

## 4 Diskussion

### 4.1 Elektromechanische Kopplung in humanen Koronararterien

Das Ruhemembranpotential der glatten Gefäßmuskelzellen der in diesen Versuchen verwendeten humanen Koronararterien lag bei  $-58,1 \pm 1,1$  mV. Das Membranpotential an glatten Gefäßmuskelzellen ist in erster Hinsicht als passives Ionendiffusionspotential innerhalb des gedacht konstanten Feldes der Zellmembran zu begreifen, das sich mit Hilfe der Goldman-Gleichung aus den relevanten Ionenkonzentrationen und Ionenpermeabilitäten errechnen lässt. Es wird durch aktiven Transport hauptsächlich einer elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten sowie, in weitaus geringerem Anteil, durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die Calciumionen in den Extrazellulärraum und das sarkoplasmatische Retikulum der glatten Muskelzelle schleust.

Die Hauptdeterminante des Tonus glatter Muskelzellen ist die intrazelluläre Calciumkonzentration, deren Wert unter Ruhebedingungen etwa  $2 \times 10^{-7}$  mol/l beträgt. Während einer langdauernden Depolarisation der Zellmembran, weniger auch bei Aktionspotentialen, die in Gefäßmuskelzellen praktisch nicht vorkommen, werden spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle in der Plasmamembran und der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums geöffnet. Calciumionen strömen entlang ihre Kationengradienten in die Zelle und führen zu einer Erhöhung des Calciumangebots für die kontraktilen Elemente und somit zu einer Tonuszunahme der glatten Muskelzelle. Neben dieser elektromechanischen Koppelung zwischen Membranpotential und Tonus spielt die pharmakomechanische Koppelung eine Rolle, bei der die Tonusveränderung potentialunabhängig ist und lediglich von der Wirkung von sekundären Botenstoffen wie Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) abhängt. Während  $\text{IP}_3$  direkt eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit sarkoplasmatischer Calciumkanäle bewirkt, führt DAG calciumunabhängig über die Aktivierung der Proteinkinase C zu einer tonischen Kontraktion.  $\text{IP}_3$  steigert darüber hinaus durch Vermittlung zytosolischer G-Proteine und Tyrosinkinasen die Reaktionsfähigkeit der kontraktilen Proteine gegenüber Calcium im Sinne einer Calciumsensitivierung [135].

Für eine Tonusabnahme glatter Muskelzellen ist die Beendigung der elektrischen Aktivität oder eine Membranrepolarisierung verantwortlich. Weiterhin kann auch eine Hyperpolarisierung der Zellmembran zu einer Relaxation der Gefäßmuskulatur führen.

Unabhängig vom Membranpotential bewirken eine Reihe von Pharmaka, Neurotransmittern und Hormonen über eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration der zyklischen Nucleotide cAMP und cGMP eine erhöhte Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum sowie eine Hemmung der Myosinkinaseaktivität und dadurch eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur.

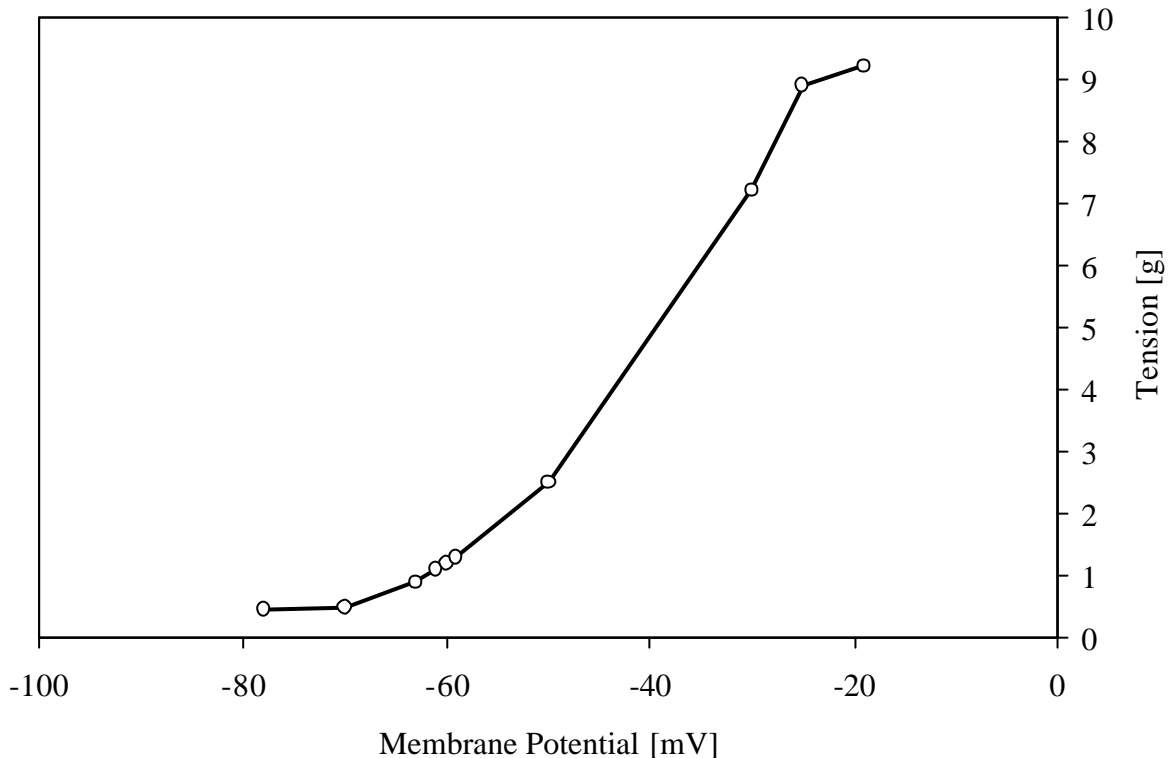


Abb. 15: Stationäre Aktivierungskurve von normalen Koronararterien (Werte zusammengefaßt aus Heparinase-, Chondroitinase-, Trypsin- und Noradrenalinversuchen)

Nach Somlyo und Somlyo werden Prozesse als elektromechanisch gekoppelt bezeichnet, in denen die resultierende Tonusveränderung allein auf die Änderung des Membranpotentials zurückzuführen ist [161]. Abbildung 15 zeigt eine stationäre Aktivierungskurve der Gefäßmuskulatur humaner Koronararterien, in die auch Ergebnisse eigener Experimente aufgenommen wurden, bei denen durch Noradrenalinfreisetzung höhere Tonuswerte erreicht wurden. Neben dem sigmoiden Verlauf der Gesamtkurve zeigt sich hier im Potentialbereich zwischen  $-53$  mV und  $-30$  mV eine Linearität des Kurvenverlaufs, die sich aus einer engen elektromechanischen Kopplung in dem für die Versuche der vorliegenden Arbeit relevanten Meßbereich ergibt. Der Kopplungskoeffizient für die Kontrollkurve kann mit  $0,266$  g/mV ( $3,76$  mV/g) angegeben werden.

Abb. 16 zeigt die elektromechanische Kopplung von in dieser Arbeit verwendeten Präparaten, die in einem engen Bereich um die Kontrollkurve der Abb. 15 liegt.

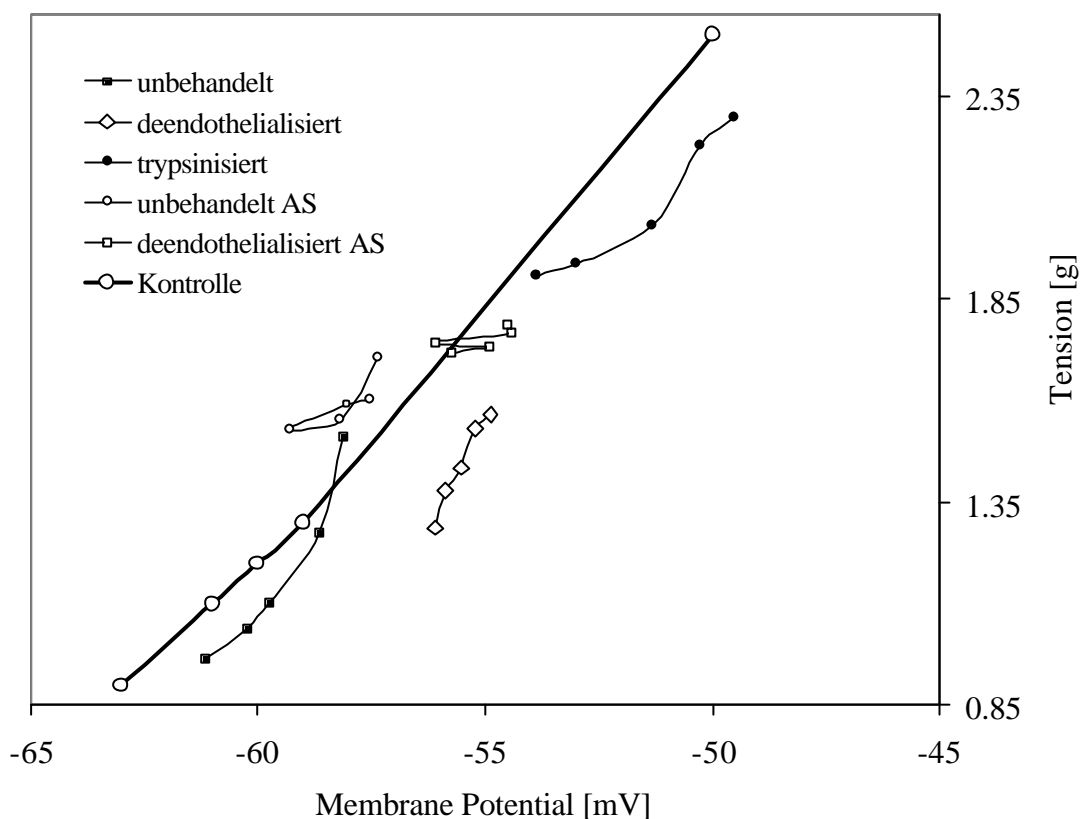


Abb. 16: Elektromechanische Kopplung in unbehandelten, deendothelialisierten und trypsinisierten normalen Präparaten sowie in unbehandelten und deendothelialisierten arteriosklerotischen Präparaten

## 4.2 Trypsinisierung

Trypsin ist ein proteolytisch wirkendes Enzym, das *in vivo* als inaktive Vorstufe im Pankreas aller Säugetiere gebildet und nach Abspaltung eines Hexapeptidrests mittels Enteropeptidase sowie durch bereits vorhandenes Trypsin im Dünndarm aktiviert wird. Als Endopeptidase spaltet es Proteinketten durch Angriff zwischen Arginin und Lysin. Die den hier vorgestellten Experimenten zugrundeliegende *in vitro*-Wirkung kurz einwirkenden, niedrig dosierten Trypsins zerfällt in zwei Einzelaspekte: einerseits die direkte Wirkung auf luminale, endothelständige Proteine, andererseits die Wirkung auf abluminale Proteine der extrazellulären Matrix.

Der Vollständigkeit halber seien zwei weitere Wirkungen von Trypsin auf Gefäßendothel und glatte Muskelzellen erwähnt, die jedoch erst bei weit höheren Dosen auftreten. In

Konzentrationen zwischen 0,125% und 0,25% bewirkt das Enzym eine Destruktion der die Endothelzellen an der Unterlage fixierenden Haftplatten [35], während die Zellen selber intakt bleiben. Aufgrund dieser Wirkung wird Trypsin zur Lösung von Endothelzellen für Zellkulturen eingesetzt. Von diesen Resultaten einer Kurzzeit-Trypsinisierung ist die rezeptorvermittelte Trypsinwirkung auf Endothelzellen abzugrenzen, die bei der hier verwendeten kurzen Einwirkzeit und niedrigen Konzentration jedoch ebenfalls keine Rolle spielt. Trypsin induziert in höheren Dosen von 4-10 nmol/l über proteinase-aktivierte Rezeptoren eine endothelabhängige Vasodilatation, die mit der Freisetzung von EDRF einhergeht [146]. In Dosen von 100 nmol/l wird ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Endothelzellen von Schweinekoronarien beschrieben, der biphasisch eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt, wobei die initiale Phase NO- und EDHF-, die Spätphase nur NO-abhängig ist. Tonusabnahme und intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kehren bereits nach 5 bzw. 10 min auf ihren Ausgangswert zurück [118]. An deendothelialisierten Rattenaortasegmenten bewirkt Trypsin ebenfalls rezeptorabhängig eine Kontraktion der glatten Muskelzellen, die abhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sowie durch Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockers Nifedipin zu 70% aufhebbar war. Dies suggeriert die partielle Vermittlung trypsinabhängiger Vasokonstriktion unter hohen Trypsinkonzentrationen durch eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit glattmuskulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx [99].

#### **4.2.1 Auswirkung in normalen Gefäßen**

Luminal wird durch Trypsin die extrazelluläre Domäne der Syndecan-Proteoglycane der Endothelzellmembran im Bereich der dort vorhandenen dibasischen Sequenz abgespalten. Mit diesem Sensormolekül geht der Primärreiz der flußabhängigen Vasomotorik verloren, und die mechanosensorische Endothelfunktion wird geschwächt. Für die abluminale Wirkung der *in vitro*-Trypsinisierung ist ein parazellulärer Transport anzunehmen, der innerhalb von Sekunden abläuft. Nach Einwirkzeiten von 30 bis 60 Sekunden greift niedrigdosiertes Trypsin Aktinfasern [131], Fibronektin [94] und intrazelluläre Mikrofilamente [57] an und spaltet diese. Darüberhinaus bewirkt die Trypsinisierung eine Auflösung der Bindung der Integrine an Fasern der extrazellulären Matrix über die RGD-Erkennungssequenz. Die extrazelluläre Matrix normaler Gefäße verliert dadurch unter Trypsinbehandlung einen Großteil ihrer integrativen und tonusmodulierenden Kompetenz. Hieraus resultiert eine starke Nettokontraktion.

#### **4.2.2 Auswirkung in arteriosklerotischen Gefäßen**

In arteriosklerotischen Gefäßen führt Trypsinisierung zu einer Netto Relaxation, die ebenfalls einen endothelialen sowie einen Matrixanteil hat. Auf endothelialer Ebene bewirkt Arteriosklerose –neben einer endothelialen Dysfunktion mit erhöhter Empfindlichkeit für konstriktiv wirkende Katecholamine- eine posttranslationale Modifikation der Seitenketten der luminalen Proteoglycane. Bei Syndecan wird in arteriosklerotisch verändertem Endothel das Gleichgewicht zwischen Heparansulfat- und Chondroitinsulfat-Seitenketten zugunsten des konstriktiv wirkenden Chondroitinsulfats verändert [48]. Durch die Ablösung der Syndecan-Ektodomäne unter Trypsin wird die durch Syndecan vermittelte Konstriktion aufgehoben. Auf Matrixebene bewirken erst fortgeschrittene arteriosklerotische Läsionen über eine Überaktivierung der Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 eine Degradation der subendothelialen Basalmembran sowie der Vinculinfasern und Integrine der Haftplatten. Zusätzlich wird durch die Ablagerung von Media-Plaques in fortgeschrittenen Arteriosklerosestadien die tonusmodulierende Kompetenz der Matrix behindert [141,162].

#### **4.3 Deendothelialisierung**

Um die Nettokraftentwicklung unter Trypsin in ihren Sensor- und Matrixanteil aufzutrennen, wurden die Meßergebnisse unter Trypsin mit den Ergebnissen der Deendothelialisierung als Maß für den Endotheleffekt verglichen. Die Deendothelialisierung führte in normalen wie in arteriosklerotischen Gefäßen zu einem Verlust der flußabhängigen Dilatationsfähigkeit. In arteriosklerotischen Gefäßen resultierte eine Kontraktion.

#### **4.4 Mechanosensorik und Mechanotransduktion in normalen Gefäßen**

Bewegt man eine visköse Flüssigkeit parallel zu einer Oberfläche aus verankerten Zellen, entsteht eine Scherkraft, die sich auf die luminalen Oberflächenstrukturen auswirkt und von tensilen Elementen im Cytoskelett dieser Zellen ausbalanciert wird. Diese Elemente geben die Scherkraft an Verankerungsmoleküle auf der abluminalen Seite weiter. Schlußendlich induziert also Scherkraft die Deformation von luminalen, cytoskelettalen und abluminalen Elementen, die gemeinsam ein Muster intrazellulärer Botenstoffe mit der Produktion von NO als gemeinsamer Endstrecke aktivieren. Hier ist die Unterscheidung zwischen luminalen Mechanosensoren, die direkten Kontakt mit dem Flußgeschehen haben und den Impuls der Scherkraft aufnehmen, und Mechanotransduktoren, Elementen der extrazellulären Matrix, die diesen Impuls modulieren und verteilen, sinnvoll.

Wie eingangs beschrieben, ist trotz intensiver Beforschung die Erklärung der Einzelmechanismen der Umsetzung mechanischer Reize durch die endotheliale Oberfläche hindurch auf die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur unter Konzentrationsänderung vasoaktiver Substanzen allenfalls theoretisch geblieben. Aus der Analyse der Reaktionsfähigkeit insbesondere der flußabhängigen Dilatation auf minimale zeitliche und räumliche Veränderungen im Flußgeschehen lassen sich eine Reihe von Anforderungen an potentielle Mechanosensoren und –transduktoren ableiten sowie mögliche Kandidaten nennen, die diesen gerecht werden.

#### **4.4.1 Anforderungen**

Luminale Mechanosensoren müssen innerhalb von Sekunden durch Scherkraft in physiologischer Bandbreite aktiviert werden können, optimal durch eine Konformationsänderung, die zu einem optimierten thermodynamischen Äquilibrium führt, und/ oder durch Veränderung des Massentransports von intraluminale Mediatoren [36,138,168]. Dies muß zur Aktivierung biochemischer Kaskaden führen, die in die Bildung von NO münden, sowie an „Kernereignisse“, wie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, gekoppelt sein [63].

Auch Mechanotransduktoren in der Gefäßwand sollten in der Lage sein, in Antwort auf mechanische Deformation und Auslenkung der Fasern sekundäre Botenstoffe zu generieren. Zusätzlich sollten sie eine funktionelle Assoziation mit Komponenten des Zytoskeletts wie Aktin besitzen, die die auf der Zelloberfläche generierten mechanischen Kräfte fokussieren und weitergeben [180].

#### **4.4.2 Kandidaten**

##### *4.4.2.1 Mechanosensoren*

Den oben genannten Anforderungen entsprechen vier identifizierte Mechanismen: mechanosensitive Ionenkanäle, G-Proteine, endotheliale Caveolae und die Proteoglykane der endothelialen Glycocalix.

- a) Die Leitfähigkeit von mechanosensitiven Ionenkanälen hängt von mechanischen Einflußgrößen wie Druck oder Zug ab; sie kommen in Organen wie dem Innenohr (Labyrinth und Cochlea) sowie in kutanen Mechanosensoren (u.a. Vater-Pacini-Körperchen, Merkel-Zellen) vor und sind dort entscheidend für den Gehör- und Gleichgewichtssinn sowie den Tastsinn verantwortlich. Lansman identifizierte 1987

die ersten nichtselektiven mechanosensitiven Ionenkanäle an der luminalen Seite von Endothelzellen, die durch Saugen per patch-clamp-Sonde aktivierbar waren [102]. 1988 wies Olsen einen shear stress-aktivierten  $K^+$ -Kanal nach, der über eine Hyperpolarisation von Endothelzellen und, per direkter elektrischer Kopplung, von glatten Muskelzellen zur Relaxation letzterer führen sollte. Für diesen Kanal wies er eine Sättigung bei einer Scherkraft von  $17 \text{ dyn/cm}^2$  nach, entsprechend dem bekannten Adaptationsphänomen kutaner Mechanosensoren [123]. Die Aktivierung der eNOS, die Produktion von NO und die scherkraftabhängige Vasodilatation sind durch Perfusion der Zellen mit Kaliumkanalblockern aufhebbar [31,97,122]. Im weiteren Verlauf wurden verschiedene andere mechanosensitive Ionenkanäle nachgewiesen, unter anderem saug-aktivierbare nichtselektive Kationenkanäle auf glatten Gefäßmuskelzellen [40], stretch-aktivierte  $Ca^{2+}$ -Kanäle [26,39], flußaktivierte selektive  $Cl^-$ -Kanäle [6] und ein scherkraftabhängiger  $Na^+$ -Kanal, der die Aktivierung der Tyrosinkinase ERK1 und ERK2 vermittelt [169]. Weiterhin konnte die Abhängigkeit stretch-aktivierter  $Ca^{2+}$ -Kanäle von einem intakten Aktin-Zytoskelett nachgewiesen werden; hierdurch wird erneut die Bedeutung des Zytoskeletts bei der Wahrnehmung und Transmission mechanischer Kräfte bewiesen [98]. Alle Autoren gingen von dem Zusammenspiel einer Vielzahl von Ionenkanälen bei der Umsetzung des Flußreizes auf intrazelluläre Signale aus.

- b) Die Rolle von membranständigen G-Proteinen (Guanosin-5'-triphosphat-bindenden Proteinen), insbesondere von  $G\alpha_q$ , für die scherkraftabhängige Aktivierung der Serinkinasen ERK1 und 2 wurde in einem Experiment nachgewiesen, bei dem die Zugabe von „antisense“-Oligonukleotiden als falschem Substrat die Funktion von  $G\alpha_q$  blockierte und die scherkraftabhängige Aktivierung der Kinasen verhinderte. Die Aktivierung konnte durch Zugabe von Cholesterin verstärkt werden, was durch den membranstabilisierenden Effekt des Cholesterins erklärt wurde [67].
- c) Caveolae sind cholesterinreiche Vertiefungen der Plasmamembran von Endothel- und glatten Muskelzellen, an deren zytoplasmatischer Seite mit immunhistochemischen Verfahren eine besondere Dichte an caveolingebundener eNOS nachgewiesen werden konnte [111]. Hier sorgt ebenfalls caveolingebundenes Calmodulin, einem biochemischen Schalter gleich, für eine scherkraftabhängige Aktivierung oder, bei nachlassender Schubspannung, für eine Inaktivierung des Enzyms [33,60,143,149].

- d) Die luminal Membran von Endothelzellen verfügt über verschiedene an Heparan- und Chondroitinsulfat-Seitenketten reiche Proteoglycane, deren Zusammensetzung abhängig von langanhaltender Flußexposition ist [43,165]. In einem außergewöhnlichen Experiment an isolierten Meerschweinchenherzen, deren Koronarien mit spezifischen Lektinen gegen die Zuckeruntereinheiten luminaler Proteoglycane perfundiert wurden, wurde ein negativ dromotroper Effekt als indirektes Maß einer endothelialen Minderfunktion und resultierenden koronaren Hypoperfusion dargestellt. Ein ähnlicher Effekt war mit Antikörpern gegen  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine zu erreichen [143].

Der Aufbau der dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuche läßt keine präzisen Aussagen über die Funktionsfähigkeit der drei erstgenannten Mechanismen nach Trypsinisierung zu. Allerdings ist ein Einfluß niedrig dosierten, kurz wirkenden Trypsins auf die Offenwahrscheinlichkeit von mechanosensitiven Ionenkanälen, die Konformation von G-Proteinen oder membrangebundenem Caveolin wenig wahrscheinlich. Keiner der genannten Mechanismen scheint daher für die gemessenen Unterschiede in der Entwicklung von Membranpotential und glattmuskulärem Tonus verantwortlich zu sein. Im Vergleich hierzu stellt das luminal Proteoglycan Syndecan aufgrund seiner besonderen Konformation mit einer unmittelbar oberhalb der Endothelzellmembran situierten dibasischen Sequenz, die durch niedrig dosiertes Trypsin gespalten werden kann, ein geeignetes Modell für den für die Ergebnisse dieser Arbeit ausschlaggebenden Mechanosensor dar.

#### 4.4.2.2 *Mechanotransduktoren*

Den oben genannten Anforderungen entsprechen Elemente des Zytoskeletts wie Integrine und Haftplatten, aber auch die für die Signaltransduktion wichtigen Tyrosin- und Serinkinasen.

- a) Integrine, insbesondere das in Haftplatten konzentrierte  $\alpha_1\beta_5$ -Integrin, können mechanische in biochemische Signale umsetzen [81]. Nach Blockierung von Integrinen über ihre RGD-Bindungsstellen ist die flußabhängige NO-Produktion der Endothelzellen sowie die resultierende Vasodilatation um 89% vermindert [115]. Diese Bindungsstellen sind in allen Abschnitten des arteriellen Gefäßsystems nachweisbar und bewirken auch im Rahmen einer lokalen Entzündungsreaktion nach Verletzung durch Bindung von Kollagen-I-Faserfragmenten eine starke flußunabhängige Dilatation [114].
- b) Für eine Reihe von bindegewebigen Fasern, die insbesondere in der Nähe von Haftplatten konzentriert sind, wie Vinculin [21], Aktin [188] und Talin [77], sind in



Abhängigkeit von der angreifenden Scherkraft Strukturveränderungen wie Anstieg von Faserquerschnitt und –dichte sowie eine zunehmende Ausrichtung der Fasern in Richtung auf die Haftplatte beschrieben worden [166]. Auch Mikrofilamente werden unter Flußbedingungen vermehrt angelegt und sorgen für die bereits oben erwähnte stromlinienförmige Ausrichtung von Endothelzelle und Centrosom [178].

- c) Serinkinasen wie die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP) werden sowohl durch Fluß als auch durch  $\beta_1$ -Integrine aktiviert [25], wobei die Aktivierung durch Fluß schneller (Spitzenaktivität nach 15 min vs. 20 min) und stärker (80% vs. 40% der maximalen Aktivierung) als die durch Integrine erfolgt [83].

Alle hier genannten Fasertypen zeichnen sich durch einen hohen Proteinanteil aus und sind daher durch Trypsinisierung in ihrer Funktionsfähigkeit beschränkbar. Hypothetisch ist ein Angriff von Trypsin in der hier verwandten Konzentration an den RGD-Sequenzen der subendothelial an Haftplatten konzentrierten Integrine sowie eine Desintegration von Mikrofilamenten, Vinculin, Aktin und Talin vorstellbar. Eine Zuordnung des Matrixeffekts zu Einzelbestandteilen der extrazellulären Matrix war im Rahmen der hier vorgestellten Versuche nicht möglich und scheint darüberhinaus aufgrund der Vielzahl an Querverbindungen zwischen Einzelkomponenten der Regelstrecke „Mechanotransduktion“ wenig sinnvoll.

#### **4.5 Mechanosensorik und –transduktion bei Arteriosklerose**

Die Funktionsfähigkeit lokaler Vasomotorik spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung, Progression, aber auch der Auflösung arteriosklerotischer Läsionen. Der Zusammenhang zwischen lokalen hämodynamischen Faktoren und der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen wurde bereits im 15. Jahrhundert von Leonardo da Vinci formuliert. Im 19. Jahrhundert wurde dieser Zusammenhang durch weitere Beobachtungen von Virchow, Rokitansky und Aschoff unterlegt. Nachdem zunächst eine sehr hohe laminare Scherkraft als Hauptrisikofaktor für endotheliale Denudation und Adherogenese gewertet worden war, konnte 1985 erstmals eine niedrige Scherkraft mit starken Oszillationen in der Richtung der Scherkraft, ein Hauptmerkmal der turbulenten Strömung, als Risikofaktor für die Entstehung intimaler arteriosklerotischer Plaques nachgewiesen werden [101]. Als zusätzliche Risikofaktoren wurden im Verlauf Flußumkehr, -teilung, geringe Scherkraftamplituden sowie eine fluktuierende Scherkraft identifiziert [63]. Die Abhängigkeit vom vorherrschenden Flußmuster ist nicht nur für die Initiation atherosklerotischer Plaques,

sondern auch für ihre Auflösung entscheidend: Bei weiterhin funktionstüchtigem Endothel kann eine ausdauernde körperliche Belastung zur Arretierung der Arterioskleroseentwicklung, sowie, ab einer Wochenleistung von 2200 kcal, sogar zu einer Auflösung arteriosklerotischer Plaques führen [119].

#### **4.5.1 Endotheliale Dysfunktion**

Arteriosklerotische Läsionen entstehen in primär intaktem Endothel. Der Ausbildung einer makroskopisch sichtbaren Läsion geht eine endotheliale Dysfunktion mit frühzeitigem Verlust der flußabhängigen Vasodilatation durch Herabregulation der NO- und Prostacyclin-Produktion voraus. Diese Dysfunktion wird durch niedrige Scherkraft und zusätzliche Risikofaktoren wie chronischer Nikotinabusus [187], Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie [186] sowie rezidivierende Hyperglykämien im Rahmen eines Diabetes mellitus begünstigt [185]. Weitere Faktoren sind eine erhöhte Arginase-Aktivität und eine hieraus resultierende Minderversorgung der Endothelzelle mit dem NO-Vorläufer Arginin, eine geringere Expression von eNOS und Tetrahydrobiopterin, einem eNOS-Kofaktor, sowie eine Zunahme konstriktorisch wirkender freier Sauerstoffradikale, die zusätzlich zu einer Inaktivierung der eNOS führen [70,163]. Die fehlende Unterdrückung von Monozytenadhäsion und -chemotaxis, Thrombozytenaggregation und Proliferation von glatten Muskelzellen durch NO sowie die niedrige Scherkraft mit einer resultierenden längeren Passagezeit führt zu einer stärkeren Ablagerung von Lipiden und Adhäsion von Monozyten, T-Lymphozyten und Thrombozyten. Die betroffenen Substanzen verstärken sich dabei in mannigfaltigen Regelkreisen untereinander in ihrer Wirkung; so bewirkt eine Erhöhung der lokalen Konzentration oxidierten LDLs die vermehrte Expression von VCAM-1, einem Adhäsionsfaktor für monozytäre Zellen [170]. Die lokalen Imbalancen führen zunächst zur Ausprägung intimaler „fatty streaks“, streifenförmiger Lipidablagerungen, später, bei zunehmender Erschöpfung der endothelialen Permeabilitätsschranke, zu einer lokalen Entzündungsreaktion [105]. Im Verlauf dieser Entzündungsreaktion invadieren lipidhaltige Makrophagen die tieferen Gefäßwandschichten und führen dort, zusammen mit vereinzelt glatten Muskelzellen und Kollagenen, zur Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques [162]. Mit Anwachsen der Läsion weicht der intakte Endothelzellverband über der Läsion zur Seite, so daß freiliegende Bestandteile der extrazellulären Matrix der glatten Gefäßmuskelzellen als Rezeptoren für die Thrombozytenadhäsion dienen können.

Eine entscheidende Auswirkung der endothelialen Dysfunktion ist die erhöhte Empfindlichkeit von Koronararterien für den konstriktorischen Effekt von Katecholaminen

[184]; unter Einfluß endogener Katecholamine kommt es zu einer paradoxen Gefäßkonstriktion [148]. Bei Applikation von Adrenalin *in vivo* führt bereits eine 100-fach unter dem physiologischen Bereich liegende Konzentration zu einer Konstriktion [177]. Dieser Mechanismus spielt, zusammen mit einer erhöhten Sensitivität der glatten Muskelzellen für konstriktorisch wirkendes Endothelin, eine Rolle bei der Entstehung sowohl von myokardialer Ischämie und von akuten Koronarsyndromen [183]. Ebenso konnte gezeigt werden, daß arteriosklerotisch veränderte Gefäßabschnitte nach Applikation von Acetylcholin in physiologischen Konzentrationen eine paradoxe Konstriktion statt der erwarteten Dilatation aufweisen, die dosisabhängig ist [19,104].

#### **4.5.2 Matrixveränderungen bei Arteriosklerose**

In der Gefäßwand arteriosklerotischer Gefäße nehmen, vor allem im Bereich von Plaques, durch den Einfluß vermehrt freigesetzter Wachstumsfaktoren wie PDGF, bFGF und TGFβ Kollagenfasern in Anzahl und Umfang zu [84]; der Umfang einer Faser kann das bis zu 10fache einer glatten Muskelzelle betragen [91]. Die Konzentration von Kollagenfibrillen hat zwei Folgen: Zum einen wird das Gefäßlumen verengt, zum anderen werden die Plaques zunächst stabilisiert und eine frühzeitige Ruptur und Obliteration des Gefäßlumens durch den Plaqueinhalt verhindert. Gleichzeitig haben Lipoproteine, allen voran oxidiertes LDL, eine starke Affinität zu den Kollagenfasern der extrazellulären Matrix und der Basalmembran. Von glatten Muskelzellen, aber auch durch Makrophagen synthetisierte Elastinfasern dienen ebenfalls als Bindungsstelle für Lipide und Calciumionen. Auch Proteoglycane wie Perlecan, Versican und Syndecan, die sich in der Intima um beginnende arteriosklerotische Läsionen sowie in der Faserkappe der Plaques finden, beteiligen sich an der Bindung freien LDLs [159]. Mit zunehmender Größe der so formierten Plaques werden Kollagen- und Elastinfasern im lipidhaltigen Zentrum vermehrt abgebaut, was zu einer wachsenden Instabilität führt. Im Plaqueareal vermehrt exprimierte Glykoproteine wie Fibronectin, Thrombospondin und Osteopontin fördern zusätzlich die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima.

In normalen Gefäßen wird der Umsatz von Bestandteilen der extrazellulären Matrix durch ein äquimolares Gleichgewicht zwischen am Abbau beteiligten Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und ihren Inhibitoren (TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinases) aufrechterhalten. In arteriosklerotischen Läsionen führt die Überaktivierung von MMP-2 und MMP-9 durch T-Lymphozyten und Monozyten zur Degradation der subendothelialen Basalmembran und zu

einer vermehrten Permeabilität für die genannten Zellen, aber auch für Lipoproteine. Überaktivierte Metalloproteinasen können darüberhinaus über die Degradation von Kollagenfasern insbesondere in der Übergangszone zwischen Plaque und normalem umliegendem Gewebe ebenfalls zur Instabilisierung und Ruptur des Plaques beitragen; über die Zerstörung der Versicanbestände dieser Region können sie zur Loslösung der Faserkappe vom lipidhaltigen Plaquekern führen [4]. Durch den Aufbau von weit in die Media reichenden arteriosklerotischen Plaques wird die Integrität und Funktion der extrazellulären Matrixbestandteile, insbesondere bei der Vermittlung und Aufrechterhaltung der flußabhängigen Vasodilatation, gestört.

#### **4.6 Einfluß von endothelständigem Sensor und subendothelialer Matrix auf die Kraftentwicklung bei verschiedenen Flußraten in normalen Gefäßen**

Die in den Versuchen mit deendothelialisierten Präparaten weiterbestehende flußabhängige Dilatation ist auf das Wirken der intakten Matrix der untersuchten Gefäße zurückzuführen. Wird die maximale Kraftentwicklung normaler Gefäße bei einer Flußrate von 100 ml/min gleich 100% gesetzt, ergeben sich für die Einzelkomponenten folgende Anteile an der flußabhängigen Dilatation: Im Bereich niedriger Flußraten (5 ml/min) liegt der Sensoranteil mit 47% deutlich über dem Matrixanteil von 11%. Bei gesteigertem Fluß nehmen Sensor- und Matrixanteil kontinuierlich zu (65% vs. 25% bei 20 ml/min), wobei der Sensoranteil bis zu einer Flußrate von 40 ml/min nahezu konstant bleibt (65% vs. 38% bei 40 ml/min). Bei hohen Flüssen von 100 ml/min ist der Matrixanteil an der flußabhängigen Dilatation mit 72% maximal und steht gegenüber dem Sensoranteil von 28% stark im Vordergrund.

Diese Ergebnisse sind mit der Beteiligung von Integrinen –als einem mittleren Glied der Signaltransduktionskette– an der Aktivierung von endothelialen MAP-Kinasen bei mittelstarker Scherkraft (12 dyn/cm<sup>2</sup>) vergleichbar: hier erreichte die endotheliale Aktivierung über Fluß 80% der maximalen MAP-Kinasenaktivierung, während die alleinige Aktivierung über  $\beta_1$ -Integrine 40% der Aktivierung erreichte [83].

#### **4.7 Einfluß von endothelständigem Sensor und subendothelialer Matrix auf die Kraftentwicklung bei verschiedenen Flußraten in arteriosklerotischen Gefäßen**

In arteriosklerotischen Gefäßen zeigt sich eine endothelvermittelte Kontraktion, die von 18,4% bei einem Fluß von 20 ml/min auf 43,8% bei 100 ml/min zunimmt und ein indirektes Maß für die endotheliale Dysfunktion in diesen Gefäßen darstellt. Die endothelvermittelte Kontraktion wird durch die tonusmodulierende Kompetenz der Fasern der extrazellulären Matrix zum Teil aufgehoben. Der Matrixeffekt bewirkt bei niedrigen Flußraten eine Dilatation in Höhe von 12,9% der maximalen Nettodilatation eines intakten normalen Gefäßes, so daß bei Flußraten zwischen 20 ml/min und 100 ml/min 26,3% bis 27,1% der Maximaldilatation aufrechterhalten werden können.

Eine Analyse der Varianz sämtlicher Meßreihen (n-way anova) ergab entsprechend, daß der Einfluß arteriosklerotischer Veränderungen sowohl auf die Mittelwerte der Einzelpräparate ( $p=0,0017$ ) als auch auf die mathematisch abgeleiteten Werte ( $p=0,0006$ ) um ein Vielfaches höher war als der jeweilige Einfluß von Deendothelialisierung ( $p=0,008$ ) oder Trypsinisierung ( $p=0,006$ ).

Der Anteil der Einzelkomponenten der Matrix konnte in diesen Versuchen nicht im Detail analysiert werden. Ausgehend von der Bedeutung, die der subendothelialen Matrix für die Aufrechterhaltung einer funktionierenden Vasomotorik unter physiologischen Flußraten in normalen und arteriosklerotisch veränderten Gefäßen zukommt, sind detailliertere Untersuchungen in diesem Bereich wünschenswert.