

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

## DISSERTATION

# Die Interaktion zwischen Low-Density Lipoprotein und sympathischen Adrenorezeptoren an Koronararterien des Menschen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Grün  
aus Hildesheim

Datum der Promotion: 25.06.2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>iv</b>
<b>Abstrakt .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Regulation der Gefäßweite .....	2
1.1.1 Kontraktionszustand der glatten Muskelzelle.....	2
1.1.2 Second Messenger Systeme .....	4
1.1.3 Autoregulation, FMD, metabolische Einflüsse .....	7
1.1.4 Regulation durch adrenerge Innervation .....	13
1.2 Lipoproteine .....	14
1.2.1 Low-Density Lipoprotein (LDL).....	16
1.3 Klinischer Zusammenhang und Herleitung einer Fragestellung .....	18
<b>2 Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1 Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien, Votum der Ethikkommission ....	20
2.2 Gewinnung der koronararteriellen Präparate.....	21
2.3 Aufbau der Versuchsapparatur.....	21
2.4 Lösungen .....	23
2.4.1 Krebslösung .....	23
2.4.2 LDL-Lösung.....	23
2.4.3 Adrenorezeptoren-Blocker.....	24
2.5 Aufbereitung und Equilibrierung der Präparate.....	24
2.6 Ermittlung der mechanischen Spannung .....	25
2.6.1 Einspannen des Präparates in die Messapparatur .....	25
2.6.2 Vorspannen der Gefäße .....	25

## *Inhaltsverzeichnis*

2.6.3	Versuchsdurchführung .....	26
2.6.4	Messreihen .....	26
2.7	Intrazelluläre Membranpotentialableitung .....	27
2.7.1	Mikroelektroden und Datenaufnahme .....	27
2.7.2	Versuchsablauf .....	28
2.7.3	Intrazelluläre Platzierung der Elektroden .....	28
2.8	Konzentrationsbestimmung von cAMP und cGMP .....	28
2.8.1	Aufschluss der Präparate .....	29
2.8.2	Bestimmung der cAMP-Konzentration .....	29
2.8.3	Bestimmung der cGMP-Konzentration .....	30
2.8.4	Auswertung .....	31
2.9	Statistische Auswertung .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Kraft- und Potentialentwicklung .....	32
3.1.1	Kontrollen unter Krebslösung .....	32
3.1.1.1	Krebslösung und AR-Blocker .....	34
3.1.2	LDL .....	35
3.1.3	LDL unter Zugabe von Blockern .....	37
3.2	cAMP und cGMP .....	45
3.2.1	cAMP .....	47
3.2.2	cGMP .....	49
3.3	Chemoelektrische Kopplung .....	51
3.4	Elektromechanische Kopplung .....	52
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4.1	Patientenkollektiv und Präparateauswahl .....	55
4.2	FMD in Krebslösung .....	57
4.3	Intrinsischer Blockereffekt .....	58
4.4	LDL, FMD und LDL-Bindungsstellen .....	59
4.5	LDL und $\alpha$ -Blockade .....	61

## *Inhaltsverzeichnis*

4.6	LDL und $\beta$ -Blockade.....	64
4.7	LDL und kombinierte $\alpha$ - und $\beta$ -Blockade.....	66
4.8	Weitere Wirkungen von LDL auf die Gefäßmuskulatur .....	67
4.9	LDL-Lösung.....	68
4.10	LDL und Membranpotential, elektromechanische Kopplung .....	69
4.11	LDL und zyklische Nukleotide .....	69
4.12	Chemomechanische und chemoelektrische Kopplung .....	71
4.13	LDL, Statine und Blutdruck.....	72
4.14	Gesamtmodell und klinische Relevanz .....	77
4.15	Studienlimitationen und abschließende Beurteilung .....	79
	<b>Literatur .....</b>	<b>82</b>
	<b>Eidstattliche Erklärung .....</b>	<b>102</b>
	<b>Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....</b>	<b>103</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>105</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>106</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>107</b>

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -AR	$\alpha$ -Adrenorezeptor
$\alpha_1$ -AR	$\alpha_1$ -Adrenorezeptor
$\alpha_2$ -AR	$\alpha_2$ -Adrenorezeptor
$\beta$ -AR	$\beta$ -Adrenorezeptor
$\beta_1$ -AR	$\beta_1$ -Adrenorezeptor
$\beta_2$ -AR	$\beta_2$ -Adrenorezeptor
5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
5'-GMP	5'-Guanosinmonophosphat
A	Adrenalin
AC	Adenylatzyklase
ACh	Acetylcholin
acLDL	Acetyliertes LDL
AR	Adrenorezeptor
AT <sub>1</sub> -Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATP	Adenosintriphosphat
cA-PK	cAMP-abhängige Proteinkinase
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
CAD	Koronare Herzkrankheit (Coronary artery disease)
CAM	Calmodulin
cAMP	Zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
CE	Cholesterinester
cG-PK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	Zyklisches Guanosin-3', 5'-monophosphat
COX	Cyklooxygenase

## Abkürzungsverzeichnis

CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen (Cardiovascular diseases)
DAG	Diacylglycerin
DBP	Diastolischer Blutdruck
EDHF	Epithelium Derived Hyperpolarising Factor
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FMD	Flussabhängige Vasodilatation (Flow-mediated dilation)
GC	Guanylatzyklase
HDL	High-Density Lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HS-PG	Heparansulfat-Proteoglykan
IDL	Intermediate-Density Lipoprotein
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low-Density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
MLC	Leichte Kette des Myosins (Myosin light chain)
MLCK	Myosin-leichte Ketten-Kinase (Myosin light chain kinase)
MLCP	Myosin-leichte Ketten-Phosphatase (Myosin light chain phosphatase)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Arithmetischer Mittelwert
NA	Noradrenalin
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Hydrat
nLDL	Normales (nicht oxidiertes oder acetyliertes) Low-Density Lipoprotein
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase

## Abkürzungsverzeichnis

NSB	Nichtselektive Bindung
NYHA	New York Heart Association
oxLDL	Oxidiertes Low-Density Lipoprotein
PDE	Phosphodiesterase
PECAM-1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> , Prostazyklin
PH	Phentolaminhydrochlorid
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipid
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PR	Propranololhydrochlorid
PTX	Pertussistoxin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen/Minute
SBP	Systolischer Blutdruck
SEM	Standard error of the mean
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -Pumpe in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TG	Triglyceride
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
VEGFR2	Vascular Epithelial Growth Factor Receptor 2
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzelle (Vascular smooth muscle cell)

# Abstrakt

Einleitung: Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache weltweit, wobei Lipidstoffwechselstörungen mit erhöhtem Cholesterin, insbesondere Low-Density Lipoprotein (LDL)-Cholesterin, und arterielle Hypertension hierfür als unabhängige Risikofaktoren gelten. In Studien konnte eine Assoziation von erhöhten Blutdruckwerten und erhöhten Cholesterin-, bzw. LDL-Levels nachgewiesen werden. Ein möglicher Mechanismus für eine Beeinflussung der Blutdruckregulation durch LDL ist die durch LDL verursachte Einschränkung der flussabhängigen Vasodilatation (FMD), die in verschiedensten Gefäßgebieten gezeigt wurde. Ziel der Arbeit ist, zu untersuchen, ob die durch LDL verursachte Einschränkung der FMD durch eine Wechselwirkung mit sympathischen Adrenorezeptoren (AR) verursacht wird.

Methoden: Flussabhängiger isometrischer Gefäßtonus, intrazelluläres Membranpotential und cAMP- und cGMP-Konzentrationen wurden unter Einfluss von Kontrolllösung (Krebs-Lösung), LDL-Lösung und LDL-Lösung unter Zugabe von AR-Blockern an Koronararterienpräparaten aus Herztransplantationen von insgesamt 46 Patienten gemessen.

Ergebnisse: Im Vergleich zu Krebslösung beeinflusste LDL die FMD und verursachte eine relative Kontraktion  $\Delta(T_3 - T_{100})$ : Krebs 0,496 g; LDL 0,278 g). Komplette Blockade von  $\alpha$ - (Phentolamin  $10^{-7}$  mol/l) und  $\beta$ -Rezeptoren (Propranolol  $10^{-7}$  mol/l) führte zu einer ca. 50% verminderten Reduktion der FMD durch LDL. Die Blockade von entweder  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Rezeptor führte zu jeweils kleineren Effekten, die in der Summe mit dem Effekt unter kombinierter Blockade übereinstimmten. Gleiche Effekte konnten bei Messung der Membranpotentiale der Gefäßmuskelzellen und der Konzentration der intrazellulären zyklischen Nukleotide festgestellt werden. Mit den erhobenen Messdaten konnten eine intakte chemoelektrische und chemomechanische, sowie eine lineare elektromechanische Kopplung an menschlichen Koronararterien nachgewiesen werden.

Diskussion: Wir konnten zeigen, dass die von LDL verursachte Einschränkung der FMD zu 50% über eine Wechselwirkung zwischen LDL und  $\alpha$ - wie auch  $\beta$ -Rezeptor bedingt ist. Die Ergebnisse



## *Abstrakt*

zeigten sich sowohl auf mechanischer und elektrischer, als auch auf Ebene der Second Messenger. Da eine einzelne Blockade von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptor jeweils zu einer relativen Dilatation unter LDL führte, gehen wir von einer Aktivierung des  $\alpha$ - und Inhibition des  $\beta$ -Rezeptors durch LDL aus. Über die Beeinflussung der FMD und seine Interaktion mit den sympathischen AR kann LDL einen Einfluss auf die Blutdruckregulation nehmen. Unterstützt wird diese Vermutung durch eine nachgewiesene Korrelation von niedrigeren LDL-Levels mit niedrigen Blutdruckwerten nach Gabe von Statinen, unabhängig von pleiotropen Statin-Effekten. Wir weisen in unserer Studie folglich nach, dass die unabhängigen Risikofaktoren Hypertonie und LDL-Cholesterin auf Ebene der sympathischen AR und der FMD verknüpft sind.

# Abstract

Introduction: Cardiovascular diseases are the main cause of death worldwide, whereas disorders of lipid metabolism with elevated blood cholesterol, especially low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, and arterial hypertension count as independent risk factors. Studies show an association between elevated blood pressure and both elevated cholesterol and LDL levels, respectively. One of the underlying mechanisms for the influence of LDL on blood pressure regulation is an LDL-induced impairment of the flow-mediated vasodilation (FMD), which has been demonstrated in different types of blood vessels. This work is aiming to examine if an interaction between LDL and sympathetic adrenoreceptors (AR) could be the underlying cause for an LDL-induced impairment of FMD.

Methods: Flow-dependent isometric tension, intracellularly recorded membrane potential and intracellular cAMP- and cGMP-concentration were measured under the influence of Krebs solution (control), LDL solution and LDL solution with added AR-blockers in segments of coronary arteries from heart transplantations of 46 patients in total.

Results: As compared to Krebs solution, LDL affected FMD and caused a relative contraction  $\Delta(T_3 - T_{100})$ : Krebs 0,496 g; LDL 0,278 g. Complete blockade of both  $\alpha$ - (phentolamin  $10^{-7}$  mol/l) and  $\beta$ -receptors (propranolol  $10^{-7}$  mol/l) resulted in a  $\sim 50\%$  reduction of LDL-induced FMD impairment. Blockage of either  $\alpha$ - or  $\beta$ -receptors showed smaller effects which added up to the measured effect under blockage of both receptors. Similar effects were apparent in the recorded membrane potential of the vascular smooth muscle cells and in the intracellular concentration of the cyclic nucleotides. From our data, we could show an intact chemoelectrical, chemomechanical and furthermore a linear electromechanical coupling in human coronary arteries.

Discussion: We could show that the LDL-induced impairment of FMD is in  $\sim 50\%$  due to an interaction between LDL and both  $\alpha$ - and  $\beta$ -receptors. Similar results could be shown in mechanical and electrical measurements and on the level of second messengers. Since blockage of each receptor resulted in a relative dilatation, we assume that the LDL effect is caused by

## *Abstract*

a stimulation of  $\alpha$ - and an inhibition of  $\beta$ -adrenoreceptors. Through its influence on FMD and its interaction with sympathetic AR, LDL might be implicated in blood pressure regulation. This finding is supported by studies that suggest that lower LDL levels, achieved through administration of statins, are correlated with lower blood pressure, independent of pleiotropic statin effects. Therefore we demonstrate in this study that the former independent risk factors of elevated LDL-cholesterol and high blood pressure are linked on the level of sympathetic AR and through FMD.

# 1 Einleitung

Durch Arteriosklerose bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD), wie die koronare Herzkrankheit (CAD), Schlaganfall und andere, sind die häufigste Todesursache weltweit [1]. 2011 starben geschätzte 16,5 Millionen Menschen weltweit an CVD (30,4% aller Todesfälle weltweit) [2]. In den USA betrug die Prävalenz für eine oder mehrere CVD 2009 83,6 Millionen (35,3% der Bevölkerung) [3]. In Europa bedingen CVD jährlich über 4,3 Millionen Todesfälle (48,3%) [2]. In Deutschland wurden 2012 40,2% aller Todesfälle durch CVD bedingt und diese Erkrankungen verursachten 2008 allein in Deutschland Kosten von 37 Milliarden Euro [4, 5].

In zahlreichen Studien konnten Risikofaktoren für Arteriosklerose und CVD identifiziert werden. Hierzu gehören unter anderem Bluthochdruck und abnormale Blutfette, d.h. erhöhtes gesamtes Cholesterin bzw. Low-Density Lipoprotein (LDL)-Cholesterin und niedriges High-Density Lipoprotein (HDL)-Cholesterin [6, 7]. Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen werden hierbei bisher im Allgemeinen als voneinander unabhängige Risikofaktoren angesehen [7].

Die verschiedenen Lipoproteine, wie LDL und HDL, sind wasserlösliche Komplexe aus Protein- (Apolipoproteine) und Lipidkomponenten (siehe Tabelle 1.1), die für den Transport von hydrophoben Lipiden im menschlichen Körper zuständig sind [8].

Für die Regulation des Blutdruckes spielt neben der Auswurfleistung des Herzens, die Regulation der Gefäßweite in den verschiedenen Gefäßbetten des Körpers, und somit des Widerstandes im Systemkreislauf eine große Rolle [9]. Die Gefäßweite wird zum einen über lokale Faktoren und endogene Mechanismen der Gefäßwand und zum anderen über zirkulierende Substanzen und Hormone, wie zum Beispiel Katecholamine, reguliert [10].

Diese Arbeit untersucht den Einfluss von LDL-Cholesterin auf die flussabhängige Vasodilatation (FMD) und somit die Vasomotorik an Koronararterien des Menschen. Hierbei soll insbesondere die Wechselwirkung mit den sympathischen Adrenorezeptoren und eine Beeinflussung der FMD über diese betrachtet werden. Auf Ebene dieser Schnittstelle werden die unabhängigen

## 1 Einleitung

Risikofaktoren Dyslipidämie und Hypertonie verknüpft. In den folgenden Abschnitten soll auf die Grundlagen der Gefäßweitenregulation eingegangen und die Lipoproteine, insbesondere LDL, vorgestellt werden.

### 1.1 Regulation der Gefäßweite

Die Weite eines Blutgefäßes wird durch den Kontraktionszustand der glatten Muskulatur in der Gefäßwand bestimmt. Hierfür enthält die glatte Gefäßmuskelzelle (VSMC) einen kontraktilem Apparat, der, ähnlich dem der Skelettmuskelzelle, kontraktile Filamente aus Aktin und Myosin enthält, die mehr oder weniger parallel zur Zellachse liegen und zu einer Kontraktion auf maximal die Hälfte der Ruhelänge führen können [10, 11]. Die VSMCs sind zirkulär im Gefäß angeordnet und führen bei einer Kontraktion zu einer Verengung des Gefäßlumens [11]. Die Aktin-Myosin-Interaktion und somit der Kontraktionszustand der VSMCs wird intrazellulär durch verschiedene molekulare und elektrochemische Einflüsse reguliert, welche wiederum von extrazellulär durch hormonelle, metabolische und physische Einflüsse gesteuert werden.

#### 1.1.1 Kontraktionszustand der glatten Muskelzelle

Die Kontraktion der VSMC wird durch eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) getriggert. Bei einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  bindet dieses an Calmodulin (CAM), welches wiederum die Myosin-leichte Ketten-Kinase (MLCK) aktiviert [11, 12]. Diese ist vollständig inaktiv in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und spielt eine zentrale Rolle in der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulation des Kontraktionszustandes der VSMC. Der aktive Komplex aus  $\text{Ca}^{2+}$ , CAM und MLCK ist in der Lage, die leichten Ketten des Myosins (MLC) zu phosphorylieren und damit die Interaktion der Myosin-II-ATPase mit dem Aktinfilament, und somit eine Kontraktion der VSMC, zu ermöglichen [11, 13–15]. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ /CAM/MLCK-Komplex kann hierbei viele MLC phosphorylieren [11].

Der Gegenspieler der MLCK ist die Myosin-leichte Ketten-Phosphatase (MLCP). Diese hemmt durch Dephosphorylierung der MLC die Kontraktion der glatten Muskelzelle [16, 17]. Zwi-

## 1 Einleitung

schen der MLCK und der MLCP herrscht ein Gleichgewicht, dessen Verhältnis ein wichtiger Regulationsmechanismus für den Kontraktionszustand der VSMC ist [11]. Die beiden Enzyme werden durch diverse Mechanismen und Kinasen gesteuert [18]. Die Aktivität der MLCP ist im Gegensatz zur MLCK nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und überwiegt den Effekt der MLCK bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen unter  $10^{-7}$  mol/l [11].

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wird durch Einstrom und Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol gesteuert. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle von extrazellulär ist durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle möglich, deren Öffnungswahrscheinlichkeit bei einer Depolarisation ansteigt und bei einer Hyperpolarisation abnimmt. Zudem können  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle direkt über Rezeptoren aktiviert werden [14, 19, 20]. Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) der VSMC fungiert als intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, aus dem  $\text{Ca}^{2+}$  über ligandengesteuerte Kanäle freigesetzt werden kann [11, 21]. In der glatten Gefäßmuskulatur ist das SR allerdings sehr variabel ausgeprägt und in VSMCs kleiner Arterien nur noch spärlich vorhanden, so dass dieser Mechanismus in kleinen Gefäßen nur eine untergeordnete Rolle spielt [11, 21]. In diesen Bereichen kommt es in den VSMCs zu einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Aktivierung spannungsabhängiger T- und L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [11].

Die Senkung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  geschieht über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe in der Plasma-Membran, die Adenosintriphosphat (ATP) benötigt, und einen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion im Austausch gegen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus dem Zytosol entfernt. In Zellen mit einem SR wird  $\text{Ca}^{2+}$  über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) wieder in die Speicher aufgenommen. Diese Pumpe wird durch CAM aktiviert, die Aktivität wird also bei einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gesteigert [11].

Der Kontraktionszustand der VSMC ist gleichzeitig hochgradig abhängig vom Membranpotential der VSMC, da durch dieses die Öffnung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gesteuert wird [19]. Bei Depolarisation erhöht sich somit der Gefäßtonus, bei Hyperpolarisation dilatiert das Gefäß [19, 22]. Dabei hat diese enge „elektromechanische Kopplung“ keinen Schwellenwert [11, 14, 19]. Die Kopplung der Kraftentwicklung an das Membranpotential durch intrazelluläre Signalmoleküle ( $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen) zeigt sich durch die zeitversetzte Kontraktion nach Änderung des Membranpotentials [22]. Das Membranpotential in normalen Arterien und Arteriolen unter

## 1 Einleitung

normalen Druckbedingungen beträgt  $-48$  mV ( $-40$  bis  $-55$  mV), was einem teilkontrahierten Zustand entspricht, von dem aus sie in Abhängigkeit vom Blutbedarf sowohl kontrahieren, als auch dilatieren können [11, 19].

Das Membranpotential in Ruhe wird hauptsächlich durch die Leitfähigkeit von  $K^+$ -Kanälen geregelt [19]. Ein  $K^+$ -Ausstrom hyperpolarisiert die Zelle, wohingegen eine Erhöhung der Leitfähigkeit für  $Cl^-$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen die Zelle depolarisiert. Ein Einstrom von  $Na^+$ -Ionen durch  $Na^+$ -Kanäle führt allgemein zu einer Depolarisation. Zudem hat die Aktivität der  $Na^+/K^+$ -ATPase und des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers einen Einfluss auf das Membranpotential, da die  $Na^+/K^+$ -ATPase hyperpolarisierend wirkt und der  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher depolarisiert. Die beschriebenen Ionenkanäle können jeweils durch das Membranpotential oder spezifische Liganden gesteuert werden [11].

### 1.1.2 Second Messenger Systeme

Um einen Einfluss auf  $[Ca^{2+}]_i$  zu nehmen, und damit den Kontraktionszustand der Gefäßmuskulatur zu beeinflussen, lösen verschiedene Substanzen, Hormone, aber auch andere Einflüsse, wie mechanischer Stress, intrazelluläre Signalkaskaden mit biochemischem Effekt aus.

Einer der Mechanismen, um einen intrazellulären Effekt auszuüben, ist die Bindung eines Agonisten an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. G-Proteine sind GTP-bindende Proteinkomplexe, bestehend aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) [23]. Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Bindung von GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins, welche sich vom  $\beta/\gamma$ -Dimer trennt und bestimmte Enzyme aktiviert. Nach Spaltung von GTP durch die  $\alpha$ -Untereinheit bildet die inaktive GDP- $\alpha$ -Untereinheit mit der  $\beta/\gamma$ -Einheit wieder das G-Protein-Trimer. G-Proteine kommen in verschiedenen Familien vor, die unter anderem danach eingeteilt werden, welches Enzym sie aktivieren [11, 24].

## 1 Einleitung

### **Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG)**

Eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch ein G<sub>q</sub>-Protein führt zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) aus der Zellmembran in IP<sub>3</sub> und DAG [14, 25]. IP<sub>3</sub> ist in Zellen mit einem ausgebildeten SR in der Lage, Ca<sup>2+</sup> aus diesem über einen ligandenaktivierten Ionenkanal freizusetzen [14, 25, 26]. Das freigesetzte DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche weitere Stoffwechseleränderungen und zelluläre Effekte vermittelt [27]. So führt die Phosphorylierung von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen zu einem erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom [11, 20]. Der Cl<sup>-</sup>-Efflux durch Ca<sup>2+</sup>-abhängige Cl<sup>-</sup>-Kanäle und ein Na<sup>+</sup>-Einstrom führen zu einer Depolarisation der Membran [22]. Insgesamt führen IP<sub>3</sub> und DAG somit zu einer Vasokonstriktion durch eine Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und durch eine Membrandepolarisation. Neben der Steuerung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kann die PKC auch direkten aktivierenden Einfluss auf die Kontraktion nehmen, indem sie die MLCK phosphoryliert und dadurch die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des kontraktiven Apparates erhöht [11, 14].

### **Zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosin-3', 5'-monophosphat (cGMP)**

cAMP wird von der Adenylatzyklase (AC) aus ATP synthetisiert und aktiviert direkt die cAMP-abhängige Proteinkinase (cA-PK) [24, 28]. Hierzu analog aktiviert von der Guanylatzyklase (GC) aus GTP hergestelltes cGMP eine cGMP-abhängige Proteinkinase (cG-PK). Insgesamt führen cAMP und cGMP und die durch sie aktivierten Proteinkinasen über verschiedene Mechanismen zu einer Vasodilatation [29, 30].

Die cA-PK hemmt die MLCK durch Phosphorylierung der A Domäne, was über eine verminderte Phosphorylierung der MLC zu einer Dilatation der VSMC führt [11, 14]. Die Phosphorylierung der MLCK bewirkt eine Verminderung der Affinität der MLCK zum Ca<sup>2+</sup>/CAM-Komplex, so dass eine höhere Ca<sup>2+</sup>-Konzentration für das gleiche Maß an Aktivität der Kinase und damit Kontraktion benötigt wird [31]. Die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des kontraktiven Apparates wird also gesenkt [14]. Eine Phosphorylierung der MLCK an der B Domäne durch die cG-PK hat keine Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms [11, 14]. Neben einer Hemmung der MLCK steigert



## 1 Einleitung

die cA-PK über Phosphorylierung von RhoA und damit Hemmung der Rho-Kinase die Aktivität der MLCP. Auch die cG-PK kann über diesen Mechanismus die MLCP aktivieren [32].

Unter Einfluss der cA-PK und cG-PK kommt es zu einer Hemmung von spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und damit zu vermindertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom [11, 33]. Die verminderte Öffnung der Kanäle führt zu einer Hyperpolarisation, was durch die Aktivierung von  $\text{K}^+_{\text{Ca}}$ - und  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ -Kanälen unterstützt wird, und einen weiteren Schluss der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bewirkt [34, 35]. Eine Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in der Zellmembran fördert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Entfernung aus der Zelle [36, 37]. Weitere Effekte der cA-PK sind eine Phosphorylierung der  $\text{IP}_3$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle des SR und Aktivierung der SERCA [35, 36, 38]. Bei erhöhter Produktion von cAMP sinkt also  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch verminderten Influx, erhöhten Efflux und Rückführung von  $\text{Ca}^{2+}$  in intrazelluläre Speicher [39].

Auch cGMP führt zu einer Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen der Plasmamembran und des SR, sowie Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes und Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [30, 37, 40–42]. Der niedrigere  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel führt über die oben geschilderten Mechanismen zu einer Hemmung der MLCK und somit zu einer Dilatation.

Zwischen den beiden Kinasen cA-PK und cG-PK besteht eine Kreuzaktivierung. So sind die Kinasen zwar spezifisch für das jeweilige zyklische Nukleotid, können aber bei hohen Konzentrationen von cAMP oder cGMP auch durch das jeweils andere Nukleotid aktiviert werden [42–45]. Hierzu braucht es eine ca. 10-fach höhere Konzentration des jeweils anderen Nukleotids [14, 43]. Da die cAMP-Konzentration in der VSMC normalerweise ca. 10-fach höher ist als die Konzentration von cGMP, wirkt cAMP potentiell eher über beide Kinasen [14]. Die durch Stickstoffmonoxid (NO) induzierte cGMP-Steigerung (siehe unten) reicht jedoch aus, um auch die cA-PK zu aktivieren [46].

Auch der Signalweg über  $\text{IP}_3$  und DAG kann durch cAMP und cGMP beeinflusst werden, indem diese die PLC hemmen. Dies spielt allerdings *in vivo* bei der Dilatation der VSMC nur eine untergeordnete Rolle [11, 30].

Der Effekt von cAMP und cGMP wird durch deren Abbau über verschiedene Phosphodiesterasen zu 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP) und 5'-Guanosinmonophosphat (5'-GMP) beendet

[29].

### 1.1.3 Autoregulation, FMD, metabolische Einflüsse

Ohne Einflüsse von vasoaktiven Substanzen wird die Gefäßweite durch das Gleichgewicht zweier Mechanismen, der myogenen Autoregulation und der FMD bestimmt. Bei erhöhter metabolischer Aktivität wird die Gefäßweite zudem durch lokale Faktoren beeinflusst [10].

Die myogene Autoregulation (Bayliss-Effekt) ist eine reaktive Kontraktion der Gefäßmuskulatur bei Erhöhung des transmuralen Druckes [47]. Dieser Effekt dient dazu, einen konstanten Kapillardruck bei Veränderungen des Blutdruckes zu gewährleisten [10]. Die myogene Autoregulation wird durch eine Dehnung der VSMC bei Druckanstieg vermittelt. Vermutlich kommt es hierbei durch Öffnung von dehnungsabhängigen Ionenkanälen zu einem unselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Einstrom und somit zu einer Depolarisation [11]. Die Depolarisation führt zur Aktivierung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen mit konsekutiver Kontraktion. In größeren Arterien und Venen ist der Bayliss-Effekt schwächer ausgeprägt. Sie lassen sich durch erhöhten intraluminalen Druck kontinuierlich erweitern [10].

Der zweite Regulationsmechanismus, die endothelvermittelte, flussabhängige Vasodilatation (FMD), bewirkt eine Dilatation des Gefäßes bei Zunahme des Shear-Stress (Schubspannung). Der Shear-Stress ist die tangential zur Oberfläche wirkende Kraft pro Fläche der Gefäßwand, die durch Reibung zwischen Blut und endothelialer Zelloberfläche generiert wird [10, 11]. Der Shear-Stress ( $\tau$ ) steigt an bei Erhöhung der Flussrate im Gefäß, aber auch durch Vasokonstriktion mit Verkleinerung des Radius bei gleichbleibendem Fluss [48]. Zudem ist der Shear-Stress abhängig von der Viskosität ( $\mu$ ) der Flüssigkeit nach der Formel:

$$\tau = \frac{4\mu Q}{\pi r^3} \quad (\text{nach [49]}) \quad (1.1)$$

Die FMD wird auch als Schretzenmayr-Effekt bezeichnet und wirkt in Arterien jeder Größe und auch in Venen, wobei in kleinen Gefäßen die myogene Autoregulation überwiegt [10, 50]. Schretzenmayr beschrieb den Effekt erstmals 1933, indem er zeigte, dass sich zuführende Arterien

## 1 Einleitung

zu arbeitender Muskulatur erweitern. Hierbei interpretierte er ihn zunächst fälschlich als metabolisch vermittelte Vasodilatation bei Muskelarbeit [51]. Der Effekt konnte in verschiedensten Arterien nachgewiesen werden [49, 50]. An Koronararterien und Unterarmarterien des Menschen wurde der Effekt *in vivo* gezeigt und konnte ebenso in koronaren Arteriolen bei Schweinen nachgewiesen werden [50, 52–55].

Bei der FMD kommt es zu einem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in der Endothelzelle, welcher einer direkten Dosis-Wirkungs-Beziehung folgt [10, 40, 56].  $Ca^{2+}$ -Ionen können über nicht selektive Kationen-Kanäle, dem elektrochemischen Gradienten folgend, in die Endothelzelle gelangen [11, 40, 56]. Als möglicher Kandidat hierfür wurde der ATP-aktivierte Kationenkanal  $P2X_4$  Purinozeptor postuliert [56]. Allerdings ist auch ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle diskutiert worden [57–59].

Eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  in der Endothelzelle durch Shear Stress führt zur Produktion des Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF), welcher identisch ist mit Stickstoffmonoxid (NO) [10, 11, 40, 60]. NO wird durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin hergestellt. Die eNOS ist ein Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Hydrat (NADPH)-abhängiges Enzym, welches durch  $[Ca^{2+}]_i$  über CAM gesteuert wird [11, 30, 40]. Die flussabhängige Freisetzung von NO wird durch pulsierenden Fluss und Kompression des Gefäßes deutlich gesteigert, was zum Beispiel beim Herzen eine Rolle bei der Beziehung zwischen mechanischer Herzarbeit und myokardialer Perfusion spielt [10, 50, 61].

Nach Diffusion von NO in die glatte Muskulatur bewirkt es dort eine Stimulation der löslichen GC [24, 30]. Über die oben genannten Mechanismen bewirkt cGMP hier eine Hyperpolarisation mit Schluss der spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle und somit eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Abbildung 1.1). EDRF/NO vermittelt auch Vasodilatation durch diverse Vasodilatoren und wurde initial als Auslöser der Acetylcholin (ACh)-vermittelten Vasodilatation entdeckt [11]. Neben der vasodilatatorischen Eigenschaft wirkt NO auch antiatherogen durch eine Verminderung des Wachstums von VSMC und des Remodeling in der Gefäßwand [30, 62].

Zusätzlich zu NO, als Hauptvermittler der FMD, kommt es bei einer Erhöhung des Shear-Stress und Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  im Endothel zu einer erhöhten Freisetzung von Prostaglandin  $I_2$  ( $PGI_2$ )

## 1 Einleitung

[10, 63]. Es wird durch die Cyclooxygenase (COX) aus Arachidonsäure, nach Freisetzung derselben durch die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), hergestellt und stimuliert nach Bindung an seinen Rezeptor an der glatten Muskelzelle die Produktion von cAMP durch die AC [11, 40, 64]. Der Anstieg von cAMP wirkt vasodilatatorisch, synergistisch zum NO-vermittelten cGMP-Effekt (siehe Kapitel 1.1.2). Beim Corelease von NO und PGI<sub>2</sub> benötigt die Aktivierung der PLA<sub>2</sub> allerdings eine hohe Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, wobei die Aktivierung der NO-Synthase (NOS) bereits bei relativ geringen Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup> erfolgt [64].

Neben der Aktivierung der cAMP- und cGMP-abhängigen Mechanismen können NO und PGI<sub>2</sub> über Aktivierung von K<sup>+</sup>-Kanälen direkt zur Hyperpolarisation führen [11].

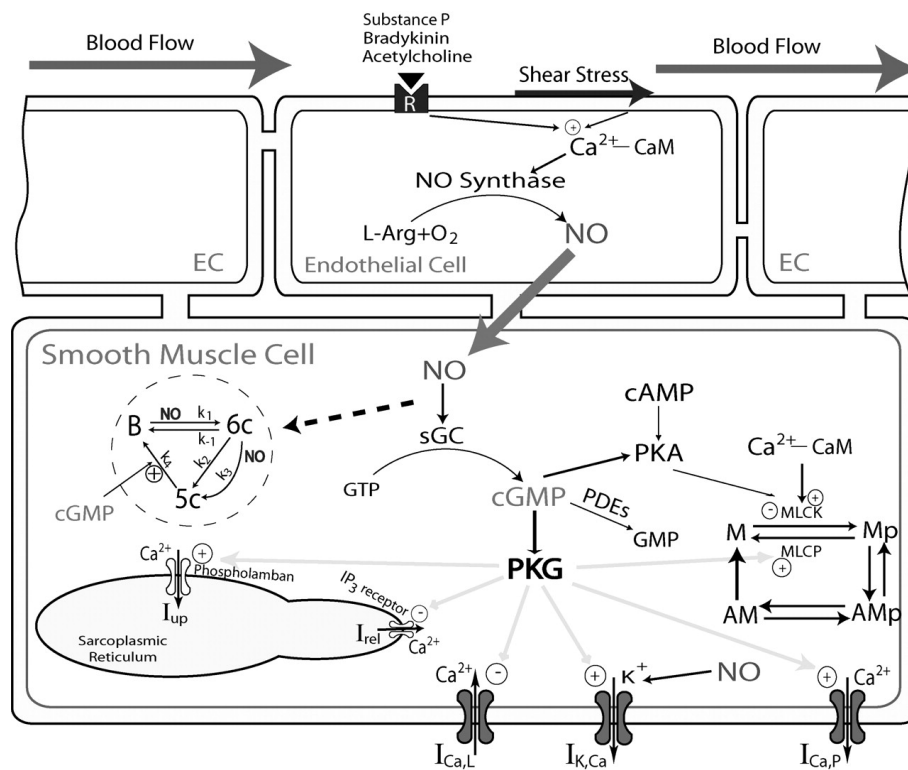


Abbildung 1.1: Relaxation der VSMC durch Second Messenger als Antwort auf Shear-Stress [65]

M: Myosin; Mp: Phosphoryliertes Myosin; AMp: Aktin/Myosin-Komplex (phosphoryliert); AM: Aktin/Myosin-Komplex; sGC: lösliche Guanylatzyklase; PKA: Proteinkinase A; PKG: Proteinkinase G

Die Registrierung des Shear-Stress wird über polyanionische Makromoleküle in der endothelialen Zellmembran vermittelt [11]. *Bevan und Siegel et al.* beschrieben den Sensor für Shear-Stress an der menschlichen Koronararterie erst als Na<sup>+</sup>-sensitiv und konnten ihn anschließend als Syndecan, ein Heparansulfat-Proteoglykan (HS-PG), identifizieren [49, 57–59]. Dies konnte später von mehreren Autoren, unter anderem in der Zellkultur und im Tierexperiment, bestätigt werden, da

## 1 Einleitung

die Entfernung von Heparansulfat dort die flussabhängige NO-Produktion verhinderte [14, 56]. Eine Konformationsänderung des Makromoleküls HS-PG durch flussbedingte Krafteinwirkung führt zu einer erhöhten  $\text{Na}^+$ -Bindung durch Freiwerden von Bindungsstellen. Dies ermöglicht eine „counterion migration“ der  $\text{Na}^+$ -Ionen entlang des HS-PG durch unspezifische Kationen-Kanäle und somit  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Endothelzelle [57]. Über die resultierende Depolarisation kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, welcher zu NO und  $\text{PGI}_2$ -Freisetzung führt [57, 58]. Da HS-PG auch eine intrazelluläre Domäne besitzt, wirkt es möglicherweise auch über eine intrazelluläre Interaktion mit dem Zytoskelett oder über eine Wechselwirkung mit G-Proteinen, die mit der NOS assoziiert sind [62].

Auch andere Mechanismen haben einen Einfluss auf die FMD und spielen eine Rolle bei der Transduktion von mechanischem Shear-Stress in eine Dilatation. Ca. 3% der in der Endothelzelle exprimierten Gene reagieren in irgendeiner Weise auf Shear-Stress [56]. Mögliche weitere Mechanismen sind:

- Stresssensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die direkt zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führen. Hier unter anderem der ATP-aktiviert Purinorezeptor  $\text{P2X}_4$  [56].
- Aktivierung von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen, welche über eine Depolarisation zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führen [56].
- Hyperpolarisation durch Aktivierung von  $\text{K}^+$ -Kanälen, was jedoch eher eine Gegenregulation durch sekundäre Aktivierung darstellt. [57, 66].
- Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, z.B. VEGFR2 (Vascular Epithelial Growth Factor Receptor 2), der eine Shear-Stress induzierte ligandenunabhängige Phosphorylierung zeigt [56].
- G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [56].
- Proteine der Zelladhäsion, unter anderem stressaktivierte Integrine, die den Ras-ERK-Pathway aktivieren können oder Stresssignale an das Zytoskelett weiterleiten können [56]. Auch PECAM-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) wurde als Mechanosensor vorgeschlagen [56, 67].

Da der Flusssensor auf der Membran des Endothels sitzt und die FMD durch endotheliale Messenger vermittelt wird, ist die Intaktheit des Endothels essentiell für die FMD [50, 68]. Ein Teil der FMD kann allerdings auch nach Entfernung des Endothels erhalten bleiben [69]. Dies

## 1 Einleitung

legt die Existenz eines Flusssensors in der Subintima nahe, was jedoch nicht in allen Studien bestätigt wurde [50]. Möglicherweise ist der Anteil an der FMD von Endothel und Subendothel in Abhängigkeit von der Flussrate variabel [70].

Kontrovers diskutiert wird der Epithelium Derived Hyperpolarising Factor (EDHF), der bisher nicht genau identifiziert ist. Vermutlich handelt es sich hierbei um mehrere Faktoren oder Mechanismen, durch die das Endothel in der Lage ist, die glatte Muskulatur zu hyperpolarisieren. EDHF ist definiert als ein Dilatator der 1. das Endothel benötigt, 2. sich von NOS oder COX Metaboliten unterscheidet, 3. die glatte Muskulatur hyperpolarisiert und 4. eine  $K^+$ -Kanal Aktivierung bewirkt, hierbei meistens  $K^+_{Ca}$ -Kanäle. EDHF trägt zum basalen Tonus bei und spielt eine Rolle in der endothelvermittelten Dilatation durch pharmakologische Stimuli. Vermutlich gibt es einen Cross-Talk zwischen EDHF und NO, und der Beitrag von EDHF zur FMD steigt mit sinkendem Gefäßdurchmesser [64]. Es gibt experimentelle Hinweise, dass es bei bestimmten Erkrankungen zu einer Verschiebung von der NO-vermittelten zur EDHF-vermittelten Dilatation kommen kann [64]. So zeigten *Miura et al.*, dass EDHF in Koronararterien von Patienten mit CAD mehr zur FMD beiträgt als in Patienten ohne CAD [71]. Der Einfluss von EDHF ist ebenso bei Hypercholesterinämie erhöht [72].

In den kleinen Widerstandsarterien, die den Blutzufuss der jeweiligen Region regeln, spielt ein dritter Mechanismus zur Gefäßweitenregulation eine große Rolle. Hier kommt es bei höherer metabolischer Aktivität zu einer Vasodilatation durch Anhäufung metabolischer Endprodukte. Dies ist eine Grundlage für die reaktive Hyperämie nach temporärer Ischämie. Hierbei sind verschiedene Mechanismen beteiligt:

- Die Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration bewirkt eine Hyperpolarisation und Relaxation der VSMCs durch Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen.
- Azidose und Hyperosmolarität vermitteln eine Dilatation durch Beeinflussung des  $Ca^{2+}$ -Eintrittes.
- Hypoxie, also besonders bei der reaktiven Hyperämie von Relevanz, führt, außer in der Lunge, zu einer vermehrten Freisetzung von NO und  $PGI_2$ .
- Adenosin, das beim Verbrauch von ATP entsteht, kann über seinen Rezeptor eine cAMP-vermittelte Relaxation auslösen.

## 1 Einleitung

Die reaktive Hyperämie nach temporärer Ischämie wird auch dadurch unterstützt, dass es durch den niedrigen transmuralen Druck zu einer myogenen Vasodilatation kommt und die anschließende Hyperämie durch die FMD verstärkt wird [10]. Die funktionale Hyperämie durch metabolische Vasodilatation wird teilweise begrenzt durch die entgegengesetzt wirkende sympathische Vasokonstriktion [61].

Insgesamt bestimmen, ohne Vorliegen einer metabolischen Regulation, die myogene Autoregulation und FMD gemeinsam den Tonus des Gefäßes. Je nach Situation wirken die beiden Mechanismen synergistisch oder antagonistisch und ergänzen bzw. begrenzen einander [73]. Die FMD ist jedoch in der Lage, den Bayliss-Effekt zu überwiegen [74]. Widerstandsarterien befinden sich *in vivo* in einem Zustand der teilweisen aktiven Vasokonstriktion, von dem sie, je nach Bedarf, dilatieren oder kontrahieren können, und welcher durch myogene, endotheliale, neurogene und metabolische Einflüsse reguliert wird [19, 73]. Die Vasodilatation durch metabolische Faktoren ist am größten in den kleinsten Arterien. Sie wird als wichtigster regulierender Mechanismus im koronaren Gefäßbett angesehen, oberhalb der kleinen Arteriolen beeinflussen die FMD und der Bayliss-Effekt die Blutzufuhr [50, 61]. Kommt es nach Dilatation der kleinen Gefäße bei erhöhter metabolischer Aktivität zu einem Ansteigen des Blutflusses, so wird die zuführende Arterie durch FMD erweitert und somit eine ausreichende Blutzufuhr gewährleistet. Dieser Mechanismus spielt zum Beispiel bei der koronaren Herzerkrankung eine Rolle, wo moderate Stenosen nicht die Perfusion des Myokards unter basalen Bedingungen reduzieren, die Koronarreserve aber deutlich eingeschränkt ist [61].

*Gerova et al.* zeigten als erste eine FMD im koronaren Stromgebiet [75]. Der Gefäßdurchmesser geht, nach Normalisierung des Flusses, mit einer gewissen Latenz auf Ausgangswerte zurück. Kleine Arteriolen sind hierbei vermutlich sensitiver gegenüber Veränderungen im Fluss als große Arterien [50, 68]. Die Reaktion auf Fluss ist abhängig vom Ausgangstonus des Gefäßes und ist am größten bei normalen Ruhewerten. Bei sehr niedrigem Ausgangstonus kann Fluss allerdings auch eine Konstriktion bewirken [50].

### 1.1.4 Regulation durch adrenerge Innervation

Sympathische Adrenorezeptoren (AR) kommen ubiquitär an Organen und Gefäßen im menschlichen Körper vor. Sie sind Rezeptoren für die Transmitter des Sympathikus, Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA). Es handelt sich um G-Protein-gekoppelte heptahelikale Transmembranproteine, die über eine intrazelluläre Signalkaskade die jeweilige Wirkung vermitteln [11, 24, 25, 28]. AR lassen sich nach pharmakologischem Verhalten und intrazellulärer Signaltransduktion einteilen in  $\alpha$ -Adrenorezeptor ( $\alpha$ -AR) und  $\beta$ -Adrenorezeptor ( $\beta$ -AR) und diese Gruppen lassen sich weiter in  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ -AR unterteilen [25, 28, 76–78]. Die jeweiligen Gruppen können durch Klonierung und spezielle pharmakologische Substanzen noch weiteren Untergruppen zugeordnet werden und die Existenz eines  $\beta_4$ -Rezeptors wurde postuliert [25, 27, 28, 78].

Es wurde angenommen, dass die adrenerge Steuerung der Gefäßweite vornehmlich durch  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren ( $\beta_2$ -AR) an Gefäßen des Herz- und Skelettmuskels und  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren ( $\alpha_1$ -AR), postjunctional, und  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren ( $\alpha_2$ -AR), prä- und postjunctional, an nahezu allen Gefäßen des Körpers geschieht [11]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren ( $\beta_1$ -AR) in der Regulation der Gefäßweite involviert sind [79]. Hierbei bindet A stärker an  $\beta$ -AR und NA stärker an  $\alpha$ -AR [11, 25, 76, 80]. An der Koronararterie führt eine Aktivierung von  $\alpha_1$ -AR zu einer Kontraktion und eine  $\beta_2$ -Aktivierung zu einer Dilatation [79–81]. In Gefäßen, in denen beide Rezeptoren vorhanden sind, überwiegt bei niedrigen Adrenalinkonzentrationen der dilatatorische  $\beta$ -Effekt und bei hohen Konzentrationen der konstriktorische  $\alpha$ -Effekt [11]. In Gefäßen ohne  $\beta$ -AR wirkt A ausschliesslich konstriktorisch über  $\alpha$ -AR [10].

Bei der Aktivierung des  $\alpha_1$ -AR durch NA kommt es über ein  $G_q$ -Protein zu einer Aktivitätssteigerung der PLC, die DAG und  $IP_3$  freisetzt und damit durch eine Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  zu einer Kontraktion der VSMC führt (siehe Kapitel 1.1.1) [11, 25, 27]. Indirekt bewirkt NA über oben geschilderte Vorgänge eine Depolarisation durch Erhöhung der  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Cl^-$ -Leitfähigkeit [11, 22, 27]. G-Protein unabhängig werden  $K^+_{Ca}$ -Kanäle deaktiviert und die spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle aktiviert, was zu einer weiteren Depolarisation führt [11, 20].

Auch der postjunctionale  $\alpha_2$ -AR führt zu einer Vasokonstriktion, jedoch geschieht dies durch



## 1 Einleitung

Senkung der cAMP-Konzentration durch Aktivierung eines  $G_i$ -Proteins, welches die AC hemmt [11, 25, 79]. Dies führt zu einer Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  über spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle [20, 22]. Präjunktionale  $\alpha_2$ -AR führen über den selben Mechanismus zu einer verminderten NA-Ausschüttung aus sympathischen Nervenendigungen [11, 25]. Postjunktionale  $\alpha_2$ -AR befinden sich vorwiegend in kleinen Arterien, Arteriolen und Venen, wohingegen präjunktionale  $\alpha_2$ -AR an großen und kleinen Arterien vorkommen [11, 21].

Gegensätzlich zum  $\alpha$ -Effekt bewirkt die Aktivierung des  $\beta_2$ -AR durch A eine Hyperpolarisation mit Erhöhung der  $K^+$ -Leitfähigkeit und somit eine Dilatation. Nach Bindung von A kommt es zur Aktivierung der AC durch ein  $G_s$ -Protein mit Bildung von cAMP. cAMP bewirkt über oben genannte Effekte eine verminderte Phosphorylierung der MLC und damit einen verminderten Kontraktionszustand der glatten Muskelzelle. Der Mechanismus des dilatatorischen Effektes des  $\beta$ -AR gleicht dem von  $PGI_2$  [11].

Es konnte gezeigt werden, dass Koronararterien nicht nur  $\beta_2$ -, sondern auch  $\beta_1$ -AR besitzen [82]. Diese sind maßgeblich an der adrenergen Dilatation mitbeteiligt [79, 82]. Die Signaltransduktion der  $\beta_1$ -AR entspricht der von  $\beta_2$ -AR, also einer Steigerung von cAMP durch eine Aktivierung eines  $G_s$ -Proteins [28, 76].

Auch Endothelzellen besitzen AR. Der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Aktivierung von  $\alpha$ -AR durch NA führt zu einer Freisetzung von NO. Der dilatatorische Effekt übersteigt nicht den konstriktorischen Effekt von NA auf die VSMC, ist jedoch in der Lage, diesen zu begrenzen [10, 40]. Dieser Prozess erklärt auch, warum der konstriktorische Katecholamineffekt bei Einschränkung der Endothelfunktion gesteigert ist [10, 83].

## 1.2 Lipoproteine

Lipoproteine bestehen aus einer hydrophilen Hülle aus Phospholipiden (PL) und Apolipoproteinen, die einen hydrophoben Kern umgibt, welcher hauptsächlich Triglyceride (TG) und Cholesterinester (CE) enthält [8]. Apolipoproteine stabilisieren zum einen die Struktur des Partikels und binden andererseits an Rezeptoren oder aktivieren Schlüsselenzyme im Lipidstoffwechsel [8].

## 1 Einleitung

Lipoproteine lassen sich anhand ihrer Dichte in Subklassen unterteilen, die sich auch in der Zusammensetzung ihrer Apolipoproteine unterscheiden (siehe Tabelle 1.1).

Lipoprotein	Dichte (g/ml)	Größe (nm)	Haupt-Lipid	Haupt-Apo-lipoprotein	Weitere Apo-lipoproteine
Chylomikronen	<0,930	75–1200	Exogene TG	ApoB-48	A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III, E
VLDL	0,930–1,006	30–80	Endogene TG	ApoB-100	A-I, A-II, A-V, C-I, C-II, C-III, E
IDL	1,006–1,019	25–35	CE und TG	ApoB-100	C-I, C-II, C-III, E
LDL	1,019–1,063	18–25	CE	ApoB-100	E, weitere
HDL	1,063–1,210	5–12	CE	ApoA-I	A-II, A-IV, A-V, C-III, E

Tabelle 1.1: Einteilung Lipoproteine modifiziert nach [84–86].  
TG: Triglyceride, CE: Cholesterinester

Chylomikronen werden im Darm gebildet und sind für den Transport von exogenen Nahrungsfetten (vorwiegend TG) verantwortlich. Nach Spaltung der Fette durch die Lipoproteinlipase (LPL) in der Peripherie werden die Chylomikron-Remnants in der Leber rezeptorvermittelt aufgenommen [85, 87].

Aus endogenen TG, Cholesterol und Chylomikronen-Remnants wird in der Leber Very Low-Density Lipoprotein (VLDL) synthetisiert, das in der Peripherie einen Großteil seiner TG abgibt und als Intermediate-Density Lipoprotein (IDL) entweder von der Leber aufgenommen oder dort in LDL umgewandelt wird [85, 87].

HDL wird peripher und in der Leber gebildet und hat einen hohen Phospholipid (PL)-Anteil. Im Verlauf nimmt HDL unter anderem peripheres Cholesterol auf und transportiert es zur Leber [85, 87].

### 1.2.1 Low-Density Lipoprotein (LDL)

LDL-Partikel werden in der Leber aus IDL gebildet. Während dieses Prozesses wird der größte Teil der vorher enthaltenen TG durch die hepatische Lipase hydrolysiert und nahezu alle Apolipoproteine bis auf ApoB-100 auf HDL übertragen, so dass LDL zum größten Teil aus CE besteht. Als Hauptprotein besitzt LDL Apolipoprotein ApoB-100 [85, 87, 88]. LDL enthält jedoch auch ApoE und weitere Apolipoproteine, mit welchen es zeitweise assoziiert sein kann [86]. LDL ist vorwiegend für den Transport von Cholesterin in die peripheren Gewebe zuständig und überschüssiges LDL wird anschließend wieder von der Leber aufgenommen. Sowohl peripher als auch in der Leber bindet LDL mittels ApoB-100 an den LDL-Rezeptor und wird über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen [85, 87, 88].

LDL hat eine globuläre bis diskoidale Gestalt und besteht aus zwei Kompartimenten, einem apolaren Kern und einer amphipatischen Hülle [89, 90]. Der Kern besteht aus ca. 170 TG- und 1600 CE-Molekülen und die Hülle aus ca. 700 PL-Molekülen sowie einer einzigen Kopie des Apolipoproteins B-100 [91]. Zusätzlich enthält ein LDL-Partikel ca. 600 Moleküle nicht veresterten Cholesterols, das sich zu ca. einem Drittel im Kern und zu zwei Dritteln in der Hülle befindet und zusätzliche weitere Proteinanteile (ApoE und andere variable Apolipoproteine und Proteine) [86]. Die Haupt-PL sind Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, wobei LDL auch Lysophosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Diacylglycerol, Ceramide und Phosphatidylinositol enthält. Neben den Fetten transportiert LDL auch fettlösliche Substanzen wie  $\gamma$ -Tocopherol, Carotinoide und weitere [91]. Eine Kopplung von Kern und Hülle geschieht durch die Eigenschaften der Fettsäureketten der Hülle und der CE und TG des Kerns, sowie der direkten Interaktion von ApoB-100 mit dem Kern [91]. *Hevonoja et al.* postulieren eine dritte Schicht zwischen Kern und Hülle, welche aus den Fettsäureketten der Phospholipide in der Hülle und den damit interagierenden Lipiden des Kerns besteht [91]. ApoB-100 macht ca. 20% des Gesamtgewichts von LDL aus und gehört zu den größten bekannten monomeren Glykoproteinen [78, 89]. Es umgibt den LDL-Partikel ring- bis halbkugelförmig und stabilisiert den Protein-Lipid-Komplex. Das Protein besitzt fünf konsekutive Domänen mit verschiedenen Funktionen. So spielt der N-Terminus eine wichtige Rolle in der Interaktion mit Lipasen und mit Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen. Zudem weist ApoB-100, zusätzlich zur Rezeptorbindungsstelle

## 1 Einleitung

für den LDL-Rezeptor am COOH-Terminus, acht Bindungsstellen für Glycosaminoglykane auf [89]. Glycosaminoglykane, insbesondere Syndecan, wurden bereits im Kapitel 1.1.3 als bedeutend für die Vermittlung der FMD herausgestellt.

LDL spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung arteriosklerotischer Plaques. Es diffundiert passiv durch die Verbindungen zwischen Endothelzellen oder wird durch die Endothelzellen hindurchtransportiert und bindet subendothelial mittels Apo B-100 an Matrix-Proteoglykane [7, 89]. Die Bildung eines Nanoplaque bei diesem Prozess ist hierbei  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig [92]. Das retinierte LDL unterläuft verschiedene Modifikationen, von denen die wichtigste eine Oxidation der enthaltenen Lipide darstellt [7]. Die Oxidation geschieht durch oxidative Abfallprodukte bzw. durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Gefäßwand und durch Endothelzellen während des vesikulären Transportes durch die Zellen selbst [7, 85].

Oxidiertes Low-Density Lipoprotein (oxLDL) inhibiert unter anderem die Produktion von NO in der Gefäßwand und bewirkt eine inflammatorische Reaktion mit Einwanderung von Monozyten/Makrophagen [7, 85]. Weitere Oxidation von LDL geschieht durch ROS aus Endothelzellen und Makrophagen und bewirkt eine Aufnahme des „highly oxidized“ LDL in Makrophagen über Scavenger-Rezeptoren, wobei sich Schaumzellen bilden [7, 90]. Die fortgesetzte Entzündungsreaktion durch oxLDL und die zugrunde gegangenen Schaumzellen lösen eine Proliferation von VSMCs und eine Zunahme der durch diese produzierten extrazellulären Matrix aus [7, 85]. Im Verlauf kalzifiziert der Plaque zunehmend [7]. Der arteriosklerotische Plaque ist somit eine Ansammlung von Schaumzellen, freigewordenem Cholesterin und CE, VSMCs, extrazellulärer Matrix und  $\text{Ca}^{2+}$  [85].

In neueren Studien wurde gezeigt, dass LDL aus einer Gruppe von heterogenen Unterformen besteht, die sich in Dichte, Größe, Oberflächenladung und chemischer Zusammensetzung unterscheiden [85, 89]. Die kleinen, dichten LDL-Partikel haben höheres artherogenes Potential und sind mit einem höheren Risiko für Myokardinfarkt, unabhängig vom Cholesterin-Level vergesellschaftet [85, 89]. Dagegen sind die größeren, leichten Partikel anfälliger für Modifikationen [89]. Je nach Autor werden bis zu 6 Unterformen von LDL nach Größe und Dichte unterschieden und ebenso wie LDL lassen sich auch die anderen Lipoproteinklassen in verschiedene Untergruppen einteilen [85, 93].

## 1.3 Klinischer Zusammenhang und Herleitung einer Fragestellung

In diversen Studien konnte eine Korrelation zwischen hohen Serumcholesterinkonzentrationen und höherem bzw. erhöhtem Blutdruck festgestellt werden [6, 94–99]. Anders herum, weisen Patienten mit erhöhten Blutdruckwerten häufig auch ein hohes Plasmacholesterin auf [96]. Diese Assoziation kann für einen Teil der erhöhten Mortalität bei CAD und Inzidenz von Schlaganfällen bei erhöhtem Serumcholesterin verantwortlich gemacht werden [98]. Weitergehende Untersuchungen ergaben einen Zusammenhang von LDL, und noch spezifischer der ApoB-Konzentration, mit dem arteriellen Blutdruck [99]. Dies legt eine direkte Interaktion von Serumcholesterin bzw. LDL mit dem Blutdruck und einen Einfluss auf die Gefäßweitenregulation nahe [96]. *Siegel et al.* fanden zudem eine direkte Korrelation der Änderung des oxLDL/Gesamt-LDL-Verhältnisses mit Änderungen des systolischen (SBP) und diastolischen Blutdruckes (DBP) [100].

LDL hat viele nachgewiesene Effekte, die dazu beitragen können, dass es einen Einfluss auf den Blutdruck gewinnt. In vielen Arbeiten zeigte sich eine signifikante Verminderung der endothelvermittelten Vasodilatation (sowohl gegenüber Acetylcholin (ACh), als auch die FMD) durch LDL bzw. oxLDL *in vitro*. Dies wurde *in vivo* sowohl anhand der Durchblutung des Unterarms (Injektion von ACh bzw. FMD bei reaktiver Hyperämie), als auch in Koronargefäßen bestätigt [54, 55, 101–105]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass LDL und oxLDL NO verstärkt inaktivieren und zusätzlich die lösliche GC inhibieren können, welche den vasodilatatorischen Effekt von NO auslöst [106–108]. Ob auch die vom Endothel unabhängige Vasodilatation eingeschränkt ist, wird widersprüchlich diskutiert. LDL und oxLDL haben jedoch nicht nur einen negativen Einfluss auf die Vasodilatation, sie verstärken nach einigen Arbeiten auch die Vasokonstriktion durch diverse Agonisten (Noradrenalin, Serotonin, KCl) [83]. Zusätzlich wurde auch ein direkter vasokonstriktorischer Effekt, vorwiegend von oxLDL, aber auch von LDL, nachgewiesen [96, 109, 110].

Zusätzlich zur Inaktivierung von NO beeinflusst LDL verschiedenste Second-Messenger-Systeme der glatten Muskelzelle. Hierzu gehört ein Anstieg von Phosphoinositolen und DAG mit konsekutiver Aktivierung der PKC und Beeinflussung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels [111]. Von

## 1 Einleitung

*Siegel et al.* wurde ein Abfall der zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP bei Exposition von Koronararterien des Menschen gegenüber LDL in physiologischen Konzentrationen unter Fluss gemessen [112]. Das bedeutet, dass LDL eben diese Signaltransduktionswege aktiviert bzw. hemmt, die durch die sympathischen AR beeinflusst werden.

Fragestellung dieser Arbeit war somit, ob die Assoziation von Blutdruck und erhöhten Cholesterinwerten, die Einschränkungen der FMD durch LDL und der Einfluss von LDL auf die Signaltransduktion der glatten Muskelzelle über eine Wechselwirkung zwischen LDL und den sympathischen Adrenorezeptoren zu erklären ist, und ob auf dieser Ebene eine Verbindung zwischen den Risikofaktoren arterieller Hypertonie und Hypercholesterinämie gefunden werden kann.

## 2 Methoden

Es wurden *in vitro* Versuche an Koronararterien von menschlichen Herzen durchgeführt, die im Rahmen von Herztransplantationen entnommen wurden. Es wurden Wandspannung der Gefäßpräparate und das Membranpotential der glatten Gefäßmuskelzellen unter Superfusion mit Krebslösung oder LDL-Lösung in Abhängigkeit von der Perfusionsgeschwindigkeit gemessen. Die Messungen erfolgten ohne und mit Blockade von  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR. Nach den Flussversuchen wurde die intrazelluläre cAMP- und cGMP-Konzentration mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt.

### 2.1 Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien, Votum der Ethikkommission

Die untersuchten Koronararterien stammen aus Empfängerherzen von insgesamt 46 Patienten, die sich im Deutschen Herzzentrum Berlin einer Herztransplantation unterzogen. Das Patientenkollektiv war bezüglich zugrunde liegender kardialer Vorerkrankung, Nebendiagnosen, Medikation, Alter und Geschlecht der Patienten inhomogen. Die Arterienpräparate wurden unabhängig von den zuvor genannten Faktoren eingeschlossen. In die Studie wurden auch Präparate von Herzen einbezogen, deren Funktion durch Assist-Systeme oder Schrittmacher unterstützt wurden und die im Rahmen von kombinierten Herz-Lungen-Transplantationen explantiert wurden.

Das positive Votum der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin liegt im Deutschen Herzzentrum Berlin pauschal vor.

## 2.2 Gewinnung der koronararteriellen Präparate

Die Präparation der Arteriensegmente erfolgte innerhalb eines Zeitraumes von maximal 45 Minuten nach Explantation des Herzens. Das Herz wurde bis zum Zeitpunkt der Arterienentnahme im OP in einem separaten Behälter steril in gekühlter, isotoner NaCl-Lösung gelagert. Die Präparation erfolgte in einer Nierenschale bei Raumtemperatur. Unter sterilen Operationsbedingungen wurden die *A. coronaria dextra* und *sinistra*, sowie deren Abgänge von epikardial aufgesucht. Die Präparation erfolgte vom *Sinus aortae* aus entweder mittels zweier Pinzetten zur Separation des umliegenden Fettgewebes oder mit Hilfe einer Präparationsschere, mit der die Arterie direkt vom umliegenden Gewebe getrennt wurde. Pro Herz wurden mindestens 3 bis 4 Arteriensegmente dargestellt. Aufgrund der guten Zugänglichkeit wurden vorzugsweise der *R. marginalis dexter* sowie *R. interventricularis posterior* der *A. coronaria dextra* und der *R. interventricularis anterior* sowie *R. circumflexus* der *A. coronaria sinistra* ausgewählt. Deutlich arteriosklerotische Gefäßabschnitte mit makroskopisch sichtbaren, kalzifizierten Plaques, sowie Abschnitte, die mit einem Stent versorgt waren, wurden nicht verwendet. Zu Anastomosen mit Bypassgefäßen wurde ein Abstand von mindestens 5 mm gewahrt, ebenso zum Abgang der Koronararterie aus der Aorta. Die präparierten Koronararteriensegmente wiesen eine Länge von mindestens 30 mm und einen Durchmesser von 1-3 mm auf. Nach der Präparation wurden die Gefäßabschnitte zusammen mit Resten des anhaftenden Fettgewebes in ein Gefäß mit gekühlter Krebslösung (2 °C - 8 °C) überführt. Die Zeit zwischen Entnahme des Herzens und Abschluss der Präparation betrug maximal 60 Minuten. Im Herzzentrum wurden die Gefäßsegmente maximal 24 Stunden gekühlt gelagert (2 °C - 8 °C), bevor sie mit einer Transportzeit von ca. 45 Minuten in das Labor transportiert wurden. Der zeitliche Abstand zwischen Präparation der Koronararterien und laborexperimentellem Versuchsbeginn betrug maximal 36 Stunden.

## 2.3 Aufbau der Versuchsanordnung

Die verwendete Apparatur diente zur Messung der Wandspannung eines ca. 5 mm langen Arteriensegmentes. Das aufgeschnittene, rechteckige Gefäßpräparat wurde auf zwei gegenüberliegenden Seiten in einer durchströmbaren Kammer zwischen je zwei Plexiglas-Backen



## 2 Methoden

eingespannt und mittels Schrauben fixiert. Eine Seite des Präparates war fix mit der Messkammer verbunden, während die andere Seite mit dem Kern eines induktiven Kraftabnehmers gekoppelt wurde. Zusätzlich war es möglich, über eine Stellschraube den Zug auf das Präparat zu erhöhen und eine gewünschte Wandspannung einzustellen. Die Kraftentwicklung wurde über einen digitalen Messverstärker (KWS 522.C; CMS 32, KS2C, Hottinger Baldwin, Darmstadt) angezeigt und via Datenschnittstelle RS 232C ausgegeben [80, 113, 114]. Eine Dilatation des Gefäßes wurde durch die Verminderung der Wandspannung des Präparates als Abfall der gemessenen Kraft registriert, eine Kontraktion als Anstieg der Wandspannung und damit der registrierten Kraft. Die Messung kann als nahezu isometrisch angenommen werden, da der Messweg des Kraftaufnehmers bei einer maximal möglichen Verkürzung des Präparats um etwa 1% weniger als 100  $\mu\text{m}$  beträgt [80].

Zusätzlich zur digitalen Aufzeichnung wurde in fünfminütigen Intervallen die gemessene Kraft abgelesen. Die Vorrichtung zur Kraftmessung wurde regelmäßig mit Gewichten von 1 g bis 10 g über eine Umlenkrolle kalibriert.

Zulauf zur Versuchsanordnung bestand aus maximal sechs verschiedenen Behältern, die jeweils über ein Zulaufsystem mit Wärmetauscher mit der Messkammer verbunden waren. Mittels einer Weiche konnten die verschiedenen Zulaufsysteme separat ausgewählt werden. Der Fluss in der Messkammer wurde durch einen mechanischen Regler konstant gehalten, welcher eine stufenlose Steuerung des Flusses von 1 ml/min bis 100 ml/min ermöglichte. Die gewählte Flussrate wurde regelmäßig manuell mit Hilfe einer Stoppuhr und eines Messzylinders überprüft und protokolliert. Aufgrund des geringen vorhandenen Volumens der Versuchslösungen wurden die Perfusionslösungen, nach Durchfluss durch die Messkammer, wieder in das jeweilige Zulaufsystem zurückgeführt. Die Perfusionslösungen der sechs Zulaufsysteme wurden vor und während des Versuchs mit Carbogen-Gemisch (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast, wodurch ein physiologischer pH-Wert (pH 7,36 – 7,43) sichergestellt wurde, und die Temperatur der Lösungen mit einem Haake-Thermostat auf 37.0 °C konstant gehalten.

## 2.4 Lösungen

### 2.4.1 Krebslösung

Zum Transport der Präparate, sowie zum Spülen, Äquilibrieren und als Kontrolllösung, wurde modifizierte Krebslösung (isotone Blutersatzlösung) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

$\text{Na}^+$  151.19 mmol/l;  $\text{K}^+$  4.69 mmol/l;  $\text{Ca}^{2+}$  2.52 mmol/l;  $\text{Mg}^{2+}$  1.10 mmol/l;  $\text{Cl}^-$  143.42 mmol/l;  $\text{HCO}_3^-$  16.31 mmol/l;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  1.38 mmol/l und Glukose 7.77 mmol/l.

Aufgrund der ständigen Begasung mit einem Carbogen-Gemisch konnte auf einen Zusatz organischer Puffer verzichtet werden. Der pH-Wert wurde hierbei kontinuierlich kontrolliert.

### 2.4.2 LDL-Lösung

Die Lipoproteinlösungen wurden aus Blut von gesunden Probanden gewonnen, die keine lipid-senkende Medikation einnahmen. Zur Blutentnahme wurden Röhrchen verwendet, die Ethylen-diamintetraacetat (EDTA) zur Gerinnungsinhibition enthielten. Bei regelrechter Füllung betrug die EDTA-Endkonzentration 1 mg/dl Blut. Die weitere Aufbereitung der Proben wurde durch das Lipidlabor der Universitätsklinik Freiburg durchgeführt:

Durch Zentrifugation (2500 x g für 6 min) wurde aus den Blutproben Plasma gewonnen, welches vorsichtig abpipettiert wurde. Aus der Plasmafraktion wurden die Lipoproteinfraktionen mittels Ultrazentrifugation in einer Optima™ TLX Ultrazentrifuge mit Rotor TLA-120.2 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA) bei einer Geschwindigkeit von 120.000 rpm (entsprechend 625.000 x g) und einer Temperatur von 18 °C isoliert [115, 116].

Im ersten Schritt wurden die Teströhrchen mit 0,5 ml Plasma gefüllt, welches mit 0,5 ml eines Mediums mit festgelegter Dichte überdeckt wurde. Die Dichtemedien wurden zuvor mit Argon entgast und gereinigt, um die vollständige Deoxygenierung sicherzustellen. Für die Isolierung der einzelnen Lipoproteinfraktionen wurde sowohl eine unterschiedlich lange Zentrifugationsdauer

## 2 Methoden

als auch verschieden dichte Medien gewählt: 30 min und 1,006 kg/l für VLDL, 150 min und 1,063 kg/l für LDL und 260 min und 1,12 kg/l für HDL.

Die überstehende, mit Lipoproteinen angereicherte Flüssigkeit, wurde anschließend mit feinsten Pipetten aspiriert und, um die Oxidation zu minimieren, unter kontinuierlicher Stickstoffbegasung in kleine Glasröhrchen abgefüllt. Zuletzt wurden Lipoproteinfraktionen von EDTA und Kupferionen durch Gelfiltration gereinigt. Diese aufgereinigte LDL-Lösung wurde uns vom Lipidlabor zur Verfügung gestellt. Die Lipidlösungen enthielten gepooltes LDL von bis zu 10 Probanden [117].

Im Labor wurde die LDL-Lösung mit entgaster Krebslösung mit einem pH-Wert von 7,35 verdünnt. Als Endkonzentration wurde dabei für alle Versuche die physiologische Blutkonzentration von 100 mg/dl gewählt.

### 2.4.3 Adrenorezeptoren-Blocker

Zur Blockade der Adrenorezeptoren wurden der nicht selektive  $\alpha$ -AR-Antagonist Phentolaminhydrochlorid (PH) und der nicht selektive  $\beta$ -AR-Antagonist Propranololhydrochlorid (PR) eingesetzt. Diese wurden in der Konzentration  $10^{-7}$  mol/l den jeweiligen Versuchslösungen zugesetzt, da in dieser Konzentration eine wirksame Blockade der Rezeptoren gewährleistet werden kann [80].

## 2.5 Aufbereitung und Equilibrierung der Präparate

Mindestens zwei Stunden vor Beginn des Versuches wurden die koronararteriellen Präparate in Krebslösung bei 37 °C äquilibriert und mit Carbogen begast, um die physiologischen Ionenkonzentrationen und Temperaturverhältnisse wiederherzustellen. Fünf Minuten vor dem Einspannen des Präparates in die Messapparatur wurde ein Segment von ca. 5 mm Länge und ca. 3 mm Durchmesser für den Versuch ausgewählt. Hierbei fand nochmals eine makroskopische Beurteilung des Präparates statt und es wurden für alle Versuchsreihen möglichst gleichartig beschaffene

und gleich große Präparate ohne makroskopische arteriosklerotische Plaques verwendet. Nach *Sun et al.* wird das prozentuale Dilatationspotential nicht durch den Anfangsgefäßdurchmesser des eingespannten Präparates beeinflusst [81].

In einem ebenfalls auf 37 °C vorgewärmten und mit Krebslösung gefüllten Präparationsgefäß wurde das Arteriensegment vollständig von anhaftendem Fett- und Bindegewebe befreit. Anschließend wurde das ringförmige Präparat längs aufgeschnitten.

## 2.6 Ermittlung der mechanischen Spannung

### 2.6.1 Einspannen des Präparates in die Messapparatur

Das nach dem Aufschneiden entstandene ca. 5 mm x 10 mm große, rechteckige Gefäßstück wurde an den Schnittseiten mit dem Epithel nach oben in die Versuchsapparatur eingespannt. Hierdurch war die Längsrichtung der Myozyten der ringförmigen Gefäßmuskulatur in Richtung der Kraftregistrierung angeordnet. Während des Einspannens wurde das Präparat nur an peripheren Stellen berührt, die sich während des Versuches unter den Fixationsbacken befanden. Bei adäquater Durchführung dieser Maßnahmen kann eine Intaktheit des Endothels im Messbereich gewährleistet werden, die mikroskopisch nachgewiesen werden kann [117].

### 2.6.2 Vorspannen der Gefäße

Vor Beginn der eigentlichen Messreihe wurden die Präparate in der Messapparatur auf einen einheitlichen Ausgangszustand gebracht. Um den *in vivo* herrschenden Blutdruck zu simulieren, wurde das Präparat auf einen Tonus von 2 g vorgespannt. Dies entspricht nach dem Laplace-Gesetz einem arteriellen Mitteldruck von ca. 100 mmHg [118]. Während des Vorspannens herrschte in der Messkammer ein Fluss von 3 ml/min und zur Perfusion wurde carbogenisierte, erwärmte (37 °C) Krebslösung verwendet.

Das Vorspannen des Präparates erfolgte durch eine kontinuierliche Erhöhung des Gefäßtonus über 5 Minuten durch Auseinanderbewegen der Backen in der Messkammer mittels Stellschraube.

## 2 Methoden

Nach Erreichen eines Tonus von 2 g wurde diese Spannung für weitere 5 Minuten gehalten, um eine spannungsbedingte Relaxation (Stress-Relaxation) des Gefäßes auszugleichen. Nach insgesamt 10 Minuten erfolgte die eigentliche Messung.

### 2.6.3 Versuchsdurchführung

Nach dem Vorspannen des Präparates in Krebslösung wurde das Zulaufsystem auf die Perfusionslösung der jeweiligen Versuchsreihe umgestellt. Zu Beginn des Versuches betrug die Flussrate in der Messkammer 3 ml/min. Dieser Fluss wurde für die ersten 10 Minuten beibehalten und anschließend in 10-minütigen Abständen auf die folgenden Werte gesteigert: 5 ml/min, 20 ml/min, 40 ml/min und 100 ml/min. Alle 5 Minuten wurde der Gefäßtonus protokolliert. Nach Registrierung des letzten Messwertes wurde das Präparat ohne Unterbrechung des Flusses ausgespannt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 2.6.4 Messreihen

Zur Bestimmung der FMD der Koronararterien unter verschiedenen Bedingungen wurden unterschiedliche Messreihen durchgeführt. Innerhalb der Messreihen wurde die Reihenfolge der einzelnen Versuchslösungen variiert, um Unterschiede in den Equilibrierungszeiten der einzelnen Präparate auszugleichen.

Messreihe 1: Bestimmung des intrinsischen Einflusses der AR-Blocker auf die FMD.

Messung der FMD in

- Krebslösung unter Zugabe von Phentolaminhydrochlorid ( $10^{-7}$  mol/l) (n=16)
- Krebslösung unter Zugabe von Propranololhydrochlorid ( $10^{-7}$  mol/l) (n=16)
- Krebslösung unter Zugabe beider Blocker (n=16)

Als Kontrolle diente Krebslösung (n=8).

Messreihe 2: Messung der FMD unter Einfluss von LDL (n=15). Als Kontrolle diente Krebslösung (n=35).

Messreihe 3: Messung des Effektes von LDL auf die FMD unter Blockade der sympathischen Adrenorezeptoren.

Messung der FMD in

- LDL-Lösung unter  $\alpha$ -AR-Blockade mit Phentolaminhydrochlorid ( $10^{-7}$  mol/l) (n=7)
- LDL-Lösung unter  $\beta$ -AR-Blockade mit Propranololhydrochlorid ( $10^{-7}$  mol/l) (n=7)
- LDL-Lösung unter  $\alpha$ -AR- und  $\beta$ -AR-Blockade (n=7)

Als Kontrollen dienten je LDL- (n=15) und Krebslösung (n=35).

## 2.7 Intrazelluläre Membranpotentialableitung

### 2.7.1 Mikroelektroden und Datenaufnahme

Für die Messung des intrazellulären Membranpotentials der VSMCs wurden Mikroelektroden aus Spezialglas (Pyrex Brand K2916 Corning Glass Works, New York; Innen-/Außendurchmesser 1,8/3,0 mm) verwendet, die mit 3 mol/l KCl-Lösung gefüllt waren. Vor Versuchsbeginn wurden die Elektroden mit einem Horizontalpuller (T. Chowdhury Pipette Puller, ISEW, Kalkutta) bei 6,8 A Heizstrom in 2 min ausgezogen und nur Elektroden mit Spitzendurchmesser  $< 1 \mu\text{m}$  und einem Widerstand zwischen 60 und 100 M $\Omega$  verwendet. Das Tip-Potential der Mikroelektroden betrug -60 bis -100 mV. Als indifferente Elektrode wurde eine mit 3 mol/l KCl-Lösung gefüllte Agar-Brücke verwendet, die die Messkammer mit einem mit 3 mol/l KCl-Lösung gefüllten Gefäß verband, das wiederum durch eine Ag/AgCl/Platin-Elektrode mit dem Messverstärker verbunden war. Der gesamte Versuchsaufbau wurde durch einen Faraday-Käfig abgeschirmt und zusätzlich besaßen die einzelnen Mikroelektroden eine separate Abschirmung. Das gemessene Potential wurde 10-fach verstärkt auf einem Großbildoszilloskop (SGM43 BN901 s/N293, Knott, München) dargestellt. Die Daten wurden über einen Analog/Digital-Digital/Analog-Wandler (DT 2821, Data Translation, Marlboro, Massachusetts, USA) auf einem PC (80486 DX-66, Highscreen, Vobis, Aachen) mit Win ADDA (V.1.31, Mikrotaurus Software, Berlin) in Echtzeit dargestellt und gespeichert.

### 2.7.2 Versuchsablauf

Die Messung der Membranpotentiale erfolgte unter den selben Bedingungen und in der selben Versuchsanordnung wie die Tonusmessungen. Es wurden hierzu eigenständige Präparate verwendet. Parallel zu den Versuchen zur Registrierung des Gefäßtonus wurden die Versuche zur Potentialmessung nach 10-minütigem Vorspannen in Krebslösung und anschließendem Umschalten auf die Versuchslösung durchgeführt. Die Flussraten wurden in gleicher Weise wie bei der Kraftmessung alle 10 Minuten auf die oben angegebenen Werte gesteigert (Abschnitt 2.6.3). Die Messung der Potentiale erfolgte jeweils nach 10 Minuten bei der jeweiligen Flussrate, da hier von einem quasi-stationären Zustand (steady-state) bezüglich des mechanischen Verhaltens des Präparates ausgegangen werden kann.

### 2.7.3 Intrazelluläre Platzierung der Elektroden

Unter Kontrolle am Großbildoszilloskop wurde die Elektrode mit Hilfe eines Mikromanipulators senkrecht an die luminale Seite des Gefäßes herangeführt und anschließend durch Klopfen am Antivibrationstisch eingestochen. Als Bestätigung für das Eindringen in die glatte Muskelzelle wurde ein plötzlicher steiler Potentialabfall auf - 40 bis - 65 mV gewertet. Positiver liegende Potentialabfälle wurden als vom Endothel stammend beurteilt und verworfen. Nach Abschluss der Messung wurden Tip-Potential und Elektrodenwiderstand überprüft und nur bei fehlender Veränderung gegenüber dem Ausgangswert die gemessenen Potentiale in die Auswertung einbezogen. Für jede neue Messung wurde der Messpunkt am Präparat horizontal verschoben, um repräsentative Werte des gesamten Präparates zu erhalten.

## 2.8 Konzentrationsbestimmung von cAMP und cGMP

Die Konzentrationen von cAMP und cGMP wurden in den selben Präparaten durchgeführt, an denen der Gefäßtonus und das intrazelluläre Membranpotential unter Fluss gemessen worden war. Durch das Tiefrieren in flüssigem Stickstoff ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) konnte die intrazelluläre Konzentration der zyklischen Nukleotide über einen längeren Zeitraum konserviert werden.

### 2.8.1 Aufschluss der Präparate

Nach Bestimmung des Gewichtes der Probe in einem Polypropylen-Tube wurde diese aus dem flüssigen Stickstoff in einen gekühlten 2 ml Glasmörser überführt. Die Homogenisierung erfolgte unter Zugabe von 200 µl Lyselösung (0,25%ige Dodecyltrimethylammoniumbromid-Lösung). Bei diesem Vorgang werden die Zellmembranen der Epithel- und Muskelzellen zerstört. Der Überstand wurde in einen 1,5 ml Polypropylen-Tube pipettiert. Der Vorgang wurde unter Zugabe von weiteren 200 µl Lyselösung wiederholt und der Überstand in den selben Tube überführt. Durch Zentrifugieren bei 10000 rpm für 5 Minuten wurden feste Bestandteile des Homogenisates sedimentiert und der Überstand bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C eingefroren.

### 2.8.2 Bestimmung der cAMP-Konzentration

Zur Bestimmung der cAMP-Konzentration im Homogenisat der Präparate wurde ein Biotrak-ELISA ohne Acetylierung der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die Messung beruht auf einer Kompetition des freien cAMP in der Probe mit einem cAMP-Peroxidase-Konjugat um die Bindung an immobilisiertes cAMP-spezifisches Antiserum. Verdünntes Antiserum und cAMP-Peroxidase-Konjugat wurden je in 11 ml Testpuffer (0,05 mol/l Natriumacetatpuffer, pH 6,0; zusätzlich 0,002% bovines Serumalbumin und 0,01% Konservativ) gelöst und das Antiserum zusätzlich noch einmal 1:2 mit Testpuffer verdünnt. Zur Herstellung eines Standards wurde aus einer Stammlösung (32 nmol/l) eine Verdünnungsreihe hergestellt mit Gesamtmengen von 0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 und 3200 fmol in jeweils 100 µl Volumen. Auf einer mit Anti-Kaninchen-IgG beschichteten 96-well ELISA-Platte wurden die Ansätze aufgetragen, die entweder 100 µl Standard oder 80 µl Testpuffer und 20 µl Probe enthielten. Bei hohen cAMP-Konzentrationen in der Probe wurde die Probenmenge entsprechend reduziert. Alle Ansätze der Standards und Proben wurden doppelt hergestellt. Standards und Proben sowie 200 µl Testpuffer zur Bestimmung der nichtselektiven Bindung (NSB) des Konjugats wurden nach Hinzugabe von 100 µl Antiserum für 120 min im Kühlraum bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde zu allen Ansätzen 50 µl cAMP-Peroxidase-Konjugat gegeben und weitere 60 min inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Ansätze 4-mal mit Waschpuffer (0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,5; zusätzlich 0,05% Tween 20) gewaschen und die



## 2 Methoden

Platten sorgfältig getrocknet. Die quantitative Bestimmung der gebundenen Menge Peroxidase-Konjugates wurde über die Umsetzung von 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) durch die Peroxidase photometrisch bestimmt. Bei Raumtemperatur wurde in alle Wells 150 µl der fertigen TMB-Substratlösung gegeben und eine Blaufärbung des Standards beobachtet. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde die Reaktionszeit so gewählt, dass die Absorption einen Wert von 1,5 – 1,7 Absorptionseinheiten nicht überstieg. Der hierfür benötigte Zeitraum variierte zwischen 10 und 120 Minuten. Nach optimaler Blaufärbung der Nullwerte wurde 100 µl 1 mol/l Schwefelsäure zugegeben. Dies führte zu einem Farbumschlag von Blau nach Gelb, welcher bis zu einer Stunde stabil blieb. Die anschließende Absorptionsmessung erfolgte mit einem ELISA Reader bzw. einem Perkin Elmer Victor ELISA Platten Photometer bei 450 nm.

### 2.8.3 Bestimmung der cGMP-Konzentration

Die Konzentration von cGMP wurde mit einer analogen Methode mit zusätzlicher Acetylierung von Standards und Proben bestimmt. Durch Acetylierung wird die Sensitivität des Tests etwa um den Faktor 10 gesteigert, da das Antiserum eine höhere Affinität zu acetylierten zyklischen Nukleotiden besitzt. Entsprechend der Bestimmung von cAMP wurde eine Verdünnungsreihe als Standard hergestellt. Die Ansätze enthielten 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 und 512 fmol in einem Volumen von 50 µl. Zur Acetylierung wurde ein Acetylierungsreagenz aus zwei Teilen Triäthylamin und einem Teil Essigsäureanhydrid im Verhältnis 1:10 zu den Standards und Proben gegeben. Die Ansätze für die Proben enthielten 100 µl Probe sowie 10 µl Testpuffer und 11 µl Acetylierungsreagenz. Die Acetylierungsreaktion benötigte ca. 5 Minuten. Es wurden wiederum alle Standards und Probenansätze doppelt hergestellt. Jeweils 50 µl von Probe oder Standard wurden zu 100 µl Antiserum gegeben und 120 Minuten inkubiert. Für den NSB-Ansatz wurden 150 µl Testpuffer verwendet. Auf die Hinzugabe von 100 µl cGMP-Peroxidase-Konjugat folgten weitere 60 Minuten Inkubation. Nach dem Waschen der Platten wurden 200 µl TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reagenz hinzugegeben und bis zum Farbumschlag, wie bereits beschrieben, inkubiert. Die photometrische Absorptionsbestimmung erfolgte wiederum nach Zugabe von 100 µl 1 mol/l Schwefelsäure.

### 2.8.4 Auswertung

Mit Hilfe des Standards mit cAMP-Mengen zwischen 0 und 3200 fmol pro Ansatz bzw. cGMP-Mengen zwischen 0 und 512 fmol pro Ansatz wurde eine nichtlineare Kalibrierungskurve erstellt. Dies geschah durch einen Fit der Absorption an die Funktionsgleichung

$$f(x) = y = \frac{a * b}{(b + x)} + c \quad (2.1)$$

wobei  $x$  für die Konzentration des Standards steht. Aus den Fitparametern  $a$ ,  $b$  und  $c$  wurde die Menge cAMP ( $x$ ) der Proben über die Formel

$$x = \frac{a * b}{(y - c)} - b \quad (2.2)$$

berechnet. Hierbei steht  $y$  für die Absorption bei 450 nm. Zur Berechnung der Konzentration der Probe wurde  $x$  mit einem Faktor  $F$  (Gesamtvolumen / eingesetztes Probenvolumen) multipliziert und durch das Gewebsgewicht in mg geteilt. Die ermittelte Konzentration trägt die Einheit nmol/kg.

## 2.9 Statistische Auswertung

Sämtliche Messwerte wurden als arithmetischer Mittelwert und standard error of the mean (MW  $\pm$  SEM) voneinander unabhängiger Experimente ( $n$ ) angegeben. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test nach Student für unverbundene Zufallsstichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten herangezogen. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kraft- und Potentialentwicklung

Unter steigenden Flussgeschwindigkeiten wurde die flussabhängige Verminderung der Wandspannung an Arteriensegmenten gemessen. Es wurden Kontrollen mit Krebslösung und mit Krebslösung unter Zugabe von  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l) und  $\beta$ -AR-Blocker (PR  $10^{-7}$  mol/l) durchgeführt. Die Perfusion der Arteriensegmente mit LDL-Lösung führte zu einer signifikanten Abnahme der FMD, die durch Zugabe von  $\alpha$ -AR- und  $\beta$ -AR-Blocker zum Teil aufgehoben werden konnte.

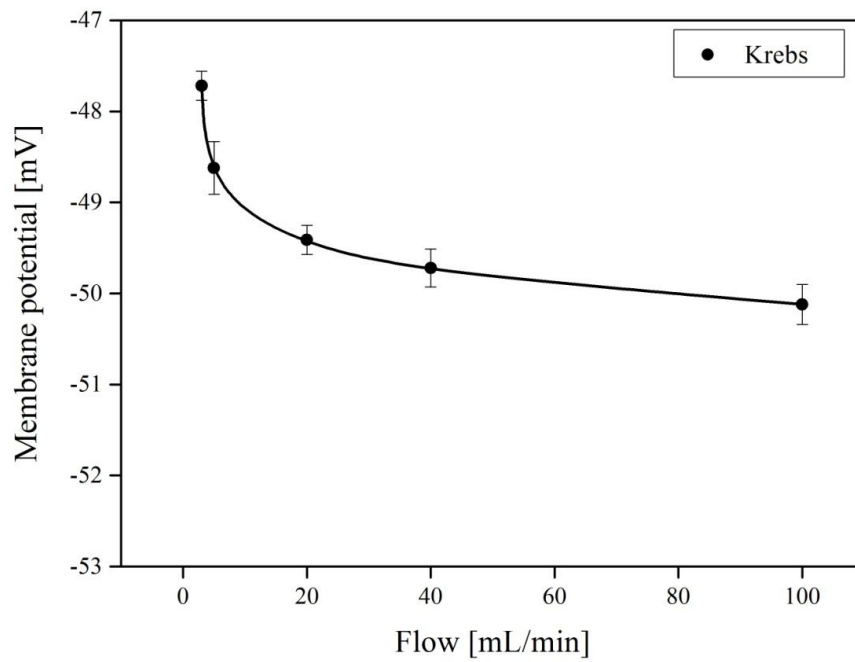
#### 3.1.1 Kontrollen unter Krebslösung

Zu Beginn der Untersuchung wiesen die VSMCs ein Membranpotential von  $-47,1 \pm 0,2$  mV bei einem Fluss von 3 ml/min auf. Bei Erhöhung des Flusses bis auf 100 ml/min hyperpolarisierten die Zellen schrittweise um insgesamt 3,7 mV auf  $-50,8 \pm 0,2$  mV ( $p < 0,0001$  für Differenz Potentiale zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Dies entspricht einem Abfall von 7,8 % relativ zum Ausgangswert.

Bei der Tonusmessung betrug der Ausgangstonus nach dem Vorspannen der Gefäße unter einem Fluss von 3 ml/min  $1,630 \pm 0,043$  g. Nach Erhöhung des Flusses zeigte sich eine schrittweise Dilatation des Gefäßes um 0,459 g bis auf  $1,171 \pm 0,042$  g bei einem Fluss von 100 ml/min ( $p < 0,0001$  für Differenz Tonus zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Dies entspricht einer Dilatation von 28,2 %.

### 3 Ergebnisse

(a)



(b)

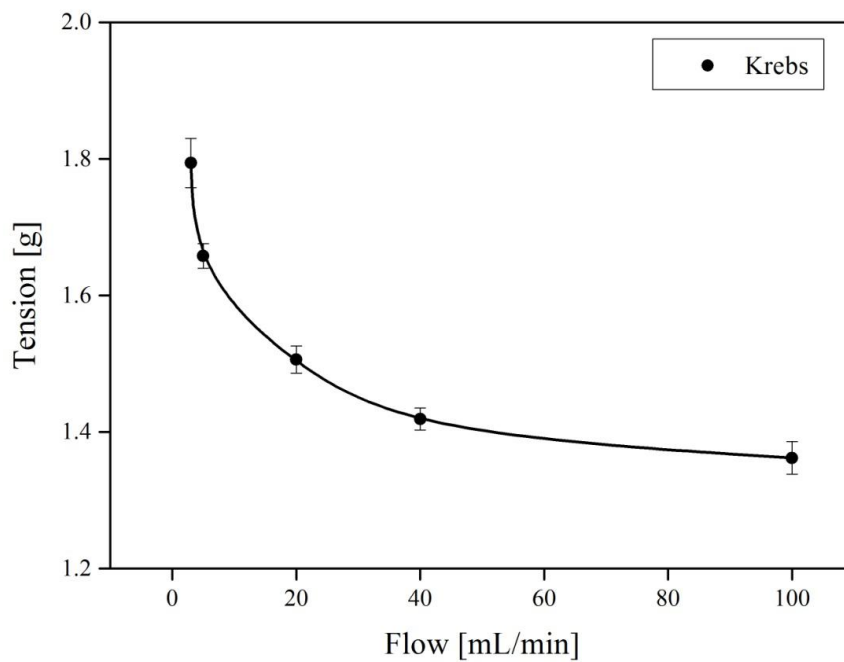


Abbildung 3.1: a) Flussabhängige intrazelluläre Membranpotentiale bei Perfusion mit Krebslösung (MW  $\pm$  SEM).

b) Flussabhängige Tonusentwicklung bei Perfusion mit Krebslösung (MW  $\pm$  SEM).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1.1.1 Krebslösung und AR-Blocker

Zur Bestimmung eines intrinsischen Effektes des  $\alpha$ -AR-Blockers PH und des  $\beta$ -AR-Blockers PR wurde die FMD von Krebslösung mit zugegebenen AR-Blockern im Vergleich zu Krebslösung gemessen. In den Kontrollen mit Krebslösung innerhalb des getesteten Kollektivs zeigte sich nach Vordehnung eine Dilatation des Präparates von  $1,777 \pm 0,052$  g bei einem Fluss von 3 ml/min auf  $1,351 \pm 0,021$  g bei einem Fluss von 100 ml/min ( $p < 0,0001$  für Differenz Tonus zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Krebslösung mit  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l) führte zu einer Dilatation von  $1,799 \pm 0,060$  g auf  $1,383 \pm 0,015$  g ( $p < 0,0001$  für Differenz Tonus zwischen 3 und 100 ml/min Fluss), Krebslösung mit  $\beta$ -AR-Blocker (PR  $10^{-7}$  mol/l) zu einer Dilatation von  $1,819 \pm 0,040$  g auf  $1,359 \pm 0,008$  g ( $p < 0,0001$  für Differenz Tonus zwischen 3 und 100 ml/min Fluss) und Krebslösung mit  $\alpha$ -AR- und  $\beta$ -AR-Blocker (PH + PR, je  $10^{-7}$  mol/l) zu einer Dilatation von  $1,779 \pm 0,041$  g auf  $1,395 \pm 0,013$  g ( $p < 0,0001$  für Differenz Tonus zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Bei nur minimalen Unterschieden der Werte ohne statistische Signifikanz ( $p > 0,05$  für alle Differenzen zwischen Krebslösung und Blockerlösungen) wurde für die folgenden Versuche ein fehlender intrinsischer Effekt der Blocker angenommen.

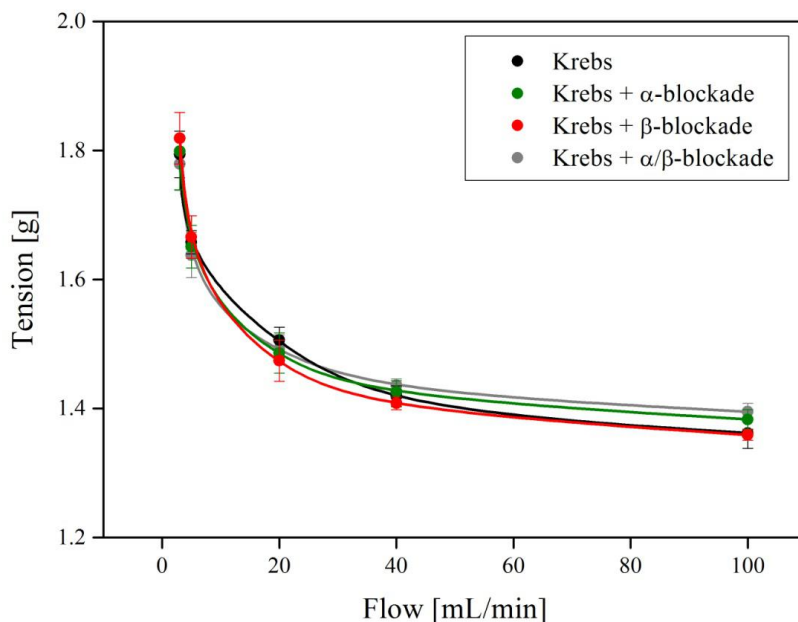


Abbildung 3.2: Flussabhängige Tonusentwicklung bei Perfusion mit Krebslösung, sowie mit Krebslösung unter Zugabe von AR-Blockern (PH  $10^{-7}$  mol/l und PR  $10^{-7}$  mol/l) (MW  $\pm$  SEM).  $p > 0,05$  für Unterschiede zwischen allen Kurven.

#### 3.1.2 LDL

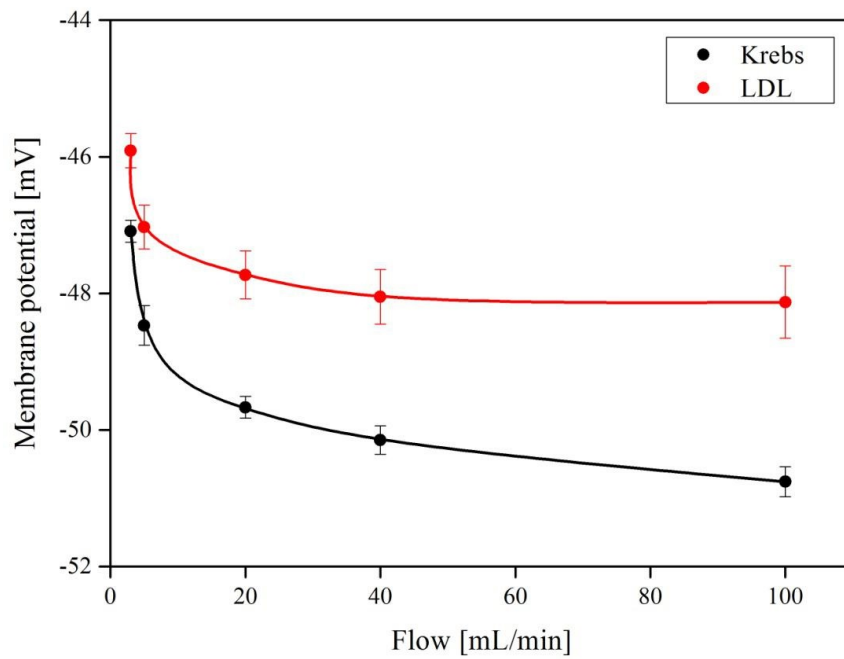
In den Messungen des Membranpotentials bei Perfusion mit LDL-Lösung hyperpolarisierten die VSMCs bei der Flussteigerung von  $-45,9 \pm 0,3$  mV bei 3 ml/min um 2,2 mV auf  $-48,1 \pm 0,5$  mV bei 100 ml/min ( $p = 0,0003$  für Differenz der Potentiale zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Dies ist eine Senkung des Potentials um 4,8 % und somit nur 61,8 % der in der Kontrolle gemessenen Hyperpolarisation. Die Differenz zur Krebslösung betrug 1,2 mV bei einem Fluss von 3ml/min ( $p < 0,0001$ ) bzw. 2,6 mV bei einem Fluss von 100 ml/min ( $p < 0,0001$ ).

Der Grundtonus der Gefäße war bereits bei einem Fluss von 3 ml/min bei Perfusion mit LDL-Lösung mit einer Kraftentwicklung von  $1,767 \pm 0,036$  g um 0,136 g höher als bei Perfusion mit Krebslösung mit  $1,630 \pm 0,043$  g ( $p = 0,0563$ ). Bei einem Fluss von 100 ml/min betrug die Differenz des Gefäßtonus zwischen LDL-Lösung und Krebslösung 0,318 g bei einer Kraft unter LDL von  $1,489 \pm 0,024$  g im Vergleich zu Krebslösung mit  $1,171 \pm 0,042$  g ( $p < 0,0001$ ). Die FMD bei Perfusion mit LDL-Lösung betrug damit im Mittel absolut 0,277 g oder prozentual 15,7 % ( $p < 0,0001$  für Differenz Tonus zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Dies entspricht 60 % der gemessenen FMD unter Krebslösung und bei Betrachtung der prozentualen Dilatation 55,7 %. Die FMD war aber weiterhin signifikant.

Somit zeigte sich bei LDL-Lösung sowohl ein erhöhter Grundtonus des Gefäßes, als auch eine verminderte FMD in Verbindung mit geringerer flussabhängiger Hyperpolarisation gegenüber der Perfusion mit Krebslösung.

### 3 Ergebnisse

(a)



(b)

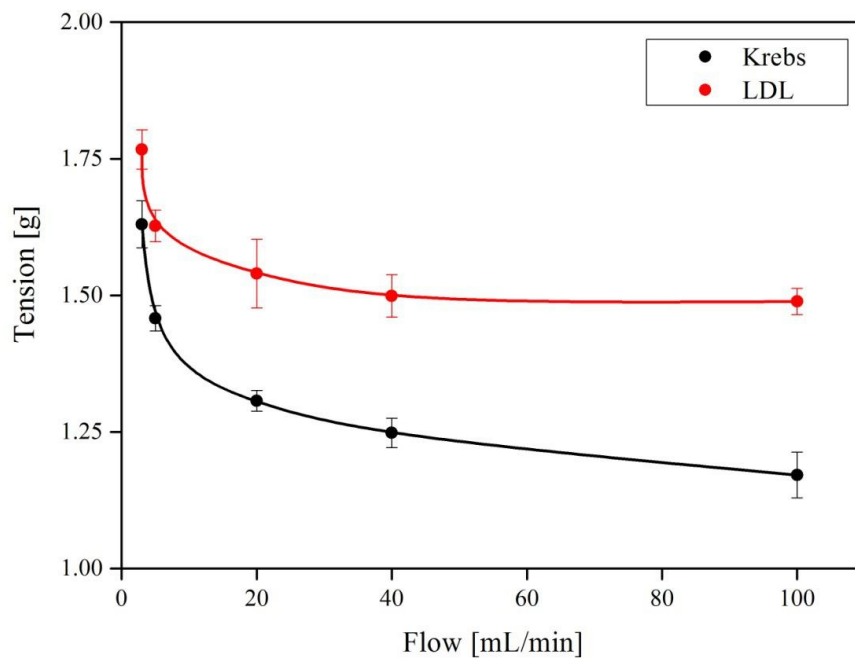


Abbildung 3.3: a) Flussabhängige intrazelluläre Membranpotentiale bei Perfusion mit LDL im Vergleich zu Krebslösung (MW  $\pm$  SEM).  
b) Flussabhängige Tonusentwicklung bei Perfusion mit LDL im Vergleich zu Krebslösung (MW  $\pm$  SEM)

#### 3.1.3 LDL unter Zugabe von Blockern

Bei Zugabe von AR-Blocker zur Perfusionslösung mit LDL hyperpolarisierten die VSMCs im Vergleich zur Perfusion mit reiner LDL-Lösung deutlich mehr. Dennoch war der Abfall des Membranpotentials geringer als unter Perfusion mit Krebslösung (Tabelle 3.1). Bei Flusssteigerung auf 100 ml/min zeigte sich ein schrittweiser Abfall des Membranpotentials der VSMCs bei Perfusion mit LDL-Lösung unter  $\alpha$ -AR-Blockade (PH  $10^{-7}$  mol/l) von 2,2 mV, unter  $\beta$ -AR-Blockade von 3,4 mV und unter kombinierter Blockade von 3,0 mV (jeweils  $p < 0,0001$  für Differenz Membranpotential zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Diese Abfälle liegen jeweils zwischen den Abfällen bei Flusssteigerung unter Krebslösung mit 3,7mV und unter LDL-Lösung mit 2,2 mV ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0004$  und  $p = 0,0001$  für Membranpotential bei 100 ml/min im Vergleich zu Krebslösung und  $p = 0,605$ ,  $p = 0,1516$  und  $p = 0,0281$  im Vergleich zu LDL-Lösung). Der absolute Abfall unter kombinierter AR-Blockade lag niedriger als unter reiner  $\beta$ -AR-Blockade (PR  $10^{-7}$  mol/l), jedoch lag hier auch bereits ein niedrigerer Ausgangswert bei einem Fluss von 3 ml/min vor. Die Hyperpolarisation war bei kombinierter AR-Blockade im Vergleich zur Perfusion mit reiner LDL-Lösung signifikant erhöht. Eine Übersicht über die Absolutwerte bei den verschiedenen Flussgeschwindigkeiten unter Einfluss der verschiedenen Lösungen sowie die Differenzen der Messwerte unter AR-Blockade zu den Messwerten unter LDL-Lösung finden sich in Tabelle 3.1. Die Werte sind grafisch in Abbildung 3.4 und 3.5 aufgetragen.



### 3 Ergebnisse

	Fluss	3	5	20	40	100	p-Wert
		ml/min	ml/min	ml/min	ml/min	ml/min	Differenz
							3ml - 100ml
1	Krebs [mV]	-47,1 ± 0,2	-48,5 ± 0,3	-49,7 ± 0,2	-50,2 ± 0,2	-50,8 ± 0,2	p<0,0001
2	LDL [mV]	-45,9 ± 0,3	-47,0 ± 0,3	-47,7 ± 0,4	-48,1 ± 0,4	-48,1 ± 0,5	p=0,0003
	Differenz 1-2 [mV]	-1,2 ± 0,3 (p<0,0001)	-1,4 ± 0,4 (p=0,0014)	-1,9 ± 0,4 (p<0,0001)	-2,1 ± 0,5 (p<0,0001)	-2,6 ± 0,6 (p<0,0001)	
3	LDL <sub>α</sub> [mV]	-46,3 ± 0,1	-47,4 ± 0,2	-48,2 ± 0,1	-48,6 ± 0,1	-48,5 ± 0,1	p<0,0001
	Differenz 1-3 [mV]	-0,8 ± 0,2 (p=0,0063)	-1,1 ± 0,3 (p=0,0345)	-1,5 ± 0,2 (p<0,0001)	-1,6 ± 0,2 (p<0,0001)	-2,3 ± 0,2 (p<0,0001)	
	Differenz 2-3 [mv]	0,4 ± 0,3 (p=0,3418)	0,4 ± 0,4 (p=0,4816)	0,4 ± 0,4 (p=0,3689)	0,5 ± 0,4 (p=0,3417)	0,4 ± 0,5 (p=0,605)	
4	LDL <sub>β</sub> [mV]	-46,2 ± 0,1	-47,5 ± 0,1	-48,5 ± 0,1	-49,0 ± 0	-49,5 ± 0,1	p<0,0001
	Differenz 1-4 [mV]	-0,9 ± 0,2 (p=0,0007)	-1,0 ± 0,3 (p=0,0129)	-1,2 ± 0,2 (p<0,0001)	-1,2 ± 0,2 (p=0,0134)	-1,2 ± 0,2 (p=0,0004)	
	Differenz 2-4 [mV]	0,3 ± 0,3 (p=0,48)	0,5 ± 0,3 (p=0,2175)	0,8 ± 0,4 (p=0,0969)	1,0 ± 0,4 (p=0,1483)	1,4 ± 0,5 (p=0,1516)	
5	LDL <sub>αβ</sub> [mV]	-46,5 ± 0,1	-47,5 ± 0,1	-48,6 ± 0,1	-49,3 ± 0,1	-49,6 ± 0,1	p<0,0001
	Differenz 1-5 [mV]	-0,6 ± 0,2 (p=0,0286)	-1,0 ± 0,3 (p=0,0158)	-1,0 ± 0,2 (p<0,0001)	-0,9 ± 0,2 (p=0,02)	-1,2 ± 0,2 (p=0,0001)	
	Differenz 2-5 [mV]	0,6 ± 0,3 (p=0,0787)	0,5 ± 0,3 (p=0,1893)	0,9 ± 0,4 (p=0,0436)	1,3 ± 0,4 (p=0,0151)	1,4 ± 0,5 (p=0,0281)	

Tabelle 3.1: Messwerte Elektrik: Intrazelluläre Membranpotentiale der VSMCs unter den verschiedenen Versuchslösungen (1-5) und Flüssen sowie Differenzen aller LDL-Lösungen zur Kontrolle mit Krebslösung und der LDL-Lösungen mit AR-Blocker zu reiner LDL-Lösung. LDL<sub>α</sub>: LDL-Lösung mit α-AR-Blocker (PH 10<sup>-7</sup> mol/l); LDL<sub>β</sub>: LDL-Lösung mit β-AR-Blocker (PR 10<sup>-7</sup> mol/l); LDL<sub>αβ</sub>: LDL-Lösung mit α-AR-Blocker (PH 10<sup>-7</sup> mol/l) und β-AR-Blocker (PR 10<sup>-7</sup> mol/l).

### 3 Ergebnisse

Die Tonusentwicklung verhielt sich nach Zugabe von AR-Blockern zur LDL-Lösung analog den gemessenen Membranpotentialen. Auch hier zeigte sich eine schrittweise Dilatation mit steigendem Fluss, die im Vergleich zur Perfusion mit reiner LDL-Lösung erhöht war. Die FMD zeigte sich jedoch weiterhin geringer als unter Krebslösung (Tabelle 3.2). So dilatierten die untersuchten Segmente bei Perfusion mit LDL unter Einfluss von  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l) von  $1,746 \pm 0,050$  g auf  $1,453 \pm 0,046$  g bei 100 ml/min Flussrate und somit absolut um 0,293 g ( $p = 0,001$  für Differenz Tonus zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Dies entspricht einer prozentualen Dilatation von 16,8%. Bei einer Flussrate von 100 ml/min zeigte sich die Dilatation um 0,282 g, und somit signifikant geringer als in der Kontrolle mit Krebslösung ( $p = 0,0058$ ), aber 0,036 g höher als unter LDL ( $p = 0,4516$ ). Diese Unterschiede waren noch deutlicher bei Hinzugabe des  $\beta$ -AR-Blockers (PR  $10^{-7}$  mol/l) zur LDL. Hier dilatierten die Gefäße von  $1,752 \pm 0,060$  g auf  $1,343 \pm 0,025$  g um absolut 0,409 g und prozentual um 23,3% bei 100 ml/min Flussgeschwindigkeit ( $p < 0,0001$  für Differenz Tonus zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Die Differenz zur Kontrolle mit Krebslösung war bereits nicht mehr signifikant und betrug hier 0,172 g ( $p = 0,0791$ ) und die Dilatation war um 0,146 g im Vergleich zu LDL signifikant erhöht ( $p = 0,0014$ ).

Unter Einfluss beider AR-Blocker fand sich unter LDL-Lösung eine Dilatation um 0,374 g (22,0%) von  $1,699 \pm 0,036$  g auf  $1,325 \pm 0,061$  g bei 100 ml/min Flussrate ( $p = 0,0004$  für Differenz Tonus zwischen 3 und 100 ml/min Fluss). Bei geringeren Ausgangswerten als in den Messreihen mit PH bzw. PR kam es bei 100 ml/min Fluss mit einer Dilatation von 0,374 g zu einer geringeren absoluten Dilatation als unter LDL mit  $\beta$ -AR-Blockade (PR  $10^{-7}$  mol/l). Bei 100 ml/min Flussrate ergab sich dennoch eine erhöhte, signifikante Differenz zu den Messwerten unter LDL von 0,165 g ( $p = 0,0063$ ) und zu einer weiteren Annäherung an die Kontrollwerte unter Krebslösung mit einer nicht signifikanten Differenz von 0,154 g ( $p = 0,154$ ). Tabelle 3.2 zeigt eine Übersicht über die gemessenen Tonuswerte bei Perfusion mit den verschiedenen Lösungen und die Differenzen der Tonuswerte unter Blockereinfluss zur Perfusion mit reiner LDL-Lösung. Abbildung 3.4 und 3.5 zeigen die grafisch aufgetragenen Werte.

### 3 Ergebnisse

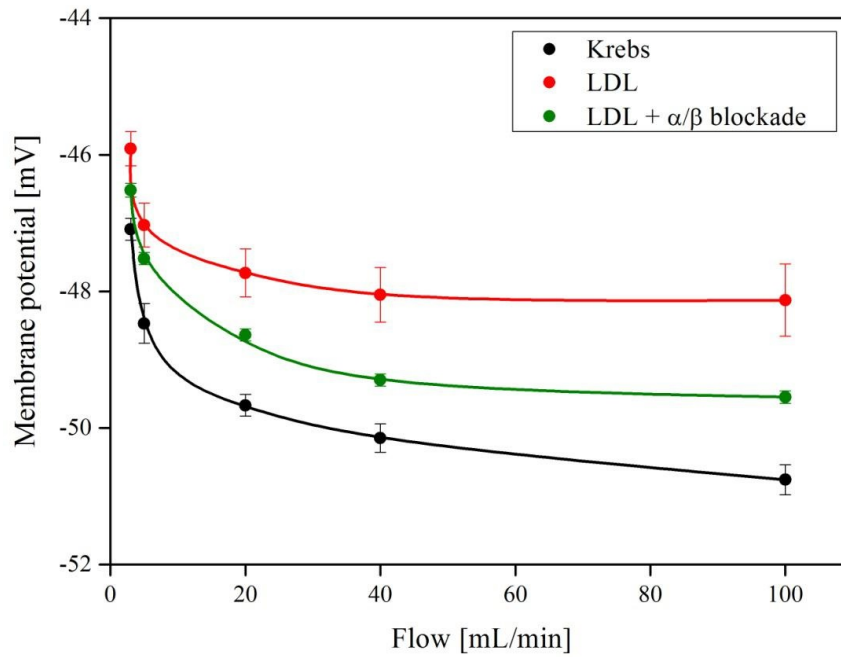
	Fluss	3	5	20	40	100	p-Wert
		ml/min	ml/min	ml/min	ml/min	ml/min	Differenz
							3ml - 100ml
1	Krebs [g]	1,630 ± 0,043	1,458 ± 0,023	1,307 ± 0,019	1,248 ± 0,027	1,171 ± 0,042	p<0,0001
2	LDL [g]	1,767 ± 0,036	1,627 ± 0,029	1,540 ± 0,063	1,499 ± 0,039	1,489 ± 0,024	p<0,0001
	Differenz	-0,136	-0,169	-0,233	-0,252	-0,318	
	1-2 [g]	± 0,056 (p=0,563)	± 0,037 (p=0,0001)	± 0,066 (p<0,0001)	± 0,048 (p<0,0001)	± 0,049 (p<0,0001)	
3	LDL <sub>α</sub> [g]	1,746 ± 0,050	1,610 ± 0,017	1,505 ± 0,046	1,455 ± 0,049	1,453 ± 0,046	p=0,001
	Differenz	-0,116	-0,152	-0,198	-0,207	0,282	
	1-3 [g]	± 0,066 (p=0,25)	± 0,029 (p=0,006)	± 0,050 (p=0,0003)	± 0,056 (p=0,003)	± 0,063 (p=0,006)	
	Differenz	0,021	0,017	0,035	0,044	0,036	
	2-3 [g]	± 0,061 (p=0,74)	± 0,034 (p=0,70)	± 0,078 (p=0,74)	± 0,063 (p=0,51)	± 0,052 (p=0,45)	
4	LDL <sub>β</sub> [g]	1,752 ± 0,060	1,595 ± 0,029	1,448 ± 0,042	1,396 ± 0,023	1,343 ± 0,025	p<0,0001
	Differenz	-0,121	-0,137	-0,141	-0,149	0,172	
	1-4 [g]	± 0,074 (p=0,23)	± 0,037 (p=0,014)	± 0,047 (p=0,007)	± 0,036 (p=0,02)	± 0,049 (p=0,08)	
	Differenz	0,015	0,032	0,092	0,103	0,146	
	2-4 [g]	± 0,070 (p=0,82)	± 0,041 (p=0,50)	± 0,076 (p=0,39)	± 0,046 (p=0,1)	± 0,035 (p=0,001)	
5	LDL <sub>αβ</sub> [g]	1,699 ± 0,036	1,554 ± 0,037	1,418 ± 0,039	1,356 ± 0,031	1,325 ± 0,061	p=0,0004
	Differenz	-0,069	-0,096	-0,111	-0,109	-0,154	
	1-5 [g]	± 0,056 (p=0,52)	± 0,043 (p=0,14)	± 0,043 (p=0,04)	± 0,041 (p=0,12)	± 0,074 (p=0,15)	
	Differenz	0,068	0,073	0,122	0,143	0,165	
	2-5 [g]	± 0,051 (p=0,29)	± 0,047 (p=0,20)	± 0,074 (p=0,30)	± 0,050 (p=0,04)	± 0,065 (p=0,006)	

Tabelle 3.2: Messwerte Mechanik: Gefäßtonus unter den verschiedenen Versuchslösungen (1-5) und Flüssen und Differenzen aller LDL-Lösungen zur Kontrolle mit Krebslösung und der LDL-Lösungen mit AR-Blocker zu reiner LDL-Lösung.

LDL<sub>α</sub>: LDL-Lösung mit α-AR-Blocker (PH 10<sup>-7</sup> mol/l); LDL<sub>β</sub>: LDL-Lösung mit β-AR-Blocker (PR 10<sup>-7</sup> mol/l); LDL<sub>αβ</sub>: LDL-Lösung mit α-AR-Blocker (PH 10<sup>-7</sup> mol/l) und β-AR-Blocker (PR 10<sup>-7</sup> mol/l).

### 3 Ergebnisse

(a)



(b)

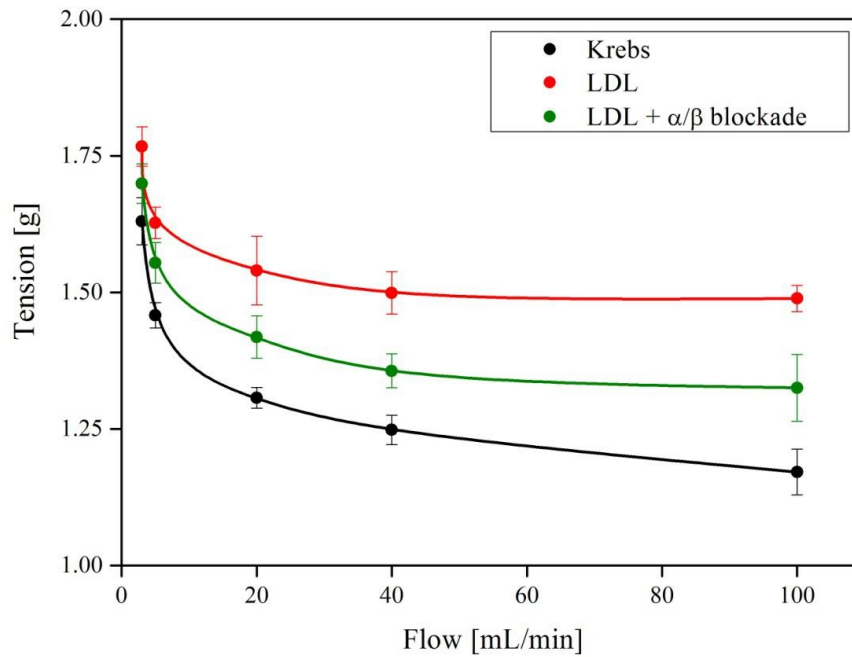
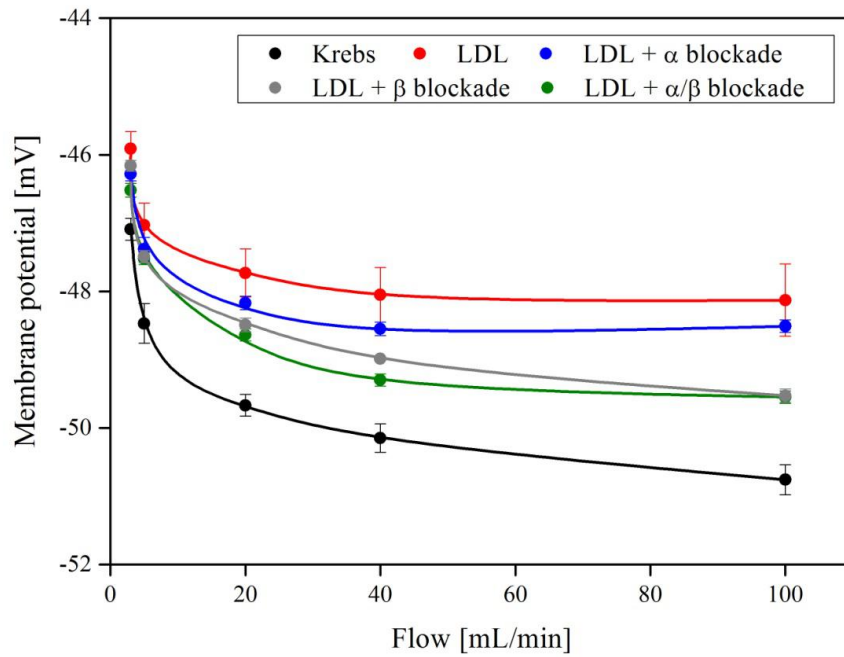


Abbildung 3.4: a) Flussabhängige intrazelluläre Membranpotentiale bei Perfusion mit LDL-Lösung unter Zugabe von  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l) und  $\beta$ -AR-Blocker (PR  $10^{-7}$  mol/l) im Vergleich zu LDL und Krebslösung (MW  $\pm$  SEM).

b) Flussabhängige Tonusentwicklung bei Perfusion mit LDL-Lösung unter Zugabe von  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l) und  $\beta$ -AR-Blocker (PR  $10^{-7}$  mol/l) im Vergleich zu LDL und Krebslösung (MW  $\pm$  SEM).

### 3 Ergebnisse

(a)



(b)

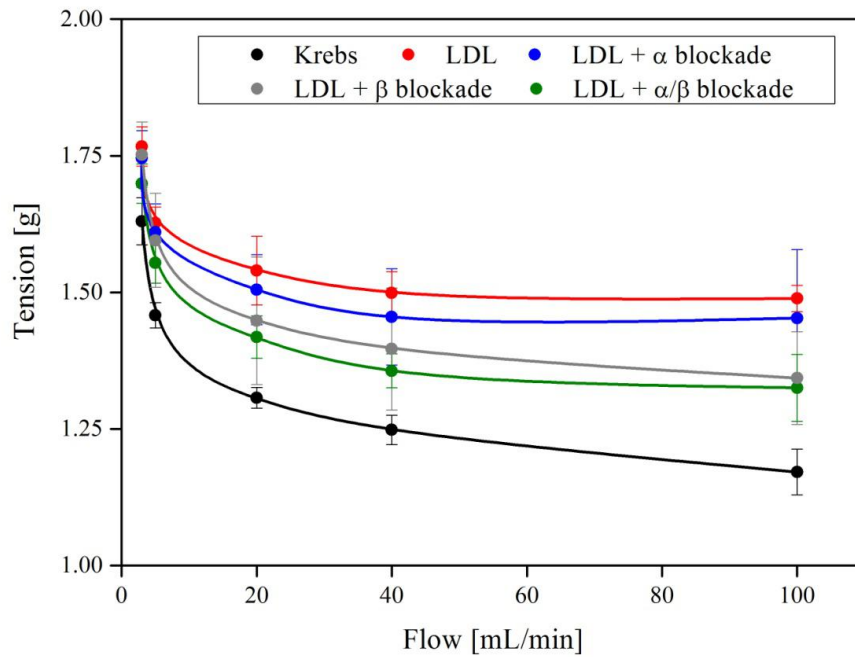


Abbildung 3.5: a) Flussabhängige intrazelluläre Membranpotentiale bei Perfusion mit Krebslösung, LDL-Lösung und LDL-Lösung unter der Zugabe von  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l),  $\beta$ -AR-Blocker (PR  $10^{-7}$  mol/l) oder Kombination beider Blocker (MW  $\pm$  SEM).

b) Flussabhängige Tonusentwicklung bei Perfusion mit Krebslösung, LDL-Lösung und LDL-Lösung unter der Zugabe von  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l),  $\beta$ -AR-Blocker (PR  $10^{-7}$  mol/l) oder Kombination beider Blocker (MW  $\pm$  SEM).

### 3 Ergebnisse

Zur Ermittlung des Effektes von LDL und LDL unter Zugabe von Blockern auf die FMD wurden von den Kraftwerten der Kontrolle mit Krebslösung jeweils die Kraftwerte der Fettlösungen abgezogen und die Ergebnisse aufgetragen. So ließ sich ein Effekt der jeweiligen Lösung auf die Verminderung der FMD bzw. die relative Konstriktion im Vergleich zu Krebslösung bestimmen. Für LDL ergab sich damit ein konstriktiver Effekt von  $0,136 \pm 0,056$  g bei 3 ml/min Fluss und  $0,318 \pm 0,049$  g bei 100 ml/min im Vergleich zu Krebslösung ( $p < 0,0001$  bei 100 ml/min Fluss). Der dilatatorische Effekt, der bei der Kontrolle auftrat ( $0,370$  g bei 3 ml/min und  $0,829$  g bei 100 ml/min), war also um 36,8 % bzw. 38,3 % reduziert. Für die Zugabe von Blockern zur LDL-Lösung ergaben sich niedrigere Werte (Abbildung 3.6). Die SEM der Differenzen sowie p-Werte sind bereits in Tabelle 3.2 zu finden. Unter  $\alpha$ -AR-Blockade (PH  $10^{-7}$  mol/l) betrug der LDL-Effekt bei maximalem Fluss von 100 ml/min somit 88,7%, unter  $\beta$ -AR-Blockade (PR  $10^{-7}$  mol/l) 54,1% und bei Hinzugabe beider Blocker 48,4% des Effektes von reiner LDL-Lösung.

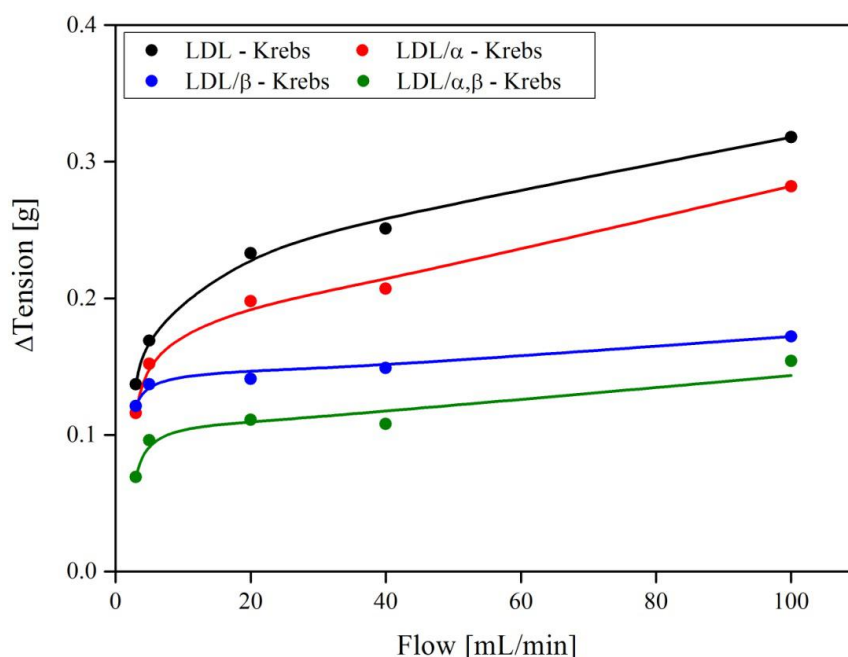


Abbildung 3.6: Berechnete flussabhängige kontraktile Effekte der einzelnen LDL-Lösungen mit und ohne Zugabe von AR-Blockern auf den Gefäßtonus (MW  $\pm$  SEM).

LDL/ $\alpha$ : LDL-Lösung mit  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l); LDL/ $\beta$ : LDL-Lösung mit  $\beta$ -AR-Blocker (PR  $10^{-7}$  mol/l); LDL/ $\alpha,\beta$ : LDL-Lösung mit  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l) und  $\beta$ -AR-Blocker (PR  $10^{-7}$  mol/l).

### 3 Ergebnisse

Aus den berechneten Effekten der einzelnen Lösungen auf die FMD kann der LDL-Effekt, der über die jeweiligen AR vermittelt wird, berechnet werden, indem man den Effekt der Lösung mit dem jeweiligen AR-Blocker vom LDL-Effekt subtrahiert. Durch Blockade eines AR fällt genau der Anteil des Effektes von LDL weg, der über diesen Rezeptor vermittelt wird. Es ergeben sich die Werte in Tabelle 3.3 für die absoluten LDL-Effekte über  $\alpha$ -AR und  $\beta$ -AR, die in der Abbildung 3.7 aufgetragen sind. Zusätzlich zu den durch Messung bestimmten Effekten über  $\alpha$ -AR und  $\beta$ -AR wurde der theoretische Wert über beide Rezeptoren mittels Addition von  $\alpha$ -AR-Effekt und  $\beta$ -AR-Effekt berechnet und aufgetragen.

Fluss	3 ml/min	5 ml/min	20 ml/min	40 ml/min	100 ml/min
LDL-Effekt $_{\alpha}$ [g]	0,020	0,017	0,035	0,045	0,036
LDL-Effekt $_{\beta}$ [g]	0,015	0,032	0,092	0,103	0,146
LDL-Effekt $_{\alpha\beta}$ [g] (gemessen)	0,068	0,073	0,122	0,143	0,164
LDL-Effekt $_{\alpha\beta}$ [g] (berechnet)	0,036	0,048	0,127	0,147	0,182

Tabelle 3.3: Berechnete Effekte von LDL auf die FMD über die einzelnen AR (MW  $\pm$  SEM).

LDL-Effekt $_{\alpha}$ : LDL-Effekt über den  $\alpha$ -AR; LDL-Effekt $_{\beta}$ : LDL-Effekt über den  $\beta$ -AR; LDL-Effekt $_{\alpha\beta}$  (gemessen): Gemessener LDL-Effekt über  $\alpha$ -AR und  $\beta$ -AR; LDL-Effekt $_{\alpha\beta}$  (berechnet): LDL-Effekt über  $\alpha$ -AR und  $\beta$ -AR durch Addition von LDL-Effekt $_{\alpha}$  und LDL-Effekt $_{\beta}$ .

### 3 Ergebnisse

Zusammenfassend konnte eine Zugabe von  $\alpha$ -AR-Blocker (PH  $10^{-7}$  mol/l),  $\beta$ -AR-Blocker (PR  $10^{-7}$  mol/l) oder beiden Blockern zur LDL-Lösung einen Teil der durch LDL verursachten Inhibition der FMD, sowohl auf Ebene des Membranpotentials, als auch auf Ebene des Gefäßtonus, wieder aufheben. Hierbei zeigte sich eine Blockade des  $\beta$ -AR als wesentlich effektiver als die des  $\alpha$ -AR und eine kombinierte Blockade einen additiven Effekt von beiden Blockaden.

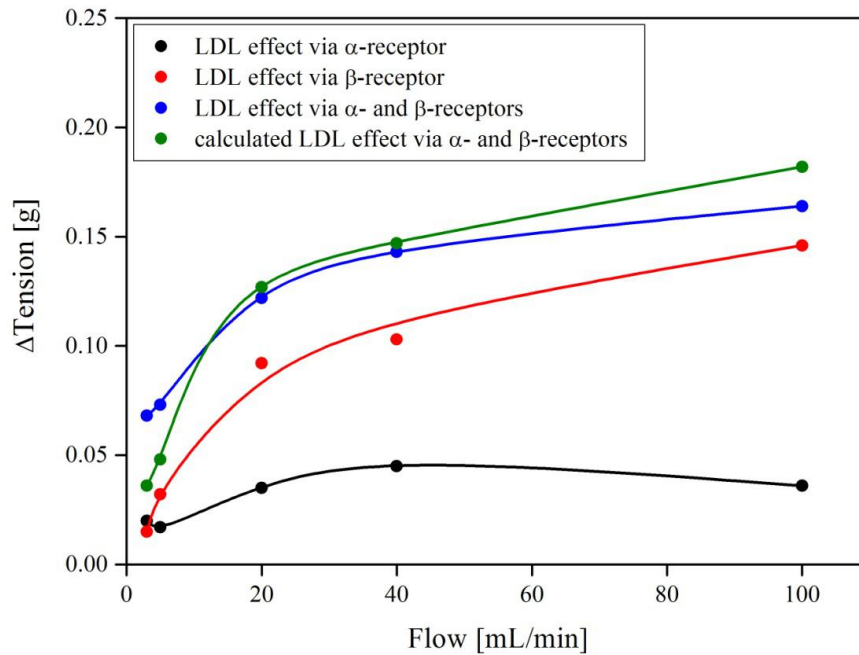


Abbildung 3.7: Effekte von LDL über die einzelnen Adrenorezeptoren, bestimmt aus Messwerten und Berechnung.

## 3.2 cAMP und cGMP

Die Konzentration der zyklischen Nukleotide wurde jeweils an Präparaten bestimmt, die zuvor einem Fluss von 100 ml/min in der jeweiligen Versuchslösung über 10 Minuten ausgesetzt waren. Die Messwerte dieser Versuchsreihe finden sich in Tabelle 3.4.



### 3 Ergebnisse

	Tonus bei 100 ml/min [g]	cAMP [nmol/kg]	cGMP [nmol/kg]
1 Krebs	1,171 ± 0,042	77,2 ± 1,7	13,9 ± 1,1
2 LDL	1,489 ± 0,024	24,8 ± 1,6	2,0 ± 0,7
Differenz 1 - 2		52,4 ± 2,3 (p < 0,0001)	11,9 ± 1,3 (p < 0,0001)
3 LDL <sub>α</sub>	1,453 ± 0,046	28,0 ± 2,3	2,3 ± 0,6
Differenz 1 - 3		49,2 ± 2,8 (p < 0,0001)	11,6 ± 1,3 (p < 0,0001)
Differenz 2 - 3		-3,2 ± 2,8 (p = 0,2712)	-0,3 ± 1,0 (p = 0,8179)
4 LDL <sub>β</sub>	1,343 ± 0,025	44,3 ± 4,1	4,4 ± 0,9
Differenz 1 - 4		32,9 ± 4,4 (p < 0,0001)	9,5 ± 1,5 (p < 0,0001)
Differenz 2 - 4		-19,5 ± 4,4 (p < 0,0001)	-2,4 ± 1,2 (p = 0,1941)
5 LDL <sub>αβ</sub>	1,325 ± 0,061	48,3 ± 11,6	5,5 ± 1,1
Differenz 1 - 5		28,9 ± 11,7 (p = 0,0211)	8,4 ± 1,6 (p < 0,0001)
Differenz 2 - 5		-23,5 ± 11,7 (p = 0,0287)	-3,5 ± 1,4 (p = 0,0643)

Tabelle 3.4: Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP in den Koronararterienpräparaten nach Perfusion mit Krebs- oder LDL-Lösung und unter Zugabe von AR-Blockern. Messung nach Exposition mit 100 ml/min Fluss bei der angegebenen Lösung unter Aufbringung des angegebenen Tonus durch das Präparat.

LDL<sub>α</sub>: LDL-Lösung mit α-AR-Blocker (PH 10<sup>-7</sup> mol/l); LDL<sub>β</sub>: LDL-Lösung mit β-AR-Blocker (PR 10<sup>-7</sup> mol/l); LDL<sub>αβ</sub>: LDL-Lösung mit α-AR-Blocker (PH 10<sup>-7</sup> mol/l) und β-AR-Blocker (PR 10<sup>-7</sup> mol/l).

#### 3.2.1 cAMP

Wie auch bei den Tonus- und Potentialbestimmungen zeigte sich in der cAMP-Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen der Perfusion mit Krebslösung mit einer cAMP-Konzentration von  $77,2 \pm 1,7$  nmol/kg und Perfusion mit LDL mit  $24,8 \pm 1,6$  nmol/kg ( $p < 0,0001$ ). Die Werte nach Blockade der AR lagen jeweils zwischen diesen Werten. Nach Perfusion mit LDL unter  $\alpha$ -AR-Blockade (PH  $10^{-7}$  mol/l) lag der Wert bei  $28,0 \pm 2,3$  nmol/kg ( $p = 0,27$  im Vergleich zu LDL,  $p < 0,0001$  im Vergleich zu Krebslösung) unter  $\beta$ -AR-Blockade (PR  $10^{-7}$  mol/l) bei  $44,3 \pm 4,2$  nmol/kg ( $p < 0,0001$  im Vergleich zu LDL,  $p < 0,0001$  im Vergleich zu Krebslösung) und unter Blockade beider Rezeptoren bei  $48,3 \pm 11,6$  nmol/kg ( $p = 0,03$  im Vergleich zu LDL,  $p = 0,02$  im Vergleich zu Krebslösung). Es zeigte sich somit, äquivalent zu den Messungen des Gefäßtonus, ein signifikant geringerer cAMP-Abfall durch LDL unter Blockade der  $\beta$ -AR, jedoch nicht unter der  $\alpha$ -AR-Blockade. Die cAMP-Werte wurden zu den jeweiligen Spannungen beim Fluss von 100 ml/min ins Verhältnis gesetzt. Zusammen mit den cAMP-Konzentrationen und Tonuswerten aus den Kontrollversuchen mit Krebslösung und Blockerlösungen ergab sich der in Abbildung 3.8b ersichtliche Verlauf einer chemomechanischen Kopplung mit logarithmischer Ausgleichskurve.

### 3 Ergebnisse

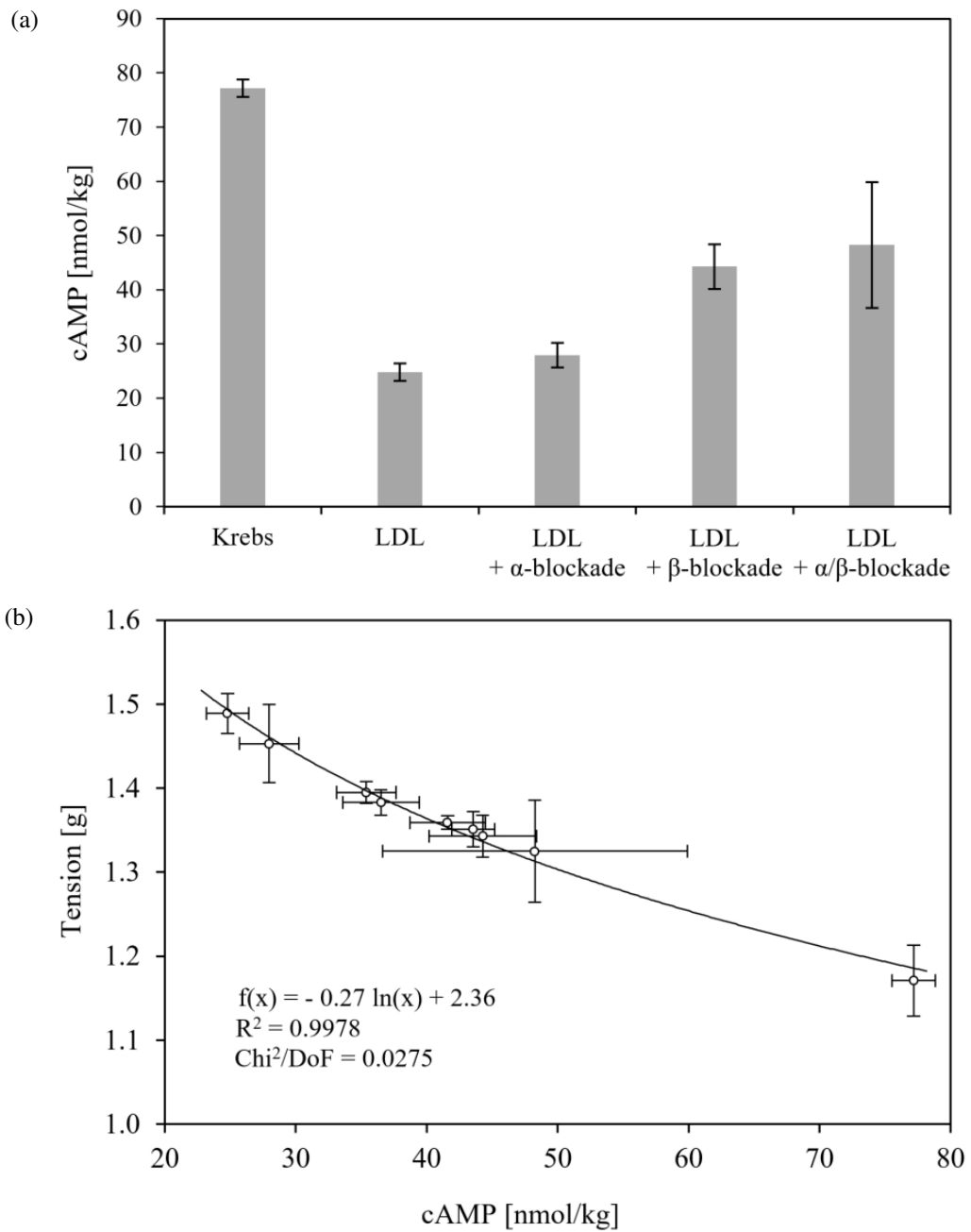


Abbildung 3.8: a) cAMP-Konzentration der Koronararterienpräparate bei einem Fluss von 100 ml/min bei Perfusion mit den einzelnen Versuchslösungen (MW  $\pm$  SEM). b) Chemomechanische Kopplung für cAMP als Funktion des Tonus in Abhängigkeit von der Konzentration von cAMP (MW  $\pm$  SEM).

#### 3.2.2 cGMP

Bei der Bestimmung von cGMP fand sich ein ähnliches Bild wie bei cAMP. Die bestimmten Konzentrationen betragen hier unter Krebslösung  $13,9 \pm 1,1$  nmol/kg und unter LDL-Lösung  $2,0 \pm 0,7$  nmol/kg mit signifikanter Differenz ( $p < 0,0001$ ). Nach Zugabe von Blockerlösungen betrug die cGMP-Konzentration bei Perfusion mit LDL unter  $\alpha$ -AR-Blockade (PH  $10^{-7}$  mol/l)  $2,3 \pm 0,6$  nmol/kg ( $p = 0,82$  im Vergleich zu LDL,  $p < 0,0001$  im Vergleich zu Krebslösung) und unter  $\beta$ -AR-Blockade (PR  $10^{-7}$  mol/l)  $4,4 \pm 0,9$  nmol/kg ( $p = 0,19$  im Vergleich zu LDL,  $p < 0,0001$  im Vergleich zu Krebslösung). Bei einer Blockade beider Rezeptoren wurde eine Konzentration von  $5,5 \pm 1,1$  nmol/kg ( $p = 0,06$  im Vergleich zu LDL,  $p \leq 0,0001$  im Vergleich zu Krebslösung) gemessen. Auf Ebene des zyklischen cGMP ergab sich somit kein signifikanter Unterschied zur Perfusion mit LDL-Lösung bei Blockade der AR. Bei Hinzunahme der Werte aus den Kontrollversuchen und Auftragen der cGMP-Konzentrationen gegen den Gefäßtonus beim Fluss von 100 ml/min ergab sich ebenfalls das Bild einer chemomechanischen Kopplung mit logarithmischer Ausgleichskurve (Abbildung 3.9b).

### 3 Ergebnisse

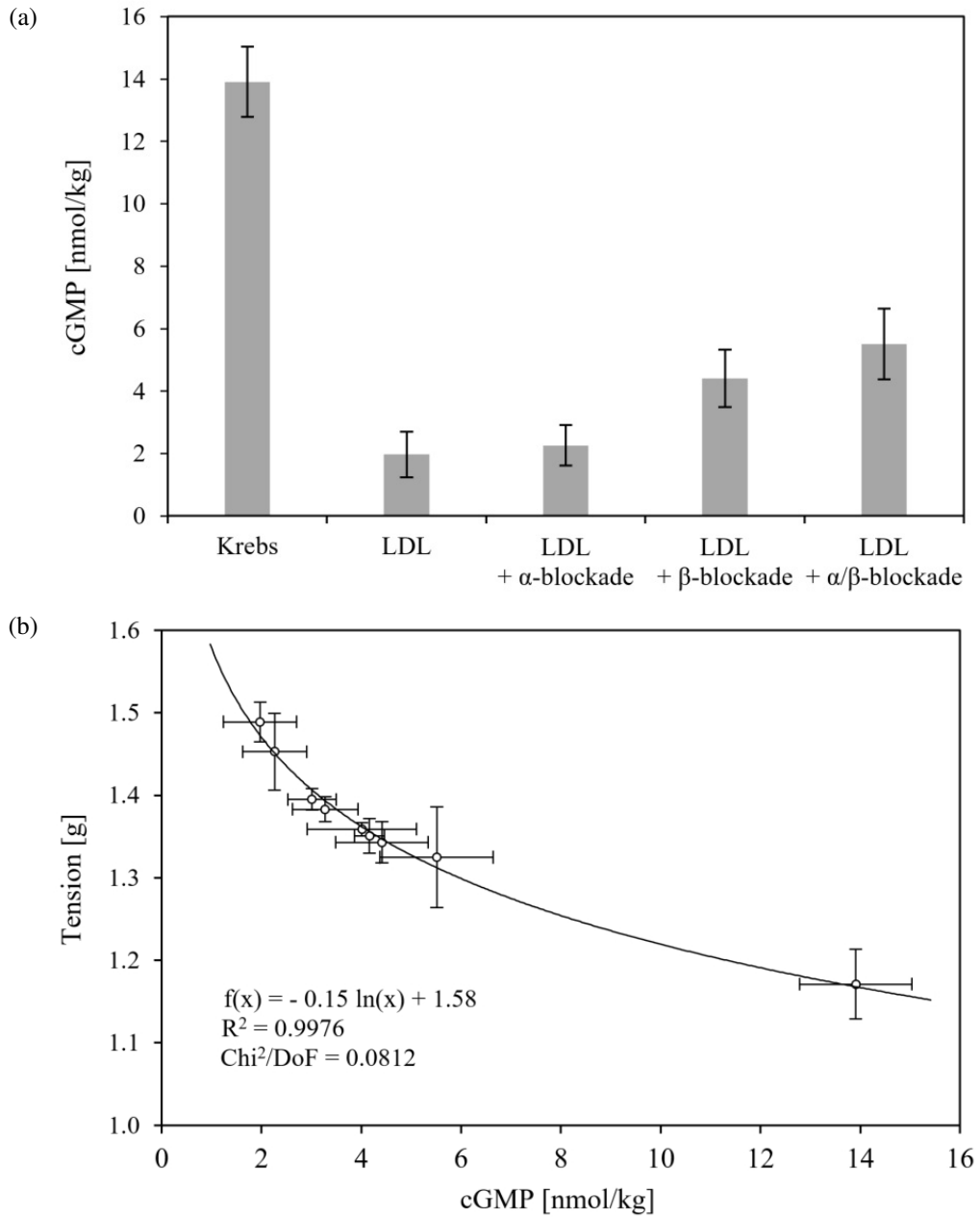


Abbildung 3.9: a) cGMP-Konzentration der Koronararterienpräparate bei einem Fluss von 100 ml/min bei Perfusion mit den einzelnen Versuchslösungen (MW  $\pm$  SEM). b) Chemomechanische Kopplung für cGMP als Funktion des Tonus in Abhängigkeit von der Konzentration von cGMP (MW  $\pm$  SEM).

### 3.3 Chemoelektrische Kopplung

Für cAMP und cGMP lässt sich auch eine chemoelektrische Kopplung darstellen, indem man die Konzentration des jeweiligen Nukleotids gegen das entsprechende Membranpotential aufträgt. Es ergeben sich die Graphen in Abbildung 3.10 mit logarithmischen Ausgleichskurven.

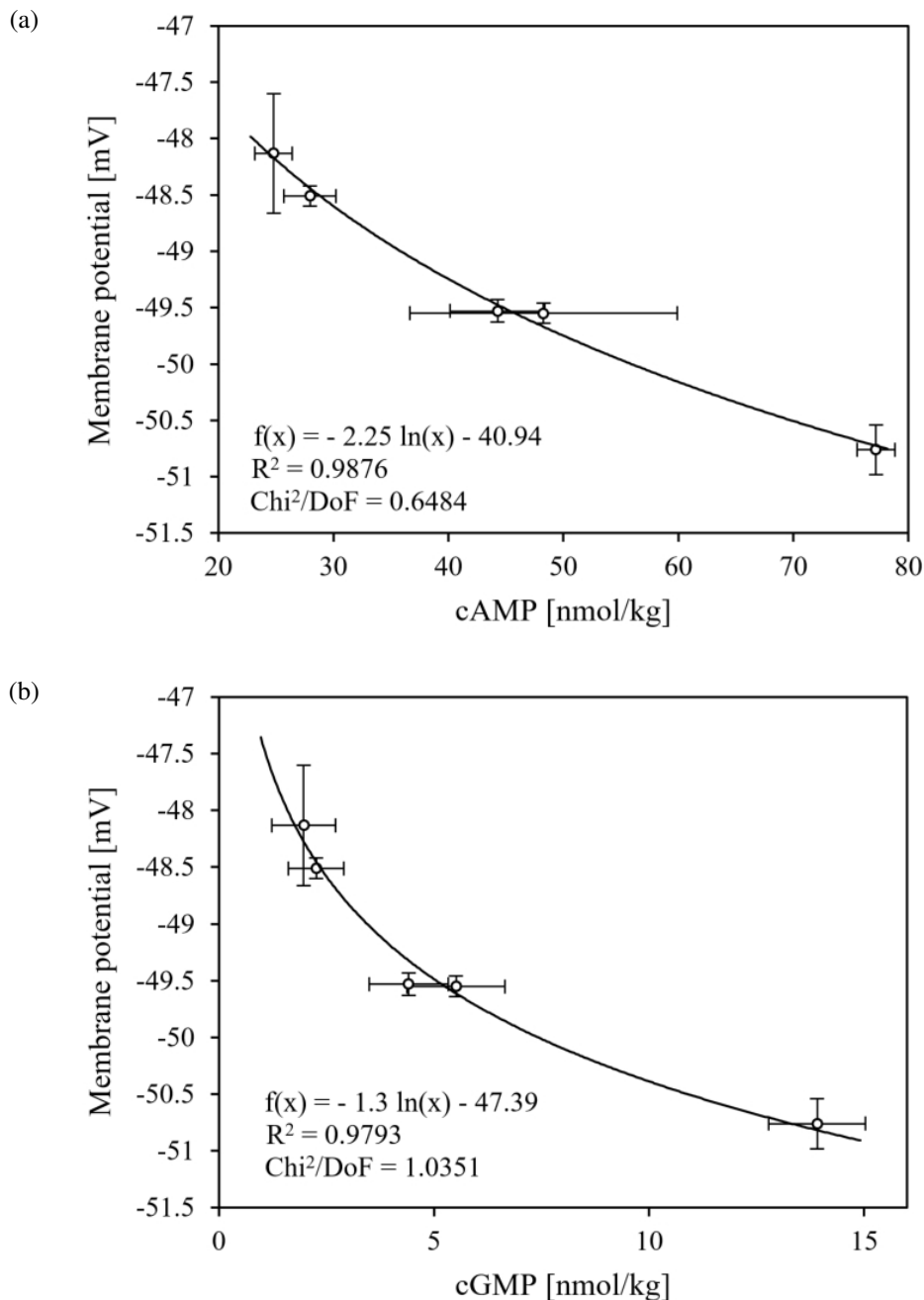


Abbildung 3.10: a) Chemoelektrische Kopplung für cAMP als Funktion des Membranpotentials in Abhängigkeit von der Konzentration von cAMP (MW  $\pm$  SEM).  
 b) Chemoelektrische Kopplung für cGMP als Funktion des Membranpotentials in Abhängigkeit von der Konzentration von cGMP (MW  $\pm$  SEM).

### 3.4 Elektromechanische Kopplung

Die gemessenen Membranpotentiale der VSMC bei den verschiedenen Flussgeschwindigkeiten unter den verschiedenen Versuchslösungen lassen sich gegen den dabei bestimmten Gefäßtonus auftragen. Hierbei ergibt sich eine lineare Beziehung für die elektromechanische Kopplung (Abbildung 3.11).

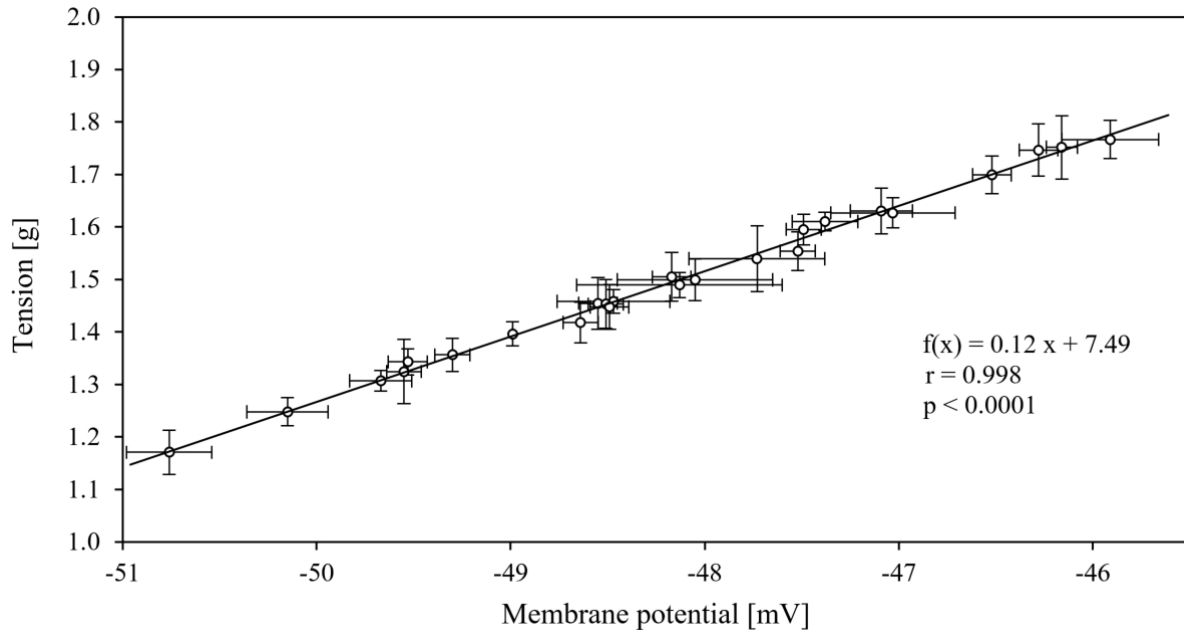


Abbildung 3.11: Elektromechanische Kopplung als lineare Funktion des Gefäßtonus in Abhängigkeit vom Membranpotential der VSMCs in Koronararterien des Menschen (MW  $\pm$  SEM).

Die Kurve in Abbildung 3.11 ist aus den Werten der Versuchsreihen erstellt. Löst man die Formeln der Ausgleichskurven der chemomechanischen Kopplung und der chemoelektrischen Kopplung auf und setzt sie ineinander ein, so erhält man für die berechnete Funktion der elektromechanischen Kopplung die Formel  $f(x) = 0,12x + 7,27$  (bei Verwendung der Messwerte für cAMP) und  $f(x) = 0,123x + 7,41$  (bei Verwendung der Messwerte für cGMP). Diese errechneten Formeln stimmen nahezu mit der aus den Versuchsdaten bestimmten Ausgleichsgeraden für die elektromechanische Kopplung überein.

## 4 Diskussion

Die FMD spielt in den Koronararterien eine bedeutende Rolle. Der myokardiale Sauerstoffverbrauch beträgt ca. 9-10 ml O<sub>2</sub>/min pro 100 g Gewebe und kann bei schwerer Arbeit bei gesunden, jungen Personen auf über 50 ml ansteigen. Der linksventrikuläre Blutfluss beträgt in Ruhe 70-80 ml/min pro 100 g Gewebe und kann auf fast 400 ml/min ansteigen [61]. Der koronare Fluss kann hierbei fast 5-fach vergrößert werden. Dies geschieht vorwiegend durch metabolische Vasodilatation der kleinen Arterien, denen eine FMD der zuführenden größeren Arterien folgt [50, 61]. Die FMD ist somit ein essentieller Faktor in der Koronardurchblutung. Bei Arteriosklerose ist diese Koronarreserve stark vermindert [61].

In diversen Studien konnte eine eingeschränkte bzw. aufgehobene FMD in arteriosklerotischen Arterien verschiedener Gefäßgebiete nachgewiesen werden. Eine FMD wurde *in vivo* in angiographisch normalen Segmenten des *R. interventricularis anterior* der linken Koronararterie beobachtet, war aber deutlich eingeschränkt in arteriosklerotischen Gefäßen [53]. In stark sklerotischen Arterien kann es sogar zu einer flussabhängigen Vasokonstriktion kommen. Zu einer Umkehrung von FMD in flussabhängige Vasokonstriktion kommt es mit steigendem Arteriosklerosegrad [57]. Als Ursachen für diese drastische Veränderung der FMD wird unter anderem eine verminderte PGI<sub>2</sub>-Synthese und eine Dysfunktion des PGI<sub>2</sub>-Sensors diskutiert [57, 114]. Bezüglich vermindelter PGI<sub>2</sub>-Synthese liegen jedoch widersprüchliche Ergebnisse vor [119]. Bei älteren Patienten kann PGI<sub>2</sub> selbst statt einer Dilatation eine Vasokonstriktion auslösen [64]. Studien an isolierten Gefäßen in experimentellen Tiermodellen zur Arteriosklerose und in arteriosklerotischen menschlichen Koronararterien zeigen, dass die endothelabhängige Relaxation durch Arteriosklerose vermindert wird [53].

Aufgrund der klinischen Relevanz der FMD im koronaren Stromgebiet haben wir uns für eine Untersuchung von koronararteriellen Präparaten entschieden. Gleichzeitig ermöglicht eine Untersuchung der Präparate unter physiologischen Bedingungen *in vitro* eine sehr viel genauere Messung der Vasomotorik als koronarangiographische Messungen *in vivo*.



#### 4 Diskussion

Im umgekehrten Sinne spielt Shear-Stress eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Arteriosklerose. Endothelzellen verändern ihre Form mit dem Shear-Stress, es kommt zu einer Neuordnung des Zytoskeletts und Shear-Stress beeinflusst die Produktion und Eliminierung von ROS. Laminarer Shear-Stress aktiviert die Superoxiddismutase (SOD), die ROS inaktiviert, oszillierender Shear-Stress aktiviert die NADPH-Oxidase, die  $O_2^-$  produziert [56].

Auch die Antwort auf vasoaktive Substanzen wird durch Artherosklerose beeinflusst. In unveränderten Gefäßen führt ACh zu einer endothelabhängigen Vasodilatation, indem es zu einer NO-Freisetzung führt [11, 120]. In mild arteriosklerotischen und stark sklerotischen Arterien ist diese endothelvermittelte Vasodilatation vermindert, da die NO-Produktion in diesen Gefäßen reduziert ist, und ACh kann sogar eine paradoxe Vasokonstriktion bewirken [53, 64]. Bei fortgeschrittener CAD kommt es zu einem Verlust der dilatatorischen Antwort auf ACh und Fluss [53]. Eine weitere Gruppe von Autoren postulierte, dass die endothelabhängige Vasodilatation gegenüber ACh und Blutfluss auch schon in frühen Stadien von Arteriosklerose verloren gehen könnte [120]. Salbutamol, das als  $\beta_2$ -Agonist normalerweise dilatatorisch wirkt, zeigt eine Dilatation noch in leicht sklerotischen Arterien. In stark sklerotischen Arterien bewirkt es allerdings eine Kontraktion, was möglicherweise durch einen verstärkten  $\alpha$ -Effekt oder durch verstärkte Freisetzung von NA über präsynaptische  $\beta_2$ -AR bewirkt werden könnte. An den koronaren Widerstandsarterien spielen  $\beta_2$ -AR eine größere Rolle als  $\beta_1$ -AR. Studien zeigen eine Hemmung der koronaren  $\beta_2$ -AR in stenotischen Koronararterien. Es gibt Berichte, dass Salbutamolinhalationen auch eine CAD demaskieren können [121].

Dass sich die Beeinflussung der Vasomotorik auch auf andere Gefäßsysteme übertragen lässt, wurde in weiteren Studien untersucht. Patienten mit endothelialer Dysfunktion in Koronararterien, welche sich als Vasokonstriktion auf ACh manifestierte, hatten signifikant verminderte FMD in der Brachialarterie gegenüber Patienten mit normaler koronarer Endothelfunktion. Die Studie zeigt eine enge Beziehung zwischen endothelabhängiger vasomotorischer Antwort auf ACh im Koronarium und FMD in der Brachialarterie [122]. In einer weiteren Studie führte, nach Adjustierung nach Risikofaktoren, eine 1 %-ige Erhöhung der FMD im Unterarm-Blutfluss-Versuch zu einem relativen Risiko von 0.87 für kardiovaskuläre Events (entspricht 13 % Risikoreduktion) [123]. Die Auswirkungen von LDL auf die FMD und der Mechanismus der Beeinflussung ist somit von höchster klinischer Relevanz.

## 4.1 Patientenkollektiv und Präparateauswahl

Die von uns untersuchten Präparate waren sowohl in ihrer Beschaffenheit, als auch in der Auswahl des Patientengutes bezüglich Alter, Vorerkrankungen und Vormedikation heterogen. Dies erfordert eine genaue Betrachtung, wie diese Parameter zu Veränderungen in unseren Ergebnissen geführt haben könnten.

Aufgrund der Veränderungen der Vasomotorik durch Arteriosklerose wurde bei der Auswahl der Arteriensegmente für die Messungen besonders darauf geachtet, dass diese keine arteriosklerotischen Plaques enthielten. Zudem wurden möglichst gleichartige Präparate (Durchmesser, Länge, Beschaffenheit) ausgewählt, um vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten. Um eine intakte FMD in den Präparaten nachzuweisen und pathologisches Verhalten des Präparates aufgrund der Gefäßeigenschaften zu erkennen, wurde an mindestens einem Segment des koronararteriellen Präparates jedes Patienten eine Kontrolle mit Krebslösung durchgeführt. Weiterhin konnte *Jumar* zeigen, dass sich arteriosklerotische Präparate, unter gleichen Versuchsbedingungen wie in dieser Arbeit, nicht im Basaltonus von plaquefreien Segmenten unterscheiden [80]. Bezüglich der Aussagekraft unserer Ergebnisse zum Effekt über die AR war es auch wichtig, dass die Gefäße möglichst wenig sklerotisch waren, da es bei Arteriosklerose auch zu einer verminderten  $\beta$ -AR-Wirkung kommen kann [81, 121]. Eine Verschiebung der Dominanz der verschiedenen Rezeptorsubtypen ( $\alpha_1$ -AR in normalen Koronararterien,  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -AR in sklerotischen Arterien [124]) bei Arteriosklerose spielt bei einem Einsatz von unselektiven AR-Blockern keine Rolle. Bezüglich des gefundenen LDL-Effektes muss dementsprechend allerdings weiter untersucht werden, ob die Wirkung über bestimmte Rezeptor-Subtypen vermittelt wird.

In einer weiteren Arbeit unserer Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Koronarpräparate in Abhängigkeit vom Patientenalter eine bessere Stress-Relaxation zeigten, je jünger die Patienten waren [80]. Diese Stress-Relaxation wurde allerdings in den ersten 10 Minuten nach dem Vorspannen des Versuches ohne Zugabe von Test-Lösungen gemessen, was in unserem Fall nicht möglich war, da die Präparate nach dem Vorspannen direkt der jeweiligen Test-Lösung ausgesetzt wurden, um eine gute Inkubation zu ermöglichen und vergleichbare Versuche zu vorangegangenen Versuchsreihen unter anderen Testlösungen zu produzieren. Da das Alter unserer Patienten und das Verhalten der Präparate in Krebslösung äquivalent zu den Ergebnissen

## 4 Diskussion

aus der Arbeit von *Jumar* [80] waren, können wir davon ausgehen, dass die Annahme, die Präparate zeigen in Abhängigkeit vom Alter unterschiedliche Stress-Relaxationen, auch für unsere Präparate gilt. Stress-Relaxation ist die Dilatation, die das Gefäß als Reaktion auf Dehnung ausführt (siehe hierzu Kapitel 4.2).

Von einer Vormedikation der Patienten kann man einen Einfluss auf die Rezeptorbesetzung und das Verhalten des Koronararterienpräparates erwarten. Eine Rezeptormodulation durch medikamentöse Therapie vor Herztransplantation wurde mehrfach beschrieben [125]. Eine dauerhafte Stimulation des  $\beta$ -AR führt zu einer Desensitivierung des Rezeptors. Dies würde eine Rolle spielen, wenn Patienten vor der Transplantation mit Katecholaminen behandelt wurden. Längere Exposition des Rezeptors gegenüber Agonisten führt zu einer Downregulation des Rezeptors [76].

Umgekehrt führt chronische  $\beta_1$ -Blockade zu einer Zunahme der  $\beta_1$ -AR-Dichte, nicht aber der  $\beta_2$ -AR-Dichte. Die Blockade führt aber dennoch zu einer verstärkten  $\beta_2$ -Reaktion bei unveränderter  $\beta_1$ -Reaktion [126]. Dies würde bei Gabe eines  $\beta_1$ -AR-Blockers zu einer zusätzlichen koronaren Dilatation führen, und ist vermutlich durch eine Kreuzsensitivierung des  $\beta_2$ -AR bedingt [127]. Das Ansprechen von  $\alpha$ -AR wird durch  $\beta$ -Blockade nicht beeinflusst, jedoch hat auch der  $\alpha_1$ -AR Phosphorylierungsstellen, die in der Desensitivierung eine Rolle spielen [27, 126].

Bei Herzinsuffizienz kommt es zu einer Veränderung des Antwortverhaltens auf adrenerge Einflüsse, unter anderem durch Entkoppelung der  $\beta_2$ -AR mit Verminderung der dilatatorischen Wirkung [80, 128]. Da ausschließlich Koronararterien von Patienten mit Herzinsuffizienz NYHA IV (Stufe IV in der Klassifikation der New York Heart Association) verwendet wurden, ist die Studienpopulation dahingehend sehr homogen, und die Veränderung der Ergebnisse der Versuche durch die Pathologie der Herzinsuffizienz wurde minimiert. Die von uns gefundenen Effekte über den  $\beta$ -AR könnten somit bei Patienten ohne Herzinsuffizienz sogar ausgeprägter sein.

In der Arbeit von *Jumar* konnte gezeigt werden, dass die Vormedikation (Katecholamine,  $\beta$ -AR-Antagonisten, und Phosphodiesterase (PDE)-Hemmer) keinen signifikanten Einfluss auf den Gefäßtonus der Arterienpräparate hatte. Der Tonus der Präparate von mit selektiven  $\beta_1$ -Antagonisten behandelten Patienten lag leicht unterhalb der Vergleichsgruppe, der von mit

PDE-Hemmern behandelten Patienten leicht darüber. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant [80].

Da das Patientengut sonst sehr heterogen war, sind gute Kontrollversuche unerlässlich. An jedem Koronararterienpräparat, an dem Versuche mit verschiedenen Lipidlösungen durchgeführt wurden, wurde eine Kontrollmessung mit Krebslösung durchgeführt. Dies lässt einerseits Pathologien der Vasomotorik des Präparates schnell erkennen und zum anderen führt es dazu, dass sich die eventuellen Einflüsse individueller Faktoren in der Auswertung ausgleichen. Aufgrund pathologisch veränderter Präparate und Vormedikation der Patienten lässt sich die Gesamtaussage jedoch vermutlich nur auf das von uns untersuchte Patientenkollektiv (Herzinsuffizienz NYHA IV, vorwiegend männliche Patienten) beziehen.

### 4.2 FMD in Krebslösung

Durch die Kontrollversuche mit Krebslösung konnten wir eine funktionsfähige FMD an unseren Präparaten nachweisen. Die FMD in der menschlichen Koronararterie wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen und gilt als allgemein bekannter Effekt (siehe Kapitel 1.1.3). Durch eine hohe Präparatezahl in den Kontrollversuchen war es uns möglich, eine valide Kontrollkurve für die FMD in unserem Patientenkollektiv zu erstellen. Es gilt allerdings zu bedenken, dass das Ausmaß der Dilatation von 28,2% im Vergleich zum Ausgangstonus nicht nur durch die FMD, sondern auch zum Teil durch die Stress-Relaxation bedingt ist.

Durch das Vorspannen der Präparate wurde die Stress-Relaxation minimiert. Andere Arbeiten und unsere Kontrollkurven haben gezeigt, dass es auch nach den ersten 10 Minuten nach Einspannen in die Versuchsapparatur zu einer Dilatation des Gefäßsegmentes kommt, die flussunabhängig ist [80, 117]. Diese Relaxation ist abhängig von den Eigenschaften des Präparates, unter anderem vom Alter des Patienten (siehe Kapitel 4.1). Diese Stress-Relaxation wurde von uns nicht separat gemessen, müsste aber in der Auswertung von der Dilatation abgezogen werden, um den genauen Wert der FMD zu erhalten. Bei Gleichartigkeit der Segmente eines Präparates würde die Stress-Relaxation allerdings ähnlich ausfallen und somit herausfallen, wenn wir Differenzen

der Dilatationen von 2 Präparaten, also den absoluten Effekt einer Intervention (LDL, AR-Blocker) berechnen. Im Falle des Effektes von LDL führt die Stress-Relaxation dazu, dass wir den eigentlichen LDL-Effekt auf die FMD eher unterschätzen, denn LDL inhibiert nur einen Teil der FMD im Vergleich zur Krebslösung. Wenn ein Teil dieser verbleibenden Dilatation der Stress-Relaxation zuzuschreiben ist, ist der relative Anteil der FMD, der durch LDL inhibiert wird, grösser.

### 4.3 Intrinsischer Blockereffekt

Vor den Versuchen mit LDL-Lösung zeigte sich in den Kontrollversuchen zur Ermittlung der intrinsischen Blockeraktivität kein signifikanter Einfluss der AR-Blocker auf die FMD. Dies steht im Widerspruch zu einer Studie von *Okajima et al.*. Sie wiesen eine verminderte FMD von Koronararterien unter  $\beta$ -Blockade *in vivo* bei Hunden nach. Sie postulierten ein Überwiegen des verbleibenden  $\alpha$ -Effektes unter erhöhter körperlicher Anstrengung, welcher jedoch bei unseren *in vitro* Experimenten nicht gegeben ist [129]. *Hull et al.* zeigte, dass die FMD in Femoralarterien von Kaninchen nicht durch PR verändert wurde [68]. Bezüglich  $\alpha$ -Blockade konnte kein Einfluss von PH auf die FMD im menschlichen Unterarm gefunden werden, jedoch zeigte sich ein deutlicher negativer Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die FMD, was unsere Theorie bestärkt, dass die FMD über Adrenorezeptoren moduliert werden kann [130]. Zudem ist zu beachten, dass die Rezeptorenverteilung und der Effekt über die Rezeptoren in verschiedenen Spezies, ja sogar innerhalb einer Spezies, und in verschiedenen Gefäßbetten sehr unterschiedlich sein kann. Da in der von uns durchgeführten Versuchsreihe zum Effekt von AR-Blockern auf die FMD kein signifikanter Effekt im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollversuchen zu finden war, konnte der Einfluss der Blocker somit als minimal oder nicht vorhanden angenommen werden. Daher wurde er für die folgenden Versuche mit LDL nicht mehr berücksichtigt.

## 4.4 LDL, FMD und LDL-Bindungsstellen

Wie in der Einleitung erwähnt, führt LDL bzw. oxLDL in normalen Gefäßen zu einer Verminderung der FMD. Es ist immer noch nicht vollständig geklärt, über welchen Mechanismus LDL diese Einschränkung bewirkt. Das Prinzip unserer Versuche basierte auf der Hypothese, dass, sollte LDL seinen Effekt über die sympathischen AR ausüben, eine Blockade dieser Rezeptoren auch den LDL-Effekt auf die FMD vermindern würde. Wir entschieden uns für eine unspezifische Blockade jeweils der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -AR ohne spezifische Blockade der jeweiligen Untergruppen, da gut untersuchte, gruppenspezifische Präparate zur Verfügung stehen.

Unter Einfluss von LDL-Lösung zeigte sich eine signifikante Einschränkung der FMD. Dieses Ergebnis bestätigt vorliegende Studien, in denen dieser Effekt bereits vielfach nachgewiesen werden konnte [54, 55, 101–104, 131]. In unseren Messungen reduzierte LDL die FMD um 40% des Wertes unter Krebslösung bei Betrachtung der Absolutwerte und um 44,3% bei Bestimmung der prozentualen Dilatation in Abhängigkeit vom Ausgangstonus.

*Rosendorf* fasste 2002 zusammen: „LDL hat vasokonstriktorische, mitogene, pro-inflammatorische und thrombogene Eigenschaften“ [132]. Hypercholesterinämie vermindert die endothelabhängige Vasodilatation, die rezeptorvermittelte Dilatation und die FMD [133, 134]. Es kommt zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO, einer Downregulation von NO und zu einer erhöhten Bildung von Superoxid ( $O_2^-$ ), das NO inaktiviert und LDL oxidiert [64, 133]. *Zhang et al.* zeigten ausserdem, dass oxLDL durch Reduktion des L-Arginin-Transportes die Möglichkeit des Endothels vermindert, NO zu produzieren [135]. Es konnte weiter gezeigt werden, dass bereits eine einzelne LDL-Apharese mit Reduktion von LDL und oxLDL zu einer Verbesserung der Endothelfunktion mit Verbesserung der Dilatation in Antwort auf Ach führt [102]. Schon durch hochkalorische Cholesterindiät konnte im Tierexperiment eine paradoxe Vasokonstriktion auf Ach und verminderte FMD nachgewiesen werden [120]. OxLDL, isoliert aus Arterien von Kaninchen mit Hypercholesterinämie, kann die endothelabhängige Relaxation inhibieren [110, 120].

Zugleich ist Cholesterin aber auch essentiell für die Antwort der Endothelzellen auf Shear-Stress und somit für die FMD. Es wurde gezeigt, dass die Plasmamembranfluidität als Antwort auf

#### 4 Diskussion

Shear-Stress zunimmt. Die Entfernung von Cholesterin aus der Plasmamembran verhindert hierbei die Antwort auf Shear-Stress der Endothelzelle, inklusive ERK-(extracellular-signal regulated kinase) und eNOS-Aktivierung [56].

Die Interaktion von LDL mit den Endothelzellen und VSMC war Gegenstand intensiver Forschungen. Schon 1992 wurde von *Bochkov et al.* postuliert, dass es zwei verschiedene Bindungsstellen für LDL gibt, eine mit hoher Affinität, die in ihrer Affinität dem klassischen ApoB/E-Rezeptor ähnelt, und eine mit niedrigerer Affinität, die aber eine viel höhere Bindungskapazität besitzt. Da ein  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phosphoinositolanstieg durch Pertussistoxin (PTX) signifikant inhibiert wurde, vermuteten sie eine direkte Kopplung dieser LDL-Rezeptoren an G-Proteine, wahrscheinlicher aber eher eine Aktivierung der G-Proteine durch indirekte Effekte. Dies ist ein erster Hinweis auf die Interaktion von LDL mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie den sympathischen AR [88, 136].

LDL kann auch über geladene Aminosäuren innerhalb seiner Apolipoproteine an diverse endotheliale Proteine und Rezeptoren binden. *Siegel et al.* zeigten, dass dies unter anderem beim HS-PG-Rezeptor der Fall ist, der zudem als Flusssensor für die FMD indentifiziert wurde [92, 137]. Die Bindung an diesen Rezeptor spielt eine essentielle Rolle bei der Bildung von Nanoplaques in der Gefäßwand, der ersten Stufe der Arteriosklerose [92]. Weiterhin kann LDL über Scavenger-Rezeptoren in Zellen aufgenommen werden, dies gilt besonders für modifiziertes LDL (oxLDL oder acetyliertes LDL (acLDL)) und spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Progression von arteriosklerotischen Plaques [7, 138].

Es zeigt sich, dass LDL stark mit den für die FMD notwendigen Mechanismen interagiert. Natürlich kann postuliert werden, dass die Einschränkung der FMD nur durch Interaktion mit den FMD-vermittelnden Sensoren und Mechanismen, wie dem HS-PG-Rezeptor und der Inaktivierung von NO, bewirkt wird. Dies steht aber im Kontrast zu den gemessenen Veränderungen intrazellulärer Signalmoleküle in den VSMC, die durch LDL bewirkt werden. LDL interagiert nachgewiesenermaßen mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und kann intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, die identisch sind mit der intrazellulären Wirkungsweise von adrenergen Rezeptoren oder dieser entgegengesetzt (siehe folgende Kapitel).

## 4.5 LDL und $\alpha$ -Blockade

Eine Zugabe des  $\alpha$ -AR-Blockers PH verminderte den negativen Effekt von LDL auf die FMD im Vergleich zu reiner LDL-Lösung um 11,3%. Dieser Wert war nicht signifikant und bezieht sich auf einen Fluss von 100 ml/min. Bei niedrigeren Flussgeschwindigkeiten war der absolute Effekt jeweils geringer. Trotz der fehlenden Signifikanz interpretieren wir diese Verbesserung der FMD als Effekt, der von LDL über Wechselwirkung mit dem  $\alpha$ -AR auf die FMD ausgeübt wird. Da der  $\alpha$ -AR eine Kontraktion des Gefäßes bewirkt, muss der Effekt durch eine Aktivierung des  $\alpha$ -AR durch LDL geschehen.

Hinweise auf diesen Mechanismus wurden in vielfältiger Weise schon früh gefunden. Wie in der Einleitung beschrieben, führt eine Aktivierung des  $\alpha_1$ -AR zu einer Produktion von  $IP_3$  und DAG durch die PLC, mit konsekutivem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ . *Bochkov et al.* beschrieben einen Anstieg der verschiedenen Phosphoinositole (1- $IP_1$ , 4- $IP_1$ , 1,4- $IP_2$ , 1,4,5- $IP_3$  und 1,3,4,5- $IP_4$ , die positiv identifiziert wurden, sowie 3 weitere) nach Exposition der VSMC gegenüber LDL, von denen 1,4,5- $IP_3$  für die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern zuständig ist, und eine Aktivierung der PKC mit Anstieg der Phosphoinositole und Diacylglycerole (DAGs) [26, 136]. Der durch LDL verursachte Phosphoinositolkatabolismus wird durch Aktivierung der PKC, Aktivierung der AC (Anstieg von cAMP) und Erhöhung des intrazellulären cGMP (durch ein Analogon) vermindert und durch PTX verhindert [111, 136]. Dieses Ergebnis (Anstieg von  $IP_3$  und  $[Ca^{2+}]_i$ , der durch PTX vermindert werden konnte) wurde ebenfalls schon 1989 von *Morita et al.* gezeigt [139]. *Giardina et al.* fanden eine oxLDL-abhängige Kontraktion der VSMC, die nicht mit einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , allerdings mit einer Aktivierung der PKC-Isoformen  $\alpha$  ( $Ca^{2+}$ -abhängig) und  $\epsilon$  ( $Ca^{2+}$ -unabhängig) einhergeht. Sie schlossen daraus, dass diese für eine erhöhte  $Ca^{2+}$ -Sensitivität des kontraktilen Apparates verantwortlich ist [140]. Auch *Resink et al.* stellten fest, dass oxLDL zu einer zeit- und dosisabhängigen Phosphoinositolakkumulation führt. Dabei bewirkte eine vorherige Inkubation mit LDL eine signifikante Erhöhung des oxLDL-induzierten Anstiegs von Inositolphosphaten. Auch hier wurde der Anstieg durch PKC-Aktivierung, cAMP-Erhöhung und ein cGMP-Analogon vermindert. Zusätzlich wurde die Phosphoinositolakkumulation durch NaF (bewirkt eine Dissoziation von G-Proteinen [141]), Calcium-Antagonisten (Verapamil, Diltiazem und Nifedipin) sowie verschiedene Endozytosein-



#### 4 Diskussion

hibitoren verhindert. Daraus schlossen sie, dass LDL ähnlich wie  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierende Hormone wirken könnte, die über eine G-Protein-gekoppelte PLC zu einem Anstieg der Phosphoinositole führen, und dass es einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Phosphoinositole und der rezeptorvermittelten Endozytose gibt [142]. In einem weiteren Artikel zeigten sie, dass LDL eine zeitabhängige Produktion von Inositolmono-, -bis- und -trisphosphat ( $\text{IP}_1$ ,  $\text{IP}_2$ ,  $\text{IP}_3$ ) induziert [143]. Dieser Anstieg war in spontan hypertensiven Ratten 2-3 mal höher als in normotensiven Ratten, war konzentrationsabhängig und zeigte eine Sättigungskinetik. LDL löste weiterhin einen biphasischen Anstieg der DAG-Konzentration aus, der in spontan hypertensiven Ratten größer war als in normotensiven Ratten und eine Dosisabhängigkeit zeigte. Die LDL-stimulierte Phosphoinositol-Produktion wurde durch PTX verhindert, so dass die Autoren vermuteten, dass es sich um einen Prozess handelt, bei dem ein  $\text{G}_i$ -Protein beteiligt ist. Zusätzlich zeigten sie, dass dieser Anstieg nicht abhängig ist von den polykationischen Eigenschaften von ApoB [144]. Bei *Ogihara et al.* zeigte sich eine konzentrationsabhängige Stimulation der  $\text{IP}_3$ -Produktion 30 s nach Zugabe von LDL oder ApoB [145]. In einer Arbeit von *Tasaki et al.* wurde eine signifikante Erhöhung des  $\text{IP}_3$ -Gehaltes nach Inkubation mit LDL für 2,5 und 10 min, allerdings nicht nach 20 h Inkubation gemessen [146]. *Encabo et al.* beschrieben eine durch Phorbol-12,13-dibutyrate (PKC-Aktivatoren) ausgelöste, konzentrationsabhängige Verstärkung der Kontraktion durch oxLDL. Weiterhin verhinderte Staurosporin, ein Inhibitor der PKC, die durch oxLDL ausgelöste Verstärkung der serotonininduzierten Vasokonstriktion, woraus sie schlossen, dass der oxLDL-Effekt über eine Aktivierung der PKC vermittelt wird [147].

Weitere Arbeiten, in denen ein Anstieg der Phosphoinositole gemessen wurde, stammen von *Block et al.*, die einen Anstieg unter LDL in niedrigen Konzentrationen in verschiedenen Zelltypen feststellten, der auch mit einem Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  verbunden war, und von *Scott-Burden et al.*, die auch zusätzlich eine Aktivierung der PKC maßen [148, 149]. *Sachinidis et al.* konnten hingegen keine Erhöhung der Inositolphosphat-Konzentrationen nachweisen [150].

Die Erhöhung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die letztendlich für die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur verantwortlich ist, wurde teilweise mit untersucht und teilweise in gesonderten Arbeiten betrachtet.

In mehreren Untersuchungen mit unterschiedlichen Ansätzen wurde ein Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

#### 4 Diskussion

durch LDL bzw. oxLDL gezeigt. *Sachinidis et al.* und *Bochkov et al.* zeigten, dass LDL einen Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  verursacht, welches erst stark ansteigt und anschließend auf ein weiterhin erhöhtes Level abfällt [136, 150–153]. Laut den Autoren waren Ähnlichkeiten der Reaktion der Zellen auf LDL mit  $Ca^{2+}$ -freisetzenden Hormonen zu erkennen, und der Anstieg von  $Ca^{2+}$  konnte in einer Studie durch PTX verhindert werden [111, 136]. Der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  konnte auch für oxLDL gezeigt werden und in dieser Arbeit durch Zugabe eines  $Ca^{2+}$ -Kanal-Blockers oder in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium verhindert werden [146, 154, 155]. Dies legt einen erhöhten  $Ca^{2+}$ -Influx von extrazellulär als Grund des Anstiegs dar.

In den meisten Studien war der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch oxLDL höher als durch normales (nicht oxidiertes oder acetyliertes) LDL (nLDL) [145, 156–158]. Dieser Unterschied ließ sich durch Zugabe eines AC-Inhibitors vermindern [157].

*Ogihara et al.* zeigten, dass ApoB den gleichen Effekt auf  $[Ca^{2+}]_i$  haben kann wie LDL. Auch die einzelnen Subfraktionen von LDL haben eine unterschiedliche Potenz  $Ca^{2+}$  freizusetzen, wobei die kleinsten, dichtesten Partikel den höchsten Anstieg auslösten [145]. In der Frage, ob der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch einen Antikörper gegen den LDL-Rezeptor verhindert werden kann, zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse [146, 150]. Lediglich in einer Studie konnte kein Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  durch LDL gefunden werden [140].

Interessant ist der Punkt, dass PTX in einigen Studien den  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg verhindern konnte, was gegen eine Beteiligung des  $\alpha_1$ -AR spricht, da das  $G_q$ -Protein des  $\alpha_1$ -AR nicht PTX sensitiv ist. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der  $\alpha_1$ -AR über ein PTX-sensitives G-Protein zu einer direkten Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen führt. Hierfür wird allerdings eine starke Aktivierung des Rezeptors benötigt [159]. Von den in unserer Studie betrachteten Rezeptoren ist der einzige mit dem PTX-sensitiven  $G_i$ -Protein gekoppelte Rezeptor der  $\alpha_2$ -AR. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zu einem Abfall von cAMP, welcher von uns unter Einfluss von LDL gemessen wurde. Gegen eine alleinige Beteiligung dieses Rezeptors sprechen der in mehreren Studien gemessene Anstieg der Phosphoinositole, von DAG und die Aktivierung der PKC durch LDL. Eine Aktivierung des  $\alpha_1$ -AR durch LDL, eventuell zusätzlich zur Aktivierung des  $\alpha_2$ -AR, ist somit wesentlich wahrscheinlicher.

Unsere Ergebnisse, zusammen mit dem biochemischen Korrelat, das in vielen älteren Arbeiten gefunden wurde, bestätigt uns in der Interpretation, dass LDL die FMD über die Aktivierung eines  $\alpha$ -AR einschränkt. Welcher Subtyp des  $\alpha$ -AR für den Effekt verantwortlich ist oder ob beide eine Rolle spielen, lässt sich beim Einsatz eines unselektiven  $\alpha$ -Blockers und bei Ergebnissen, die durch beide Rezeptoren erklärbar wären, nicht endgültig klären.

### 4.6 LDL und $\beta$ -Blockade

Die Blockade der  $\beta$ -AR mittels PR führte zu einer signifikanten Verminderung des LDL-Effektes um insgesamt 45,9% gegenüber reiner LDL-Lösung, so dass wir postulieren können, dass 45,9% des Effektes von LDL auf die FMD über eine Interaktion von LDL mit  $\beta$ -AR vermittelt wird. Dieser Wert war signifikant und in unseren Messungen wesentlich stärker ausgeprägt als der Effekt über den  $\alpha$ -AR. Der Mechanismus ist hierbei deutlich schwieriger zu erklären als bei der Wechselwirkung mit dem  $\alpha$ -AR, denn unter physiologischen Konditionen vermittelt der  $\beta$ -AR eine Dilatation. Somit müsste eine Hemmung des  $\beta$ -AR durch LDL stattfinden, um zu einer verminderten FMD zu führen.

*Okajima et al.* zeigten, dass der  $\beta$ -AR eine bedeutende Rolle in der NO-vermittelten FMD während körperlicher Anstrengung spielt, und dass eine Blockade des Rezeptors auch die NO-Produktion durch Shear-Stress hemmt. Dies geschah allerdings *in vivo* unter erhöhtem adrenergen Tonus bei körperlicher Anstrengung [129]. Wie schon in der Einleitung beschrieben, kann zirkulierendes A über AR auf dem Endothel Einfluss auf die NO-Produktion nehmen und so die FMD regulieren.

Eine andere mögliche Erklärung lieferte *Johnson* [28]: Wahrscheinlich existieren  $\beta$ -AR in zwei Zuständen, aktiviert und inaktiviert. Unter normalen Umständen gibt es ein Gleichgewicht, das durch die inaktive Form dominiert wird. Möglicherweise führen  $\beta$ -AR-Agonisten zu einer Konformationsänderung des Rezeptors zum aktivierten Zustand mit einer Verschiebung des Gleichgewichts. Dies würde bedeuten, dass es eine basale Produktionsrate von cAMP durch den aktivierten Rezeptor auch in Abwesenheit von Agonisten gibt.  $\beta$ -AR-Antagonisten binden mit hoher Affinität an die inaktivierte Form des Rezeptors und verschieben das Gleichgewicht

#### 4 Diskussion

in die entgegengesetzte Richtung. Ein Hinweis hierauf ist, dass GDP, das an die inaktive Form des Rezeptors bindet, die Bindung von  $\beta$ -AR-Agonisten erschwert und von  $\beta$ -AR-Antagonisten erleichtert. Dies würde bedeuten, dass  $\beta$ -AR-Antagonisten nicht mit den Agonisten um eine gemeinsame Bindungsstelle konkurrieren, sondern an unterschiedliche Formen des Rezeptors binden und damit das Gleichgewicht zwischen aktivierter und inaktivierter Form in verschiedene Richtungen verschieben [28].

$\beta$ -AR-Agonisten können, z.B. in sklerotischen Arterien, jedoch auch konstriktorisch wirken (siehe Kapitel 4). Wahrscheinlich wird dies aber durch eine  $\alpha$ -adrenerge Innervation vermittelt und spielt bei kombinierter Blockade, wie in unseren Versuchen, keine Rolle.

Die Messungen mehrerer Autoren deuten darauf hin, dass auch die intrazelluläre Signaltransduktion sich mit einer Senkung des zyklischen Nukleotids cAMP gegensätzlich zur Aktivierung des  $\beta$ -AR verhält. *Galle et al.* untersuchten die Konzentration von cAMP und cGMP in Femoralarterien des Kaninchens, in denen vorher das Endothel entfernt worden war, in Antwort auf Inkubation mit nLDL und oxLDL. Sie stimulierten die cGMP- und cAMP-Freisetzung mit Natriumnitroprussid bzw. Forskolin. nLDL hatte hierbei keinen Einfluss auf die stimulierte cAMP- und cGMP-Freisetzung, während oxLDL beide signifikant verringerte [160].

Die Bestimmungen von *Galle et al.* fanden an Gefäßen ohne Endothel statt. Ein großer Teil der zyklischen Nukleotide befindet sich jedoch in den Endothelzellen. In einer unveröffentlichten Studie wurde von *Fabich et al.* ein Absinken der intrazellulären cAMP- und cGMP-Konzentrationen des gesamten Gefäßpräparates nach Exposition des Gefäßes gegenüber nLDL und oxLDL gefunden [161]. Auch unsere Arbeit zeigt einen deutlichen Abfall von cAMP und cGMP bei Zugabe von LDL-Lösung. Dieser wird durch  $\beta$ -AR-Blockade vermindert, was ein Indiz für einen über den  $\beta$ -AR vermittelten cAMP-Abfall ist. Unsere Messungen sowie andere Arbeiten geben somit auch in der intrazellulären Signaltransduktion Hinweise auf die Wechselwirkung von LDL mit dem  $\beta$ -AR.

Die Arbeiten bezüglich der intrazellulären Signaltransduktion, die durch LDL in den glatten Muskelzellen ausgelöst wird, fokussieren sich auf die glatte Gefäßmuskulatur und vornehmlich auf den Inositolphosphat- $\text{Ca}^{2+}$ -Weg ( $\alpha$ -AR). Wir konnten einen vorwiegenden Effekt über den

$\beta$ -AR zeigen. Dies ist möglicherweise eine Auswirkung der Prämedikation unseres Patientenkollektives, wo eine Dauermedikation mit  $\beta$ -AR-Blocker zu einer Hochregulation und Sensitivierung der  $\beta$ -AR geführt haben könnte.

### 4.7 LDL und kombinierte $\alpha$ - und $\beta$ -Blockade

Die kombinierte Blockade von  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR führte zu einer Reduktion des LDL-Effektes um 51,6%, so dass wir postulieren, dass ca. 50% des LDL-Effektes auf die FMD über die Wechselwirkung von LDL mit den sympathischen AR erklärt werden kann. Es zeigte sich bereits bei sehr kleinen Flussgeschwindigkeiten ein niedrigerer Ausgangswert des Gefäßtonus, so dass dieser Effekt eher noch unterschätzt sein könnte.

Die kombinierten gemessenen Effekte über den  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR, also der rechnerische Effekt einer kombinierten Blockade, stimmt erstaunlich gut mit dem tatsächlich gemessenen Effekt einer kombinierten Blockade überein (siehe Abbildung 3.7 im Ergebnisteil). Aufgrund der niedrigen Absolutwerte und der mehrfachen Differenzbildung zur Berechnung der Effekte sind diese Ergebnisse nicht signifikant. Wir gehen dennoch von einem additiven Effekt der  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR-Blockade aus.

Ein additiver Effekt bzw. ein Zusammenhang der Wirkungen über beide Rezeptoren ist nicht verwunderlich, da einzelne Second-messenger-Systeme nicht eigenständig Vorgänge in der Zelle regulieren, sondern mit anderen Second-messenger-Systemen in einem Netzwerk verbunden sind. So konnte gezeigt werden, dass cAMP und cGMP den durch LDL induzierten Anstieg von Inositolphosphaten hemmen können [111, 141]. Ein Rezeptor-Cross-Talk zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR war Gegenstand der Forschung und konnte in diversen Arbeiten nachgewiesen werden. So hat unter anderem die Aktivierung des  $\beta$ -AR einen Einfluss auf die Expression des  $\alpha$ -AR und umgekehrt [76].

## 4.8 Weitere Wirkungen von LDL auf die Gefäßmuskulatur

*Bolz et al.* fanden, dass die Exposition von kleinen Widerstandsarterien gegenüber oxLDL zu einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des kontraktiven Apparates führt, die durch die Inhibition von Rho und der Rho-assoziierten Kinase verhindert werden konnte. Der oxLDL-induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg wurde durch die Inhibition von Rho nicht beeinträchtigt. Die Autoren schlugen vor, dass oxLDL zu einer Aktivierung des Rho/Rho-Kinase-Weges führt und damit die Sensitivierung bedingt. Sie vermuteten, dass dieser Weg hauptsächlich Auswirkungen auf den Gefäßtonus nach einer Kontraktion hat, da die eigentliche Kontraktion durch erhöhtes intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  kaum eingeschränkt war, jedoch die anschließende Gefäßweite verringert war [154]. *Nickenig et al.* beobachteten eine Erhöhung der Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression des Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1 ( $\text{AT}_1$ -Rezeptor) und der  $\text{AT}_1$ -Rezeptor-Expression durch LDL in einer Zellkultur von VSMC aus der Aorta von Ratten, ohne Affinitätsänderungen des Rezeptors. Damit verbunden war ein vermehrtes Ansprechen auf Angiotensin II (determiniert durch  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung). Sie wiesen eine LDL-induzierte Erhöhung der Stabilität der  $\text{AT}_1$ -Rezeptor-mRNA nach [162].

Zusammenfassend zeigte sich in nahezu allen oben beschriebenen Studien ein Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , der konzentrationsabhängig von LDL und durch oxLDL verstärkt auslösbar war, eine Sättigungskinetik zeigte und nach Exposition wieder abfiel. Langzeiteffekte wurden allerdings kaum untersucht. Der direkte konstriktorische Effekt durch den  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg wurde von einigen Autoren nachgewiesen [151, 155]. In anderen Arbeiten wurde ein solcher Effekt von LDL und geringen Konzentrationen von oxLDL nicht gezeigt [83, 106].

Der Anstieg der Phosphoinositole in der VSMC, sowie eine Erhöhung der DAG-Konzentration und Aktivierung der PKC, zusammen mit einer Verminderung der cAMP- und cGMP-Konzentration legt die Vermutung nahe, dass, wie von uns postuliert, LDL über eine Wechselwirkung mit den sympathischen AR wirken kann. Eine Vermutung in diese Richtung formulierten schon *Bochkov et al.* und *Resink et al.*, die zeigten, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und der Anstieg der Phosphoinositole als Antwort auf LDL sehr ähnlich denen von  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Hormonen, zum Beispiel NA, sind [136, 142].

Neben der Inaktivierung und der verminderten Produktion von NO vermindert oxLDL die basale und die durch Agonisten induzierte PGI<sub>2</sub>- und NO-Ausschüttung. Zeitgleich kann hochgradig oxidiertes LDL aber auch zu einer PGI<sub>2</sub>-Produktion in glatten Muskelzellen führen [163, 164]. Es scheint allerdings deutlich die Hemmung des bei der FMD von den Endothelzellen im Corelease mit NO freigesetzten PGI<sub>2</sub> zu überwiegen. Diverse Studien konnten eine Verminderung der PGI<sub>2</sub>-Synthese, sowohl bei der endothelabhängigen Vasodilatation, als auch bei der basalen PGI<sub>2</sub>-Produktion nachweisen [165, 166]. Schon eine einzelne LDL-Apharese kann das Plasma-PGI<sub>2</sub> und hierüber den koronaren Blutfluss verbessern [167]. Zusätzlich konnten bei hypertensiven Patienten signifikant niedrigere PGI<sub>2</sub>-Level nachgewiesen werden, wobei sich hierbei wiederum eine negative Korrelation zwischen oxLDL und PGI<sub>2</sub>-Level fand [168].

### 4.9 LDL-Lösung

Es ist anzumerken, dass viele der beschriebenen Effekte eher von oxLDL als von LDL ausgelöst werden. Dabei ist fraglich, ob das in vielen Arbeiten verwendete, mit Kupfer oxidierte LDL, die realen Vorgänge *in vivo* widerspiegeln kann. In einigen Arbeiten wurde das LDL auch auf andere Art und Weise oxidiert (z.B. Inkubation mit kultivierten Endothelzellen [155]), wobei auch unklar ist, ob oxLDL äquivalent zu in der Arterienwand oxidiertem LDL entsteht. Auch bei den Ergebnissen, die für nLDL beobachtet wurden, ist nicht auszuschließen, dass nicht ein Teil des LDL, trotz Zugabe von Antioxidantien, durch Autooxidation oxidiert wurde. In mehreren Arbeiten wurde LDL ohne Betrachtung des Oxidationsgrades verwendet, was natürlich den Effekt nicht auf nLDL beschränkt, da isoliertes LDL immer einen gewissen Anteil oxLDL enthält, und ohne Zugabe von Antioxidantien auch weiter oxidieren kann.

In unserer Arbeit wurden gepoolte LDL-Lösungen verwendet, die unter Ausschluss von Sauerstoff aufgereinigt wurden. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass auch in unseren Lösungen ein sehr geringer Anteil von oxidiertem LDL enthalten war. Die Aussage dieser Arbeit sollte somit nicht nur auf natives LDL, sondern auf die Gesamtheit von LDL, inklusive oxidativer Modifikationen, bezogen werden. In den zitierten Arbeiten wurden relativ geringe Konzentrationen von LDL verwendet (1-50 µg/mL-Bereich), die wesentlich geringer sind als die im Blut (85-130 mg/dL

[153]). Dies wurde damit begründet, dass die LDL-Konzentrationen in der Gefäßwand, mit der die VSMC direkt in Kontakt kommen, durch die Diffusionsbarriere des Endothels viel geringer sei [153]. Die gefundene Sättigungskinetik ließ scheinbar eine Untersuchung von höheren Konzentrationen als nicht sinnvoll erscheinen. Wir haben uns jedoch zur Verwendung von physiologischen Konzentrationen von LDL (100 mg/dl) entschieden, da dies eher die Vorgänge *in vivo* widerspiegelt und die VSMC im Versuchsaufbau nicht in direktem Kontakt zu LDL standen. Die Diffusionsbarriere des Endothels war weiterhin intakt. Trotz kurzer Einwirkzeiten können wir davon ausgehen, dass LDL auch einen direkten Effekt auf die VSMC hat, da es parazellulär diffundiert und mittels Transzytose schnell in den subepithelialen Raum transportiert wird. Dieser Transport wird unter anderem über HS-PG vermittelt, welches gleichzeitig als Fluss-Sensor fungiert [169].

### **4.10 LDL und Membranpotential, elektromechanische Kopplung**

Bei der Messung der Membranpotentiale konnten wir eine intakte lineare elektromechanische Kopplung im Potentialbereich von -46 bis -51 mV in unseren Präparaten zeigen. Der Potentialverlauf in unseren Experimenten entsprach dem Verlauf der mechanischen Kraft und wurde ebenso durch die Blockade der AR beeinflusst. LDL führte zu einer signifikanten Depolarisation im Vergleich zur Krebslösung, die sich durch  $\beta$ - bzw.  $\alpha$ -AR-Blockade teilweise aufheben ließ. Somit konnten wir zeigen, dass LDL über die sympathischen AR einen Einfluss auf das Membranpotential der VSMC hat. Ebenso ist der Nachweis einer strikt linearen elektromechanischen Kopplung Ausdruck der Messgenauigkeit unserer Versuche.

### **4.11 LDL und zyklische Nukleotide**

Wir konnten nachweisen, dass die Zugabe von LDL und die durch LDL hervorgerufene Reduktion der FMD mit einer signifikanten Abnahme des intrazellulären cAMP-Spiegels einhergeht. Dies



#### 4 Diskussion

legt eine direkte Interaktion von LDL mit dem  $\beta$ -AR, also eine Hemmung der Aktivität des Rezeptors durch das Lipoprotein, nahe. Dass eine Blockade des  $\beta$ -AR bei LDL-Exposition zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg im Vergleich zu reiner LDL-Lösung führte, ist schwierig zu erklären. Wie in der Einleitung beschrieben, wird durch Aktivierung des  $\beta$ -AR cAMP freigesetzt. Eine Blockade des Rezeptors, unabhängig welcher Art, sollte somit zu einer Senkung des intrazellulären cAMP-Spiegels führen. Eine mögliche Erklärung wäre eine Konkurrenz von  $\beta$ -AR-Blocker und LDL um die gleiche Bindungsstelle und eine geringere hemmende Aktivität des  $\beta$ -AR-Blockers gegenüber LDL. Die Theorie, dass der  $\beta$ -AR-Blocker das Verhältnis von aktivem und inaktivem  $\beta$ -AR zum inaktiven Zustand verschiebt (siehe Kapitel 4.6), bildet eine gute Grundlage für diese Erklärung. LDL würde somit zu einer stärkeren Verschiebung zum inaktiven Rezeptor und damit zu einem Absinken von cAMP führen, wogegen der  $\beta$ -AR-Blocker dann eine relative Verschiebung zum aktiven Zustand bewirken würde. Ein solcher Mechanismus wäre auch möglich, wenn LDL und  $\beta$ -AR-Blocker über zwei verschiedene Bindungsstellen die Aktivität des  $\beta$ -AR beeinflussen.

Auch eine Blockade des  $\alpha$ -AR führte zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP. Diese war, wie die Verbesserung der FMD durch  $\alpha$ -AR-Blockade, nicht signifikant, ist aber womöglich Ausdruck des Cross-Talk zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR, so dass eine Aktivierung des  $\alpha$ -AR durch LDL zu einem Absinken des intrazellulären cAMP führt.

Das intrazelluläre cGMP verhielt sich analog zum cAMP. Im Vergleich zur Perfusion mit Krebslösung wurden unter LDL signifikant niedrigere intrazelluläre cGMP-Konzentrationen gemessen. Die Blockade der AR führte zu einem Anstieg dieser Konzentrationen, welcher mit  $p = 0,0643$  gerade nicht signifikant war. Die niedrigeren cGMP-Level unter LDL sind einerseits Ausdruck einer Kopplung von cAMP und cGMP (Erhöhung von cAMP im Endothel führt zu NO-Produktion und damit zum cGMP-Anstieg in den VSMC), zum anderen ist das cGMP-Level Ausdruck der mit der FMD einhergehenden NO-Produktion. Da LDL zu einer verminderten NO-Freisetzung bei der FMD führt (siehe Kapitel 1.3), kann man auch niedrigere cGMP-Level erwarten [106]. Interessant ist, dass die durch LDL verursachte Senkung des cGMP-Spiegels sowohl durch  $\beta$ -AR- als auch  $\alpha$ -AR-Blockade verringert werden konnte. Es ist vorstellbar, dass dieses durch eine verbesserte NO-Freisetzung, Disinhibierung der GC oder durch die Erhöhung der cAMP-Produktion bewirkt wird.

In unserer Studie wurde darauf verzichtet, die Metabolite der Signalkaskade des  $\alpha$ -AR zu messen. Zum einen war der Effekt, der von LDL über den  $\alpha$ -AR ausgeübt wurde, wesentlich geringer als der über den  $\beta$ -AR und zudem nicht signifikant. Andererseits können wir aufgrund vorhergehender Studien davon ausgehen, dass LDL eine Erhöhung dieser Second Messenger bewirkt (siehe Kapitel 4.5). Es wurde nicht untersucht, ob der Anstieg auch *in vivo* einen Effekt auf die Vasomotorik hat, in unseren Versuchen konnten wir jedoch Hinweise hierauf finden. Sowohl in der mechanischen Messung und der Messung des Membranpotentials, als auch bei der Bestimmung der zyklischen Nukleotide konnte ein übereinstimmender Effekt der Blockade des  $\alpha$ -AR nachgewiesen werden, auch wenn die Werte nur tendentiell signifikant waren.

### 4.12 Chemomechanische und chemoelektrische Kopplung

Der lineare Zusammenhang zwischen Gefäßspannung und Membranpotential wirft die Frage auf, inwiefern die intrazellulären Vorgänge mit diesen Messgrößen korreliert sind. Die Second Messenger haben einen Einfluss auf den kontraktilem Apparat einerseits und durch Beeinflussung von Ionenkanälen auf das Membranpotential andererseits. Trägt man die Konzentration der zyklischen Nukleotide im Präparat gegen den Gefäßtonus bzw. das Membranpotential auf, so erhält man zwei Kurven mit logarithmischem Verlauf. Wir konnten in dieser Arbeit, unseres Wissens nach als erste Arbeitsgruppe, eine chemomechanische und chemoelektrische Kopplung an Präparaten der menschlichen Koronararterie nachweisen. Aus der Kombination der beiden Kurven für das jeweilige Nukleotid lässt sich die elektromechanische Kopplung berechnen, indem man die Formeln ineinander einsetzt. Dass die errechnete Formel aus den Messwerten von cAMP und cGMP mit der experimentell bestimmten Formel aus den Messwerten von Mechanik und Potential-Messung nahezu übereinstimmt, zeigt erneut die sehr gute Messgenauigkeit unserer Versuche.

Wir konnten somit ein intaktes System aus Second Messengern, Membranpotential und daraus resultierender Kraftentwicklung in der menschlichen Koronararterie nachweisen, bei dem alle Anteile gleichermaßen durch LDL inhibiert wurden. Die Hemmung war in allen Fällen durch

AR-Blocker teilweise reversibel, was darauf schließen lässt, dass LDL über eine Interaktion mit den AR Einfluss auf alle Ebenen der Kontraktionskaskade des Gefäßmuskels ausüben kann.

### 4.13 LDL, Statine und Blutdruck

Wie in der Einleitung beschrieben, ist ein erhöhtes LDL- oder Gesamt-Cholesterin Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Zur Risikoreduktion werden 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA)-Reduktase-Hemmer, so genannte Statine, eingesetzt, die über eine Hemmung der endogenen Cholesterinsynthese die Cholesterin- und LDL-Spiegel im Blut senken. Auf diese Weise verringern Statine die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen. Eine grosse Metaanalyse von 2005 zeigte eine Verringerung von kardiovaskulären Ereignissen, koronaren Revaskularisationen und Schlaganfällen um ca. ein Fünftel pro mmol/l Reduktion der LDL-Konzentration [170]. Die mit höheren Cholesterinwerten einhergehenden höheren Blutdruckwerte waren Mittelpunkt vieler Studien, auch im Hinblick auf eine Blutdruckreduktion durch Statine [98]. Bei der Untersuchung des Einflusses von LDL auf den Blutdruck, für den wir in unserer Arbeit einen zugrundeliegenden Mechanismus beschreiben, stellen Statine eine sinnvolle Intervention in Studien dar.

Statine verbessern die endothelabhängige Vasodilatation, erhöhen die Bioverfügbarkeit von NO und vermindern die Endothelin-1 Level [171]. Sie downregulieren die Expression von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren, vermindern die Expression der NADPH-Oxidase subunit p22phox und reduzieren die Freisetzung von freien Radikalen im Gefäß [96, 171]. Zudem verbessern Statine die arterielle Compliance und können die Bildung von Nanoplaques in der Gefäßwand, den Vorläufer von arteriosklerotischen Läsionen, reduzieren [92, 171].

Der erhöhte Blutdruck im Vergleich zur Kontrollgruppe mit normalen Cholesterinwerten bzw. der Blutdruck allgemein konnte in mehreren Studien durch Gabe von Statinen gesenkt werden [172–176]. Vielfältig wurden hierbei pleiotrope Effekte für Statine nachgewiesen [177–179]. Hierunter versteht man in diesem Zusammenhang eine direkte Wirkung des Medikamentes auf das Endothel und weitere Effekte, die unter anderem zu einer Blutdrucksenkung führen können, die jedoch nicht mit der eigentlichen Wirkung, der Cholesterinsenkung, assoziiert sind. Trotz all

#### 4 Diskussion

dieser pleiotropen Effekte ist fraglich, ob nicht auch die Senkung des LDL-Cholesterins zu der Senkung des Blutdruckes beiträgt. Übersichtsarbeiten zu diesem Thema aus den Jahren 2007 und 2008 stammen von *Chopra et al.* und *Koh et al.* [96, 171].

Die Theorie, dass Plasmacholesterol bei der Blutdruckregulation involviert ist, wurde bereits 1997 von *Borghgi* geäußert [96, 180]. Und bereits 1995 wurde vermutet, dass die Cholesterolsenkung durch Statine mit einer gleichzeitigen Blutdruckreduktion um 2-5 mmHg einhergeht [181]. *Chopra et al.* postulieren hierzu 3 Mechanismen für den Einfluss von Statinen auf den Blutdruck [96]:

- Verbesserung der endothelialen NO-Produktion:
  - Eine endotheliale Dysfunktion führt zu einer Abnahme der NO-Produktion.
  - Die Statintherapie erhöht wiederum dosisabhängig die eNOS und damit den zirkulierenden NO-Level.
  - Durch eine Reduktion der oxLDL-Konzentration wird die Downregulation der eNOS verhindert und zudem führen Statine direkt zu einer Upregulation der eNOS und Erhöhung der eNOS-Aktivität.
- Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)
  - Statine haben antioxidative Eigenschaften und fangen direkt freie Radikale ab, welche sonst NO inaktivieren und die endotheliale Vasodilatation vermindern.
- Direkter Effekt auf die Gefäßwand mit Plaquestabilisation.

Die ausgewerteten Studien zeigten eine Reduktion des SBP und/oder des DBP bzw. eine zusätzliche Blutdrucksenkung durch Kombination von Antihypertensiva und Statinen [174, 182, 183]. Hierbei wurde in 2 Studien eine Korrelation zwischen DBP und Serumcholesterin gefunden [182, 183]. In den anderen ausgewerteten Studien konnte hingegen weder SBP noch DBP mit dem Serumcholesterin korreliert werden. Die erklärenden Mechanismen für eine Blutdruckreduktion durch Statine umfassten Verbesserung der Endothelfunktion durch Verminderung der LDL-Konzentration und Upregulation der NOS, Erhöhung des NO-Levels durch LDL-Senkung, Verringerung des Calcium-Einstromes, sowie Verbesserung der Sensitivität der Gefäßwand gegenüber Antihypertensiva oder direkter Synergismus von Statinen und Hypertensiva [174, 182,

#### 4 Diskussion

183]. Eine Gruppe von Autoren zeigte Verringerung der AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Dichte bei Ratten durch Statine und zog so die Verbindung zur Blutdruckregulation [177].

Eine Studie von *Koh et al.* (zitiert in [96]) mit kleiner Studienpopulation und geringer Statindosis fand keinen Unterschied in den Blutdrücken, zeigte jedoch eine verbesserte FMD durch Simvastatin. *Chopra et al.* werteten zusätzlich auch große Statinstudien aus, in denen jedoch keine Senkung des Blutdruckes bei Senkung des Serumcholesterins gezeigt wurde. Hierfür machten sie verantwortlich, dass der Blutdruck in diesen Studien keine direkte Untersuchungsgröße darstellte und vor Beginn der Studie bei den Probanden eine Anpassung der antihypertensiven Therapie vorgenommen worden war [96]. Auch *Koh et al.* erwähnten, dass der blutdrucksenkende Effekt von Statinen möglicherweise schwer in großen Studien zu entdecken ist, da diese einen großen Anteil an normotensiven Patienten aufweisen und meist nicht spezifisch designed sind, um einen Effekt von Statinen auf den Blutdruck zu messen [171].

Eine Metaanalyse von 20 randomisiert-kontrollierten Studien von *Strazzullo* zeigte einen positiven Effekt von Statinen auf den Blutdruck, und hier besonders den SBP. Der Effekt war größer bei Patienten mit erhöhten Blutdruckwerten. Eine signifikante Verbindung zwischen dem Blutdruckeffekt des Statins und dem Ausgangs-Serum-Cholesterin oder Veränderung des totalen oder des LDL-Cholesterins konnte nicht gefunden werden. Der senkende Effekt von Statinen auf den Blutdruck war umso größer, je höher der Ausgangswert war. Dieser Effekt war unabhängig von Alter, Senkung des Serumcholesterins und Länge der Studie [175].

*Koh et al.* werteten zum Teil die selben Studien aus wie *Chopra et al.*, schlossen jedoch auch Studien ein, die die Auswirkungen von Statinen auf den Blutdruck von Patienten mit normotonen Blutdruckwerten untersuchten [96, 171]. Hierbei wurde keine übereinstimmende behandlungsabhängige Reduktion des arteriellen BD in mit Statinen behandelten normotensiven Patienten gefunden. Im Gegensatz dazu zeigten mit Statinen behandelte hypertensive Patienten einen niedrigeren SBP von -5,7 mmHg und DBP von -3,5 mmHg. Die behandlungsbezogene Blutdruckreduktion war signifikant korreliert mit dem Baseline Level des SBP und DBP, jedoch nicht mit der statininduzierten Cholesterin-Senkung. Bei Patienten mit kontrolliertem Bluthochdruck und Hypercholesterinämie berichten 3 Studien keine Änderung des Blutdrucks unter Statinen, wobei andere Studien zeigen, dass eine zusätzliche Statin-Therapie zu einer größeren Reduktion des

#### 4 Diskussion

Blutdrucks führte als bei Patienten mit unkontrolliertem Bluthochdruck. Widersprüchliche Resultate könnten nach den Autoren durch methodische Limitationen (Blutdruck-Messtechnik) oder unterschiedliche Effekte von Statinen bei verschiedenen biologischen Konditionen (Cholesterolllevel, Blutdruck-Level, Alter, etc.) bedingt sein [96, 171, 174, 182, 183].

Unter unserer Annahme, dass LDL mit den sympathischen Adrenorezeptoren interagiert, ergeben sich weitere Möglichkeiten, wie LDL einen Einfluss auf den Blutdruck gewinnen kann bzw. wie Statine unabhängig von ihren direkten Effekten auf das Endothel zu einer Blutdrucksenkung führen können:

- Bei einem Beginn des Einflusses von LDL auf den Blutdruck erst ab einer bestimmten Grenzkonzentration würde sich ein Effekt erst bei einer Senkung des Gesamtcholesterins bzw. des LDL-Cholesterins unter diesen Wert bemerkbar machen. Dies kann eine fehlende Korrelation der absoluten Lipidsenkung mit einer Blutdrucksenkung erklären.
- Die Wirkung von LDL ist zusätzlich abhängig von humoralen Faktoren. So erhöht LDL auch die durch Agonisten induzierte Kontraktion an der Gefäßmuskulatur (Kapitel 1.3). Besonders oxLDL erhöht die Kontraktion durch Vasokonstriktoren (NA, Serotonin und Phenylephrin) stark [106]. Die Verstärkung ist abhängig vom Grad der Oxidation und der Effekt ist deutlich erhöht bei Gefäßen ohne Endothel [83]. Viele kardiovaskuläre Risikofaktoren, die die FMD vermindern, sind durch eine erhöhte sympathische Aktivität charakterisiert und die endotheliale Funktion wird durch die sympathische Aktivität beeinflusst. Hierbei ist die FMD niedrig, wenn die sympathische Aktivität hoch ist [130]. Auch mentaler Stress kann die FMD signifikant vermindern, was einen Einfluss von Adrenorezeptoren auf die FMD nahelegt. Die aktuelle Datenlage impliziert eine spezifische Hemmung der flussvermittelten NO-Freisetzung durch sympathische Aktivierung [130]. Bei einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems *in vivo* würde es bei erhöhten LDL-Leveln zu einem vermehrten Ansprechen auf vasokonstriktorische Effekte des Sympathikus kommen. Damit würde eine LDL-Senkung zu wesentlich größeren Effekten führen als bei Personen ohne erhöhte sympathische Aktivität. Die Empfindlichkeit des Gefäßes für die Einflüsse von LDL und adrenerge Einflüsse sind daher je nach Ausgangslage sehr verschieden und machen eine Erfassung kleinerer Veränderungen in einem inhomogenen Patientenkollektiv sehr schwierig.

#### 4 Diskussion

- Auf Ebene des Mediators der FMD, NO, haben Statine und LDL einen antagonistischen Effekt. Da Statine selbst die NO-Produktion erhöhen und gleichzeitig LDL reduzieren, welches die NO-Ausschüttung hemmt, ergibt sich so ein kombinierter positiver Effekt, der schwerlich nur einem der beiden Anteile zugeordnet werden kann. Endotheliales NO kann bis in die sympathischen Nervenendigungen diffundieren und dort die Freisetzung von konstriktorischen Neurotransmittern (z.B. NA) hemmen [10]. So besteht auch hier eine Verbindung zwischen dem adrenergen System und der endothelvermittelten bzw. flussabhängigen Dilatation, in die LDL durch Beeinflussung des NO-Metabolismus und der sympathischen ARen eingreifen kann.
- Statine reduzieren die Bildung von ROS im Endothel [96, 171, 184, 185]. Hierdurch reduzieren sie auch den Anteil an oxLDL am Gesamt-LDL. Da oxLDL, in Abhängigkeit vom Oxidationsgrad, wesentlich stärker vasokonstriktorisch wirkt als LDL, wäre ein Effekt auf den Blutdruck dementsprechend relativ unabhängig von der Senkung des Gesamt-Cholesterins oder Gesamt-LDLs [83]. *Siegel et al.* konnten in einer Studie zeigen, dass das Verhältnis oxLDL/LDL sehr genau mit der Änderung des SBP und DBP korreliert [100]. Zudem ist bei einem verringerten Verhältnis oxLDL/LDL die Atherogenität vermindert [100]
- Bei normotensiven, hypercholesterolämischen Patienten könnten Kompensationsmechanismen den Blutdruck auf einem normalen Niveau halten. Diese Kompensation würde bei Wegfall der Vasokonstriktion durch LDL ebenfalls herunterreguliert, so dass der Ruheblutdruck unverändert bliebe. Es käme dann erst bei Versagen der Kompensationsmechanismen bei Hypercholesterinämie sekundär zu höheren Blutdruckwerten.
- Eine eingeschränkte FMD ist hauptsächlich bei Arteriosklerose relevant. Zudem ist an arteriosklerotischen Gefäßen der Effekt von LDL und von konstriktorischen Agonisten verstärkt. Weiterhin kann in sklerotischen Arterien ein dilatierender Agonist eine Vasokonstriktion auslösen oder die dilatatorische Antwort auf den Agonisten kann vermindert sein [121, 130]. In stark atherosklerotischen Arterienringen kann die  $\beta$ -AR-vermittelte Antwort so verändert sein, dass NA nur noch vasokonstriktorisch wirkt [186]. Arteriosklerose/arteriosklerotische Vorstufen können die Gefäße somit anfällig für den konstriktorischen/dilatationshemmenden LDL-Effekt werden lassen, welches wiederum zu erhöhten Blutdrücken führt. Die arteriosklerotischen Läsionen können durch Hypercholesterinämie

bedingt sein, so dass Statine sowohl an der Ursache angreifen als auch die sklerotischen Arterien vor dem LDL-Einfluss schützen.

Aus den Studien zum Einfluss von Statinen auf den Blutdruck können wir erkennen, dass Blutdruck und Cholesterin bzw. LDL zumindest miteinander assoziiert sind. Auch wenn bei der Beeinflussung des Blutdrucks durch Statine viele weitere Faktoren eine Rolle spielen, gehen wir davon aus, dass die Beeinflussung der Vasomotorik durch LDL einen wesentlichen Teilaspekt darstellt. Unsere Ergebnisse liefern hierbei einen überzeugenden Mechanismus für eine Verbindung von Blutlipiden und Blutdruck.

### 4.14 Gesamtmodell und klinische Relevanz

Eine Verbindung von Blutdruck und FMD liegt nahe, da die Aufrechterhaltung des Blutdruckes ein dynamischer Prozess ist und auch über die Vasomotorik reguliert wird. Patienten, die unter Hypertension leiden, haben häufig eine eingeschränkte FMD und ein vermindertes endotheliales Ansprechen auf vasodilatatorische Substanzen [187, 188]. Es ist schwierig zu beurteilen, ob eine eingeschränkte FMD eine Hypertension bedingt, ob schädliche Faktoren zu einer Hypertension und gleichzeitig zu einer eingeschränkten FMD führen, oder ob die Hypertension selber zu einer eingeschränkten FMD führt. Eine Therapie der Hypertension führt gleichzeitig zu einer Verbesserung der FMD [189, 190]. KO-Mäuse, denen der P2X<sub>4</sub>-Kanal fehlt, der möglicherweise in der Vermittlung der FMD eine Rolle spielt, haben einen höheren Blutdruck als Wildtyp-Mäuse und eine verschlechterte FMD [56]. Eine eingeschränkte endotheliale Reaktivität ist kein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Hypertension, aber eine eingeschränkte FMD kann als Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse angesehen werden und ist mit kardiovaskulären Risikofaktoren und dem 10-Jahres-Risiko für CVD verbunden [191–194]. Ebenso kann sich eine latente Hypertonie durch eine eingeschränkte FMD bemerkbar machen [195]. Während körperlicher Anstrengung spielt die FMD eine Rolle in der Blutdruckregulation bei gesunden Personen. So lässt sich eine niedrigere FMD mit einem erhöhten Pulsdruck und DBP korrelieren [196].



#### 4 Diskussion

Eine Einschränkung der FMD durch LDL wäre ein plausibler Mechanismus, um höhere Blutdruckwerte bei hypercholesterinämischen Patienten zu erklären. Wir konnten zeigen, dass diese Einschränkung zum Teil über die sympathischen Adrenorezeptoren und hier vorwiegend über den  $\beta$ -AR vermittelt wird. Auch in weiteren Bereichen der Vasomotorik könnte LDL über diese Interaktion einen Einfluss auf den Blutdruck ausüben.

Für die klinische Anwendung ist zu diskutieren, welche Auswirkung die Medikation im klinischen Alltag hat. Die Frage, ob hypercholesterinämische Patienten  $\beta$ -AR-Blocker erhalten sollen, ist nicht einfach zu beantworten, da diese viele weitere Effekte besitzen. Die Gabe von  $\beta$ -AR-Blockern bei Patienten nach Herzinfarkt und mit Hypertonie bei myokardialer Vorschädigung ist gängige Praxis und mit einem positiven Outcome assoziiert [197]. Möglicherweise trägt die Verbesserung der FMD durch Minderung des LDL-Effektes bei diesen Patienten, die meist auch unter Hypercholesterinämie leiden, zur positiven Wirkung einer Gabe von  $\beta$ -AR-Blockern bei. Unbestreitbar sinnvoll ist die Gabe von Statinen bei hypercholesterinämischen Patienten und die verstärkte Cholesterinsenkung nach kardiovaskulären Ereignissen. Durch Senkung des LDL-Levels wird sowohl ein Risikofaktor für Arteriosklerose vermindert, als auch die FMD (und möglicherweise der Blutdruck) verbessert. Durch die pleiotropen Wirkungen des Statins wird ein zusätzlicher positiver Effekt auf Blutdruck, FMD und Endothelfunktion ausgeübt. Eine Gabe von  $\beta$ -AR-Blockern ist bei alleiniger Betrachtung unserer experimentellen Daten bei hypercholesterinämischen und hypertensiven Patienten sinnvoll, besonders wenn diese bereits eine arteriosklerotische Vorschädigung ihrer Blutgefäße aufweisen. Eine Beeinflussung der Lipidkonzentrationen durch AR-Blocker *in vivo* sollte hierbei allerdings mitbetrachtet werden.  $\beta$ -AR-Blocker können *in vivo* die Blut-Triglyceride und LDL erhöhen sowie HDL verringern. Der Hauptmechanismus ist hierbei eine adrenerge Beeinflussung der LPL, obwohl auch eine Beeinflussung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), des LDL-Rezeptors und der hepatischen LDL-Synthese eine Rolle spielen.  $\alpha$ -AR-Blocker haben eine gegensätzliche Wirkung mit einer Senkung von LDL, TG und einer Erhöhung von HDL [198]. Wie groß diese Effekte wirklich sind und welche physiologischen Auswirkungen sie haben, ist nicht ausreichend untersucht.

Die positive Wirkung von  $\beta$ -AR-Blockern auf die FMD zeigte sich bereits bei physiologischen LDL-Konzentrationen von 100 mg/dl. In Anbetracht der weiteren Wirkungen (kardial, pulmonal,

etc.) der  $\beta$ -AR-Blocker kann dennoch keine generelle Empfehlung für eine Gabe dieser Medikamente gegeben werden. Eine Therapieentscheidung sollte immer individuell abgewogen werden, jedoch liefert diese Arbeit eine weitere Erklärung für den positiven Effekt der  $\beta$ -AR-Blocker in Patienten mit multiplen Risikofaktoren für Arteriosklerose und kardialer Vorerkrankung.

Mit dieser Studie liefern wir Anhaltspunkte dafür, dass die als unabhängig geltenden Risikofaktoren Bluthochdruck und Hypercholesterinämie auf Ebene des sympathischen Nervensystems verbunden sind. Dies bietet neue Ansatzpunkte für Therapien der einzelnen Erkrankungen und liefert überzeugende Erklärungen für die Wirksamkeit von medikamentöser Therapie von Hypercholesterinämie und Hypertension im Hinblick auf Mortalität und Morbidität.

### 4.15 Studienlimitationen und abschließende Beurteilung

Die größte Limitation unserer Studie ist die geringe Fallzahl und das inhomogene Patientenkollektiv. Trotz niedriger Fallzahlen waren unsere Ergebnisse so eindeutig, dass die Aussagen, die wir in der Arbeit treffen, auf statistisch signifikanten Daten beruhen. Bezüglich der Inhomogenität des Kollektivs wurden die Unterschiede soweit wie möglich minimiert und die Präparatbeschaffenheit möglichst einheitlich gestaltet. Auf Auswirkungen von Alter, Vormedikation und Vorerkrankungen wurde bereits zu Beginn der Diskussion eingegangen. Wir können natürlich nicht ausschließen, dass diese Parameter eine Auswirkung auf unsere Messungen gehabt haben und so wären größere Studien notwendig, um unsere Daten zu bestätigen. Einen möglichen Einfluss auf die Ergebnisqualität könnte auch die unterschiedlich lange Lagerungszeit der Präparate in Abhängigkeit vom Entnahmezeitpunkt gehabt haben. Bei gekühlter Lagerung mit kurzen Wegzeiten und physiologischen Transportmedien dürften die Präparate allerdings auch bei längerer Lagerungszeit ihre Vitalität bewahrt haben, was im Versuch jeweils durch Kontrollversuche bestätigt wurde.

Eine weitere Einflussgröße ist endogenes NA in den terminalen Nervenendigungen des Präparates, das nach Freisetzung im Versuch die Vasomotorik des Präparates beeinflussen kann. Durch lange Äquilibrierungszeiten der Präparate vor dem Versuch ist ein Auswasch-Effekt

#### 4 Diskussion

denkbar, so dass der Einfluss des endogenen NA minimiert wurde. Zudem spiegelt die endogene NA-Freisetzung einen physiologischen Mechanismus wider und wäre dementsprechend durchaus erwünscht, um ein *in vivo*-Verhalten des Präparates zu simulieren. Durch lange Äquilibrierungszeiten und eine strenge Kontrolle der äußeren Einflüsse wurde das Verhalten der Präparate in möglichst physiologischer Umgebung und ohne Störfaktoren simuliert. So hätte z.B. extrazelluläres  $K^+$  einen Einfluss auf das Membranpotential entsprechend der Nernst-Gleichung, indem es die Aktivität der  $Na^+/K^+$ -ATPase und die von Inward-rectifier Kanälen beeinflusst. [11]. Besonders streng wurde der pH-Wert und die Begasung mit Carbogen kontrolliert, denn Azidose bewirkt eine Hyperpolarisation mit Dilatation und Alkalose Depolarisation mit Kontraktion [11]. Dies ist bedingt durch eine Beeinflussung der  $K^+$ -Permeabilität durch den pH-Wert, wahrscheinlich durch den  $K_{ATP}$ -Kanal [11, 21]. Eine Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes erhöht die  $PGI_2$ - und EDRF-Freisetzung, so dass Sauerstoffmangel mit einer Hyperpolarisation und Vasodilatation einhergeht [11].

Bezüglich der eigentlichen Versuchsmessung hätte von uns auch die Stress-Relaxation der Präparate gemessen werden können. Dies wurde bereits in Kapitel 4.2 diskutiert und war bei einer Differenzbildung nicht notwendig. Vielmehr wurde von uns der Einfluss der Blocker auf den LDL-Effekt bei Vernachlässigung der Stress-Relaxation eher unter- als überschätzt. Zusätzlich wäre eine Messung der Membranpotentiale an den selben Präparaten, an denen auch die Tonusmessung durchgeführt wurde, wünschenswert gewesen. Dies war aufgrund des Versuchsaufbaus nicht möglich, da dies wahrscheinlich mit dem Verhalten des Präparates bezüglich des Gefäßtonus interagiert hätte. Weiterhin war eine erneute Verwendung des Gefäßes im Sinne einer seriellen Messung von erst Tonus und anschließend Membranpotentialen nicht möglich, da es womöglich aufgrund des lange wirkenden Stresses mit Stress-Relaxation nicht mehr zu vergleichbaren Ergebnissen gekommen wäre. Zusätzlich wurden die Präparate am Ende jedes Versuches zur Messung der Second Messenger eingefroren, so dass sie nicht für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen. Die Potentialmessungen wurden somit an anderen Präparaten als denen der Tonusmessung durchgeführt, wurden aber ebenso durch eigenständige Kontrollversuche validiert.

Insgesamt handelt es sich bei unserer Arbeit um eine Studie mit soliden laborexperimentellen Daten. Sie zeigt neue Ansätze zum Verständnis der altbekannten Erkrankungen Bluthochdruck

#### 4 Diskussion

und Hypercholesterinämie, neue Aspekte zur Interaktion von LDL und Endothel sowie LDL-induzierter Signaltransduktion auf. Zur weiteren Quantifizierung und Spezifizierung der Wirkung von LDL auf die sympathischen AR braucht es weitere Studien, die einerseits über ein grösseres Patientenkollektiv verfügen, so dass andere Einflussgrössen (Medikation, Alter, etc.) besser betrachtet werden können. Andererseits sollte die Beteiligung der verschiedenen AR-Subtypen am LDL-Effekt nähergehend untersucht werden. Weiterhin wären Bindungsstudien sinnvoll, die z.B. mit Hilfe von Ellipsometrie die Interaktion von LDL mit den spezifischen Rezeptoren direkt nachweisen könnte.

# Literatur

1. World Health Organisation. Cardiovascular diseases (CVDs). 2011. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/print.html> (besucht am 25.12.2013).
2. World Health Organisation. Global Health Estimates Summary Tables. 2013. URL: [http://www.who.int/entity/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GHE\\_DthWHOReg6\\_2000\\_2011.xls/](http://www.who.int/entity/healthinfo/global_burden_disease/GHE_DthWHOReg6_2000_2011.xls/) (besucht am 25.12.2013).
3. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB, American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127:e6–e245.
4. Statistisches Bundesamt. Anzahl der Gestorbenen nach ausgewählten Todesursachen 2012. URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html> (besucht am 25.12.2013).
5. Statistisches Bundesamt. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Krankheitskosten. URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankheitskosten/Aktuell.html> (besucht am 25.12.2013).
6. Castelli WP, Anderson K. A population at risk. Prevalence of high cholesterol levels in hypertensive patients in the Framingham Study. *Am J Med* 1986;80:23–32.
7. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233–241.

## Literatur

8. Jonas A, Phillips M. Lipoprotein Structure. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Hrsg. von Vance J, Vance D. 5th ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier B.V., 2008:485–506.
9. Brandes R, Busse R. Kreislauf. In: *Physiologie des Menschen*. Hrsg. von Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. 31. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag, 2011:572–626.
10. Holtz J. Peipheral Circulation: Fundamental Concepts, Comparative Aspects of Control in Specific Vascular Sections, and Lymph Flow. In: *Comprehensive human physiology*. Hrsg. von Greger R, Windhorst U. 2. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 1996:1865–1915.
11. Siegel G. Vascular smooth muscle. In: *Comprehensive human physiology*. Hrsg. von Greger R, Windhorst U. 2. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 1996:1941–1963.
12. Means AR, VanBerkum MF, Bagchi I, Lu KP, Rasmussen CD. Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther* 1991;50:255–270.
13. Hartshorne D. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Hrsg. von Johnson L. New York, USA: Raven Press, 1987:423–482.
14. Rembold CM. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension* 1992;20:129–137.
15. Linke W, Pfitzer G. Kontraktionsmechanismen. In: *Physiologie des Menschen*. Hrsg. von Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. 31. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag, 2011:98–124.
16. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem* 2004;259:197–209.
17. Feng J, Ito M, Nishikawa M, Okinaka T, Isaka N, Hartshorne DJ, Nakano T. Dephosphorylation of distinct sites on the 20 kDa myosin light chain by smooth muscle myosin phosphatase. *FEBS Lett* 1999;448:101–104.

## Literatur

18. Hirano K, Derkach DN, Hirano M, Nishimura J, Kanaide H. Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. *Mol Cell Biochem* 2003;248:105–114.
19. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 1990;259:C3–18.
20. Nelson MT, Standen NB, Brayden JE, Worley 3rd J. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1988;336:382–385.
21. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 1990;70:921–961.
22. Mulvany MJ, Nilsson H, Flatman JA. Role of membrane potential in the response of rat small mesenteric arteries to exogenous noradrenaline stimulation. *J Physiol* 1982;332:363–373.
23. Robishaw JD, Foster KA. Role of G proteins in the regulation of the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1989;51:229–244.
24. Heinrich PC, Haan S, Hermanns HM, Löffler G, Müller-Newen G, Schaper F. Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Hrsg. von Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Heidelberg, Germany: Springer Medizin Verlag, 2007:755–808.
25. Michelotti GA, Price DT, Schwinn DA.  $\alpha_1$ -adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol Ther* 2000;88:281–309.
26. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989;341:197–205.
27. Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT.  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res* 1996;78:737–749.
28. Johnson M. The  $\beta$ -adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:S146–S153.
29. Morgado M, Cairrão E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:247–266.

30. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 2010;62:525–563.
31. Hathaway DR, Konicki MV, Coolican SA. Phosphorylation of myosin light chain kinase from vascular smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:841–850.
32. Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Makhlof GM. Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G1006–G1016.
33. Jiang LH, Gawler DJ, Hodson N, Milligan CJ, Pearson HA, Porter V, Wray D. Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2000;275:6135–6143.
34. Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 1998;273:32950–32956.
35. Murthy KS, Zhou H. Selective phosphorylation of the IP<sub>3</sub>R-I in vivo by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G221–G230.
36. Lalli MJ, Shimizu S, Sutliff RL, Kranias EG, Paul RJ. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice. *Am J Physiol* 1999;277:H963–H970.
37. Furukawa K, Tawada Y, Shigekawa M. Regulation of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1988;263:8058–8065.
38. Haug LS, Jensen V, Hvalby O, Walaas SI, Ostvold AC. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J Biol Chem* 1999;274:7467–7473.
39. Murray KJ. Cyclic AMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther* 1990;47:329–345.



## Literatur

40. Nilius B, Casteels R. Biology of the Vascular Wall and Its Interaction with Migratory and Blood Cells. In: Comprehensive human physiology. Hrsg. von Greger R, Windhorst U. 2. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 1996:1981–1993.
41. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000;184:409–420.
42. Lincoln TM, Cornwell TL. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels* 1991;28:129–137.
43. Landgraf W, Hullin R, Göbel C, Hofmann F. Phosphorylation of cGMP-dependent protein kinase increases the affinity for cyclic AMP. *Eur J Biochem* 1986;154:113–117.
44. Jiang H, Colbran JL, Francis SH, Corbin JD. Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. *J Biol Chem* 1992;267:1015–1019.
45. Jiang H, Shabb JB, Corbin JD. Cross-activation: overriding cAMP/cGMP selectivities of protein kinases in tissues. *Biochem Cell Biol* 1992;70:1283–1289.
46. Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P, Hofmann F. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* 2000;87:825–830.
47. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* 1902;28:220–231.
48. Davies P. How Do Vascular Endothelial Cells Respond to Flow? *News Physiol Sci* 1989;4:22–25.
49. Bevan JA, Henrion D. Pharmacological implications of the flow-dependence of vascular smooth muscle tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994;34:173–190.
50. Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol* 1990;259:H1063–H1070.
51. Schretzenmayr A. Über kreislaufregulatorische Vorgänge an den großen Arterien bei der Muskelarbeit. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 1933;232:743–748.

52. 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;16:349–356.
53. Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989;80:458–465.
54. Drexler H, Zeiher A. Endothelial function in human coronary arteries in vivo. Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension* 1991;18:II90–II99.
55. Gerhard M, Roddy M, Creager S, Creager M. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension* 1996;27:849–853.
56. Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J* 2009;73:1983–1992.
57. Siegel G, Malmsten M, Schmidt A. Flow sensing at the endothelial cell membrane-blood interface. *Journal of Membrane Science* 1996;113:101–113.
58. Siegel G, Walter A, Kauschmann A, Malmsten M, Buddecke E. Anionic biopolymers as blood flow sensors. *Biosens Bioelectron* 1996;11:281–294.
59. Siegel G, Malmsten M, Klüssendorf D, Walter A, Schnalke F, Kauschmann A. Blood-flow sensing by anionic biopolymers. *J Auton Nerv Syst* 1996;57:207–213.
60. 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;244:181–189.
61. Holtz J. Hemodynamics in Regional Circulatory Beds and Local Vascular Reactivity. In: *Comprehensive human physiology*. Hrsg. von Greger R, Windhorst U. 2. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 1996:1917–1939.
62. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* 2003;93:e136–e142.

63. Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res* 1996;78:750–758.
64. Stoner L, Erickson ML, Young JM, Fryer S, Sabatier MJ, Faulkner J, Lambrick DM, McCully KK. There's more to flow-mediated dilation than nitric oxide. *J Atheroscler Thromb* 2012;19:589–600.
65. Yang J, Clark JW, Bryan RM, Robertson CS. Mathematical modeling of the nitric oxide/cGMP pathway in the vascular smooth muscle cell. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2005;289:H886–H897.
66. Lansman JB. Going with the flow. *Nature* 1988;331:481–482.
67. White CR, Frangos JA. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007;362:1459–1467.
68. Hull Jr S, Kaiser L, Jaffe MD, Sparks Jr H. Endothelium-dependent flow-induced dilation of canine femoral and saphenous arteries. *Blood Vessels* 1986;23:183–198.
69. Bevan JA, Joyce EH, Wellman GC. Flow-dependent dilation in a resistance artery still occurs after endothelium removal. *Circ Res* 1988;63:980–985.
70. Meyer-Rath G. Der Einfluß von endothelständigen Proteoglykanen und subendothelialer Matrix auf die flußabhängige Gefäßmodulation isolierter gesunder und arteriosklerotischer Koronararterien des Menschen. Diss. Institut für Physiologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2005.
71. Miura H, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. *Circ Res* 1998;83:501–507.
72. Brandes RP, Behra A, Lebherz C, Böger RH, Bode-Böger SM, Phivthong-Ngam L, Mügge A. N(G)-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1997;135:49–55.
73. Bevan JA, Joyce EH. Flow-induced resistance artery tone: balance between constrictor and dilator mechanisms. *Am J Physiol* 1990;258:H663–H668.

## Literatur

74. Pohl U, Herlan K, Huang A, Bassenge E. EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* 1991;261:H2016–H2023.
75. Gerová M, Gero J, Barta E, Dolezel S, Smiesko V, Levický V. Neurogenic and myogenic control of conduit coronary a.: a possible interference. *Basic Res Cardiol* 1981;76:503–507.
76. Wallukat G. The  $\beta$ -adrenergic receptors. *Herz* 2002;27:683–690.
77. Jänig W. Vegetatives Nervensystem. In: *Physiologie des Menschen*. Hrsg. von Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, 2011:403–434.
78. Nagatomo T, Ohnuki T, Ishiguro M, Ahmed M, Nakamura T.  $\beta$ -adrenoceptors: three-dimensional structures and binding sites for ligands. *Jpn J Pharmacol* 2001;87:7–13.
79. Young MA, Knight DR, Vatner SF. Autonomic control of large coronary arteries and resistance vessels. *Prog Cardiovasc Dis* 1987;30:211–234.
80. Jumar A. Die Wirkung von Katecholaminen auf die Koronararterien des Menschen. Diss. Institut für Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, 30.2012.
81. Sun D, Huang A, Mital S, Kichuk MR, Marboe CC, Addonizio LJ, Michler RE, Koller A, Hintze TH, Kaley G. Norepinephrine elicits  $\beta_2$ -receptor-mediated dilation of isolated human coronary arterioles. *Circulation* 2002;106:550–555.
82. Monopoli A, Conti A, Forlani A, Ongini E.  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenoceptors are involved in mediating vasodilation in the human coronary artery. *Pharmacol Res* 1993;27:273–279.
83. Galle J, Bassenge E. Oxidized low density lipoproteins potentiate vasoconstrictions to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle. *Circ Res* 1990;66:1287–1293.
84. Rader D, Hobbs H. Disorders of Lipoprotein Metabolism. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Hrsg. von Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. 17th Revised edition. New York City, New York, USA: Mcgraw-Hill Professional, 2008:2416–2429.
85. Tulenko TN, Sumner AE. The physiology of lipoproteins. *J Nucl Cardiol* 2002;9:638–649.

86. Diffenderfer MR, Schaefer EJ. The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr Opin Lipidol* 2014;25:221–226.
87. Fielding CJ, Fielding PE. Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Hrsg. von JE V, DE V. 5th ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier B.V., 2008:533–554.
88. Goldstein J, Basu S, Brown M. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 1983;98:241–260.
89. Prassl R, Laggner P. Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges. *Eur Biophys J* 2009;38:145–158.
90. Prassl R, Laggner P. Lipoprotein Structure and Dynamics: Low Density Lipoprotein Viewed as a Highly Dynamic and Flexible Nanoparticle. In: *Lipoproteins - Role in Health and Diseases*. Hrsg. von Frank S, Kostner G. InTech, 2012. Kap. 1:3–20.
91. Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:189–210.
92. Siegel G, Rodríguez M, Schön T, Abletshauer C, Schmidt A, Hetzer R, Malmsten M. Blood flow sensor susceptibility to lipoproteins in early arteriosclerosis and its clinical improvement by statin therapy - a nanoplaque study. *Desalination* 2006;191:417–425.
93. Campos H, Blijlevens E, McNamara JR, Ordovas JM, Posner BM, Wilson PW, Castelli WP, Schaefer EJ. LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1410–1419.
94. Wilkinson IB, Prasad K, Hall IR, Thomas A, MacCallum H, Webb DJ, Frenneaux MP, Cockcroft JR. Increased central pulse pressure and augmentation index in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1005–1011.
95. Rafidah H, Azizi A, MN N. Blood pressure variability and arterial elasticity in hyperlipidaemic subjects. *Singapore Med J* 2008;49:297–303.
96. Chopra V, Choksi PU, Cavusoglu E. Beyond lipid lowering: the anti-hypertensive role of statins. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21:161–169.

97. Castelli WD. The lipid risk factor in hypertension and cardiovascular disease. *Br J Clin Pharmacol* 1987;24 Suppl 1:59S–60S.
98. Prospective Studies Collaboration, Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 2007;370:1829–1839.
99. Cicero AFG, D’Addato S, Veronesi M, Rosticci M, Santi F, Dormi A, Borghi C, Brisighella Heart Study Group. Relationship between blood pressure, cholesterolemia and serum apolipoprotein B in a large population sample: the Brisighella Heart Study. *J Hypertens* 2012;30:492–496.
100. Siegel G, Ermilov E, Pries AR, Winkler K, Schmidt A, Ringstad L, Malmsten M, Lindman B. The significance of lipid peroxidation in cardiovascular disease. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014;442:173–180.
101. Goode G, Heagerty A. In vitro responses of human peripheral small arteries in hypercholesterolemia and effects of therapy. *Circulation* 1995;91:2898–2903.
102. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Y W, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997;95:76–82.
103. Creager M, Cooke J, Mendelsohn M, Gallagher S, Coleman S, Loscalzo J, VJ D. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990;86:228–234.
104. Kraml P, Syrovátka P, Stípek S, Fialová L, Koprivová H, Potocková J, Andel M. Hyperlipoproteinemia impairs endothelium-dependent vasodilation. *Physiol Res* 2004;53:471–480.
105. Kugiyama K, Doi H, Motoyama T, Soejima H, Misumi K, Kawano H, Nakagawa O, Yoshimura M, Ogawa H, Matsumura T, Sugiyama S, Nakano T, Nakajima K, Yasue H. Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation* 1998;97:2519–2526.

106. Galle J, Bassenge E. Effects of native and oxidized low-density lipoproteins on endothelium-dependent and endothelium-independent vasomotion. *Basic Res Cardiol* 1991;86 Suppl 2:127–142.
107. Myers P, Wright T, Tanner M, Ostlund R. The effects of native LDL and oxidized LDL on EDRF bioactivity and nitric oxide production in vascular endothelium. *J Lab Clin Med* 1994;124:672–683.
108. Schmidt K, Graier W, Kostner G, Mayer B, Kukovetz W. Activation of soluble guanylate cyclase by nitrovasodilators is inhibited by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:614–619.
109. Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Ohta Y, Yasue H. LPC in oxidized LDL elicits vasocontraction and inhibits endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994;267:H2441–H2449.
110. Simon BC, Cunningham LD, Cohen RA. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J Clin Invest* 1990;86:75–79.
111. Bochkov VN, Tkachuk VA, Kuzmenko YS, Borisova YL, Bühler FR, Resink TJ. Characteristics of low and high density lipoprotein binding and lipoprotein-induced signaling in quiescent human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1994;45:262–270.
112. Siegel G. Unveröffentlicht.
113. Siegel G, Malmsten M, Klüssendorf D, Hofer HW. Vascular smooth muscle, a multiply feedback-coupled system of high versatility, modulation and cell-signaling variability. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997;17:360–373.
114. Siegel G, Rückborn K, Schnalke F, Müller J. Endothelial dysfunction in human atherosclerotic coronary arteries. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl I:99–103.
115. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345–1353.
116. Leonhardt W, Pietzsch J, Nitzsche S. Very-fast ultracentrifugation of human plasma lipoproteins: influence of the centrifugal field on lipoprotein composition. *Clin Chim Acta* 1994;224:21–32.

117. Schlangen J. Die Wirkung von VLDL-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation an Koronararterien des Menschen. Diss. Institut für Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, 19.2010.
118. Toda N.  $\alpha$ -adrenoceptor subtypes and diltiazem actions in isolated human coronary arteries. *Am J Physiol* 1986;250:H718–H724.
119. FitzGerald GA, Smith B, Pedersen AK, Brash AR. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med* 1984;310:1065–1068.
120. McLenachan JM, Williams JK, Fish RD, Ganz P, Selwyn AP. Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilation occurs early in the development of atherosclerosis. *Circulation* 1991;84:1273–1278.
121. Barbato E, Piscione F, Bartunek J, Galasso G, Cirillo P, De Luca G, Iaccarino G, De Bruyne B, Chiariello M, Wijns W. Role of  $\beta_2$  adrenergic receptors in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 2005;111:288–294.
122. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1235–1241.
123. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging* 2010;26:631–640.
124. Baumgart D, Naber C, Haude M, Oldenburg O, Erbel R, Heusch G, Siffert W. G protein  $\beta_3$  subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on  $\alpha_2$ -adrenoceptor activation. *Circ Res* 1999;85:965–969.
125. Bronzetti E, Felici L, Polidori C, Amenta F. Interactions between calcium channel blockers and  $\alpha$ -adrenoceptors in the human coronary and mammary arteries: a radioligand binding study. *J Auton Pharmacol* 1994;14:79–85.



## Literatur

126. Ferro A, Kaumann AJ, Brown MJ.  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptor-mediated relaxation in human internal mammary artery and saphenous vein: unchanged  $\beta$ - and  $\alpha$ -adrenoceptor responsiveness after chronic  $\beta_1$ -adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol* 1993;109:1053–1058.
127. Ferro A, Kaumann AJ, Brown MJ.  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in human coronary artery: desensitization of  $\beta_2$ -adrenergic vasorelaxation by chronic  $\beta_1$ -adrenergic stimulation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25:134–141.
128. Lamba S, Abraham WT. Alterations in adrenergic receptor signaling in heart failure. *Heart Fail Rev* 2000;5:7–16.
129. Okajima M, Takamura M, Véquaud P, Parent R, Lavallée M.  $\beta$ -adrenergic receptor blockade impairs NO-dependent dilation of large coronary arteries during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H501–H510.
130. Hijmering ML, Stroes ESG, Olijhoek J, Hutten BA, Blankestijn PJ, Rabelink TJ. Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:683–688.
131. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:160–162.
132. Rosendorff C. Effects of LDL cholesterol on vascular function. *J Hum Hypertens* 2002;16 Suppl 1:S26–S28.
133. Britten MB, Zeiher AM, Schächinger V. Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Intern Med* 1999;245:315–327.
134. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 1993;92:652–662.
135. Zhang WZ, Venardos K, Finch S, Kaye DM. Detrimental effect of oxidized LDL on endothelial arginine metabolism and transportation. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:920–928.

## Literatur

136. Bochkov V, Tkachuk V, Buhler F, Resink T. Phosphoinositide and calcium signalling responses in smooth muscle cells: comparison between lipoproteins, Ang II, and PDGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:1295–1304.
137. Siegel G, Malmsten M, Klüssendorf D, Leonhardt W. Physicochemical binding properties of the proteoglycan receptor for serum lipoproteins. *Atherosclerosis* 1999;144:59–67.
138. Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994;63:601–637.
139. Morita R, Morimoto S, Koh E, Fukuo K, Kim S, Itoh K, Taniguchi K, Onishi T, Ogihara T. Low density lipoprotein and apoprotein B induce increases in inositol trisphosphate and cytosolic free  $Ca^{2+}$  via pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein in vascular smooth muscle cells. *Biochem Int* 1989;18:647–653.
140. Giardina JB, Tanner DJ, Khalil RA. Oxidized-LDL enhances coronary vasoconstriction by increasing the activity of protein kinase C isoforms  $\alpha$  and  $\epsilon$ . *Hypertension* 2001;37:561–568.
141. Gilman AG. Guanine nucleotide-binding regulatory proteins and dual control of adenylate cyclase. *J Clin Invest* 1984;73:1–4.
142. Resink TJ, Tkachuk VA, Bernhardt J, Bühler FR. Oxidized low density lipoproteins stimulate phosphoinositide turnover in cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992;12:278–285.
143. Resink TJ, Rybin V, Bernhardt J, Orlov S, Bühler FR, Tkachuk VA. Cellular signalling by lipoproteins in cultured smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 1993;30:169–180.
144. Resink T, Tkachuk V, Hahn A, Bochkov V. Activation of phosphoinositide catabolism and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells by LDL and positively charged proteins: evidence that effects of LDL are not specifically dependent on the polycationic nature of apo B. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1700–1709.

145. Ogiwara T, Morita R, Morimoto S, Imanaka S, Fukuo K. Intracellular signal transduction evoked by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Contrib Nephrol* 1991;90:116–121.
146. Tasaki H, Yamashita K, Nakashima Y, Kuroiwa A, Tulenko TN. Increase in intracellular calcium ion in smooth muscle cells induced by low-density lipoprotein. *Gerontology* 1994;40 Suppl 2:23–28.
147. Encabo A, Ferrer M, Conde MV, Porres A, Gómez-Gerique JA, Marín J, Balfagón G. Involvement of protein kinase C in the supersensitivity to 5-HT caused by oxidized low-density lipoproteins. *Life Sci* 1997;61:1331–1339.
148. Block LH, Knorr M, Vogt E, Locher R, Vetter W, Groscurth P, Qiao BY, Pometta D, James R, Regenass M. Low density lipoprotein causes general cellular activation with increased phosphatidylinositol turnover and lipoprotein catabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:885–889.
149. Scott-Burden T, Resink TJ, Hahn AW, Baur U, Box RJ, Bühler FR. Induction of growth-related metabolism in human vascular smooth muscle cells by low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989;264:12582–12589.
150. Sachinidis A, Locher R, Mengden T, Vetter W. Low-density lipoprotein elevates intracellular calcium and pH in vascular smooth muscle cells and fibroblasts without mediation of LDL receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;167:353–359.
151. Sachinidis A, Locher R, Mengden T, Steiner A, Vetter W. Vasoconstriction: a novel activity for low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:315–320.
152. Sachinidis A, Locher R, Steiner A, Mengden T, Vetter W. Effect of low-density lipoprotein on intracellular calcium, intracellular pH and DNA synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens Suppl* 1989;7:S116–S117.
153. Sachinidis A, Mengden T, Locher R, Brunner C, Vetter W. Novel cellular activities for low density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1990;15:704–711.
154. Bolz SS, Galle J, Derwand R, de Wit C, Pohl U. Oxidized LDL increases the sensitivity of the contractile apparatus in isolated resistance arteries for  $Ca^{2+}$  via a rho- and rho kinase-dependent mechanism. *Circulation* 2000;102:2402–2410.

155. Augé N, Fitoussi G, Bascands JL, Pieraggi MT, Junquero D, Valet P, Girolami JP, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Mildly oxidized LDL evokes a sustained  $Ca^{2+}$ -dependent retraction of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996;79:871–880.
156. Wells KE, Miguel R, Alexander JJ. Sex hormones affect the calcium signaling response of human arterial cells to LDL. *J Surg Res* 1996;63:64–72.
157. Wells KE, Alexander JJ, Miguel R. Calcium-dependent second-messenger regulation of low-density lipoprotein oxidation by human aortic smooth muscle cells. *Surgery* 1996;120:337–344.
158. Weisser B, Locher R, Mengden T, Vetter W. Oxidation of low density lipoprotein enhances its potential to increase intracellular free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992;12:231–236.
159. Ruffolo Jr R, Nichols AJ, Oriowo MA. Interaction of vascular  $\alpha_1$  adrenoceptors with multiple signal transduction pathways. *Blood Vessels* 1991;28:122–128.
160. Galle J, Bauersachs J, Busse R, Bassenge E. Inhibition of cyclic AMP- and cyclic GMP-mediated dilations in isolated arteries by oxidized low density lipoproteins. *Arterioscler Thromb* 1992;12:180–186.
161. Fabich N, Winkler K, Ermilov E, Siegel G. LDL-Apolipoprotein E Isoform Codetermines Human Coronary Artery Tone. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(5);Suppl:A108.
162. Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F, Böhm M, Seewald S, Vetter H. Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997;95:473–478.
163. Jay MT, Chirico S, Siow RC, Bruckdorfer KR, Jacobs M, Leake DS, Pearson JD, Mann GE. Modulation of vascular tone by low density lipoproteins: effects on L-arginine transport and nitric oxide synthesis. *Exp Physiol* 1997;82:349–360.
164. Lähteenmäki TA, Seppo L, Laakso J, Korpela R, Vanhanen H, Tikkanen MJ, Vapaatalo H. Oxidized LDL from subjects with different dietary habits modifies atherogenic processes in endothelial and smooth muscle cells. *Life Sci* 2000;66:455–465.
165. Dart AM, Chin-Dusting JP. Lipids and the endothelium. *Cardiovasc Res* 1999;43:308–322.

166. Szczeklik A, Gryglewski RJ. Low density lipoproteins (LDL) are carriers for lipid peroxides and inhibit prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) biosynthesis in arteries. *Artery* 1980;7:488–495.
167. Kobayashi K, Yamashita K, Tasaki H, Suzuka H, Nihei Si, Ozumi K, Nakashima Y. Evaluation of improved coronary flow velocity reserve using transthoracic Doppler echocardiography after single LDL apheresis. *Ther Apher Dial* 2004;8:383–389.
168. Kuklinska AM, Mroczko B, Musial WJ, Usowicz-Szarynska M, Sawicki R, Borowska H, Knapp M, Szmitkowski M. Diagnostic biomarkers of essential arterial hypertension: the value of prostacyclin, nitric oxide, oxidized-LDL, and peroxide measurements. *Int Heart J* 2009;50:341–351.
169. Abletshauser C, Klüssendorf D, Schmidt A, Winkler K, März W, Buddecke E, Malmsten M, Siegel G. Biosensing of arteriosclerotic nanoplaque formation and interaction with an HMG-CoA reductase inhibitor. *Acta Physiol Scand* 2002;176:131–145.
170. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R, Cholesterol Treatment Trialists' (C. T. T) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267–1278.
171. Koh KK, Quon MJ, Waclawiw MA. Are statins effective for simultaneously treating dyslipidemias and hypertension? *Atherosclerosis* 2008;196:1–8.
172. Morgado M, Rolo S, Macedo AF, Castelo-Branco M. Association of statin therapy with blood pressure control in hypertensive hypercholesterolemic outpatients in clinical practice. *J Cardiovasc Dis Res* 2011;2:44–49.
173. Golomb B, Dimsdale J, White H, Ritchie J, Criqui M. Reduction in blood pressure with statins: results from the UCSD Statin Study, a randomized trial. *Arch Intern Med* 2008;168:721–727.
174. Glorioso N, Troffa C, Filigheddu F, Dettori F, Soro A, Parpaglia P, Collatina S, Pahor M. Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. *Hypertension* 1999;34:1281–1286.

175. Strazzullo P, Kerry S, Barbato A, Versiero M, D'Elia L, Cappuccio F. Do statins reduce blood pressure?: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension* 2007;49:792–798.
176. Terzoli L, Mircoli L, Raco R, Ferrari A. Lowering of elevated ambulatory blood pressure by HMG-CoA reductase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;46:310–315.
177. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 2005;111:2356–2363.
178. John S, Schneider M, Delles C, Jacobi J, RE S. Lipid-independent effects of statins on endothelial function and bioavailability of nitric oxide in hypercholesterolemic patients. *Am Heart J* 2005;149:473.
179. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89–118.
180. Borghi C, Bacchelli S, Degli Esposti D, Ambrosioni E, Boricelli L. Pressor and metabolic correlates to long-term development of stable hypertension in borderline hypertensive patients. *J Hypertens* 1997;15:S111.
181. Goode GK, Miller JP, Heagerty AM. Hyperlipidaemia, hypertension, and coronary heart disease. *Lancet* 1995;345:362–364.
182. Borghi C, Prandin MG, Costa FV, Bacchelli S, Degli Esposti D, Ambrosioni E. Use of statins and blood pressure control in treated hypertensive patients with hypercholesterolemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35:549–555.
183. Spósito AC, Mansur AP, Coelho OR, Nicolau JC, Ramires JA. Additional reduction in blood pressure after cholesterol-lowering treatment by statins (lovastatin or pravastatin) in hypercholesterolemic patients using angiotensin-converting enzyme inhibitors (enalapril or lisinopril). *Am J Cardiol* 1999;83:1497–9, A8.
184. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97:1129–1135.
185. Mangat S, Agarwal S, Rosendorff C. Do statins lower blood pressure? *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007;12:112–123.

## Literatur

186. Berkenboom G, Depierreux M, Fontaine J. The influence of atherosclerosis on the mechanical responses of human isolated coronary arteries to substance P, isoprenaline and noradrenaline. *Br J Pharmacol* 1987;92:113–120.
187. Ghiadoni L, Huang Y, Magagna A, Buralli S, Taddei S, Salvetti A. Effect of acute blood pressure reduction on endothelial function in the brachial artery of patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2001;19:547–551.
188. Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens* 2001;19:415–420.
189. Muiesan ML, Salvetti M, Monteduro C, Rizzoni D, Zulli R, Corbellini C, Brun C, Agabiti-Rosei E. Effect of treatment on flow-dependent vasodilation of the brachial artery in essential hypertension. *Hypertension* 1999;33:575–580.
190. Benndorf RA, Appel D, Maas R, Schwedhelm E, Wenzel UO, Böger RH. Telmisartan improves endothelial function in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:367–371.
191. Shimbo D, Muntner P, Mann D, Viera AJ, Homma S, Polak JF, Barr RG, Herrington D, Shea S. Endothelial dysfunction and the risk of hypertension: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Hypertension* 2010;55:1210–1216.
192. Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007;115:2390–2397.
193. Mitchell GF, Parise H, Vita JA, Larson MG, Warner E, Keaney Jr JF, Keyes MJ, Levy D, Vasan RS, Benjamin EJ. Local shear stress and brachial artery flow-mediated dilation: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004;44:134–139.
194. Witte DR, Westerink J, de Koning EJ, van der Graaf Y, Grobbee DE, Bots ML. Is the association between flow-mediated dilation and cardiovascular risk limited to low-risk populations? *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1987–1993.

## *Literatur*

195. Kabutoya T, Hoshide S, Ogata Y, Eguchi K, Kario K. Masked hypertension defined by home blood pressure monitoring is associated with impaired flow-mediated vasodilatation in patients with cardiovascular risk factors. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2013;15:630–636.
196. Lambiase MJ, Dorn J, Thurston RC, Roemmich JN. Flow-mediated dilation and exercise blood pressure in healthy adolescents. *J Sci Med Sport* 2013.
197. O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey Jr DE, Chung MK, de Lemos JA, Ettinger SM, Fang JC, Fesmire FM, Franklin BA, Granger CB, Krumholz HM, Linderbaum JA, Morrow DA, Newby LK, Ornato JP, Ou N, Radford MJ, Tamis-Holland JE, Tommaso CL, Tracy CM, Woo YJ, Zhao DX, Anderson JL, Jacobs AK, Halperin JL, Albert NM, Brindis RG, Creager MA, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Kushner FG, Ohman EM, Stevenson WG, Yancy CW, American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2013;127:e362–e425.
198. Rabkin SW. Mechanisms of action of adrenergic receptor blockers on lipids during antihypertensive drug treatment. *J Clin Pharmacol* 1993;33:286–291.



# Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Daniel Grün, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Interaktion zwischen Low-Density Lipoprotein und sympathischen Adrenorezeptoren 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](http://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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der 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 un-wahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

18. Januar 2017, Zürich

Daniel Grün

# **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Daniel Grün hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

## **Publikation 1:**

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

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente und Mitarbeit an der Verfassung des Textes. Posterpräsentation.

## **Publikation 2:**

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.*, Abstracts 2011 Sci. Sessions, p. 219 (2011)

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

## **Publikation 3:**

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

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

Publikation 4:

Lendner, J., Krohn, S., Jumar, A., Grün, D., Zakrzewicz, A., Ermilov, E., Siegel, G.: Blood Lipoproteins May Be Implicated in Blood Pressure Regulation *Circulation Research*. 2013;113:A111

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

# Lebenslauf

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

# Publikationsliste

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

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.*, Abstracts 2011 Sci. Sessions, p. 219 (2011)

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 *Circulation Research*. 2013;113:A111

# Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Günter Siegel für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern des Institutes für Physiologie der Medizinischen Fakultät Charité Berlin für ihre stete Mithilfe danken. Allen voran danke ich hierbei Frau Angela Becker, welche durch ihre ständige Präsenz und Hilfe bei der Versuchsdurchführung, sowie Planung und sorgfältige Dokumentation, wesentlich zum Gelingen der Versuche und dieser Arbeit beigetragen hat. Ebenso zu nennen ist Herr Dr. Eugeny Ermilov, der mich bei der statistischen Auswertung und der graphischen Darstellung der Ergebnisse unterstützt hat. Bei den Mitarbeitern des Deutschen Herzzentrums Berlin und seinem Leiter Herrn Professor Dr. Roland Hetzer möchte ich mich für die Geduld und Unterstützung bei der Präparation der Koronararterienpräparate sowie die Überlassung derselben bedanken. Den Patienten möchte ich meinen besonderen Dank und Anerkennung für die Bereitschaft aussprechen, mit den von ihnen gespendeten Organen der Wissenschaft und anderen Patienten zu dienen. Für die Hilfe bei der Bestimmung der sekundären Botenstoffe bedanke ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Hans-Werner Hofer und für die Isolation der Lipoproteine und Bereitstellung eines grossen Teils der dafür notwendigen Blutproben beim Team des Lipidlabors am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Freiburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Karl Winkler. Den Mitgliedern unserer Doktorandengruppe, Frau Agnes Jumar, Frau Janna Lender und Herrn Stefan Krohn, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe während der Forschungsarbeit, aber auch darüber hinaus, danken. Ebenso bedanke ich mich bei den guten Freunden Johanna, Denise, Katrin und Janina, die mich während der langen Zeit auch in schwierigen Phasen unterstützt haben. Zu guter Letzt gilt besonderer Dank meinen Eltern, die mir stets Rückhalt, Unterstützung und Ratgeber waren und die entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.