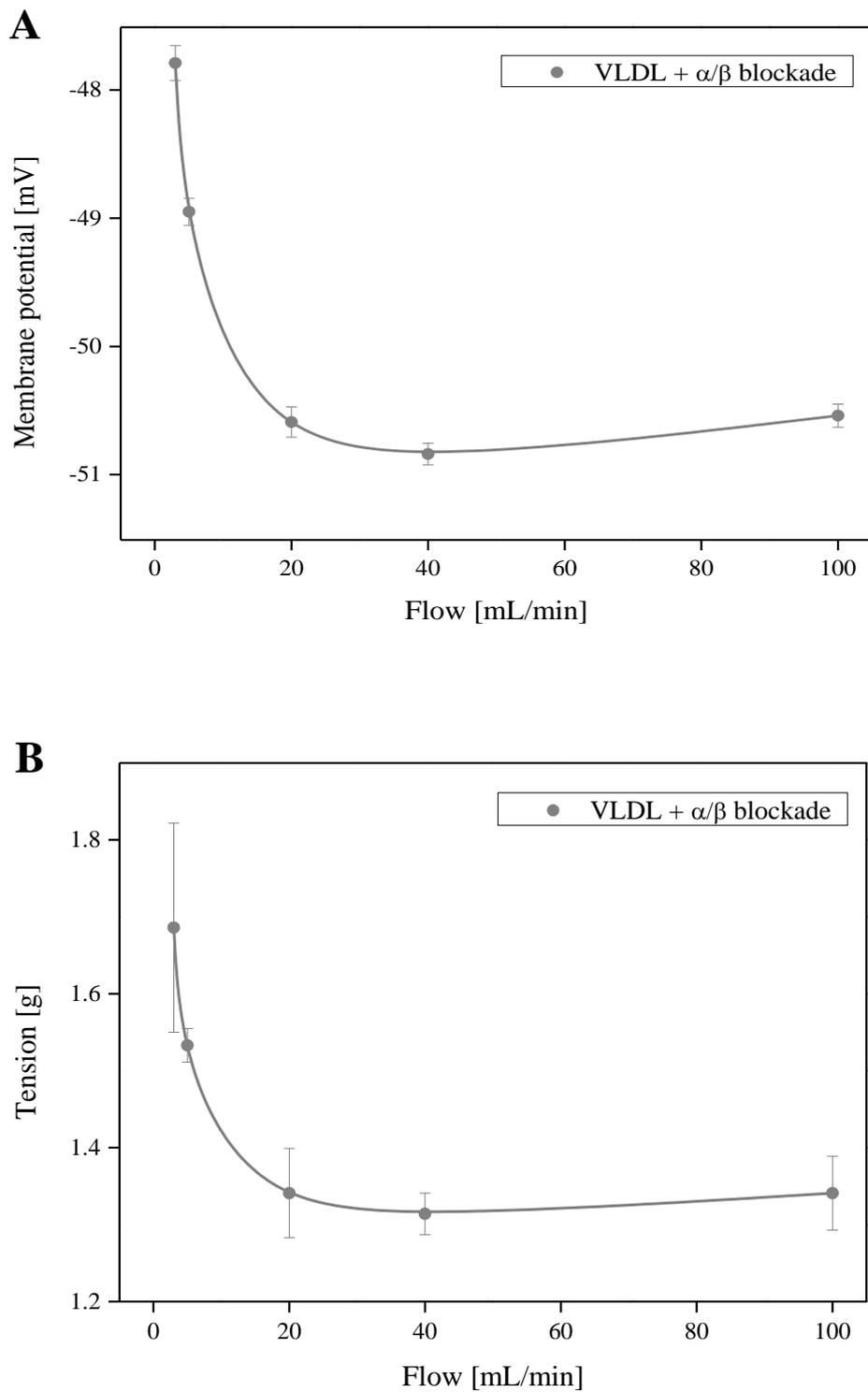


Abb. 8. Membranpotential und Tonus in VLDL unter α/β -Blockade (■), Mittelwerte \pm SEM.

A) Membranpotential bei VLDL unter α/β -Blockade ($n_3=13$, $n_5=17$, $n_{20}=17$, $n_{40}=16$, $n_{100}=18$);

B) Gefäßtonus bei VLDL unter α/β -Blockade ($n=6$).

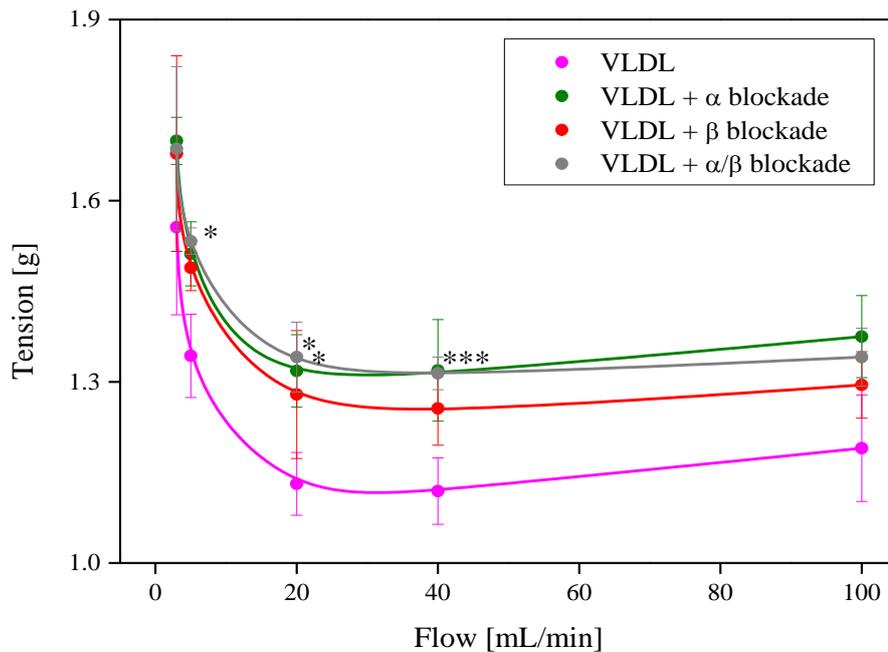


Abb. 9. Gefäßtonus in VLDL-Lösung ohne Blocker (●), mit α - (●), β - (●) und α/β -Blockade (●). Mittelwerte \pm SEM, n=6, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

3.1.3. Auswirkung der adrenergen Blockade

Da die Blockade einer oder beider sympathischer Rezeptoren in Krebslösung zu keinem signifikanten Unterschied im Gefäßtonus führt, wurde die reine Krebslösung als Vergleichswert für die VLDL-Kurven herangezogen.

Die Tonuswerte reiner VLDL-Lösung unterschieden sich bei allen Flüssen signifikant von Krebslösung; VLDL mit α -Blocker jedoch nur bei Flüssen von 5 und 20 mL/min. Die gemessenen Kraftwerte von VLDL mit β -Blocker und VLDL mit kombinierter α/β -Blockade lagen zwischen 5 und 40 mL/min signifikant unter denen von Krebs.

Betrachtet man jedoch die Nettorelaxation ($T_3 - T_{100}$) unter Krebslösung im Vergleich zu VLDL mit und ohne Blocker, so zeigt sich eine Einschränkung der flussabhängigen Relaxation um 15,3% im Sinne einer relativen Kontraktion.

Um diesen Effekt zu verdeutlichen, wurden die Differenzen zwischen Krebslösung und den VLDL-Lösungen berechnet (vgl. Abb.10). Die Differenz von Krebs- zu VLDL-Lösung entspricht dem VLDL-Effekt inklusive der VLDL-Wirkung über Adrenorezeptoren. Diese Wirkung wird von nun an als gesamter VLDL-Effekt bezeichnet. Er bewegt sich zwischen 172 bis 375 mg und ist am stärksten zwischen 5 und 20 mL/min ausgeprägt. Um die Effekte über die

einzelnen Rezeptoren zu erhalten, wurde vom gesamten VLDL-Effekt die Differenz von Krebs/VLDL + α -, β -, oder α/β -Blocker subtrahiert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2. Effekt von VLDL über die adrenergen Rezeptoren. Differenzen der Mittelwerte.

Effekt \ Fluss [mL/min]	3	5	20	40	100
Gesamter VLDL-Effekt [g]	0,238	0,315	0,375	0,300	0,172
Reiner VLDL-Effekt [g]	0,108	0,125	0,165	0,105	0,021
Effekt über adrenerge Rezeptoren [g]	0,130	0,190	0,210	0,195	0,151
[%]	54,6	60,3	56,0	65,0	87,8
Effekt über α -Rezeptoren [g]	0,143	0,169	0,187	0,200	0,185
Effekt über β -Rezeptoren [g]	0,122	0,146	0,148	0,137	0,105

Setzt man die Differenz VLDL-Krebs gleich 100%, ergibt sich durch die Blockade beider adrenerger Rezeptoren *im Mittel* über alle Flussraten eine Reduktion des gesamten VLDL-Effekts um $64,7 \pm 6,0\%$. Eine alleinige α -Blockade in VLDL-Lösung führt zu einer Reduktion um *im Mittel* $67,6 \pm 10,4\%$. Dieser Effekt entspricht in etwa der Auswirkung der kompletten adrenergen Blockade. Werden nur die β -Rezeptoren blockiert, findet sich immerhin noch eine Reduktion um *im Mittel* $48,8 \pm 3,6\%$. Die Addition der Prozentsätze ergibt mehr als hundert Prozent, da der gemessene gesamte VLDL-Effekt für die Berechnung zugrunde gelegt wurde und nicht ein errechneter Gesamteffekt. Möglicherweise lässt sich dieser Effekt mit einer Interaktion der Signalwege erklären, wenn sowohl α - als auch β -Rezeptoren von VLDL-Molekülen gebunden werden (vgl. 4.2.2. bis 4.2.4.).

Ergebnisse

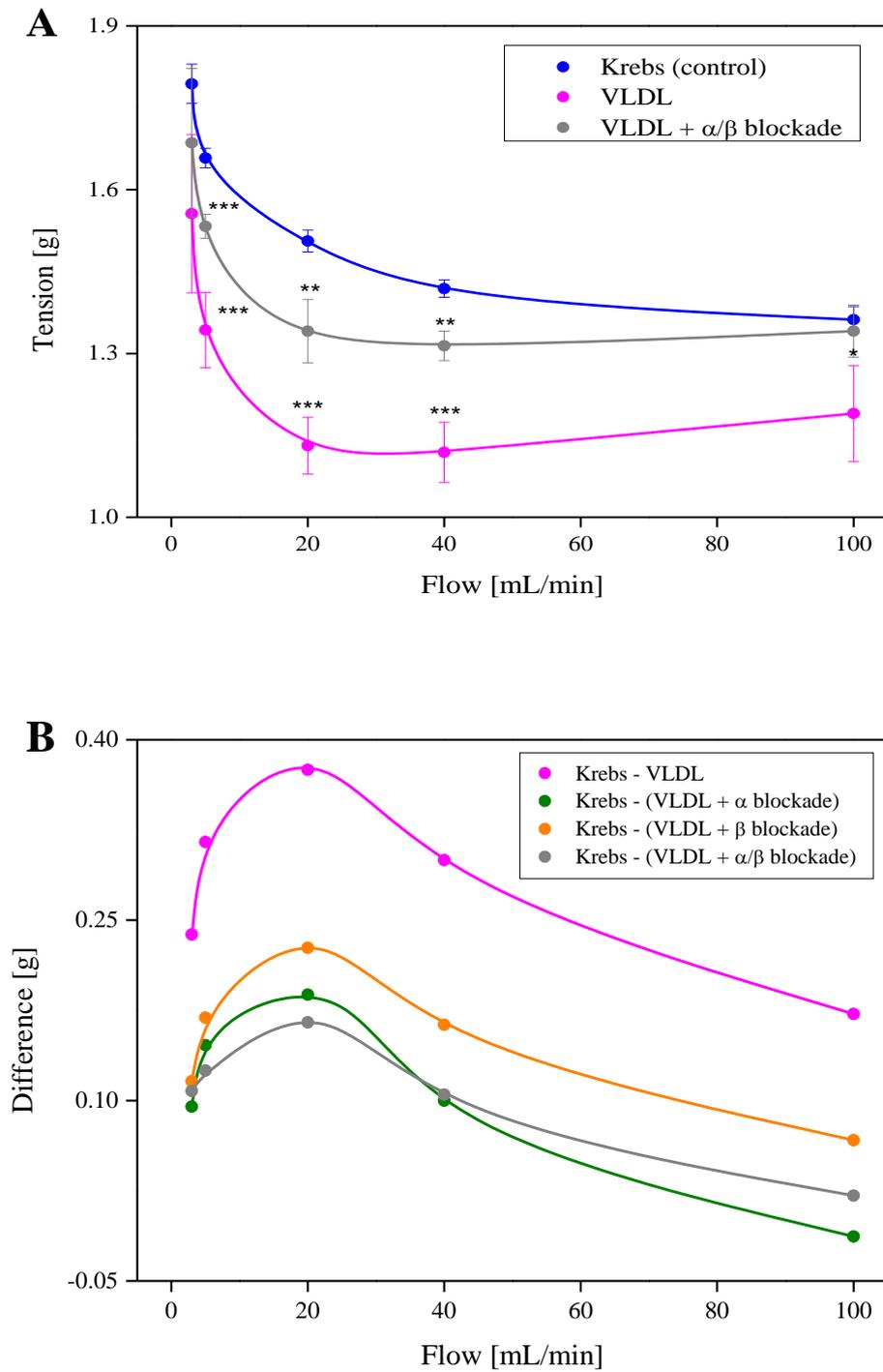


Abb. 10. VLDL-Effekt auf den Gefäßtonus im Vergleich zu Krebslösung, Mittelwerte \pm SEM,

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A) Gefäßtonus von Krebs-Lösung (●), VLDL (●) und VLDL mit α/β -Blocker (●);

B) Differenzen der Kraftentwicklung von reiner Krebslösung und VLDL ohne Blocker (●), mit α - (●), β - (●) und α/β -Blocker (●).

3.2. Konzentrationen der zyklischen Nukleotide

Die Bestimmung erfolgte an den gleichen Gefäßpräparaten wie die Tonusmessung. Diese wurden nach dem Versuch bei einem Fluss von 100 mL/min ausgespannt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. So konnten die zyklischen Nukleotide zu diesem Zeitpunkt konserviert werden und später mittels ELISA bestimmt werden. Um Fehler zu minimieren, wurden die Konzentrationen an jedem Präparat mindestens zweimal bestimmt und der Mittelwert gebildet.

3.2.1. Krebslösung

In reiner Krebslösung fand sich in den bei 100 mL/min ausgespannten Präparaten im Mittel eine cAMP-Konzentration von $43,55 \pm 1,65$ nmol/kg und eine cGMP-Konzentration von $4,16 \pm 0,03$ nmol/kg. Die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide unter den verschiedenen Blockerkombinationen zeigten im Vergleich zu reiner Krebslösung keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 5). Unter α -Blocker lag die Konzentration von cAMP um 7,1 (-16,3%), die unter β -Blocker um 1,9 (-4,4%) und die unter α/β -Blocker um 8,2 nmol/kg (-18,8%) unterhalb der von reiner Krebslösung. Die Konzentrationen von cGMP lagen unter α -Blocker 0,9 (-21,6%), unter β -Blocker 0,15 (-3,6%) und unter α/β -Blocker 1,2 nmol/kg (-27,7%) niedriger als in reiner Krebslösung.

3.2.2. Gepooltes VLDL

Bei reiner VLDL-Lösung fand sich bei einem Fluss von 100 mL/min eine Konzentration von cAMP von $73,57 \pm 2,56$ und von cGMP von $12,97 \pm 1,51$ nmol/kg. Analog zu ihren niedrigen Tonuswerten zeigte die VLDL-Lösung im Vergleich zu allen Versuchslösungen die höchste Konzentration von cAMP und cGMP. Im Vergleich zu Krebslösung lag die Konzentration von cAMP um 30,0 (68,9%) und die von cGMP um 8,8 nmol/kg (211,6%) höher. Die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide unter VLDL mit Blockern lagen immer unterhalb von denen in reiner VLDL-Lösung. Die Konzentration von cAMP war bei α -Blockade um 34,2 (-46,5%), bei β -Blockade um 19,4 (-26,4%) und bei α/β -Blockade um 28,3 nmol/kg (-38,5%) geringer als unter VLDL. Diese Unterschiede waren alle deutlich signifikant ($p < 0,001$). Die Konzentrationen von cGMP lagen in den VLDL-Lösungen mit adrenergen Blockern ebenfalls stets deutlich unter denen in reiner VLDL-Lösung – unter α -Blocker sank die Konzentration von cGMP um 9,4 (-72,5%), unter β -Blocker um 5,8 (-44,7%) und bei α/β -Blocker um 8,3 nmol/kg (-64,0%) im Vergleich zu VLDL. Diese Unterschiede waren in VLDL mit α - und α/β signifikant zu VLDL ($p < 0,05$), während die Lösung mit β -Blocker sich nicht signifikant von VLDL unterschied ($p = 0,135$).

Ergebnisse

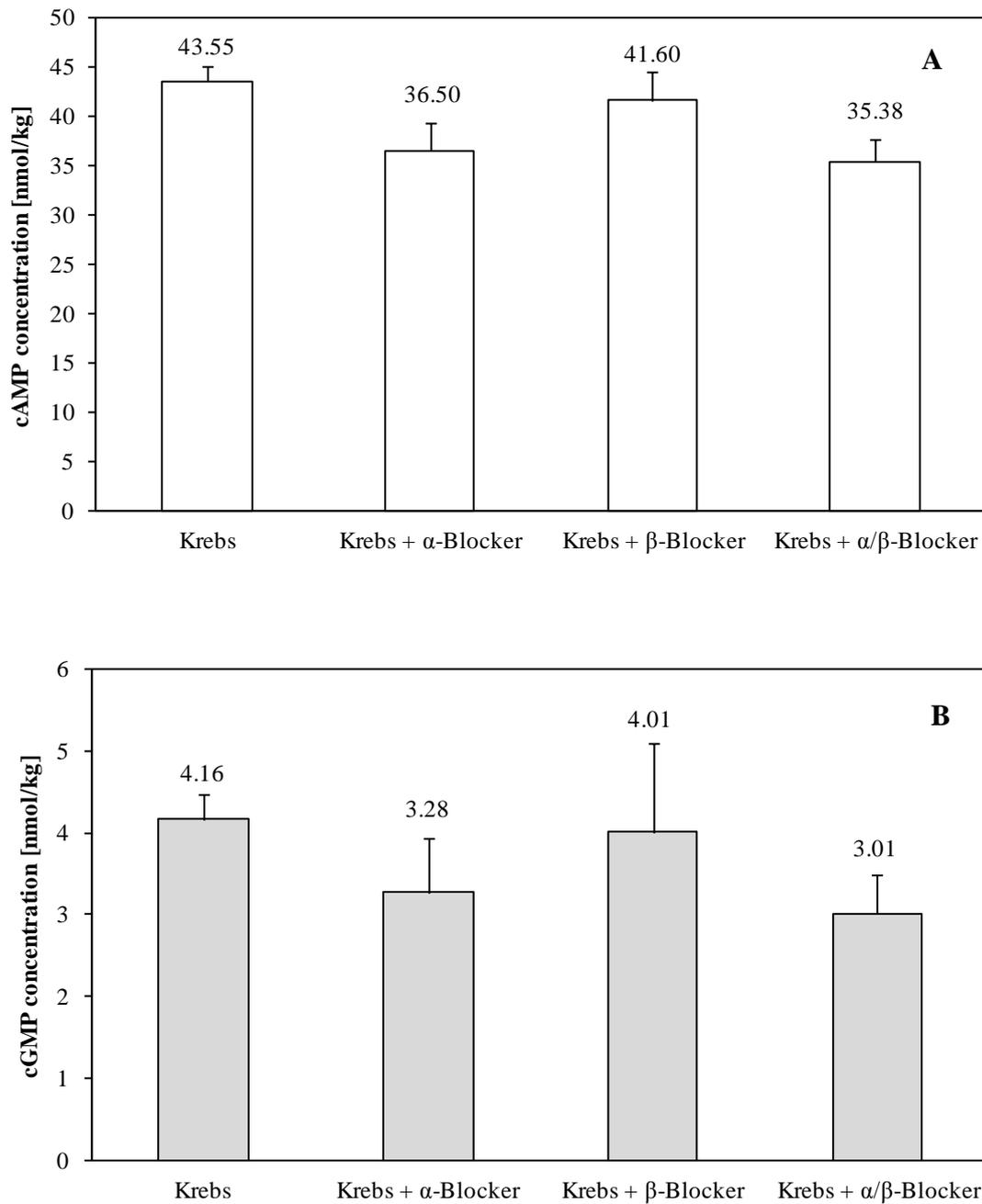


Abb.11. Konzentration von cAMP (A) und cGMP (B) bei einem Fluss von 100 mL/min in reiner Krebslösung ($n_{\text{cAMP}}=96$, $n_{\text{cGMP}}=96$) im Vergleich zu Krebslösung mit α - ($n_{\text{cAMP}}=8$, $n_{\text{cGMP}}=7$), β - ($n_{\text{cAMP}}=16$, $n_{\text{cGMP}}=16$) und α/β -Blocker ($n_{\text{cAMP}}=16$, $n_{\text{cGMP}}=14$). Mittelwerte \pm SEM, $p > 0,05$ für alle Werte.

Ergebnisse

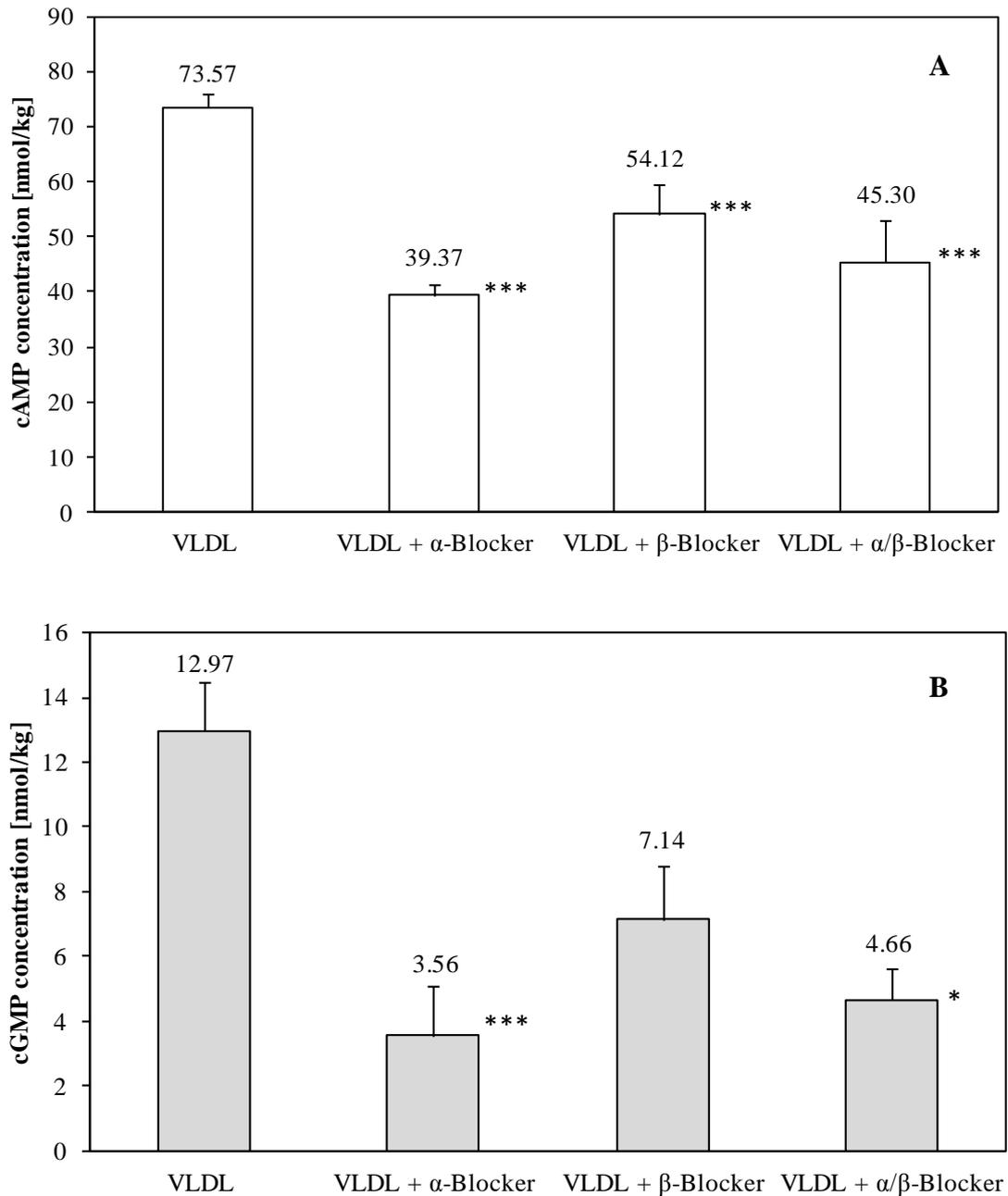


Abb.12. Konzentration von cAMP (A) und cGMP (B) bei einem Fluss von 100 mL/min in reiner VLDL-Lösung ($n_{\text{cAMP}}=23$, $n_{\text{cGMP}}=50$) im Vergleich zu VLDL mit α - ($n_{\text{cAMP}}=10$, $n_{\text{cGMP}}=10$), β - ($n_{\text{cAMP}}=11$, $n_{\text{cGMP}}=8$) und α/β -Blocker ($n_{\text{cAMP}}=20$, $n_{\text{cGMP}}=10$). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2.3. Auswirkung der adrenergen Blockade

Da sich die Konzentration der zyklischen Nukleotide in Krebslösung mit den Blockerkombinationen nicht signifikant von reiner Krebslösung unterschied, wurde diese als Vergleichswert herangezogen. Die Konzentration von cAMP lag in VLDL-Lösung um 30,0 (68,9%) und die von cGMP um 8,8 nmol/kg (211,6%) höher als in Krebslösung. In VLDL mit α -Blocker war cAMP um 4,2 (-9,6%) und cGMP um 0,6 nmol/kg (-14,5%) niedriger als in Krebs, während die der anderen Blockerkombinationen höhere Konzentrationen als Krebs aufwiesen. Unter β -Blocker zeigte sich für cAMP ein Anstieg im Vergleich zu Krebs von 10,6 (24,3%) bzw. für cGMP von 3,0 nmol/kg (70,4%). Für die gleichzeitige Blockade beider sympathischen Rezeptoren maßen wir eine Steigerung für cAMP von 1,8 (4%) bzw. für cGMP von 0,5 nmol/kg (11,9%).

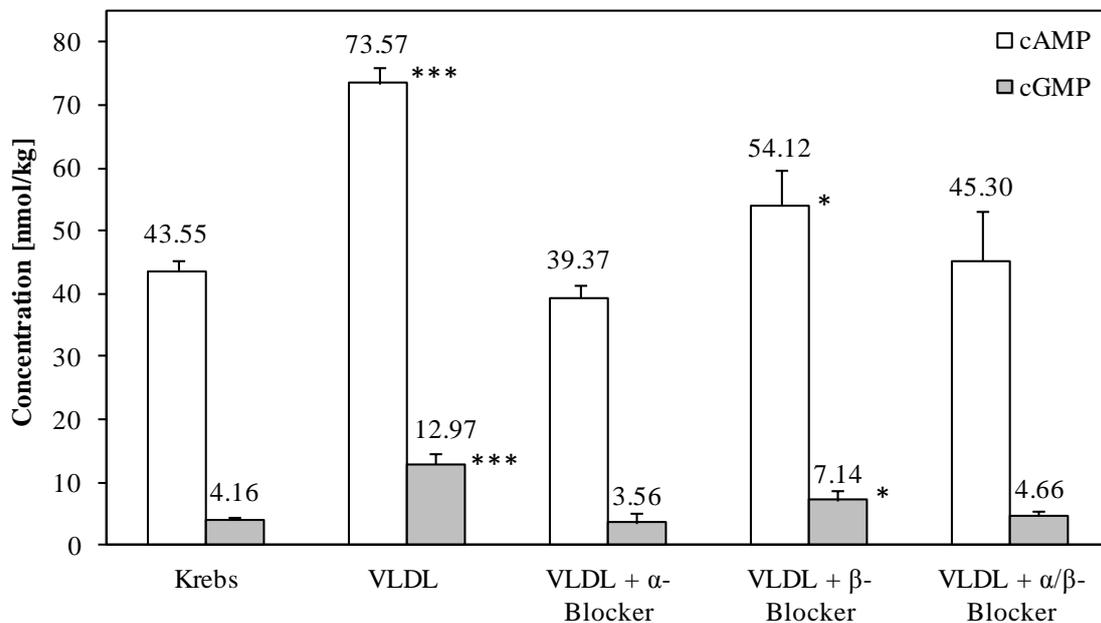


Abb. 13. Konzentration von cAMP und cGMP bei einem Fluss von 100 mL/min in reiner Krebslösung ($n_{\text{cAMP}}=96$, $n_{\text{cGMP}}=96$) im Vergleich zu VLDL ($n_{\text{cAMP}}=23$, $n_{\text{cGMP}}=50$), VLDL mit α - ($n_{\text{cAMP}}=10$, $n_{\text{cGMP}}=10$), β - ($n_{\text{cAMP}}=11$, $n_{\text{cGMP}}=8$) und α/β -Blocker ($n_{\text{cAMP}}=20$, $n_{\text{cGMP}}=10$). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.3. Betrachtung des Gesamtmodells

3.3.1. Elektromechanische Kopplung

Für die Darstellung der elektromechanischen Kopplung wurden von allen Versuchstagen und Lösungen die gemittelten Kraftwerte in Abhängigkeit vom zugehörigen Membranpotential in einem Graphen aufgetragen. Dabei zeigte sich im gemessenen Bereich zwischen -55 und -45 mV eine annähernd lineare Beziehung zwischen Potential und Kraft, was für eine enge elektromechanische Kopplung in diesem Potentialbereich spricht (s. Abb.14). Der Kopplungskoeffizient kann mit 6,8 mV/g angegeben werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Berichten einer sigmoiden Aktivierungskurve mit der stärksten Kraftentwicklung zwischen -60 und -20 mV [65, 87].

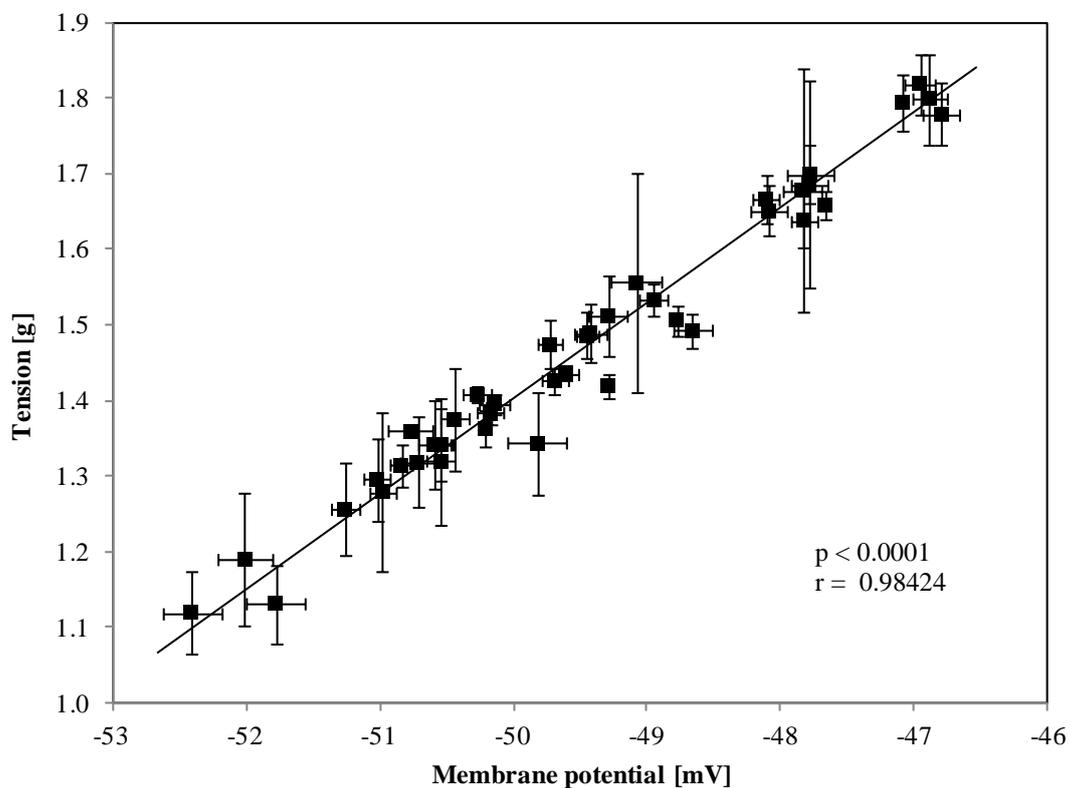


Abb.14. Stationäre Aktivierungskurve Kraftentwicklung vs. Membranpotential für alle Versuchslösungen am glatten Gefäßmuskel menschlicher Koronararterien (Mittelwert \pm SEM).

3.3.2. Chemomechanische Kopplung

Die Relaxation der glatten Muskelzellen der Media geht mit einem Anstieg der Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP einher. Sie können Hinweise darauf liefern, welche Rezeptoren aktiviert wurden. Eine Aktivierung der β -Rezeptoren geht, wie in der Einleitung beschrieben, mit einer Erhöhung der cAMP-Konzentration einher, während α_2 -Rezeptoren diese senken können. Die flussabhängige Dilatation wird über den Botenstoff NO realisiert, der in den Zellen eine Produktion von cGMP und schließlich eine Relaxation auslöst.

Bei einer graphischen Darstellung aller gemittelten Konzentrationen der zyklischen Nukleotide, unabhängig von der benutzten Versuchslösung, zeigte sich im gemessenen Bereich sowohl unter cAMP als auch unter cGMP eine annähernd lineare Beziehung zur Kraft (vgl. Abb. 15A, B).

Ergebnisse

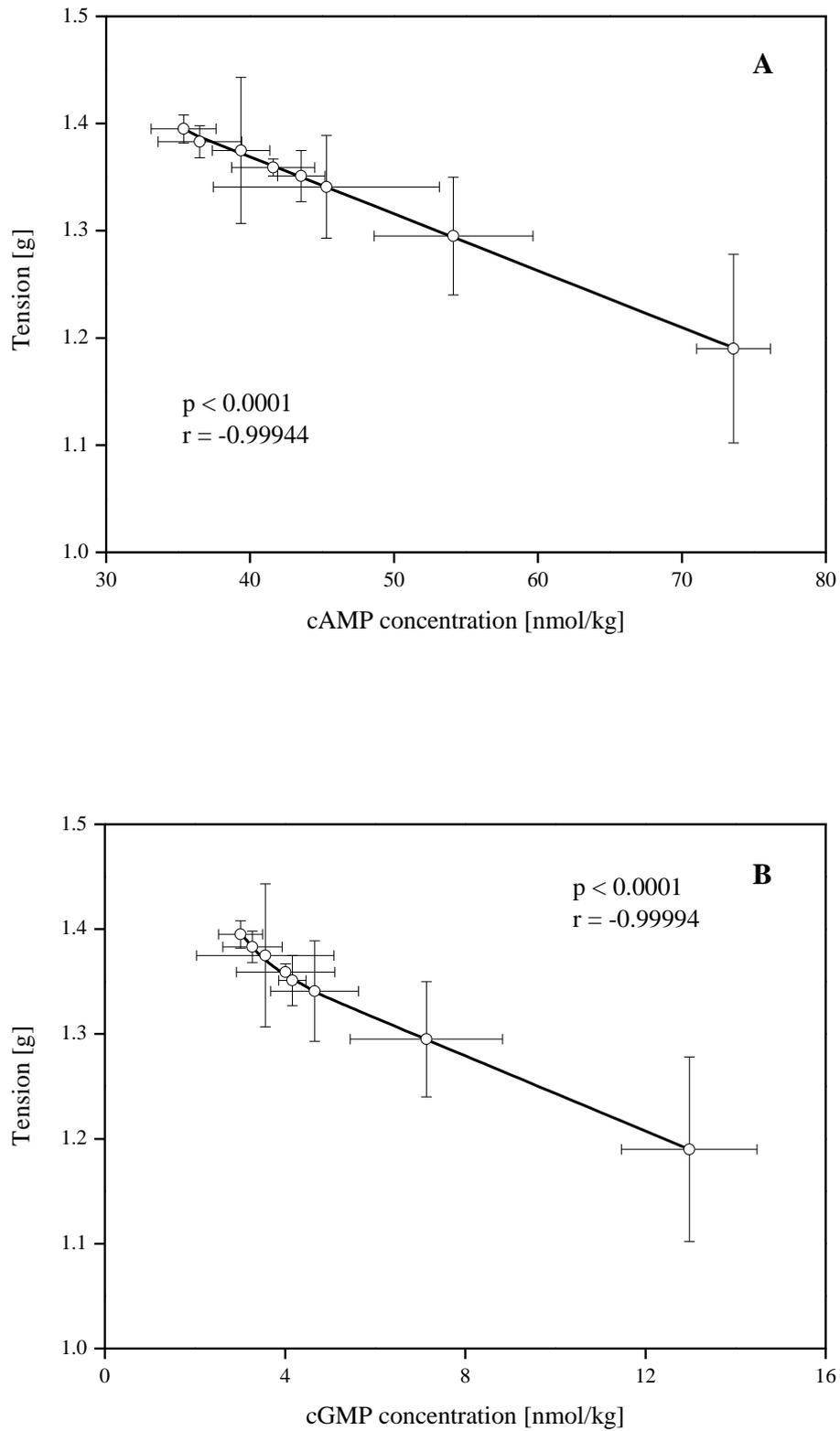


Abb. 15. Chemomechanische Kopplung in Abhängigkeit von der cAMP- (A) und cGMP-Konzentration (B); Mittelwert \pm SEM, n=8.

4. Diskussion

4.1. VLDL und flussabhängige Dilatation

Das Zusammenspiel zwischen Gefäßendothel und im Blut zirkulierenden Lipoproteinen ist Gegenstand aktueller Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Lipoproteinklassen die Endothelfunktion beeinträchtigen und dies bereits vor dem Auftreten von morphologischen Veränderungen [83]. Sie spielen somit schon in der Entstehungsphase von Arteriosklerose eine wichtige Rolle.

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob VLDL einen Teil seiner Wirkung über eine Interaktion mit dem sympathischen Nervensystem entfaltet. Dazu beobachteten wir das Verhalten des koronaren Gefäßtonus in einem flussabhängigen Setting unter VLDL und Adrenorezeptor-Blockern und bestimmten analog dazu den Verlauf des Membranpotentials der glatten Muskelzellen. Diese Messungen ergänzten wir um eine Konzentrationsbestimmung der zyklischen Nukleotide, um ein möglichst umfassendes Bild zu erhalten.

4.1.1. Beeinflussung des Gefäßtonus und Membranpotentials durch VLDL

Mehrfach konnte in Studien gezeigt werden, dass Hypertriglyzeridämie einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose darstellt [2, 72]. Sie beeinträchtigt die endotheliale Funktion und setzt die flussabhängige Dilatation herab [95, 102].

Bei Hypercholesterinämie entfaltet das oxidierte LDL seine proatherogene Wirkung über eine Störung der Permeabilität der Endothelzellen und ihre verminderte Produktion von vasorelaxierenden Substanzen wie NO und PGI₂. Lewis et al. zeigten jedoch 1999, dass die Störung der NO-Produktion nicht allein LDL vorbehalten ist; auch hohe Konzentrationen von VLDL beeinflussen die endothelvermittelte Dilatation. Bei ihren Versuchen verglichen sie die *in vivo* durch Vasorelaxantien wie Acetylcholin hervorgerufene Dilatation mit der endothelunabhängigen, NO-vermittelten Relaxation [56]. Doi et al. konnten dieses Ergebnis im Tiermodell nicht reproduzieren, fanden jedoch eine starke vasokonstriktive Wirkung von VLDL-remnants [28]. Kugiyama und sein Team bestätigten diesen Befund bei der Messung des Gefäßdurchmessers und der Flussgeschwindigkeit in Koronarien, die durch VLDL-remnants unabhängig von anderen Faktoren herabgesetzt wurden [51].

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von physiologischen Konzentrationen von VLDL (30 mg/dL) auf den Gefäßtonus untersucht. In Hinsicht auf klinische Relevanz entschieden wir uns für eine Untersuchung menschlicher Koronararterien aus explantierten Herzen. Die *in vitro* Messung hat gegenüber *in vivo* Versuchen den Vorteil einer genaueren Kraftmessung und

genaueren Regulierung von verschiedenen Flussraten. Während in *in vivo* Experimenten der Fluss nur durch das einmalige Schließen und anschließende Öffnen, z.B. einer Blutdruckmanschette reguliert wurde, lässt sich *in vitro* die Flussgeschwindigkeit schrittweise und für einen längeren Zeitraum (in der vorliegenden Arbeit für je 10 min) ändern. Zudem führt die Methode mit der Manschette zum Teil zu unphysiologisch hohen Flussraten von bis zu 700 mL/min [101]. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden arterielle Gefäßstreifen mechanisch auf einen Tonus von 2 g vorgedehnt, der als optimal für das Erreichen einer maximalen Kontraktion angesehen wird [99] und nach dem LaPlace-Gesetz einem mittleren arteriellen Blutdruck von 100 mmHg entspricht [100]. Auf eine pharmakologische Beeinflussung durch konstriktive oder dilatatorische Substanzen wurde verzichtet, um intrazelluläre Signalkaskaden möglichst unbeeinträchtigt zu lassen.

Die Koronararterien zeigten bereits bei einer physiologischen VLDL-Konzentration von 30 mg/dL eine um 15,3% reduzierte flussabhängige Nettorelaxation (T_3-T_{100}) im Vergleich zu reiner Krebslösung. Insbesondere ab Flussraten von 40 mL/min konnten die Gefäße unter VLDL nicht mehr so effektiv relaxieren wie die unter Krebslösung. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Berichten anderer Studien, die von einer Reduktion der flussabhängigen Dilatation in der *Arteria brachialis* unter postprandial erhöhten VLDL-Werten berichteten [1, 74, 101] und deutet darüber hinaus daraufhin, dass schon physiologische Konzentrationen von VLDL zu einer Einschränkung der endothelialen Funktion führen können.

Der analoge Verlauf des Membranpotentials bestätigt die Kraftentwicklung und die hohe Messgenauigkeit der Versuche. Unter VLDL-Lösung hyperpolarisierten die Präparate im Mittel von $-49,1 \pm 0,2$ auf $-52,0 \pm 0,2$ mV; in Krebslösung fiel das Potential von $-47,1 \pm 0,2$ auf $-50,2 \pm 0,2$ mV. Die Nettohyperpolarisation zeigte sich wie schon die Nettorelaxation unter VLDL mit $-2,9$ mV im Vergleich zu $-3,1$ mV in Krebs eingeschränkt.

In unserer Arbeitsgruppe konnte im Vergleich zwischen deendothelialisierten und Präparaten mit Endothel bereits gezeigt werden, dass die Relaxation endothelabhängig ist: Während bei intaktem Endothel die flussabhängige Relaxation unter VLDL signifikant eingeschränkt war, verschwand dieser Effekt nach Entfernung des Endothels [81].

4.1.2. Beeinflussung der Konzentration der zyklischen Nukleotide durch VLDL

Im Blut zirkulierende Botenstoffe entfalten ihre Wirkung auf den Tonus der glatten Muskelzelle meist über einen Signalweg, der das Gefäßendothel involviert. Diese Wege bedienen sich z.B. zyklischer Nukleotide wie cAMP und cGMP zur ihrer Signaltransduktion. Dass VLDL in dieses System eingreift, konnte mehrfach gezeigt werden.

Takahashi et al. fanden heraus, dass β -VLDL die NO-Produktion und Anreicherung in mit Interleukin-1 β stimulierten glatten Gefäßmuskelzellen fördert [97]. Sie führten diesen Effekt auf eine erhöhte Expression der induzierbaren NO-Synthase zurück. Neben seiner Wirkung auf den Gefäßtonus ist NO auch in die Regulierung der Apoptose mit einbezogen; in niedrigen Konzentrationen hemmt es die Apoptose der Endothelzellen, bei hohen Spiegel wirkt es jedoch zytotoxisch [80]. Zusätzlich wirkt das NO, das von der induzierbaren und nicht von der endothelialen NO-Synthase produziert wird, proatherogen [9], sodass die in unserer Arbeitsgruppe in anderen Arbeiten bereits gemessenen hohen basalen cGMP-Spiegel auch im Sinne einer bereits unter physiologischen Konzentrationen bestehenden proatherogenen Wirkung von VLDL interpretiert werden können [81].

Andere Studien, wie die von Minami et al. zeigten jedoch eine Inhibition der NO-Produktion durch Triglyzeride, die den Hauptbestandteil von VLDL bilden. Untersucht wurde die Produktion von NO in der Zellkultur nach Gabe von Endothelin-3. Unter TAG fiel der Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ deutlich geringer aus, die calciumabhängige NO-Synthase konnte nicht so stark aktiviert werden und die NO-Produktion nahm ab [61].

Für diese Arbeit war die basale, flussunabhängige Wirkung von VLDL auf die cGMP-Konzentration von untergeordneter Bedeutung für die Fragestellung, so dass auf ihre Bestimmung verzichtet wurde. Stattdessen untersuchten wir das Verhalten der cGMP-Konzentrationen unter VLDL bei einem Fluss von 100 mL/min und seine mögliche Beeinflussung durch die Zugabe von Adrenorezeptorblockern. Insgesamt zeigte VLDL die höchste Konzentration von cAMP ($73,57 \pm 2,56$ nmol/kg) und cGMP ($12,97 \pm 1,51$ nmol/kg), vereinbar mit dem im Vergleich zu allen Versuchslösungen geringsten Gefäßtonus bei 100 mL/min von $1,190 \pm 0,088$ g. Da wir uns auf eine Messung der zyklischen Nukleotide am Ende des Versuches bei 100 mL/min beschränkten (s.o.), lässt diese Arbeit keine Aussagen über eine Nettokonzentrationsänderung zu. Allerdings konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass der cGMP-Anstieg unter VLDL trotz des höheren basalen Wertes um ca. 25% geringer ausfällt als in Krebs [81].

Die insgesamt hohen Konzentrationen von cGMP ließen sich durch eine höhere Viskosität der VLDL-Lösung im Vergleich zur Krebslösung erklären. Diese entfaltet einen höheren *shear stress* auf die Gefäßwand und resultiert damit in einer stärkeren NO-Produktion. Da aber *in vivo* Messungen einen Einfluss von VLDL und TAG auf die NO-Produktion bestätigten [51], obwohl im Blut die Viskosität durch deren Anwesenheit insgesamt nicht beeinflusst wird, kann dies jedoch nicht der allein ausschlaggebende Faktor sein.

Kugiyama et al. zeigten 1998, dass VLDL-remnants in menschlichen Koronararterien *in vivo* die Endothelfunktion störten und die flussabhängige Dilatation verminderten. Sie führten dies auf oxidativ veränderte remnants zurück, die die Endothelzellen empfindlicher für oxidativen Stress machen und so die Bioaktivität von NO herabsetzen. Unterstützt wird diese These von ihrem Befund, dass sich die Reagibilität der Koronarien bei Patienten mit hohen Remnant-Spiegeln nach einer Gabe von Vitamin C, einem potenten Antioxidans, verbesserte [51].

Über den Einfluss von oxidativ veränderten VLDLs können wir auf Grund dieser Arbeit keine Aussage treffen, da eine Oxidation strengstens vermieden wurde (s. 4.4).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit, wie VLDL auf die flussabhängige Dilatation wirkt, bietet die Interaktion mit Flusssensoren auf der Endotheloberfläche. Diese negativ geladenen Makromoleküle wie Heparansulfat-Proteoglykan können Domänen basischer Aminosäurereste von Apolipoproteinen binden und eine intrazelluläre Signaltransduktion hervorrufen [89, 90]. Für LDL konnte gezeigt werden, dass seine Bindung in einer Konformationsänderung des Sensors resultiert, die mit einer Depolarisation der Membran und einer Kontraktion der glatten Muskelzellen einhergeht. Intrazellulär fand sich zudem ein Absinken der cGMP-Konzentration [90]. In ellipsometrischen Messungen zeigte sich, dass die zu Beginn einer Arteriosklerose entstehenden Nanoplaques aus Lipoproteinanteilen, dem Flusssensor Heparansulfat-Proteoglykan und Calcium bestehen. Für LDL konnte zudem eine vermehrte Bildung dieser Nanoplaques nachgewiesen werden. Eine Interaktion von VLDL mit Heparansulfat-Proteoglykan ist naheliegend auf Grund des ähnlichen Apolipoproteinbesatzes von LDL und VLDL. Die Bindung von VLDL an den Flusssensor könnte diesen ebenso wie LDL blockieren und die Weiterleitung des *shear stress*-Signals verhindern, sodass die flussabhängige Dilatation herabgesetzt wird.

4.2. Auswirkungen der Antagonisierung von Adrenorezeptoren

4.2.1. Intrinsische Aktivität der Adrenorezeptor-Blocker

Die Auswirkung der Blockade adrenerger Rezeptoren, auf ihre Verteilung und den Wirkmechanismus sind Gegenstand zahlreicher *in vitro* und *in vivo* Studien. Allerdings sind die Studien sehr heterogen und liefern unterschiedliche Ergebnisse. Sie sind nur teilweise an menschlichen Gefäßen durchgeführt, oft aber in tierischen Modellen wie Hund [20, 31, 43, 50, 57, 59, 99], Schwein [14, 37, 52], Kalb [104], Affe [99], Kaninchen [3], Hamster [22], Ratte [3, 21] oder Meerschweinchen [3]. Sie unterscheiden sich in den Untersuchungsmethoden, in den für die Studie benutzten Blockern und in weiteren zugesetzten vasoaktiven Substanzen wie Acetylcholin.

β -Blocker haben zum Teil verschiedene Sensitivitäten oder Spezifitäten zu bestimmten Rezeptorsubtypen, die sich in ihrer Verteilung und Wirkung unterscheiden. Sie können überwiegend auf β_1 wirken (sog. kardioselektive β -Blocker, z.B. Metoprolol) oder zugleich den α -Rezeptor blockieren [77]. Weiterhin unterscheiden sie sich in ihrer intrinsischen sympathomimetischen Aktivität, also der Fähigkeit, ganz oder teilweise als Agonisten an einem Rezeptor zu agieren, und ihrer Pharmakokinetik. Einige Blocker (wie z.B. Propanolol) können Membranen stabilisieren, was jedoch keine klinische Bedeutung zu haben scheint [60, 77].

Colantuoni et al. konnten 1984 in Hamsterhaut *in vivo* zeigen, dass Propanolol die Vasomotion förderte, während es den Gefäßdurchmesser nicht beeinträchtigte. Phentolamin hingegen, reduzierte die Vasomotion, ging aber mit einer signifikanten Dilatation einher [22]. Da diese Versuche *in vivo* stattfanden und die Blocker eine Bindung der im Blut zirkulierenden Substanzen wie der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin verhinderten, gibt die Studie nur bedingt Hinweise auf eine *in vitro* Situation. In unserem Versuchsaufbau sollte durch die mehrstündige Äquilibration der Einfluss von Katecholaminen gering sein, wobei ein Vorhandensein von Noradrenalin in sympathischen Nervenendigungen nicht auszuschließen ist.

In der vorliegenden Arbeit zeigte der gemessene Gefäßtonus in Krebslösung mit Adrenorezeptor-Blocker, unabhängig davon, ob es sich um α -, β - oder α/β -Blockade handelte, keinen signifikanten Unterschied zu reiner Krebslösung. Dieses Ergebnis bestätigte sich bei den Konzentrationsmessungen der zyklischen Nukleotide, die sich ebenfalls nicht signifikant zwischen Krebs und Krebs mit adenergen Blockern unterschied. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Adrenorezeptorblocker keinen intrinsischen Effekt auf die flussabhängige Dilatation menschlicher Koronararterien haben. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Studien, die keine intrinsische Aktivität von Propanolol am β -Rezeptor feststellen konnten [60, 68].

4.2.2. Kombinierte Blockade des α - und β -Adrenorezeptors

Die Zugabe von 30 mg/dL VLDL zur Krebslösung zeigte eine im Mittel 15,3%ige Reduktion der flussabhängigen Netterelaxation im Sinne einer relativen Kontraktion. Um einen möglichen Effekt von VLDL über sympathische Rezeptoren zu detektieren, wurde untersucht, ob die Zugabe von α - und β -Blockern den gesamten Effekt von VLDL (inkl. des Effektes über die sympathischen Rezeptoren) vermindert.

Tatsächlich zeigte sich, dass eine Blockade beider Rezeptoren den gesamten VLDL-Effekt über alle Flussraten *im Mittel* um $64,7 \pm 6,0\%$ reduziert. Da wir bereits zeigen konnten, dass die Blocker an sich in reiner Krebslösung keinen intrinsischen Effekt haben, schließen wir daraus, dass etwa 65% des gesamten VLDL-Effektes über eine Interaktion mit sympathischen Rezeptoren

zustande kommt. Da eine adrenerge Blockade diese Wirkung einschränken kann, scheint VLDL über die gleiche Bindungsstelle wie die Blocker zu wirken.

Der Verlauf der Membranpotentiale der glatten Muskelzellen unter kombinierter Blockade verhielt sich analog zur Kraftwicklung und zeigte eine große Nähe zu den Werten unter alleiniger α -Blockade. Die Präparate unter VLDL mit kombinierter Blockade hyperpolarisierten im Mittel von -47,8 auf -50,5 mV. Die Konzentration von cAMP war unter kombinierter α/β -Blockade im Vergleich zu reiner VLDL-Lösung um 38,5% reduziert, die von cGMP sogar um 64,0%. Dieses Verhältnis spiegelt den höheren mittleren Gefäßtonus von $1,341 \pm 0,048$ g bei einem Fluss von 100 mL/min im Vergleich zu reiner VLDL-Lösung wieder ($1,190 \pm 0,088$ g). Da in dieser Studie keine flussunabhängige Konzentration gemessen wurde, lässt sich keine Aussage dazu treffen, ob eine adrenerge Blockade die Nettokonzentrationsänderung der zyklischen Nukleotide verändert. Da jedoch alle cAMP- und cGMP-Konzentrationen mit den dazugehörigen Tonuswerten bei 100 mL/min auf einer Geraden lagen, liegt die Vermutung nahe, dass dies der Fall ist. Eine weitere Studie mit flussunabhängigen Konzentrationen ist für die Untermauerung dieser Vermutung angezeigt.

4.2.3. Blockade des α -Adrenorezeptors

In dieser Arbeit wurde der nichtselektive α -Blocker Phentolamin in einer Konzentration von 10^{-4} mmol/L verwendet, der auf präsynaptische α_1 - und postsynaptische α_2 -Rezeptoren wirkt. Versuche mit selektiven α -Blockern zeigten, dass über beide Subtypen eine Vasokonstriktion vermittelt wird [6]. Eine Blockade des α -Rezeptors *in vivo* geht dementsprechend mit einer über den β -Rezeptor vermittelten Relaxation einher. Wir untersuchten durch Zugabe von 30 mg/dL VLDL, ob diese mit der β -Rezeptor-vermittelten Relaxation interagiert.

Es zeigte sich, dass VLDL mit α -Blocker einen ähnlichen Kurvenverlauf wie unter gleichzeitiger Blockade beider adrenerger Rezeptoren aufwies. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass VLDL einen größeren Einfluss auf den α - als auf den β -Rezeptor entfaltet. Untersuchte man die Auswirkung einer α -Blockade auf den gesamten VLDL-Effekt (inkl. der Wirkung auf adrenerge Rezeptoren), so stellte man eine Reduktion um im Mittel von $67,6 \pm 10,4\%$ fest.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Wirkung von VLDL auf Rezeptoren des sympathischen Nervensystems zum größten Teil über eine Beeinflussung des α -Rezeptors geschieht. Da VLDL die Nettoerelaxation im Sinne einer relativen Kontraktion herabsetzt, lässt sich der Effekt über eine Stimulation von α -Rezeptoren erklären.

Eine α -Blockade in VLDL-Lösung schränkte die Produktion der zyklischen Nukleotide im Vergleich zu reiner VLDL-Lösung um 46,5% (cAMP) bzw. 72,5% (cGMP) ein. Diese Werte

sind vergleichbar mit der Reduktion unter kombinierter adrenerger Blockade. Die geringere cAMP-Konzentration ließe sich über eine Stimulation des α_2 -Rezeptors erklären, der über ein G_i -Protein zu einer Inhibition der Adenylatzyklase führt. Die ebenfalls stark verminderte cGMP-Konzentration lässt sich möglicherweise durch eine Kreuzreaktion mit dem cAMP-Signalweg oder eine Wechselwirkung mit der NO-Synthase erklären.

Diese Arbeit lässt keine Rückschlüsse auf den genauen Wirkmechanismus oder die Wirkung auf unterschiedliche α -Subtypen zu. Ebenfalls bleibt unklar, wie sich diese VLDL-Wirkung im Zusammenspiel mit anderen vasoaktiven Substanzen verhält und ob sich die Ergebnisse in *in vivo* Studien reproduzieren lassen. Hier bleibt noch viel Raum für weitere Studien.

4.2.4. Blockade des β -Adrenorezeptors

Für eine Inhibition der β -Rezeptoren verwendeten wir in dieser Studie den unselektiven β -Blocker Propranolol in einer Konzentration von 10^{-4} mmol/L. Eine Blockade der β -Rezeptoren kann einerseits ihren vasodilatatorischen Effekt einschränken und andererseits zu einer über α -Rezeptoren vermittelten Vasokonstriktion führen. Wir untersuchten, ob VLDL in physiologischen Konzentrationen einen Teil seiner Wirkung über eine Interaktion mit dem β -Rezeptor entwickelt.

Tatsächlich zeigte sich unter VLDL mit β -Blockern eine Reduktion der gesamten VLDL-Wirkung (inkl. adrenerger Blockade) um $48,8 \pm 3,6\%$. Sie fiel damit geringer aus als eine kombinierte α/β - oder eine alleinige α -Blockade.

Da VLDL die flussabhängige Nettorelaxation im Vergleich zu Krebs einschränkte, kann seine konstriktorische Wirkung im Hinblick auf die β -Rezeptoren durch eine Inhibition derselben erklärt werden. Die Konzentration der zyklischen Nukleotide war im Vergleich zu reiner VLDL-Lösung eingeschränkt, wenn auch nicht so stark wie unter α - oder kombinierter α/β -Blockade. Die cAMP-Konzentration war bei einem Fluss von 100 mL/min um 26,4 % erniedrigt, die von cGMP um 44,7%.

Da der β -Rezeptor über eine erhöhte cAMP-Produktion eine Vasorelaxation bewirkt, scheint eine Reduktion der cAMP-Produktion bei einer inhibierenden Wirkung des VLDL auf den β -Rezeptor logisch. Die ebenfalls erniedrigte cGMP-Konzentration macht eine Interaktion der beiden Signalwege wahrscheinlich, lässt sich jedoch in dieser Arbeit nicht endgültig klären.

Wie schon unter α -Blockade bleibt auch hier der genaue Wirkmechanismus, die Wirkung auf verschiedene β -Subtypen und das Zusammenspiel mit anderen vasoaktiven Substanzen ungeklärt. Zudem sollte die VLDL-Wirkung auf β -Rezeptoren in *in vivo* Studien weiterführend untersucht werden.

4.3. Betrachtung des Gesamtmodells

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Gefäßtonus und Membranpotential unter Krebs- und VLDL-Lösungen einen zueinander analogen Kurvenverlauf aufweisen. Alle Lösungen zeigten eine flussabhängige Dilatation und eine damit einhergehende Hyperpolarisation der Membran der glatten Muskelzellen.

Trug man alle Tonuswerte, unabhängig von der Versuchslösung, mit ihrem zugehörigen Potential gegeneinander auf, zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen -53 und -46 mV (s. Abb.15). Das spricht einerseits für eine sehr genaue Messung und andererseits für eine intakte und enge elektromechanische Kopplung in diesem Bereich [87]. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Hyperpolarisation von 2,5 mV mit einer Relaxation von bis zu 50% einhergeht [85]. Sie kommt durch ein vermehrtes Schließen von Ca^{2+} - und vermehrtes Öffnen von K^{+} -Kanälen zustande, durch die K^{+} aus der Zelle ausströmt [87, 85]. Die zyklischen Nukleotide können an eben diesem Punkt in die Elektrophysiologie eingreifen, in dem sie die Öffnungswahrscheinlichkeit von K^{+} -Kanälen erhöhen [85].

Demnach verhielten sich die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide im Verhältnis zum Gefäßtonus ähnlich dem Membranpotential. Stellte man alle cAMP- bzw. cGMP-Konzentrationen unabhängig von der Versuchslösung mit dem dazugehörigen Tonuswert bei 100 mL/min graphisch dar, zeigte sich bei beiden zyklischen Nukleotiden eine lineare Korrelation im gemessenen Tonusbereich zwischen 1,1 und 1,4 g. Das spricht einerseits für eine hohe Messgenauigkeit der Versuche und andererseits für ein intaktes, vitales System mit einer engen chemomechanischen Kopplung im gemessenen Kraftbereich. Die cGMP-Kurve zeigt anders als die cAMP-Kurve im Bereich um 1,3 g eine Abflachung. Diese Beobachtung ist gut mit vorherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe vereinbar, die von einem sigmoiden Kurvenverlauf unter cGMP berichten [81].

4.4. Limitationen

Das Studiendesign mit Gefäßpräparaten menschlicher Koronararterien aus explantierten Herzen machte es auf Grund der begrenzten Transplantationszahlen nötig, möglichst alle Patienten einzuschließen, unabhängig von ihrem Alter, Vorerkrankungen oder Vormedikation.

Der relativen Seltenheit der Transplantationen ist das kleine Patientenkollektiv von insgesamt 23 Probanden der gesamten Studie bzw. 16 in dieser Arbeit geschuldet. Die zusätzliche Heterogenität der Gruppe bleibt zudem zu berücksichtigen.

Um den Einfluss der verschiedenen Confounder möglichst gering zu halten, wurde an jedem Gefäß neben den Fettversuchen auch ein Kontrollversuch mit reiner Krebslösung durchgeführt.

Eine Normierung der jeweiligen Ergebnisse auf den Kontrollversuch dürfte den Einfluss der verschiedenen Störfaktoren gering halten.

Als wichtige Confounder gelten das Patientenalter und -geschlecht. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass das Alter und Geschlecht einen Einfluss auf Endothelfunktion und Entwicklung einer koronaren Arteriosklerose haben [39, 92, 98]. Der Einfluss dieser Faktoren sollte auf Grund der Normierung auf den Kontrollversuch im selben Gefäß einerseits gering sein, andererseits ist eine Auswertung unserer Daten nach Alter und Geschlecht auf Grund der geringen Fallzahl von $n=6$ in der Interventionsgruppe mit VLDL nicht aussagekräftig genug. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen sind hier sicherlich angezeigt.

Die Beeinträchtigung der Endothelfunktion durch Arteriosklerose konnte mehrfach bestätigt werden [33, 47, 66, 86]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die α_1 -vermittelte Vasokonstriktion in arteriosklerotischen Gefäßen stärker ausgeprägt ist, während die β -vermittelte Vasodilatation herabgesetzt wird [4, 94]. Deshalb wurde bei der Präparation strengstens darauf geachtet, Bereiche der Koronarien für die Versuche zu verwenden, die makroskopisch frei von Arteriosklerose waren. Das Vorhandensein von arteriosklerotischen Veränderungen im mikroskopischen Bereich und ihr Einfluss auf die flussabhängige Dilatation unter VLDL konnte in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden, soll aber in einem zukünftigen Projekt unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht werden.

Um den möglichen Einfluss einer Vormedikation zu verringern, wurden die Präparate vor Versuchsbeginn über mehrere Stunden äquilibriert. Dies sollte einerseits mögliche Restbestände von Medikamenten und vasoaktiven Substanzen ausschwemmen und andererseits, durch die optimale Versorgung der Gefäße, ein erneutes physiologisches Gleichgewicht in der Ionenverteilung und dem Rezeptorbesatz herstellen. Obwohl wir in dieser Arbeit eine Hochregulierung von Adrenorezeptoren durch eine Vormedikation mit Beta-Blockern nicht sicher ausschließen können, wird in der Literatur beschrieben, dass normotensive Patienten keine signifikante Steigerung der Expression unter einer Therapie mit Beta-Blocker aufweisen [29]. Andererseits führt die chronische Stimulation des Sympathikus in Herzinsuffizienzpatienten zu einer Desensitivierung oder Down-Regulierung der Adrenorezeptoren [4, 64], sodass der VLDL-Effekt über den Beta-Rezeptor dadurch beeinflusst worden sein könnte. Um genauere Aussagen über die Anzahl und das Expressionsmuster von Adrenorezeptoren unter Betablocker-Therapie bei Herzinsuffizienzpatienten zu treffen, sind weitere molekulargenetische Studien nötig.

Da auch nach der experimentellen Entfernung des Endothels eine Vasodilatation über β_2 möglich ist, enthalten auch die Membranen der Muskelzellen β -Rezeptoren [5]. Diese sind für β -Blocker von der luminalen Gefäßseite her schlecht zugänglich und könnten in unserem Versuch

möglicherweise einer Blockade entgangen sein. Um diesen Effekt herauszurechnen, wären Versuche mit einer Denudation nötig.

Weiterhin lässt die vorliegende Arbeit keine Rückschlüsse auf die Ansprechrate der verschiedenen Adrenorezeptor-Subtypen zu. Dazu wären weitere Versuche mit selektiven Blockern wünschenswert. Auch der mögliche Einfluss verschiedener genetischer Polymorphismen der Adrenorezeptoren könnte aufgetreten sein und erfordert weitere molekulargenetische Abklärung [64].

Obwohl den Blockern in dieser Arbeit kein intrinsischer Effekt in Krebslösung nachweisbar war, lässt sich eine Wechselwirkung der Substanzen mit VLDL nicht sicher ausschließen. Ob dies der Fall ist, sollte Gegenstand von Interaktionsstudien sein.

Die Möglichkeit, dass verschiedene Adrenorezeptorblockersubstanzen ein unterschiedliches Wirkungsprofil haben könnten, setzt die Vergleichbarkeit dieser Arbeit mit anderen Studien herab. Auch hier wären weitere Studien mit anderen Blockersubstanzen wünschenswert.

Da eine Einschränkung der flussabhängigen Dilatation durch VLDL bereits in physiologischen Konzentrationen messbar ist, lässt sich eine noch größere Wirkung durch erhöhte Spiegel vermuten. Hier bleibt Raum für zukünftige Forschungsvorhaben.

Oxidativer Stress kann die Endothelzellen schädigen [37, 84]. Um dies in der vorliegenden Arbeit gering zu halten, wurden die Koronarien möglichst zügig präpariert und in ein lichtgeschütztes Gefäß mit kalter, carbogenisierter Krebslösung überführt. Der Transport ins Labor erfolgte in maximal 45 min. Anschließend erfolgte eine Äquilibrationsphase in 37°C warmer, mit Carbogen durchperlter Krebslösung für mindestens 2 Stunden. Die Feinpräparation erfolgte unter den gleichen Umständen. Eingespannt wurde das Präparat in einer Kammer mit ebenfalls 37°C warmer, carbogenisierter Krebslösung bei einem Fluss von 3 mL/min.

Auf eine Deendothelialisierung wurde in dieser Arbeit verzichtet, um eine möglichst physiologische Betrachtung des Zusammenspiels zwischen Endothel und glatten Muskelzellen in der Regulation des Gefäßtonus zu ermöglichen. Weiterhin musste die Intaktheit des Endothels für unseren Versuchsaufbau sinnvoll erscheinen, da neben den β_2 -Rezeptoren der glatten Muskelzellen vor allem die auf dem Endothel vorhandenen Subtypen β_1 , β_2 und β_3 für eine Vasodilatation verantwortlich sind [26].

Da wir uns bei dieser Arbeit auf Grund der klinischen Relevanz auf Koronararterien beschränkten, lassen sich nur indirekte Schlüsse auf die Verhältnisse in Widerstandsgefäßen ziehen. Eine Untersuchung in anderen Gefäßen bleibt weiteren Studien überlassen.

Literaturverzeichnis

- [1] Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, et al. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2001;154:475–483.
- [2] Austin MA. Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991;11:2–14.
- [3] Angus JA, Broughton A, Mulvany MJ. Role of α -adrenoreceptors in constrictor responses of rat, guinea-pig and rabbit small arteries to neural activation. *J Physiol* 1988;403:495–510.
- [4] Barbato E, Piscione F, Bartunek J, et al. Role of β_2 adrenergic receptors in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 2005;111:288–294.
- [5] Barbato E. Role of adrenergic receptors in human coronary vasomotion. *Heart* 2009;95:603–608.
- [6] Baumgart D, Heusch G. Neuronal control of coronary blood flow. *Basic Res Cardiol* 1995;90(2):142–159.
- [7] Baumgart D, Haude M, Gorge G, et al. Augmented α -adrenergic constriction of atherosclerotic human coronary arteries. *Circulation* 1999;99:2090–2097.
- [8] Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *Physiology* 1902; 28(3): 220–231.
- [9] Behr-Roussel D, Rupin A, Simonet S, et al. Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor *N*-Iminoethyl-L-Lysine or with L-Arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2000;102:1033–1038.
- [10] Bevan JA, Joyce EH, Wellman GC. Flow-dependent dilation in a resistance artery still occurs after endothelium removal. *Circ Res* 1988;63:980–985.
- [11] Bevan JA, Laher I. Pressure and flow-dependent vascular tone. *FASEB J* 1991;5:2267–2273.
- [12] Breeman C van, Saida K. Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. *Annu Rev Physiol* 1989;51:315–329
- [13] Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(2):682–685.
- [14] Brehm BR, Meergans M, Axel DI, Pfohl M, Heinle H, Karsch KR. Downregulation of β -adrenergic receptors by low density lipoproteins and its prevention by β -adrenergic receptor antagonists. *Cardiovasc Res* 1998;38:522–530.

Literaturverzeichnis

- [15] Britten MB, Zeiher AM, Schächinger V. Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Int Med* 1999;245:315–327.
- [16] Busse R, Trogisch G, Bassenge E. The role of endothelium in the control of vascular tone. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl 1:2–9.
- [17] Busse R, Fleming I, Hecker M. Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *J Biomech* 1995;28(12):1553–60.
- [18] Busse R, Edwards G, et al. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23(8):374–80.
- [19] Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000;184:409–420.
- [20] Chilian WM. Functional distribution of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors in the coronary microcirculation. *Circulation* 1991;84:2108–2122.
- [21] Clarke GL, Bhattacharjee A, Tague SE, Hasan W, Smith PG. β -adrenoceptor blockers increase cardiac sympathetic innervation by inhibiting autoreceptor suppression of axon growth. *J Neurosci* 2010; 30(37):12446–12454.
- [22] Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M. The effects of α - or β -adrenergic receptor agonists and antagonists and calcium entry blockers on the spontaneous vasomotion. *Microvasc Res* 1984;28:143–158.
- [23] Collins S, Bolanowski MA, Caron MG, Lefkowski RJ. Genetic regulation of β -adrenergic receptors. *Annu Rev Physiol* 1989;51:203–215.
- [24] Cox DA, Vita JA, Treasure CB, et al. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989;80:458–465.
- [25] Davies PF, Mundel T, Barbee KA. A mechanism for heterogeneous endothelial responses to flow in vivo and in vitro. *J Biomech* 1995;28(12):1553–60.
- [26] Dessy C, Moniotte S, Ghisdal P, Havaux X, Noirhomme P, Balligand JL. Endothelial β_3 -adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation* 2004;110:948–954.
- [27] Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* 1989;243(4897):1483–1485.
- [28] Doi H, Kugiyama K, Ohgushi M, et al. Remnants of chylomicron and very low density lipoprotein impair endothelium-dependent vasorelaxation. *Atherosclerosis* 1998;137:341–349.
- [29] Dungan JR, Conley YP, Langae TY, et al. Altered β_2 adrenergic receptor gene expression in human clinical hypertension. *Biol Res Nurs* 2009;11(1):17–26.

Literaturverzeichnis

- [30] Ellsworth JL, Kraemer FB, Cooper AD. Transport of β -Very Low Density Lipoproteins and Chylomicron remnants by macrophages is mediated by the Low Density Lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem* 1987;262(5):2316–2325.
- [31] Fan TM, Liang C, Kawashima S, Banerjee S. Alterations in cardiac β -adrenoreceptor responsiveness and adenylate cyclase system by congestive heart failure in dogs. *Eur J Pharm* 1987;140:123–132.
- [32] Fewtrell C. Ca^{2+} oscillations in non-excitabile cells. *Annu Rev Physiol* 1993;55:427–54.
- [33] Förstermann U, Mügge A, Alheid U, Haverich A, Frölich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res* 1988;62:185–190.
- [34] Fiscus RR, Rapoport RM, et al. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced activation of cyclic GMP-dependent protein kinase in rat aorta. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 1983;9(6):415–425.
- [35] Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 1985;227(4693):1477–1479.
- [36] Frielingsdorf J, Seiler C, Kaufmann P, Vassalli G, Suter T, Hess OM. Normalization of abnormal coronary vasomotion by calcium antagonists in patients with hypertension. *Circulation* 1996;93(7):1380–1387.
- [37] Fukuda S, Toriumi T, Xu H, et al. Enhanced β -receptor-mediated vasorelaxation in hypoxic porcine coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;277:H1447–H1452.
- [38] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* 1980;288(5789):373–376.
- [39] Han SH, Bae JH, Holmes Jr DR, et al. Sex differences in atheroma burden and endothelial function in patients with early coronary atherosclerosis. *Eur Heart J* 2008;29:1359–1369.
- [40] Harder DR, Gilbert R, Lombard JH. Vascular muscle cell depolarization and activation in renal arteries on elevation of transmural pressure. *Am J Physiol Renal Physiol* 1987;253:F778–F781.
- [41] Hirst GDS, Edwards FR. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev* 1989;69(2):546–604.
- [42] Hodgson JM, Cohen MD, Szentpetery S, Thames MD. Effects of regional alpha- and beta-blockade on resting and hyperemic coronary blood flow in conscious, unstressed humans. *Circulation* 1989;79:797–809.
- [43] Holtz J. Alpha-adrenoceptor subtypes in the coronary circulation. *Basic Res Cardiol* 1990;85 Suppl 1:81–95.

Literaturverzeichnis

- [44] Hoyer J. Endothelial vasoregulation and mechanosensitive ion channels in hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12(1):6–8.
- [45] Hsieh HJ, Li NQ, Frangos JA. Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mRNA levels. *Am J Physiol* 1991;260(2 Pt 2):H642–6.
- [46] Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: Use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244(1):181–189.
- [47] Indolfi C, Piscione F, Villari B, et al. Role of alpha 2-adrenoceptors in normal and atherosclerotic human coronary circulation. *Circulation* 1992;86:1116–1124.
- [48] Jie K, Van Brummelen P, Vermey P, Timmermans PB, Van Zwieten PA. Postsynaptic alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in human blood vessels: interactions with exogenous and endogenous catecholamines. *Eur J Clin Invest* 1987;17(2):174–81.
- [49] Kiowski W, Hulthén UL, Ritz R, Bühler FR. Alpha 2 adrenoceptor-mediated vasoconstriction of arteries. *Clin Pharmacol Ther* 1983;34(5):565–569.
- [50] Kiuchi K, Sato N, Shannon RP, Vatner DE, Morgan K, Vatner SF. Depressed beta-adrenergic receptor- and endothelium-mediated vasodilation in conscious dogs with heart failure. *Circ Res* 1993;73:1013–1023.
- [51] Kugiyama K, Doi H, Motoyama T, et al. Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation* 1998;97:2519–2526.
- [52] Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1990;259:H1063–H1070.
- [53] Ledoux J, Werner ME, et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* 2006;21:69–78.
- [54] Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic Receptors. *J Biol Chem* 1988;263(11):4993–4996.
- [55] Levesque MJ, Nerem RM. The study of rheological effects on vascular endothelial cells in culture. *Biorheology* 1989;26(2):345–57.
- [56] Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JPF. Endothelium-dependent relaxation by acetylcholine is impaired in hypertriglyceridemic humans with normal levels of plasma LDL cholesterol. *J Am Coll Cardiol* 1999;33(3):805–12.
- [57] Liang CS, Frantz RP, Suematsu M, et al. Chronic beta-adrenoceptor blockade prevents the development of beta-adrenergic subsensitivity in experimental right-sided congestive heart failure in dogs. *Circulation* 1991;84:254–266.

Literaturverzeichnis

- [58] MacArthur JM, Bishop JR, Stanford KI, et al. Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest* 2007;117:153–164.
- [59] Mark AL, Abboud FM, Schmid PG, Heistad DD, May HE. Differences in direct effects of adrenergic stimuli on coronary, cutaneous, and muscular vessels. *J Clin Invest* 1972;51:279–287.
- [60] McDevitt DG. Pharmacological characteristics of β blockers and their role in clinical practice. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;8 Suppl 6:5–11.
- [61] Minami M, Yokokawa K, Kohno M, Yasunari K, Yoshikawa J. Suppression of endothelin-3-induced nitric oxide synthesis by triglyceride in human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31 Suppl 1:467-479.
- [62] Mulvany MJ, Aalkjær C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 1990;70(4):921-961.
- [63] Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P. Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: An endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1990;16(2):349-356.
- [64] Naber CK, Baumgart D, Heusch G, et al. Role of the eNOS Glu²⁹⁸ Asp variant on the GNB3825T allele dependent determination of α -adrenergic coronary constriction. *Pharmacogenetics* 2003;13:279–284.
- [65] Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol Cell Physiol* 1990;259:C3–C18.
- [66] Newton GE, Azevedo ER, Parker JD. Inotropic and sympathetic responses to the intra-coronary infusion of a β_2 -receptor agonist : A human in vivo study. *Circulation* 1999;99:2402–2407.
- [67] Ngai PK, Walsh MP. The effects of phosphorylation of smooth-muscle caldesmon. *Biochem J* 1987;244:417–425.
- [68] Nies AS, Shand DG. Clinical pharmacology of propranolol. *Circulation* 1975;52:6–15.
- [69] Oka K, Ishimufu-Oka K, Chu MJ, et al. Mouse very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) cDNA cloning, tissue-specific expression and evolutionary relationship with the low-density-lipoprotein receptor. *Eur J Biochem* 1994;224:975–982.
- [70] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium relaxing factor. *Nature* 1987;327:524–526.
- [71] Parkinson NA, Hughes AD. The mechanism of action of α_2 -adrenoceptors in human isolated subcutaneous resistance arteries. *Br J Pharmacol* 1995;115:1463–1468.

Literaturverzeichnis

- [72] Patsch JR, Miesenböck G, Hopferwieser T, et al. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992;12:1336–1345.
- [73] Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation* 1993;88:2762–2770.
- [74] Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA* 1997;278:1682–1686.
- [75] Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986;8:37–44.
- [76] Pohl U, Herlan K, Huang A, Bassenge E. EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991;261:H2016–H2023.
- [77] Prichard BNC, Tomlinson B. The additional properties of beta adrenoreceptor blocking drugs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;8 Suppl 4:1–15.
- [78] Rapoport RM, Draznin MB, et al. Endothelium-dependent vasodilator and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Trans Assoc Am Physicians* 1983;96:19-30.
- [79] Ruzycky AL, Morgan KG. Involvement of the protein kinase C system in calcium-force relationships in ferret aorta. *Br J Pharmacol* 1989;97:391–400.
- [80] Sata M, Kakoki M, Nagata D, et al. Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension* 2000;36:83–88.
- [81] Schlangen J. Die Wirkung von VLDL-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation an Koronararterien des Menschen. Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, 2010.
- [82] Schretzenmayr A. Über kreislaufregulatorische Vorgänge an den großen Arterien bei der Muskelarbeit. *Eur J Physiol* 1933;232(1):743–748.
- [83] Seiler C, Hess OM, Buechi M, Suter TM, Krayenbuehl HP. Influence of serum cholesterol and other coronary risk factors on vasomotion of angiographically normal coronary arteries. *Circulation* 1993;88:2139–2148.
- [84] Siegel G, Rückborn K, Schnalke F, Grote J. Membrane physiological reactions of human arteriosclerotic coronary arteries to hypoxia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20 Suppl 12:217–20.

Literaturverzeichnis

- [85] Siegel G, Emden J, Wenzel K, Mironneau J, Stock G. Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* 1992;311:53–72.
- [86] Siegel G, Rückborn K, Schnalke F, Müller J. Endothelial dysfunction in human atherosclerotic coronary arteries. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl I:99–103.
- [87] Siegel G. Vascular Smooth Muscle. In: Greger R, Windhorst U (eds). *Comprehensive Human Physiology*. 2. Auflage. Berlin Heidelberg, Springer Verlag, 1996:1941–1964.
- [88] Siegel G, Walter A, Kauschmann A, Malmsten M, Buddecke E. Anionic biopolymers as blood flow sensors. *Biosensors & Bioelectronics* 1996;11(3):281–294.
- [89] Siegel G, Malmsten M, Klüßendorf D, Leonhardt W. Physicochemical binding properties of the proteoglycan receptor for serum lipoproteins. *Atherosclerosis* 1999;144:59–67.
- [90] Siegel G, Rodríguez M, Schön T, et al. Blood flow sensor susceptibility to lipoproteins in early arteriosclerosis and its clinical improvement by statin therapy —a nanoplaque study. *Desalination* 2006;191:417–425.
- [91] Silbernagel S, Despopoulos A (eds). *Taschenatlas Physiologie*. 7. Auflage. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2007:58–281.
- [92] Simonsen AH, Sheykhzade M, Nyborg NCB. Age- and endothelium-dependent changes in coronary artery reactivity to serotonin and calcium. *Vasc Pharmacol* 2004;41:43–49.
- [93] Sobieszek A. Regulation of smooth muscle myosin light chain kinase. Allosteric effects and co-operative activation by calmodulin. *J Mol Biol* 1991;220:947–957.
- [94] Sun D, Huang A, Mital S, et al. Norepinephrine elicits β_2 -receptor-mediated dilation of isolated human coronary arterioles. *Circulation* 2002;106:550–555.
- [95] Takahashi M, Yui Y, Yasumoto H, et al. Lipoproteins are inhibitors of endothelium dependent relaxation of rabbit aorta. *Am J Physiol* 1990;258:H1–H8.
- [96] Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: A low density receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9252–9256.
- [97] Takahashi M, Takahashi S, Shimpo M, et al. β -very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002;162:307–313.
- [98] Takeuchi K, Zhang B, Ideishi M, et al. Influence of age and hypertension on the association between small artery compliance and coronary artery disease. *Am J Hyperten*. 2004;17(12 Pt 1):1188–91.
- [99] Toda N. Responses of human, monkey and dog coronary arteries *in vitro* to carbocyclic thromboxane A₂ and vasodilators. *Br J Pharmacol* 1984;83:399–408.

Literaturverzeichnis

- [100] Toda N. Alpha-adrenoceptor subtypes and diltiazem actions in isolated human coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1986;250:H718–H724.
- [101] Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1997;79:350–354.
- [102] Watts GF, O'Brien SF, Silvester W, Millar JA. Impaired endothelium-dependent and independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia. *Clin Sci (Lond)* 1996;91(5):567–73.
- [103] Yamamoto T, Hoshino A, Takahashi S, et al. The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE. *Ann NY Acad Sci* 1995;748:217–225.
- [104] Young MA, Vatner DE, Vatner SF. Alpha- and beta-adrenergic control of large coronary arteries in conscious calves. *Basic Res Cardiol* 1990;85 Suppl 1:97–109.
- [105] Zeiher AM, Schächinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 1995;92(5):1094–100.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Janna Lendner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Die Interaktion von VLDL mit adrenergen Rezeptoren bei der flussabhängigen Dilatation an Koronararterien des Menschen“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Hamburg, 30.03.2014

Janna Lendner

Lebenslauf

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

Publikationen

Jumar A, Grün D, **Lendner J**, Krohn S, Zakrzewicz A, Ermilov E, Siegel G: The effect of catecholamines in human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; Abstracts 2011 Sci. Sessions: 219.

Grün D, **Lendner J**, Krohn S, Jumar A, Zakrzewicz A, Ermilov E, Siegel G: Interaction between LDL and sympathetic adrenoreceptors. *Circ. Res.* 2012; 111:A166.

Krohn S, Jumar A, Grün D, **Lendner J**, Zakrzewicz A, Ermilov E, Siegel G: A new perspective on HDL: Potential navigation of blood pressure via adrenoreceptor regulation. *Hypertension* 2012; 60:A526.

Lendner J, Krohn S, Jumar A, Grün D, Zakrzewicz A, Ermilov E, Siegel G: Blood lipoproteins may be implicated in blood pressure regulation. *Circ. Res.* 2013; 113:A111.

Radtke FM, Franck M, **Lendner J**, Krueger S, Wernecke K-D, Spies CD: Monitoring depth of anaesthesia in a randomized trial decreases the rate of postoperative delirium but not postoperative cognitive dysfunction. *Brit. J. Anaesthesia* 2013; 110 (Suppl. 1):98-105.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Günter Siegel für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Promotion am Institut für Physiologie der Charité Berlin. Mit unermüdlicher Begeisterung und großem persönlichen Einsatz hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich nachhaltig für Wissenschaft und Forschung begeistert.

Auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie der Charité möchte ich mich herzlich für ihre langjährige Unterstützung bedanken. Dabei danke ich ganz besonders Frau Angela Becker für ihre Hilfe bei der Versuchsdurchführung und logistischen Organisation. Ihr Sinn für Perfektion, ihre langjährige Berufserfahrung und geduldige Anleitung waren für mich von unschätzbarem Wert. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Eugeny Ermilov und Herrn Prof. Dr. Werner Hopfenmüller für ihre Unterstützung bei der graphischen bzw. statistischen Auswertung der Ergebnisse. Ich danke dem Deutschen Herzzentrum Berlin unter der Leitung von Professor Dr. Roland Hetzer für die Kooperation mit unserem Labor und den Mitarbeitern für ihre geduldige Unterstützung und Hilfe bei der Präparation der Koronararterien zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie der Universität Freiburg unter Leitung von Herrn Professor Dr. Karl Winkler für die Gewinnung der Blutproben und die Isolierung der Lipoproteine.

Ich danke meinen Mitdoktoranden Frau Dr. med. Agnes Jumar, Herrn Daniel Grün und Herrn Stephan Krohn für die Kameradschaft und die gute Zusammenarbeit – wenn nötig auch tief in der Nacht.

Mein besonderer Dank gilt den Patienten des Deutschen Herzzentrums Berlin, die ihr Herz der Forschung zur Verfügung stellten. Ohne sie wäre dieses Projekt unmöglich gewesen.