

1 Einleitung

1.1 Das vaskuläre Endothel

1.1.1 Das vaskuläre Endothel und seine Funktionen

Als Endothel bezeichnet man eine Schicht aus Zellen, die alle Gefäße des menschlichen Körpers von innen auskleidet. Bei einer Dicke von mehr als 1 µm trennt es das intraluminale Blutkompartiment von allen Geweben und Organen des Körpers. Durch das aktive Eingreifen in die Regulation des Gefäßtonus übernimmt das Endothel eine Vielzahl von Funktionen. Es bildet eine physikalische Barriere zwischen Blutlumen und dem perivaskulären Gewebe durch seine anatomische Lage als Grenzsicht. Im Gesunden hat es eine nichtthrombogene Oberfläche und kann so eine Adhäsion und Aggregation von Blutzellen an der Gefäßwand verhindern. Das Endothel ist durch spezialisierte Strukturen, wie die Oberflächenglycocalyx, Zell-Zell-Verbindungen, Mikrovesikel, transzelluläre Kanäle, subendotheliale Matrix und aktive Transportmechanismen selektierend und permeabel für zu transportierende Makromoleküle [1]. Eine weitere wichtige Funktion des Endothels ist die Erkennung und Umsetzung von aus dem Blutkompartiment stammenden zellulären Signalen. Dies geschieht durch die Expression von verschiedenen Rezeptoren z.B. für Wachstumsfaktoren, Insulin, IGF („*insulin growth factor*“), FGF („*fibroblast growth factor*“), VEGF („*vascular endothelial growth factor*“), Zytokine oder bakterielle Toxine [1-3]. Neben dieser Sensorfunktion besitzt das Endothel noch eine integrative Signalgeberfunktion, denn es produziert vasoaktive Peptide und Hormone. Dazu zählen Vasodilatoren (Nitritoxid (NO), Prostacyclin, EDHF („*Endothel-derived hyperpolarisation factor*“), Bradykinin, Adrenomedullin, C natriuretisches Peptid (CNP)) und Vasokonstriktoren (Endothelin-1, Angiotensin II, Thromboxan A₂, Prostaglandine, Wasserstoffperoxid (H₂O₂), freie Radikale) [4]. Durch all diese Funktionen und besonders durch das umfangreiche Repertoire an biologisch aktiven Stoffen hat das Endothel einen wesentlichen Anteil an der Regulation der Hämostase und Thrombose, Vasorelaxation und –konstriktion, dem vaskulären Wachstum und Remodelling [5].

1.1.2 Das NO-abhängige Gefäßsystem

1.1.2.1 Die Entdeckung des Nitritoxids

Furchgott und Zawadski entdeckten 1980, dass bei geschädigtem Endothel eine direkte Wirkung von Acetylcholin zu einer Vasokonstriktion führt. Bei intaktem Endothel bewirkt Acetylcholin eine Vasodilatation, daher muss folglich das gesunde Endothel eine

vasodilatierende Substanz unter Einwirkung von Acetylcholin produzieren. Diese Substanz nannten sie „*Endothel-derived relaxing factor*“ (EDRF) [6]. 1992 wurde EDRF als ein diatomares Molekül, dem Nitritoxid (NO) identifiziert [7]. Die Identifikation des EDRF als NO führte zu einer raschen Aufklärung der Synthesewege und der Erkenntnis, dass NO nicht nur für die Regulation des Vasotonus von Bedeutung ist, sondern eine vielfältige Rolle in Gefäßprozessen spielt [1].

1.1.2.2 Die Funktionen des Nitritoxids

Der endotheliale Gefäßtonus wird durch die Bildung und Freisetzung von vasodilatierenden und -konstringierenden Mediatoren moduliert. NO ist wegen seiner vielfältigen Funktionen als vasodilatierender, antiaggregatorischer, antiproliferativer und antiinflammatorischer Botenstoff einer der wichtigsten Faktoren, die vom Endothel hergestellt werden [4, 8]. So ist es z.B. nicht nur ein Vasodilatator, sondern auch ein potenzieller Inhibitor der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion, der Thrombozytenaggregation und des Thrombozyten- und Leukozytenrekrutments an der Gefäßwand [9-12]. NO moduliert die Genexpression von Proteinen, die z.B. in die Atherombildung involviert sind, und senkt die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-I und ICAM-I [13, 14]. Die Proliferation und Apoptose von glatten Muskelzellen wird durch NO inhibiert [15]. NO ist ein zentraler Bestandteil bei der Aufrechterhaltung des Reduktions-Oxidations (RedOx) -Gleichgewichtes der vaskulären Zellen. Als reduktionsfreudiges Molekül wirkt es antioxidativ und verhindert eine Verschiebung des RedOx-Gleichgewichtes zu Gunsten der oxidativen Seite. [16].

1.1.2.3 Die endotheliale Synthese des Nitritoxids

NO wird durch drei Isoenzyme synthetisiert, die strukturelle Homologien aufweisen. Sie unterscheiden sich durch ihre Lokalisation und Regulation. Diese Familie von Enzymen beinhaltet die NO-Synthasen (NOS) I, II und III. Die NOS III ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und wird konstitutiv in Endothelzellen, Kardiomyozyten und Thrombozyten gebildet. Die eNOS macht die Hauptwirkung auf die NO-vermittelte Gefäßtonusmodulation aus, denn sie bildet unter normalen Ruhebedingungen kontinuierlich NO und wirkt so gegen die sympathisch-adrenerg vermittelte Vasokonstriktion [17-19]. Die eNOS bildet NO im physiologischen nanomolaren Konzentrationsbereich. Als Reaktion auf Rezeptorstimulationen oder durch Änderungen des Blutflusses und somit der auf die Endothelzelle einwirkenden Schubspannung

produziert die Endothelzelle über die eNOS NO und kann so durch eine NO-vermittelte Anpassung des Gefäßtonus zytoprotektiv wirken. Die eNOS benötigt als Substrat die Aminosäure L-Arginin. Arginin entsteht neben Fumarat im Harnstoffzyklus durch eine Spaltreaktion der Argininosuccinatlyase [20]. Die Blutkonzentration dieser Aminosäure beträgt ca. 100 µM. Sie gelangt aktiv über Transporter in die Endothelzelle und reichert sich dort bis zu einer Konzentration von 100-1000 µM an. Der Transportmechanismus wird durch Zytokine reguliert [21-24]. Die Endothelzelle ist in der Lage bei einem extrazellulären L-Arginin-Mangel diese über eine komplizierte Biosynthesekaskade aus L-Citrullin zu resynthetisieren [24-26]. Bei einem guten Substratangebot wandelt die eNOS L-Arginin zu L-Citrullin und NO um [26]. Als Kofaktoren sind O₂, Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat H (NADPH), Häm und Tetrahydrobiopterin wichtig [27, 28]. Die eNOS hat als Synthase des fundamentalen Signalgeberstoffes NO eine besondere Bedeutung bei der vaskulären Homöostase [28]. Neben eNOS bilden die NOS I und II ebenfalls NO. Die NOS I ist die neuronale NO-Synthase (nNOS), die primär im Nervengewebe nachgewiesen wird. Sie wird permanent exprimiert. L-Arginin-Analoga im Serum und Gewebe können ihre Produktion von NO inhibieren und somit Einfluss auf die NO-Verfügbarkeit haben [29]. Die NOS II ist die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und wird unter pathologischen Bedingungen in Monozyten und Makrophagen gebildet. Die iNOS wird bei Auseinandersetzungen mit Infektionen durch Entzündungsfaktoren wie Lipopolysacchariden (LPS), Endotoxinen oder Zytokinen, z.B. Interferon γ (IFNγ), in den endothelialen und glatten Muskelzellen induziert und produziert in Folge toxische Konzentrationen im mikromolaren Bereich. Die hohen Konzentrationen sind wegen der oxidierten Metabolite des NO zytotoxisch [25] und können über Schockmechanismen zu venösem Pooling und kardialer Dysfunktion führen [30, 31].

1.1.2.4 Die Regulation der endothelialen Nitritoxid-Synthese

Die Synthese des NO kann durch rezeptorabhängige Agonisten (Acetylcholin, Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Bradykinin, VEGF, Sphingosin-1-Phosphat, Insulin, „*Calcitonin-Gene-Related Peptide*“ (CGRP), Histamin, Noradrenalin/α₂-Rezeptoren, Oxytozin, Serotonin, Substanz P, Thrombin, VIP („*vasoactive intestinal peptide*“), Vasopressin), physikalische (Wandschubspannung („*shear stress*“), mechanische Deformationen, Pulsatilität, pO₂) und pharmakologische Stimuli (Melittin, Kalziumionophore) aktiviert werden [1, 22]. Dabei können Calcium-

abhängige Aktivierungswege durch Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden oder Scherkräfte sowie auch Calcium-unabhängige Aktivierungswege bestehen [32]. Diese stimulierende Modifikation erfolgt posttranslational über die Aktivierung von Proteinkinasen zu einer Phosphorylierung des Enzyms [1, 28, 33]. Die Fettsäuren Palmitat und Myristat können über eine Acetylierung der eNOS ebenfalls eine Stimulation bewirken [34, 35]. Die eNOS ist in den Caveolae der Plasmamembran der Zelle lokalisiert. Das benachbarte Netzwerkprotein Calmodulin ist verantwortlich für eine tonische Inhibition der eNOS [1, 19]. Eine Calciumbindung oder Strukturänderung durch Phosphorylierung oder Acetylierung wirken dem entgegen [1, 33]. Weiterhin wird die NO-Synthese durch die Substratverfügbarkeit beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass eine orale Substitution mit dem physiologischen eNOS-Substrat L-Arginin antiatherosklerotische Effekte in Cholesterin-gefütterten Ratten bewirkte [36-38]. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine orale Substitution mit L-Arginin bei Menschen einen positiven Effekt auf die endothelabhängige Vasodilatation hat [39-42]. L-Arginin ist assoziiert mit einer Inhibition der Adhäsion von Monozyten und der Trombozytenaggregation [37, 43]. Im Plasma sind höhere Konzentrationen von L-Arginin enthalten, als die eNOS intrazellulär benötigt, dieses Phänomen wird als „L-Arginin-Paradox“ beschrieben [22]. Auf der anderen Seite sind Arginin-Analoga, wie L-NMMA („*L-N^G-monomethyl Arginine citrate*“), das physiologisch im Blut und Gewebe vorkommt, in der Lage die Synthese zu blockieren [25, 44]. Eine Veränderung in der Verfügbarkeit von L-Arginin, Tetrahydrobiopterin oder NADPH, Veränderungen der Genexpression, defekte Rezeptor-Signalkaskaden oder eine direkte NO-Inaktivierung durch Glucose, Lipoproteine und Sauerstoffradikale sind negative Modifizierungswege [1, 45]. Die komplexe Regulation der eNOS bietet eine grosse Angriffsfläche für eine Störung der NO-Synthese. Diabetes mellitus, Hypertonus und andere Risikofaktoren mit molekularen Pathomechanismen führen zu einer reduzierten Aktivierung der eNOS und zu einer Inaktivierung des NO [45]. Es resultiert die endotheliale Dysfunktion, gekennzeichnet durch eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit. Die endotheliale Dysfunktion ist der Beginn der Atherosklerose [46, 47].

1.2 Die endotheliale Dysfunktion

1.2.1 Die endotheliale Dysfunktion - Das Vorstadium der Atherosklerose

1976 verfassten Ross und Glomset die „Response-to-injury-Hypothese“, die besagt, dass Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Hypertonus oder Diabetes mellitus

Risikofaktoren sind, die eine chronische Endothelschädigung durch Gefäßulzationen verursachen. Als Reaktion auf die Endothelläsion kommt es zu einer Aktivierung von Thrombozyten und Wachstumsfaktoren, welches wiederum zu einer Intimahyperplasie führt. Dies begünstigt die Akkumulation von Lipiden und führt zu einer Ausbildung von sklerotischen Plaques, die Atherosklerose [48]. Diese Hypothese ist heute nicht mehr so gültig, denn die Entwicklung der Atherosklerose beginnt nicht erst bei der morphologischen Schädigung, wie Ross und Glomset es mit der „Response-to-injury-Hypothese“ ausdrückten, sondern sie tritt weitaus früher ein, nämlich bei der Störung des funktionellen Zustandes des Endothels, der endothelialen Dysfunktion. So konnte z. B. die antiatherosklerotische Bedeutung des endothelial produzierten NO gezeigt werden, in dem eine Inhibition der eNOS zu einer verstärkten Neo-Intimabildung in Cholesterin-gefütterten Kaninchen führte [49]. Ein anderes Tiermodell mit eNOS-knockout Mäusen zeigte eine 100 %ige Zunahme der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques [50, 51]. Aufgrund heutiger experimenteller Ergebnisse wird die endotheliale Dysfunktion als eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit oder NO-Aktivität betrachtet und fungiert somit als Schnittstelle zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und dem atherothrombotischen Risiko [46, 47]. Die endotheliale Dysfunktion ist gekennzeichnet durch eine veränderte Vasoreaktivität mit reduzierter Vasodilatation, die als Surrogat für eine generelle funktionelle Endothelschädigung angesehen wird. Charakteristika sind eine erhöhte Gefäßpermeabilität für Plasmaproteine und eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten mit proliferativen, proinflammatorischen und proarteriosklerotischen Folgen [13, 47, 52-54].

1.2.1.1 Erhöhte Gefäßpermeabilität für Plasmaproteine

Eine erhöhte Intimapermeabilität für Plasmaproteine ist ein charakteristisches Zeichen der endothelialen Dysfunktion [1]. Infolge der erhöhten Gefäßpermeabilität akkumulieren Low-density-Lipoproteine (LDL) an der Gefäßwand. Diese Fettablagerungen nennt man „*Fatty streaks*“. Während des transzellulären Einstroms wird LDL vom Endothel durch Oxidation modifiziert. Die oxidierten LDL (oxLDL) können die Expression von Genen des Endothels für eine gesteigerte Chemotaxis, Adhäsion und Bildung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen induzieren [55-57]. Die gesteigerte Chemotaxis betrifft vor allem die Monozyten, die nach Einwanderung in das Gewebe zu Makrophagen werden. Die Makrophagen resorbieren die oxLDL-Partikel und andere Lipide über Endozytose oder spezifische Rezeptoren und gehen so in Schaumzellen

über [5, 58]. Desweiteren läuft eine aktivierte Entzündungskaskade ab. Die Makrophagen produzieren Substanzen, die die Monozytenproliferation („*Macrophage-colony stimulating factor*“ (M-CSF), „*Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*“ (GM-CSF)), die Proliferation der glatten Muskelzellen („*platelet derived growth factor*“ (PDGF), „heparin-binding EGF-like growth factor“ (HB-EGF), FGF, „*transforming growth factor*“ β (TGF β)) und die endotheliale Proliferation (VEGF) induzieren, und sie produzieren chemotaktische Moleküle für Monozyten („*macrophage chemoattractant peptide*“ (MCP-1)), Endothelzellen und glatte Muskelzellen [53, 54, 59-62]. Die Makrophagen und glatte Muskelzellen innerhalb der atherosklerotischen Läsion sind in der Lage sich zu vermehren, wodurch die Schaumzellnester expandieren und die Entwicklung einer Atherosklerose weiter treibt [5, 53-55].

1.2.1.2 Die Bedeutung der Inflammation bei der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion

Ein weiteres Charakteristikum der endothelialen Dysfunktion ist die Hyperadhäsivität für Thrombozyten und Leukozyten [1]. Untersuchungen am Kaninchen *in vivo* und *in vitro* zeigten, dass nach einer Inhibition der eNOS die Leukozytenadhäsionsneigung am Endothel zunahm. Das gleiche Ergebnis ergab ein Knockout-Maus-Modell, bei dem das Fehlen des eNOS-Genes zu einer erheblich verstärkten endothelialen Leukozyten-Adhäsion führte [12, 63-65]. Eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit führt zu einer verstärkten Zelladhäsionsneigung über eine erhöhte Expression eines Spektrums an Proteinen. Diese ermöglichen die Bindung von Monozyten, Thrombozyten und T-Lymphozyten an die Gefäßoberfläche, stabilisieren diese Bindung und machen so eine Migration über die Gefäßwand möglich. Dieser Vorgang spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung und Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques [63].

1.2.1.2.1 Adhäsionsmoleküle und die Kaskade der Zellinfiltration

Die Endothelzelladhäsion läuft in einer vierstufigen Kaskade ab: Chemotaxis, Rolling, Adhäsion und Migration [66]. Als Folge der endothelialen Dysfunktion produziert und exprimiert das aktivierte Endothel vermehrt Zytokine, Selektine und Adhäsionsmoleküle. Zytokine (Interleukin 1 (IL-1), Tumornekrosefaktor α (TNF α)) induzieren die Leukozytenannäherung an die Gefäßwand. Bestimmte Integrine (E-, P-, L-Selektine) interagieren mit korrespondierenden Liganden mit den Leukozyten. Diesen Prozess nennt man „Rolling“, die Leukozyten bewegen sich mit diesem Selektinkontakt rollend

auf der Gefäßwand. Die membrangebundenen Integrine werden nun an CAM-Adhäsionsmoleküle adhäriert. Diese Unterfamilie lässt sich unterteilen in „*intercellular-adhesion-molecule 1, II*“ (ICAM-I, ICAM-II) und „*vascular-cell-adhesion molecule 1*“ (VCAM-I). VCAM-I bindet an β 1-Integrin-Rezeptoren der Monozyten und T-Lymphozyten, und ICAM-I bindet an β 2-Integrin-Rezeptoren der zirkulierenden Leukozyten. Im nächsten Schritt sezernieren die Leukozyten Proteasen, die die Zell-Zell-Kontakte der Endothelzellen lösen, und bilden Pseudopodien, mit denen sie durch die Endothelschicht durchtreten und in das umliegende Gewebe gelangen [5, 67-72]. Die Migration der Entzündungszellen kann so die Entwicklung der Atherosklerose initiieren, aber auch bei schon bestehenden atherosklerotischen Läsionen eine Plaqueruptur provozieren. Bei einer immer größeren Menge an einwandernden Entzündungszellen wird der Plaque instabiler und deren zusätzliche Sekretion von Zytokinen und Proteasen, die die Bindegewebsstruktur schwächen, begünstigen die Ruptur der Läsion [73].

1.2.1.3 Ursachen der endothelialen Dysfunktion

Die Entwicklung zu einer endothelialen Dysfunktion ist ein multifaktorieller Prozess [8]. Heutzutage sind mehrere aber längst nicht alle pathologischen Mechanismen bekannt, die zu einem Ungleichgewicht des RedOx-Gleichgewichtes einer Zelle führen. Der aktuell als bedeutendste eingeschätzte Mechanismus ist die Entwicklung des oxidativen Stresses durch eine erhöhte vaskuläre Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen [74, 75]. Das Gleichgewicht innerhalb einer Zelle wird über das Verhältnis von Reduktion zu Oxidation gehalten. Auf der reduktiven Seite stehen Antioxidanzien wie NO, Glutathion, Superoxiddismutase, Katalase, während auf der oxidierten Seite freie Radikale stehen. Die Antioxidanzien sind im Gewebe in den Zellen lokalisiert und verhindern durch Neutralisierungsreaktionen eine überschüssige Produktion von Radikalen [76-80]. Eine erhöhte Konzentration von freien Radikalen führt zu einer Dysbalance dieses RedOx-Gleichgewichtes der Zelle. Es kommt zu einer Dominanz der Oxidationsseite, welches oxidativer Stress genannt wird. Er führt über die Aktivierung von Signaltransduktionswegen und einer verminderten biologischen NO-Verfügbarkeit (über eine Entkoppelung der NO-Synthase und eine direkte Hemmung von NO) zu einer proinflammatorischen, proliferativen und proarteriosklerotischen Antwort der Zelle, der endothelialen Dysfunktion [16, 78]. Es können ein Gewebeschaden und der Zelltod folgen.

Freie Radikale sind sehr reaktive, instabile Atome oder Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen. Sie werden als Reaktive-Sauerstoff-Spezies („*reactive oxygen species*“ (ROS)) bezeichnet. Sie sind unentbehrlich für das Immunsystem und gehören wegen ihrer Zytotoxizität und der Schädigung von Zellen auf unterschiedlichste Weise zu den Abwehrmechanismen der Neutrophilen, Makropagen und anderen immunologischen Zellen. Die ROS können in verschiedene Kategorien unterteilt werden: die Gruppe der „*reactive oxygen intermediates*“ (ROI), der „*reactive nitrogen species*“ (RNS) und der „*reactive chlorine species*“ (RCS). Zu den ROS zählen Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl (OH^{\cdot}), Peroxyl (RO_2^{\cdot}), Alkoxyl (RO^{\cdot}) und Hydroperoxyl (HO_2^{\cdot}), zu den RNS zählen Nitritoxid (NO^{\cdot}) und Nitrogendioxidradikale (NO_2^{\cdot}) und die Gruppe der RCS beinhaltet Chlorradikale (RCI^{\cdot}) bzw. atomisches Chlor (Cl^{\cdot}) [79]. Die bedeutendsten Mechanismen der freien Radikale beruhen auf Membranschädigungen aufgrund von Lipidperoxidation und DNA-Schäden, welche die intra- und extrazelluläre Umgebung verändern [77, 81-83]. In Folge von Oxidationsprozessen an den Nukleinsäuren kann es zu Mutationen kommen. Es kommt zu einer gestörten Proteinbiosynthese und dadurch zu Enzymdefekten und Veränderungen des Zytoskeletts. Eine Lipidperoxidation verursacht eine Schädigung der Zellmembranen, da Membranen einen hohen Anteil an vielfach ungesättigten Fettsäuren aufweisen, und eine Störung des Ionengleichgewichts. Es folgt eine Permeabilisierung der Zellmembranen, die schließlich in Apoptose und Nekrose mündet. Die Mitochondrien spielen dabei eine zentrale Rolle, da sie sowohl die Hauptquelle des endogenen oxidativen Stresses darstellen als auch als Signalgeber des programmierten Zelltodes (Apoptose) fungieren. Während der Elektronenübertragung in der Atmungskette entweicht schon bei der physiologischen Stoffwechselaktivität stets ein kleiner Teil von Elektronen. Diese Elektronen reduzieren den im mitochondrialen Innenraum reichlich vorhandenen Sauerstoff zu Superoxidanionradikalen, die zum Wasserstoffperoxid -eine zentrale ROS-Verbindung- sowohl autokatalytisch als auch durch die Superoxiddismutase dismutiert werden. Durch die in den Mitochondrien gespeicherten Eisenkomplexe kommt es über die Fenton-Reaktion zur reduktiven Spaltung von Wasserstoffperoxiden, wodurch daraus das sehr reaktive Hydroxylradikal entsteht. Es kommt so zu einer oxidativen Schädigung der mitochondrialen DNA und so zu einer fehlerhaften Expression von Atmungskettenkomplexen. Es resultiert eine weitere ROS-Erzeugung, wodurch ein Teufelskreis mitochondrialer Zerstörung entsteht [84-86]. Desweiteren kommt es über

eine lokale, reaktive Freisetzung von Cytochrom C zu einer Aktivierung von verschiedenen Enzymsystemen, z. B. Caspasen. Diese induzieren den programmierten Zelltod, die Apoptose [78].

Der antioxidative Mechanismus wirkt auf verschiedenen Ebenen. Man unterscheidet dabei zwischen enzymatischer Abwehr, Chelatierung von Übergangsmetallionen und direkt reduzierende Antioxidantien. Bei der enzymatischen Abwehr gegen oxidativen Stress werden ROS mittels antioxidativer Enzyme reduziert. Dazu zählen die Superoxiddismutase, die Katalase und die Selen-abhängige Glutathion-Peroxidase, welches das wichtigste Enzym zur Reduktion von H_2O_2 und Lipidperoxiden darstellt. Diese kommt sowohl im Cytosol als auch in Mitochondrien vor und benötigt als Kofaktor reduziertes Glutathion [85]. Neben der enzymvermittelten Abwehr gibt es eine Reihe von Antioxidantien, die die freien Radikale direkt reduzieren, wie z.B. Vitamin E, Vitamin C und Glutathion [83]. Desweiteren gibt es bei der Prävention von oxidativen Stress die Chelatierung von Übergangsmetallionen. Dabei werden Schwermetalle (vor allem Eisen und Kupfer, welche z.B. als mitochondrial gespeicherte Eisenkomplexe an der Bildungsreaktion von Wasserstoffperoxiden mitfungieren) durch Chelatbildner, wie Ferritin, Transferrin oder Coeruloplasmin chelatiert oder direkt oxidiert und somit inaktiviert [87]. Außerdem spielen Stressproteine eine wichtige Rolle bei der Reparatur, dem Abbau denaturierter Proteine sowie bei der Hemmung der Apoptose.

1.2.1.3.1 Die Bedeutung des oxidativen Stresses bei der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion

Eine besondere Rolle bei der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion spielen die Sauerstoffradikale Superoxid und Peroxynitrit, sowie die Sauerstoffradikal-bildenden Enzyme NADPH-Oxidase und Xanthin-Oxidase. Eine redoxsensitive Inhibition der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) führt zu einer erhöhten Kapazität des endogenen eNOS-Inhibitors asymmetrisches-Dimethylarginin (ADMA) und so zu einer reduzierten eNOS-Aktivität [88]. Die NADPH-Oxidase wird durch proatherosklerotische Reize wie Angiotensin II, mechanische Dehnung und proinflammatorische Cytokine stimuliert und bildet Superoxide [89]. Eine weitere Quelle für vaskuläres Superoxid ist die Xanthin-Oxidase [90]. Eine vermehrte Produktion von Superoxid verbraucht über einen Reaktionsweg NO und bildet als Endprodukt Peroxynitrit, das wiederum über eine Oxidation des eNOS-Kofaktors Tetrahydrobiopterin die eNOS entkoppelt, und diese statt

NO Superoxid produziert [91-94]. Es resultiert ein Circulus vitiosus, der kaum zu durchbrechen ist, denn eine erhöhte Konzentration von Sauerstoffradikalen entkoppelt eNOS, die daraufhin Sauerstoffradikale bildet, die wiederum die eNOS entkoppeln. Die Entkoppelung bedeutet eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit und somit die Progression zur endothelialen Dysfunktion. Die Entstehung und Progression der Atherosklerose wird somit durch eine Sauerstoffradikal-induzierte Endothelzellapoptose und die Proliferation glatter Muskelzellen begünstigt.

1.2.2 Die Rolle der endothelialen Dysfunktion bei der Atherogenese

Die endotheliale Dysfunktion mit ihrer erhöhten Gefäßpermeabilität entwickelt durch akkumulierte LDL Fettablagerungen, die „*Fatty streaks*“. Eine Progredienz dieser führt zu fibrösen Plaques. Sie sind größer und enger im Gegensatz zu „*Fatty streaks*“ das Lumen des Gefäßes ein [5]. Eine fibröse Plaque besteht neben der ursprünglichen Fettablagerung und dem sich bildenden Nekrosekern aus einer sogenannten „fibrösen Kappe“, die glatte Muskelzellen und Gewebematrix aus Kollagen und elastischen Fasern enthält und die Läsion bedeckt. Somit grenzt die Kappe die Plaque vom Blutlumen ab. Makrophagen und T-Lymphozyten befinden sich ebenfalls in dieser fibrösen Kappe [5, 55]. Sie selbst kann in ihrer Konsistenz variieren und je nach Festigkeit und Form gilt sie als stabil oder instabil [95, 96]. Durch veränderte Blutströmungsverhältnissen oder einspritzender Vasa vasorum, die bei Ruptur zu einer sekundären Blutung führen können, oder der Plaqueform mit Randbereichen, die leicht aufreißen können, kann ein Thrombus mit Verbindung zur Plaque entstehen. Begünstigend sind molekulare Mechanismen, die von den Thrombozyten, den Endothelzellen und Makrophagen ausgehen und durch Produktion von thrombogenen Faktoren die Thrombusbildung unterstützen. Die Folge ist ein kompletter oder inkompletter Verschluss des Gefäßes mit klinischen Komplikationen [5, 63, 73, 95-97]. Plaqueruptur und Thrombose sind verantwortlich für über 50% von Fällen von akutem Koronarsyndrom und Myokardinfarkt.

1.3 Diabetes mellitus

1.3.1 Definition des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten oder relativen Mangel von Insulin beruht. Gemeinsames Leitsymptom bei unbehandelten Patienten ist die chronische Hyperglykämie. Als sicher pathologisch für einen manifesten Diabetes wird eine Blutglucosekonzentration von über >120 mg/dl nach 0 min und von über >200 mg/dl nach 120 min bei dem oralen Glucosetoleranztest nach Definition der WHO (1985) bewertet [98].

1.3.2 Klassifikation des Diabetes mellitus

Die WHO beschreibt eine Klassifikation des Diabetes mellitus nach der Ätiologie (ADA/WHO 1997): Typ-1, Typ-2 und sonstige Typen. Der Diabetes mellitus Typ-1 tritt meist im juvenilen Alter auf und ist gekennzeichnet durch eine aufgrund von Virusinfekten oder Autoimmunerkrankungen verursachte β -Zell-Destruktion der Langerhansschen Zellen des Pankreas und führt zu einer absoluten Insulindefizienz. Genetische und exogene Faktoren spielen eine prädisponierende Rolle. Der Diabetes mellitus Typ-2 wird zu >90 % von allen weltweiten Diabetesfällen diagnostiziert. Die Pathogenese ist multikomplex. Eine Rolle spielt zum einen eine gestörte Insulinsekretion und zum anderen eine herabgesetzte Insulinwirkung bzw. eine Insulinresistenz, verursacht durch eine permanent zu hohe Glucoseaufnahme. Der wichtigste Manifestationsfaktor ist die Adipositas. Weiterhin ist der Diabetes mellitus Typ-2 mit der Hyperlipidämie und Hypertonie assoziiert. Diese Kombination ist unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ zusammengefasst. Die Botnia Studie aus Finnland zeigte, dass bei Frauen und Männern mit normalen Glucosewerten die Assoziation mit dem metabolischen Syndrom bei 10 % und 15 % lag, während sie bei einem bestehendem IFG/IGT („*impaired fasting glucose/impaired glucose tolerance*“) bei 42 % und 64 % und bei bestehendem Typ 2-Diabetes bei 78 % und 84 % lag [99, 100]. Beim Diabetes mellitus Typ-2 spielt die polygen-multifaktorielle Vererbung eine große Rolle, der genetische Faktor ist wesentlich stärker ausgeprägt als beim Diabetes mellitus Typ-1, z.B. beträgt die Wahrscheinlichkeit bei Kindern eines Diabetes mellitus Typ-2 erkrankten Elternteils an einem späteren Diabetes mellitus Typ-2 zu erkranken 50 %, die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen beträgt 100 % [101]. Weiterhin existieren andere spezifische Typen. Zu diesen gehören Formen, die hervorgerufen werden durch

genetische Defekte der β -Zell-Funktion oder der Insulin-Wirkung, Krankheiten des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, Drogen oder Chemikalien, Infektionen. Selten immunologisch bedingte Formen, sowie genetische Syndrome, die mit Diabetes mellitus vergesellschaftet sind, zählt man ebenfalls zu den spezifischen Typen. Der vierte Typ dieser Klassifikation ist der Gestationsdiabetes, der gekennzeichnet ist durch pathologische Glucosetoleranzteste während der Schwangerschaft.

Es existiert eine weitere Klassifikation des Diabetes mellitus nach dem klinischen Schweregrad (WHO 2000): Der Begriff IGT („*impaired glucose tolerance*“) bezeichnet eine gestörte Glucosetoleranz mit Glucosewerten variierend zwischen normal und hyperglykämisch [102, 103]. Der IGT beschreibt einen Schlüsselstatus bei der Entwicklung zum Diabetes mellitus Typ-2. Diese Patienten haben im Gegensatz zu der normalen Bevölkerung ein viel höheres Risiko später an Diabetes mellitus zu erkranken. So entwickeln 40 % in den nächsten 5-10 Jahren einen Diabetes [99]. Der Begriff IFG („*impaired fasting glucose*“) bezeichnet ebenfalls eine gestörte Glucosetoleranz ausgehend von schnell ansteigenden Glucosekonzentrationen. Wie der IGT ist er assoziiert mit dem Risiko sich später zu Diabetes mellitus mit folgenden kardiovaskulären Erkrankungen zu entwickeln. NIR („*non-insulin requiring*“) bedeutet „nicht Insulin-abhängig“ und steht für den Typ-2-Diabetiker. IRC („*insulin requiring for control*“) steht für den Typ-2-Diabetiker, der orale Antidiabetika und Insulin benötigt. Als IRS („*insulin requiring for survival*“) benennt man alle Typ-1- und Typ-2-Diabetiker, die keine eigene Insulinproduktion mehr besitzen.

1.3.3 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Weltweit wird eine Prävalenzzunahme des Diabetes mellitus um 35 % von 4 % im Jahre 1995 auf 5,4 % im Jahre 2025 geschätzt [104]. Dies bedeutet einen weltweiten Anstieg der Diabetesfälle von 150 Millionen im Jahr 2000 auf 220 Millionen im Jahr 2010 und auf bis zu 300 Millionen im Jahr 2025 [99, 104]. Die Prävalenz ist in Industrieländern größer als in Entwicklungsländern, dennoch ist der proportionale Anstieg größer in Entwicklungsländern als in Industrieländern [38, 104]. Dabei wird die Anzahl der an Diabetes mellitus Erkrankten in Industrieländern bei 27 % (von 6 auf 7,6 %) liegen, während in Entwicklungsländern mit einer Zunahme von 48 % (von 3,3 auf 4,9 %) gerechnet wird [104]. In Deutschland wird die Diabeteshäufigkeit auf 4 % geschätzt, davon sind 80-90 % Typ-2-Diabetiker, bis 2010 wird die Zahl der Diabetiker auf

geschätzte 11 Millionen ansteigen [98]. Eine Sekundärdatenanalyse einer Versichertenstichprobe der AOK Hessen/KV Hessen untersuchte die Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland im Zeitraum von 1998 – 2001. Diese ergab, dass im 4-jährigen Beobachtungszeitraum die Prävalenzrate von AOK-Versicherten mit bekannter Diabetesdiagnose von 7,24 % im Jahr 1998 auf 8,79 % im Jahr 2001 anstieg. Nach Korrektur für die Alters- und Geschlechtsstruktur der deutschen Bevölkerung entsprach dies einer Gesamtprävalenz von 6 % im Jahr 1998 bzw. 6,91 % im Jahr 2001. Auffällig war dabei, dass die Rate der insulinbehandelten Diabetiker von 1,49 % im Jahr 1998 auf 1,91 % im Jahr 2001 überproportional zunahm. Im Vergleich dazu fand sich ein deutlich niedrigerer Prävalenzanstieg für Diabetiker unter oral medikamentöser Therapie bzw. diätetisch behandelte Diabetiker. Bei den Versicherten im Alter von 70 Jahren und darüber war bei rund 25 % ein Diabetes mellitus bekannt. Über 6 % aller Personen in diesem Alter wurden mit Insulin behandelt. Diese Daten legen nahe, dass im Zeitraum zwischen 1998 und 2001 in Deutschland ein kontinuierlicher Anstieg der Zahl von Patienten mit bekanntem Diabetes mellitus um etwa 5 % pro Jahr zu verzeichnen war. Nach Hochrechnung auf die deutsche Bevölkerung war im Jahr 2001 bei knapp 7 % aller Deutschen ein Diabetes mellitus diagnostiziert [105]. Da der Diabetes, insbesondere der Diabetes mellitus Typ-2, in der Anfangsphase asymptomatisch verläuft, muss von einer beträchtlichen Zahl nicht-diagnostizierter Diabetesfälle ausgegangen werden. Neue Daten deuten auf eine steigende Zahl von vermutlich 7-8 % Diabetiker in Deutschland hin [105]. Der Diabetes mellitus Typ-2 ist vor allem eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Nach dem 40. Lebensjahr verdoppelt sich die Häufigkeit in jeder Altersdekade und erreicht zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr eine Prävalenz von 20 % [105]. Es zeigen sich bezüglich der Epidemiologie auch lokale Unterschiede mit unterschiedlicher Umweltbeeinflussung, so ist bei den Inuit in Grönland der Diabetes mellitus selten, während er bei den Pima-Indianern in den USA sehr häufig ist. In Finnland ist die weltweit höchste Frequenz von Diabetes mellitus Typ-1 mit einer Inzidenz von 35/100 000 Einwohner vertreten [101].

1.3.4 Klinik des manifesten Diabetes mellitus

Klinische Symptome des manifesten Diabetes mellitus sind Heisshunger, Schwitzen und Kopfschmerzen durch den Hypoinsulinismus und durch sporadische Hypoglykämien. Als Folge von Hyperglykämien und Glucosurie kommt es zu Polyurie,

Durst, Polydipsie und Gewichtsverlust. Störungen im Elektrolyt- und Wasserhaushalt sind für Wadenkrämpfe und Sehstörungen durch wechselnden Augenlinsenturgor verantwortlich. Dermatologisch äussert sich der Diabetes durch genito-analen Pruritus, Rubeosis diabetica, bakterielle und mykotische Infektionen und Necrobiosis lipoidica. An Nebenbefunden treten Libidoabschwächung, Müdigkeit sowie Leistungsminderung auf.

1.3.5 Komplikationen des Diabetes mellitus

Heutzutage wird die Lebenserwartung und -qualität eines Diabetikers nicht mehr durch metabolische Komplikationen wie diabetisches Koma, sondern durch vaskuläre Komplikationen limitiert [106, 107]. Die Mortalität liegt bei 1 % ursächlich bei dem diabetischen Koma, aber zu 70-80 % bei vaskulären Komplikationen [108]. Das diabetische Spätsyndrom umfasst die diabetischen Gefäßschäden, die in Mikro- und Makroangiopathien unterteilt werden. Die Mikroangiopathie ist ein diabetesspezifisch generalisierter Prozeß, der das Kapillarsystem betrifft und so ursächlich für die diabetische Retinopathie, die autonome diabetische Neuropathie, die periphere Polyneuropathie und die diabetische Nephropathie ist. Die Makroangiopathie ist verantwortlich für die Zerebral-Arteriosklerose, die periphere arterielle Verschlusskrankheit und die Hypertonie sowie die koronare Herzkrankheit. Sie ist diabetestypisch, nicht diabetesspezifisch. Ca. 65 % aller Diabetiker versterben an kardiovaskulären Erkrankungen, 55 % allein an Herzinfarkt (stenosierende Arteriosklerose der grossen epikardialen Koronararterien).

1.3.6 Die Assoziation von Diabetes mellitus und der endothelialen Dysfunktion

Zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass akute und chronische Hyperglykämien zu einer endothelialen Dysfunktion führen [109, 110]. Insgesamt konnte in tierexperimentellen Studien eine Assoziation zwischen dem Ausmaß einer endothelialen Dysfunktion und einer metabolischen Komponente gezeigt werden [111], [112]. Angulo et al. untersuchte den Einfluß der metabolischen Kontrolle bei Streptozotocin (STZ)-induzierten diabetischen Ratten *in vivo* anhand Messungen von HbA1c bei beginnender endothelialer Dysfunktion. Untersuchungen der Vasodilatation *in vivo* anhand des Modells der autoperfundierten Hinterpfote zeigten, dass die Antwort der Endothelfunktion nach Acetylcholingabe bei Ratten mit HbA1c-Werten > 7,5 % signifikant schlechter war als bei der Kontrollgruppe und Ratten unter

guter metabolischen Kontrolle mit HbA1c-Werten zwischen 5,5-7,4 % [111]. Diese Resultate und weitere Studien, die andere metabolische Komponenten untersuchten, zeigten, dass die endotheliale Dysfunktion beim Diabetes mellitus assoziiert ist mit der metabolischen Kontrolle von kardiovaskulären Erkrankungen. Pieper et al. konnte anhand eines tierexperimentellen Diabetesmodells zeigen, dass die Endothelantwort *in vitro* auf Acetylcholin bei STZ-induzierten diabetischen Ratten nach einer Pankreastransplantation signifikant besser war und sich die erhöhten metabolischen Komponenten im Blut normalisierten im Vergleich zu nicht transplantierten diabetischen Ratten [112]. Diese Studie zeigt ebenfalls eine enge Korrelation zwischen der endothelialen Dysfunktion beim Diabetes mellitus und seiner metabolischen Kontrolle. Weiterhin wird in pharmakologischen und genetischen Modellen anhand experimenteller Untersuchungen an verschiedenen Gefäßregionen eine Einschränkung der NO-vermittelten endothelabhängigen Regulation des Gefäßtonus bei Diabetes mellitus Typ-1 belegt [113-115]. Daher wird vermutet, dass die endotheliale Dysfunktion eine zentrale pathogenetische Rolle für die diabetesassoziierten vaskulären Komplikationen darstellt [116]. Desweiteren kommt es beim Diabetes mellitus Typ-1 und -2 über eine beschleunigte Einschränkung der dilatatorischen Reserve der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Einschränkung der NO-vermittelten Dilatation [109, 116]. Studien an diabetischen Patienten konnten eine endotheliale Dysfunktion an den Leitungs- und Widerstandsgefäßen der Unterarmzirkulation nachweisen [117-119]. Eine andere Studie, bei der die reaktive Hyperämie gemessen wurde, zeigte, dass Diabetiker im Vergleich zu Kontrollgruppen eine reduzierte endotheliale Vasodilatation haben, die mit einer reduzierten reaktiven Hyperämie korreliert [120].

1.3.6.1 Die Pathogenese der endothelialen Dysfunktion beim Diabetes mellitus

Die zentrale Bedeutung der rezidivierenden Hyperglykämien für diabetische Komplikationen ist unumstritten, wenngleich die Pathomechanismen derzeit kontrovers diskutiert werden. Es ist bekannt, dass der Diabetes mellitus über Stoffwechselweg-Änderungen die zelluläre Homöostase beeinflusst. Unter diabetischen Bedingungen kommt es zu akuten Veränderungen von verschiedenen intrazellulären Stoffwechselwegen. Zu diesen zählt die Aktivierung des Polyol- und Hexosaminstoffwechselweges, der Proteinkinase C (PK C), und die vermehrte Bildung von AGE („*advanced glycation endproducts*“) [121, 122]. Die Ursache der Aktivierung

liegt in einer durch Hyperglykämie induzierten gesteigerten Superoxidproduktion durch die mitochondriale Atmungskette. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), der Glykolyse und als Folge zu einer Akkumulation von Glukose, Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat, welches die Substrate des Polyol-, Hexosamin-, PK C- und AGE-Stoffwechsels sind. Das erhöhte Substratangebot aktiviert diese Stoffwechselwege, welche gemeinsam freie Sauerstoffradikale bilden [123-125]. Die PK C moduliert die Aktivität der NO-Synthasen und der NADPH-Oxidasen. Eine Aktivierung der PK C führt somit zu einer gesteigerten Produktion von NO durch die NO-Synthase und von Superoxid durch die NADPH-Oxidase, die miteinander zu Peroxynitrit reagieren [126, 127]. Die Zelle gerät durch die erhöhte Konzentration von Sauerstoffradikalen in einen oxidativen Stress, aus dem eine reduzierte eNOS-Aktivität bzw. NO-Bioverfügbarkeit resultiert.

1.3.7 Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus und endothelialer Dysfunktion

Die erhöhte Mortalität und Morbidität des Diabetes mellitus wird hauptsächlich von atherothrombotischen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems bestimmt. Aus der Framingham Studie ist bekannt, dass Diabetiker ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen aufweisen als Nichtdiabetiker [106, 107]. Andere Studien weisen auf eine gestörte Endothelfunktion bei Diabetikern hin [117-119]. Der Einfluß des Diabetes mellitus auf die Regulation der eNOS wird aktuell noch kontrovers diskutiert [128, 129]. Mechanismen, die im Mittelpunkt der Diskussion stehen, sind die eNOS-Expression, die Phosphorylierung der eNOS, die Inaktivierung der eNOS durch erhöhte Konzentrationen von Radikalen und Veränderungen der Expression von eNOS-Kofaktoren [130]. In diesem Zusammenhang wird derweil diskutiert, ob die Expression von eNOS unter diabetischen Bedingungen über- oder unterreguliert ist [130-133]. Eine pharmakologische Beeinflussung der eNOS-Expression könnte die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion beeinflussen. Da die endotheliale Dysfunktion als eigenständiger Risikofaktor gilt und zudem vollständig reversibel ist, kommt ihr als Therapieziel eine besondere Bedeutung zu [134]. Eine spezifische Beeinflussung der eNOS-Expression war jedoch bis vor kurzem pharmakologisch nicht möglich. Die Entwicklung von Substanzen, die zu einer erhöhten eNOS führen, stellen nun eine neue Möglichkeit dar, eNOS spezifisch zu aktivieren und somit die Rolle der eNOS bei der

endothelialen Dysfunktion zu untersuchen und als therapeutisch umsetzbares Ziel aufzunehmen.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem Einfluss einer pharmakologischen Intervention im endothelialen NO-System auf die Entwicklung einer Diabetes mellitus-induzierten endothelialen Dysfunktion und der zu Grunde liegenden Mechanismen. Dies wurde im Streptozotozin (STZ)-induzierten Diabetes-Modell der Ratte untersucht.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Führt ein experimentell induzierter Diabetes mellitus Typ 1 zu einer verminderten Expression der eNOS im Gefäßsystem des Hinterbeines der Ratte?
2. Kann eine unter diabetischen Bedingungen verminderte eNOS Expression durch eine spezifische pharmakologische Behandlung erhöht werden?
3. Hat eine pharmakologische Erhöhung der eNOS Expression einen Einfluss auf die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion unter diabetischen Bedingungen?
4. Ist ein möglicher Einfluss auf die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion in einer Reduktion des arteriellen Blutdruckes begründet oder handelt es sich dabei um Blutdruck-unabhängige Effekte?
5. Ist ein möglicher Einfluss auf die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion mit einer Veränderung der Diabetes-induzierten Inflammation assoziiert?