

Aus dem Institut für Physiologie

(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. R. Rettig)

der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Einfluss NADPH-Oxidase-abhängiger Sauerstoffradikale auf die
Entwicklung der arteriellen Hypertonie spontan hypertensiver Ratten und
Untersuchungen zu vaskulären Wirkmechanismen von Apocynin**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2011

vorgelegt von:

Anja Steffen

geb. am: 06.09.1981

in: Wolgast

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. O. Grisk

2. Gutachter: Prof. R. Schubert

Ort, Raum: Karlsburg, Greifswalder Str. 11c,
Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Seminarraum

Tag der Disputation: 22.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Endothelfunktion	7
1.2 Glatte Gefäßmuskulatur	9
1.2.1 Kontraktion und Relaxation	9
1.2.2 RhoA/Rho-Kinase-vermittelte Signaltransduktion	10
1.3 Reaktive Sauerstoffspezies	11
1.3.1 Definition und Bedeutung	11
1.3.2 Superoxidanionenbildung	12
1.3.3 NADPH-Oxidase	13
1.3.4 Reaktive Sauerstoffspezies und arterielle Hypertonie	14
1.3.5 Experimentelle Hypertonie bei spontan hypertensiven Ratten (SHR)	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere	19
2.2 Chirurgische Methoden und Gefäßpräparationen	19
2.3 Radiotelemetrie	21
2.3.1 Postnatale Apocyninbehandlung und Erfassung der Blutdruckdaten	21
2.4 Small-Vessel-Myographie	23
2.4.1 Aufbau	23
2.5 Ablauf der Myographie	24
2.5.1 Kalibrierung des Kraftmessers	24
2.5.2 Fixierung und Vordehnung der Gefäßsegmente im Myographen	26
2.6 Versuchsprotokolle	27
2.7 Lösungen und Chemikalien	30
2.7.1 Pufferlösungen	30
2.7.2 Chemikalien	31

2.8 Statistik	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Blutdruckverhalten Apocynin-behandelter SHR	34
3.1.1 Langfristige Wirkung einer postnatalen Apocyninbehandlung auf den arteriellen Druck	34
3.1.2 Kurzfristige Wirkung von Apocynin auf den arteriellen Druck	36
3.1.3 Akute Blutdruckreaktion auf intravenös verabreichtes Apocynin	37
3.1.4 Wirkung der Apocyninbehandlung auf die endothelabhängige und Apocynin-induzierte Vasodilatation	39
3.2 Pharmakologische Untersuchungen zu vasodilatierenden Wirkmechanismen von Apocynin	44
3.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies und hyperpolarisierende Effekte	44
3.2.2 Vaskuläre NADPH-Oxidase-Hemmung	47
3.2.3 Alternative Mechanismen der Apocynin-induzierten Vasodilatation	53
4 Diskussion	63
4.1 Arterielle Hypertonie	63
4.2 Renale Mechanismen in der Pathogenese experimenteller Hypertonieformen	66
4.3 Reaktive Sauerstoffspezies und arterielle Hypertonie	68
4.4 Untersuchungen zu vasodilatierenden Wirkmechanismen von Apocynin	71
4.5 Schlussfolgerungen	74
5 Zusammenfassung	76
6 Literaturverzeichnis	78
7 Publikation	90

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BSO	Buthioninsulfoximin
bsp.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
Ca^{2+}	Kalzium
CaCl_2	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGD	Chronic Granulomatous Disease
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cu^{2+}	Kupfer(II)-Ionen
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid
Fe^{3+}	Eisen(III)-Ionen
FGF	Fibroblast Growth Factor
F344	Fischer Ratten
GTP	Guanosintriphosphat
H^+	Wasserstoffion
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat
K^+	Kaliumion
KCL	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
L-NAME	L-Nitro-Arginin Methyl Ester
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
Mg^{2+}	Magnesium(II)-Ion
MgSO_4	Magnesiumsulfat
MLC	Myosin Light Chain
MYPT-1	Myosin Phosphatase-Targeting Subunit 1

Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NO	Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
n.s.	nicht signifikant
o.g.	oben genannte
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH ⁻	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
p	Signifikanzniveau
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
ROCK	Rho-Kinase
ROOH	Hydroperoxid
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffspezies
SHR	spontan hypertensive Ratten
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
u.a.	und andere
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
WKY	Wistar-Kyoto-Ratten

1 Einleitung

Die Blutgefäße dienen dem Stofftransport im Organismus und sind charakterisiert durch ihren dreischichtigen Wandaufbau. Während die innere als Tunica intima bezeichnete Schicht hauptsächlich aus Endothelzellen besteht, wird die an die Intima angrenzende Tunica media hauptsächlich aus glatten Gefäßmuskelzellen gebildet. Die darüber liegende Tunica adventitia verbindet als lockeres Bindegewebe die Gefäße mit ihrer Umgebung. Die Endothelzellen, die dem Stoffaustausch zwischen Intravasalraum und Gefäßwand dienen, bilden mit der glatten Gefäßmuskulatur, die durch aktive Spannungsentwicklung die Gefäßweite reguliert, eine funktionelle Einheit. Eine Schädigung der Endothelzellen führt unter anderem durch die verminderte Synthese und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) zur gestörten Vasodilatation sowie zur Aktivierung proinflammatorischer und prothrombotischer Prozesse.^{37, 144} Diese als endotheliale Dysfunktion bezeichnete Funktionsstörung des Endothels begünstigt die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen.^{37, 144}

1.1 Endothelfunktion

Endothelzellen kleiden als flache einschichtige Zellschicht das Lumen der Blutgefäße aus und besitzen zahlreiche bedeutende Aufgaben. Das Endothel reguliert als physiologische Barriere die Passage verschiedener Stoffe zwischen Gefäßlumen und Gewebe, die unter anderem durch Tight junctions zwischen benachbarten Zellen vermittelt wird.⁴³ Diese gürtelförmig um die Zelle angeordneten Membranproteine, die in engen Kontakt mit der Nachbarzelle treten, bilden eine regulierte Diffusionsbarriere für parazelluläre Transportvorgänge.⁴³ Das Endothel besitzt eine enge funktionelle Beziehung zur glatten Gefäßmuskulatur und reguliert durch Synthese und Freisetzung vasoaktiver Substanzen den Tonus der glatten Gefäßmuskelzellen. Zu den vasodilatatorisch wirkenden Substanzen, die vom Endothel gebildet werden, zählen Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide, NO), Prostacyclin, EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor) und Bradykinin.^{37, 144} Die Vasokonstriktion wird durch endotheliale Faktoren wie Endothelin-1, Prostaglandine und reaktive Sauerstoffspezies begünstigt.^{37, 144} Durch das optimale Zusammenspiel von Dilatation und Konstriktion reguliert das Endothel den Blutfluss und den peripheren

Gefäßwiderstand. Dabei kommt dem Autakoid NO eine besondere Bedeutung zu, da es neben der Vasodilatation antiaggregatorische,^{26, 44} antiinflammatorische,^{48, 93, 110} antioxidative^{38, 110} und antiproliferative^{49, 127} Eigenschaften besitzt.¹⁴⁴ Rezeptoren in der Zellmembran der Endothelzellen ermöglichen die Beeinflussung der Endothelfunktion durch z.B. proinflammatorische Zytokine⁷⁵ sowie Wachstumsfaktoren wie FGF (Fibroblast Growth Factor)¹⁵² und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)³⁹ die für die Angiogenese⁴¹ verantwortlich sind.¹⁴⁴ Durch ihre proliferativen, dedifferenzierenden und gefäßneubildenden Eigenschaften sind VEGF und FGF unter anderem an der Wachstumsbeschleunigung und Neovaskularisation von Tumoren beteiligt.⁵¹ Um den Organismus bei Verletzungen vor schwersten Blutungen zu schützen und ihn andererseits nach Gerinnungsaktivierung vor Thrombosen zu bewahren übernehmen die Endothelzellen komplexe Aufgaben bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Gerinnung und Fibrinolyse.^{37, 144} Neben den vielfältigen physiologischen Aufgaben ist das Endothel an einer Reihe pathologischer Prozesse beteiligt. Störungen in der Abstimmung einzelner Endothelfunktionen führen zur endothelialen Dysfunktion und tragen zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei.^{37, 144}

Bereits in den 80er Jahren entdeckte der amerikanische Pharmakologe Robert F. Furchgott, dass die Endothelzellen bei Zugabe von Acetylcholin Muscarinrezeptor-abhängig eine unbekannte diffusionsfähige Substanz freisetzen, die in der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Relaxation führte.⁴⁵ Diese wurde als EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor) bezeichnet.⁴⁵ Außerdem zeigte er, dass die Acetylcholin-abhängige Gefäßrelaxation nur unter Anwesenheit eines funktionsfähigen Endothels möglich ist.^{45, 46} Einige Jahre später konnten Robert F. Furchgott und Louis J. Ignarro unabhängig voneinander die chemische Struktur von EDRF identifizieren und EDRF als NO (Nitric Oxide) entschlüsseln.⁷³ In den darauf folgenden Jahren wurden zahlreiche weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Signaltransduktionsweges und der Funktionen des Stickstoffmonoxides durchgeführt.

Das von der endothelialen NO-Synthase gebildete kurzlebige freie Radikal NO ist ein bedeutender Regulator der Gefäßspannung und vermittelt vasoprotektive Eigenschaften. Stimuliert durch Scherkräfte¹⁴¹ und vasoaktive Substanzen wie Acetylcholin, Substanz P, Serotonin und Bradykinin katalysiert die endotheliale NO-Synthase mit Hilfe des Kofaktors Tetrahydrobiopterin^{124, 126, 140} die Oxidation von L-Arginin¹¹² zu L-Citrullin und NO. Aufgrund der elektrischen Neutralität des NO diffundiert es frei durch die Membranen

und gelangt zur glatten Gefäßmuskelzelle.^{102, 121} Dort bindet es an die lösliche Guanylatcyclase.^{80, 121} Dies führt zu einer gesteigerten Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) und zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase, die eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt.^{102, 121} Die Inaktivierung von cGMP zu GMP erfolgt durch die Phosphodiesterasen.¹²¹ Durch molekularbiologische Untersuchungen konnten drei Isoformen der NO-Synthasen (NOS) identifiziert werden.^{16, 95} Dabei werden zwei Kalzium- und Calmodulin-abhängige konstitutive NOS, zu denen die endotheliale (eNOS oder NOS3) und die neuronale NOS (nNOS oder NOS1)⁹⁵ zählen und eine induzierbare NOS (iNOS oder NOS2)¹⁶ unterschieden.

1.2 Glatte Gefäßmuskulatur

Die an das Endothel angrenzenden glatten Muskelzellen bilden das kontraktile Gewebe der Gefäße. Der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur wird durch vasoaktive Substanzen des Endothels, die autonome Gefäßinnervation, Hormone, metabolische Faktoren und Dehnung der Gefäßwand reguliert.

1.2.1 Kontraktion und Relaxation

Viele Vasokonstriktoren sind Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die eine Phospholipase C aktivieren.¹⁴⁶ Diese spaltet das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die second messenger Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG).¹⁴⁶ IP₃ bindet an Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums. Dies führt zum verstärkten Ca²⁺-Auswärtsstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration.¹⁴⁶ DAG aktiviert die Proteinkinase C, die wiederum spezifische Proteine wie z.B. L-Typ Ca²⁺-Kanäle phosphoryliert¹⁴⁶ oder die MLC-Phosphatase (Myosin Light Chain Phosphatase)⁶⁹ durch Phosphorylierung inaktiviert⁹⁶ und damit zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur beiträgt. Das in das Zytosol freigesetzte Ca²⁺ bindet an das zytoplasmatische Protein Calmodulin. Der Ca²⁺-Calmodulin-Komplex aktiviert die MLC-Kinase (Myosin Light Chain Kinase)¹, die ATP spaltet und die leichte Kette am Myosinkopf

phosphoryliert.^{79, 115, 146} Dadurch wird die Myosin-ATPase aktiviert, so dass der Querbrückenzyklus ablaufen kann. Eine Abnahme der Bindung von Vasokonstriktoren an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Verminderung der Gefäßwanddehnung und vasodilatierende Agonisten führen durch Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration¹⁴⁶ und Dephosphorylierung der leichten Ketten am Myosin (MLC) durch die aktive MLC-Phosphatase¹⁴⁶ zur Relaxation der glatten Muskulatur. Dazu werden die Ca^{2+} -Ionen über Ca^{2+} -, Mg^{2+} -ATPasen in das sarkoplasmatische Retikulum und über membrangebundene Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher in den Extrazellularraum transportiert.¹⁴⁶ Gleichzeitig sinkt die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran, um den Ca^{2+} -Einwärtsstrom in die Zelle zu reduzieren.¹⁴⁶ Durch Rezeptor-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wird wiederum die Proteinkinase A aktiviert, die durch Phosphorylierung der MLC-Kinase zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur beiträgt.¹⁰³

1.2.2 RhoA/Rho-Kinase-vermittelte Signaltransduktion

Die Rho-Kinasen sind erstmals 1996 identifizierte Effektoren des kleinen G-Proteins RhoA.⁷⁶ Sie besitzen ein Molekulargewicht von etwa 160 kDa und bestehen aus einer am N-Terminus lokalisierten Serin/Threonin-Kinasedomäne, gefolgt von einer aus 600 Aminosäuren bestehenden „coiled-coil“-Region, die die Rho-bindende Domäne (RBD) enthält und eine Pleckstrin homologe Domäne am C-Terminus.^{76, 92} Das C-terminale Ende ist die regulatorische Region der Rho-Kinase.³ In ruhenden Zellen bindet sie an die N-terminale Region des Enzyms und bildet so einen autoinhibitorischen Loop.^{3, 4, 92} Durch molekularbiologische Untersuchungen konnten zwei Isoformen der Rho-Kinasen identifiziert werden.¹⁰⁴ Sowohl die aus 1354 Aminosäuren bestehende ROCK-1, als auch die aus 1388 Aminosäuren zusammengesetzte ROCK-2 werden in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, wobei deren Gene beim Menschen auf Chromosom 18 (18q11.1) und 2 (2p24) lokalisiert sind.^{92, 129, 138} Rho-Kinasen haben eine besondere Bedeutung bei der Regulation der Kontraktion in glatten Gefäßmuskelzellen.¹¹⁶ Durch Vasokonstriktor-induzierte Rezeptoraktivierung kommt es zur Konformationsänderung des kleinen G-Proteins RhoA von der inaktiven GDP-gebundenen in die aktive GTP-gebundene Form.¹¹⁶ Die RhoA-GTP aktiviert die Rho-Kinase,¹¹⁶ dadurch wird die Interaktion zwischen dem C-terminalen Ende und der katalytischen Region des Enzyms

unterbrochen.³ Die aktivierte Rho-Kinase spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation der Aktivität der MLC-Phosphatase. Die MLC-Phosphatase setzt sich aus 3 Untereinheiten zusammen, eine 37 kDa kleine katalytische Phosphatase Untereinheit (PP-1C), eine variable 20 kDa Untereinheit, deren Funktion noch ungeklärt ist und eine 110 bis 130 kDa große regulatorische Untereinheit MYPT-1 (Myosin Phosphatase-Targeting Subunit 1).^{69, 116} Das durch die aktivierte Rho-Kinase phosphorylierte MYPT-1 hemmt die enzymatische Aktivität der MLC-Phosphatase,⁸¹ so dass die leichte Kette des Myosins phosphoryliert bleibt und die Kontraktion aufrecht erhalten wird.¹¹⁶ Über einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus phosphoryliert die Rho-Kinase direkt die MLC, wobei dies eher eine untergeordnete Rolle in der Regulation der Kontraktion glatter Muskelzellen spielt.⁵ Aufgrund der physiologischen Funktionen der Rho-Kinasen, können diese einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen haben.⁹² Durch den Einsatz des Rho-Kinase-Inhibitors Fasudil bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte die Rho-Kinase-Aktivität in Leukozyten signifikant reduziert und die Endothelfunktion verbessert werden.¹⁰⁶

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies

1.3.1 Definition und Bedeutung

Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) entstehen bei sauerstoffabhängigen Redoxreaktionen in den Mitochondrien bei der Zellatmung und als Zwischenprodukt weiterer enzymatischer Reaktionen (Xanthinoxidasen, entkoppelte NO-Synthasen, NADPH-Oxidasen) in allen Zellen des Organismus. Zu ihnen zählen freie Radikale wie Superoxidanionen (O_2^-) und hochreaktive Hydroxylradikale (OH^\cdot), die stabileren ROS Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroperoxide (ROOH), sowie angeregte Sauerstoffmoleküle.⁹³ Durch erhöhte zelluläre Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies und eingeschränkte antioxidative Schutzmechanismen entsteht oxidativer Stress. Dieser führt zur Schädigung von DNA, Zellmembranen, Proteinen und Enzymen und trägt zur Alterung der Zellen und der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, Krebserkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen bei.^{6, 18, 67} Neben diesen pathologischen Wirkungen sind ROS an einer Reihe physiologischer Prozesse beteiligt. Sie

agieren als Botenstoffe, die Signaltransduktionswege regulieren, sind an der Proliferation und am Wachstum von Zellen beteiligt und spielen eine wichtige Rolle beim „oxidativen Burst“ der Leukozyten, der der Abtötung von Mikroorganismen dient.^{40, 54, 66, 77, 78, 118} Dabei bilden die neutrophilen Granulozyten NADPH-Oxidase-abhängig Superoxidanionen, die die phagozytierten Erregerbestandteile zerstören.^{8, 27} B. M. Babior beschrieb 1973, dass es einen Zusammenhang zwischen der vermehrten Superoxidanionenbildung in den Granulozyten und der Phagozytose von Mikroorganismen gibt.^{8, 27, 78} Der X-chromosomal vererbte Defekt des membrangebundenen Cytochrom b-Komplexes der NADPH-Oxidase und Mutationen der Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox} führen in den neutrophilen Granulozyten zu einer Störung der Superoxidanionendbildung und zur Unfähigkeit Bakterien und Pilze abzutöten.²⁸ Diese als septische Granulomatose (Chronic Granulomatous Disease, CGD)⁷ bezeichnete Erkrankung manifestiert sich bei den Betroffenen durch schwere bakterielle und Pilzinfektionen.

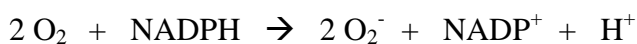
1.3.2 Superoxidanionenbildung

Reaktive Sauerstoffspezies werden in allen Zelltypen der Gefäßwand gebildet.¹²⁸ Dabei kommen den Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) und dem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) eine besondere Bedeutung als intrazelluläre Signalmoleküle zu.^{40, 54, 55, 57, 66, 77, 118} Die kurzlebigen Superoxidanionen entstehen durch Ein-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff bei der mitochondrialen Atmung während der Übertragung von Elektronen des NADH auf Sauerstoff und bei enzymkatalysierten Reaktionen durch Xanthinoxidasen, NO-Synthasen und NADPH-Oxidasen. Als Hauptquelle der vaskulären Superoxidanionenbildung wurden die NADPH-Oxidasen identifiziert.^{56, 57, 99, 150} Die Superoxidanionen sind in der Lage durch sekundäre Prozesse weitere reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal zu bilden.^{40, 54, 66, 93} Unter physiologischen Bedingungen werden die Superoxidanionen durch die Superoxiddismutase zu dem stabileren, membrangängigen Wasserstoffperoxid umgewandelt.^{66, 93} Unter Beteiligung der Katalase wird Wasserstoffperoxid enzymatisch zu Wasser und Sauerstoff abgebaut.^{40, 66, 93} Durch diese enzymatische Reaktion ist die Katalase in der Lage den oxidativen Stress zu verringern. Darüber hinaus kann Wasserstoffperoxid durch verschiedene Peroxidasen wie Glutathionperoxidase und Myeloperoxidase eliminiert werden.^{66, 93} Überschüssige Superoxidanionen sind außerdem in der Lage im Zellstoffwechsel anfallende Metallionen

wie Fe^{3+} und Cu^{2+} zu reduzieren.⁹³ Diese reduzierten Ionen können wiederum mit H_2O_2 reagieren, um hochreaktive Hydroxylradikale zu bilden, die wiederum DNA, Lipide und Proteine zerstören.^{40, 66, 93}

1.3.3 NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase ist ein, in neutrophilen Granulozyten^{9, 10} und anderen Zellen des Organismus identifizierter Enzymkomplex, der sich aus membrangebundenen und zytosolischen Untereinheiten zusammensetzt.¹⁵⁰ Der Cytochrom b_{558} – Komplex besteht aus der transmembranalen Untereinheit $\text{gp91}^{\text{phox}}$ und der membranassoziierten Untereinheit p22^{phox} .¹⁵⁰ Die drei zytosolischen Untereinheiten umfassen die Proteine p47^{phox} , p67^{phox} und das kleine G-Protein Rac.^{55, 150} Letzteres kommt in der Isoform Rac1 in nichtphagozytären Zellen⁷² und in der Isoform Rac2 in Phagozyten¹⁰ und hämatopoetischen Zellen⁷² vor. Die katalytische Untereinheit $\text{gp91}^{\text{phox}}$ des Cytochrom b_{558} -Komplexes trägt eine FAD-Gruppe und zwei Hämringe.⁸⁷ Für die Aktivierung der NADPH-Oxidase ist einerseits die Umwandlung von GDP zu GTP an der Rac-Untereinheit, andererseits die Phosphorylierung von p47^{phox} erforderlich.^{55, 87} Dieser Vorgang führt zur Konformationsänderung der zytosolischen Untereinheit, die sich an den membranständigen Cytochrom b_{558} -Komplex anlagert.⁸⁷ Das Substrat NADPH bindet auf der zytoplasmatischen Membranseite an die $\text{gp91}^{\text{phox}}$ Untereinheit und setzt zwei Elektronen frei.⁸⁷ Die Elektronen werden durch FAD und die beiden Hämgruppen auf die gegenüberliegende Membranseite übertragen, wo sie Sauerstoffmoleküle zu Superoxidanionen reduzieren.⁸⁷



Da negative Ladungen über die Membran transportiert werden, erfolgt der elektrische Ausgleich durch die gleichgerichtete Übertragung von Protonen durch einen Kanal, der Bestandteil der NADPH-Oxidase beziehungsweise mit dieser assoziiert ist.^{70, 87, 97}

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass verschiedene funktionelle NOX Isoformen für die Untereinheiten der NADPH-Oxidase in nichtphagozytären Zellen exprimiert werden, die homologe Proteine der $\text{gp91}^{\text{phox}}$ Untereinheit darstellen. Zu ihnen zählen NOX1, die in glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und in Epithelzellen des Kolons gebildet werden,^{55, 72, 87, 88} sowie die NOX2, die in humanen neutrophilen Granulozyten,⁷² in Kardiomyozyten,⁸³ Fibroblasten⁷² und in glatten Gefäßmuskelzellen der

Widerstandsgefäße²⁵ gebildet werden. Des Weiteren werden die NOX3 im Epithel der Cochlea und des Vestibularorgans exprimiert und vermutlich Rac-unabhängig aktiviert.^{72, 23} Die NOX4 werden im Tubulussystem der Nieren⁸⁵ aber auch in zerebralen Gefäßen gebildet und interagieren direkt mit der Untereinheit p22^{phox}, welches wiederum die Enzymstruktur stabilisiert.⁵⁵ Die Gruppe der NOX5 wurden in humanen glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen⁵⁵ und in lymphozytenreichen Regionen der Milz und Lymphknoten nachgewiesen und werden durch Kalzium aktiviert.^{13, 72} In den letzten Jahren haben vaskuläre NADPH-Oxidasen, die Hauptquelle der Bildung von Superoxidanionen in den Gefäßwänden sind,^{57, 99, 150} zunehmende Aufmerksamkeit erfahren. Verschiedene Faktoren, wie durch gesteigerten Blutfluss erhöhte Schubspannung am Endothel und vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II, TNF- α und PDGF regulieren die NADPH-Oxidase-Aktivität.^{30, 31, 35, 56, 120, 150} Auf diese Weise werden vermehrt Superoxidanionen gebildet. Die erhöhten vaskulären Konzentrationen NADPH-Oxidase-abhängiger Sauerstoffradikale führen wiederum zur endothelialen Dysfunktion,³⁷ die an der Entstehung und Aufrechterhaltung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind.¹⁴⁴

1.3.4 Reaktive Sauerstoffspezies und arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie stellt einen der bedeutendsten Risikofaktoren für die Entstehung von Gefäßerkrankungen, die zu Schlaganfall, koronarer Herzkrankheit und Niereninsuffizienz führen, dar. Derzeit liegt die Prävalenz der Hypertonie in den Industrienationen bei durchschnittlich 30%,¹¹⁴ die mit zunehmendem Alter und weiteren Risikofaktoren drastisch ansteigt. Nach den Leitlinien der Deutschen Hypertonie Gesellschaft liegt ein arterieller Bluthochdruck ab Werten von 140/90 mmHg vor.³² Man differenziert zwischen der in über 90% der Fälle auftretenden essentiellen Hypertonie, die durch genetische Faktoren, Umweltfaktoren und Verhaltensfaktoren bedingt ist und der sekundären Hypertonie, deren Ursache renale, endokrine und vaskuläre Erkrankungen darstellen. Da das kardiovaskuläre Risiko mit der Höhe des systolischen und diastolischen Blutdrucks korreliert, ist eine frühzeitige Erkennung und Behandlung zur Senkung der Morbidität und Mortalität von großer Bedeutung. Studien haben gezeigt, dass erhöhte Gewebekonzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies mit der Entwicklung der arteriellen Hypertonie assoziiert sind.^{22, 62, 142} Dabei spielen als pathogenetische

Mechanismen die endotheliale Dysfunktion,¹⁴³ die Erhöhung der Natriumretention in der Niere¹⁴⁷ und eine vermehrte Sympathikusaktivierung¹³⁶ eine entscheidende Rolle.

Das vom Endothel gebildete Stickstoffmonoxid reguliert durch Vasodilatation den Blutfluss und senkt den peripheren Gefäßwiderstand. Durch erhöhte zelluläre Konzentrationen von Superoxidanionen interagieren diese rasch mit Stickstoffmonoxid und bilden Peroxynitrit (ONOO⁻).¹⁷ Peroxynitrit reagiert mit dem Zink-Thiolat-Zentrum der NO-Synthase, wodurch die NO-Produktion vermindert wird.¹⁰⁵ Die reduzierte NO-Bioverfügbarkeit und die größeren Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies führen zur Störung der endothelialen Funktion mit beeinträchtigter Vasodilatation der Gefäße. Ein weiteres Phänomen ist die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase, wodurch ein Ungleichgewicht zwischen NO- und ROS-Produktion entsteht.^{19, 86} Dabei spielt Tetrahydrobiopterin, das unter physiologischen Bedingungen durch die GTP-Cyclohydrolase I aus GTP gebildet wird¹³⁹ und als Kofaktor der NO-Synthase agiert,¹⁴⁰ eine besondere Rolle. Sobald die intrazelluläre Konzentration von Tetrahydrobiopterin sinkt wird die endotheliale NO-Synthase entkoppelt, die folglich reaktive Sauerstoffspezies anstelle von NO bildet.^{19, 140} Landmesser et al. haben gezeigt, dass die von der vaskulären NADPH-Oxidase gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies den endothelialen NOS-Kofaktor Tetrahydrobiopterin in Gefäßen von hypertensiven Tieren oxidieren.⁸⁶ Durch den Verlust an Tetrahydrobiopterin wird die NO-Synthase entkoppelt, daraus resultiert eine verminderte NO-Produktion und eine gesteigerte Superoxidanionenbildung.⁸⁶ Mollnau et al. demonstrierten, dass die in vivo Behandlung von Ratten mit Angiotensin II den systolischen Blutdruck und die vaskuläre Superoxidanionenbildung durch Proteinkinase C-abhängige Aktivierung der NADPH-Oxidase erhöht und die Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten p22^{phox}, gp91^{phox} und Nox1 steigert.¹⁰⁰ Darüber hinaus entkoppelt Angiotensin II die endotheliale NO-Synthase, wodurch der oxidative Stress erhöht und die NO-Bioverfügbarkeit reduziert wird.¹⁰⁰ Dies führt wiederum zur endothelialen Dysfunktion und zur Entwicklung der Hypertonie.¹⁰⁰

Bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der arteriellen Hypertonie spielen renale Mechanismen, wie tubuläre Transportvorgänge und hämodynamische Faktoren eine entscheidende Rolle. Durch den Abfall des renalen Perfusionsdruckes wird die Reninfreisetzung im juxtaglomerulären Apparat stimuliert.^{98, 113} Mit Hilfe des Renins wird

Angiotensinogen in Angiotensin I umgewandelt.¹¹³ Aus letzterem wird durch das Angiotensin Converting Enzym Angiotensin II gebildet, welches über Rezeptoraktivierung vasokonstriktorisch wirkt und Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde freisetzt.¹¹³ Die damit verbundene gesteigerte Wasser- und Natriumrückresorption sowie Vasokonstriktion führt zur Steigerung des arteriellen Blutdruckes. Durch vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies werden renale Funktionen in der Weise beeinflusst, dass sie zur Hypertonie beitragen.¹⁴⁷ Untersuchungen haben gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies durch Interaktion mit Ionenkanälen Transportmechanismen in verschiedenen Geweben beeinflussen.⁸² Ortiz et al. zeigten, dass Superoxidanionen die Natriumchloridabsorption im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife stimulieren.¹⁰⁹ In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass in den Gefäßwänden von SHR vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die einen Einfluss auf die Entwicklung der Hypertonie haben.^{24, 137} Schnackenberg et al. demonstrierten, dass SHR im Vergleich zu WKY einen höheren renalen Gefäßwiderstand und arteriellen Blutdruck zeigen.¹²⁵ Die Behandlung mit dem membranpermeablen Superoxiddismutasemimetikum Tempol führte zu einer Abnahme des renalen Gefäßwiderstandes und des Blutdruckes.¹²⁵

Das in den Nieren gebildete Stickstoffmonoxid reguliert den renalen Gefäßwiderstand, den Blutfluss und die Natriumhomöostase,¹² indem es im proximalen Tubulus den Na^+/H^+ -Austausch und die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität vermindert.¹⁰⁵ Durch seine zahlreichen physiologischen Funktionen hat Stickstoffmonoxid einen Einfluss auf die Regulierung und Aufrechterhaltung des Blutdruckes.¹² Die Interaktion reaktiver Sauerstoffspezies mit NO führt zur Inaktivierung von NO und Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit. Eine zweiwöchige Behandlung von Sprague-Dawley Ratten mit dem Glutathionsynthase-Hemmer Buthioninsulfoximin (BSO) führte zu einer deutlichen Erhöhung des arteriellen Blutdruckes und zu einer verminderten Ausscheidung von NO im Urin.¹⁵³ Die immunhistochemische Untersuchung des Nierengewebes zeigte eine erhöhte Nitrotyrosin-Konzentration im Nierengewebe, welches einen Marker für die vermehrte Interaktion reaktiver Sauerstoffspezies mit NO darstellt.¹⁵³ Die erhöhte renale NO-Inaktivierung durch ROS und die verminderte NO-Bioverfügbarkeit tragen zur Pathogenese der Hypertonie in mit BSO-behandelten Ratten bei.¹⁵³

1.3.5 Experimentelle Hypertonie bei spontan hypertensiven Ratten (SHR)

In der Vergangenheit wurden zahlreiche hypertensive Tiermodelle zur Erforschung der Hypertonie und deren medikamentöse Behandlung etabliert.¹¹ Ein wichtiges Tiermodell für eine genetisch bedingte Hypertonie sind die spontan hypertensiven Ratten (SHR). Die Etablierung der SHR begann 1963 durch K. Okamoto und K. Aoki,¹⁰⁷ indem aus einer Kolonie von Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) die Tiere mit den höchsten Blutdrücken zur Weiterzucht selektiert wurden. Der nach mehreren Generationen selektiver Zuchtwahl etablierte Rattenstamm der SHR zeigte eine erbliche Hypertonie¹⁰⁸ mit systolischen Blutdruckwerten zwischen 160 und 180 mmHg. SHR sind ein geeignetes Modell zur Überprüfung der Wirkung antihypertensiver Substanzen¹¹⁹ sowie zur Untersuchung der Genetik und Pathogenese der arteriellen Hypertonie.¹¹ Sowohl renale als auch sympathische Mechanismen tragen bei SHR zur Entstehung und Aufrechterhaltung der arteriellen Hypertonie bei.⁵⁹ Interventionen in der neonatalen Lebensphase wie die Pharmakon-induzierte Sympathektomie⁸⁹ oder die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems⁶⁸ führen langfristig zu einer Senkung des Blutdruckes bei SHR. Erhalten SHR ein Nierentransplantat von neonatal sympathektomierten SHR-Spendern so zeigen die Empfänger dieser Nieren niedrigere Blutdruckwerte und verminderte renale Gefäßwiderstände, als SHR, die mit Nieren von Hydralazin-behandelten SHR-Spendern transplantiert wurden.^{61, 122} Zudem führte die neonatale Ausschaltung des Sympathikus zu einer Abnahme der renalen NADPH-Oxidase-Aktivität bei adulten SHR.¹²² Eine erhöhte renale^{2, 151} und vaskuläre²⁴ Sauerstoffradikalbildung in SHR wird als pathogenetisch bedeutsam für die spontane Entwicklung der Hypertonie angesehen. Durch verschiedene Interventionen, wie die Behandlung mit einer an Antioxidantien- angereicherten Diät,¹⁵¹ die Behandlung mit einem membranpermeablen Superoxiddismutasemimetikum¹²⁵ oder die Genübertragung von humaner extrazellulärer Superoxiddismutase²⁴ konnte der arterielle Blutdruck in SHR gesenkt werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies tragen zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der arteriellen Hypertonie bei, die den Hauptrisikofaktor für die kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Morbidität und Mortalität darstellt. Dabei gilt die NADPH-Oxidase als Hauptquelle vaskulärer Superoxidanionen. In Zukunft könnten Medikamente, bei der die NADPH-Oxidase als therapeutischer Angriffspunkt dient zu einer effektiveren Behandlung der arteriellen Hypertonie beitragen. Dies setzt jedoch ein besseres Verständnis über ROS-abhängige pathogene Mechanismen, die zur Entstehung der Hypertonie beitragen voraus.

Die Substanz Apocynin (Acetovanillon) hemmt die granulozytäre NADPH-Oxidase, indem es die Bindung der zytosolischen p47^{phox}-Untereinheit an die membrangebundene gp91^{phox}-Untereinheit verhindert.^{135, 148} Apocynin besitzt nach oraler Applikation eine hohe Bioverfügbarkeit bei Ratten.¹⁴⁵ Apocynin wurde bereits in zahlreichen kardiovaskulären Studien¹⁴⁸ mit dem Ziel der NADPH-Oxidase-Hemmung in vitro und in vivo eingesetzt. Es zeigte in vitro⁶⁵ vasodilatatorische Wirkungen, deren zugrunde liegende Mechanismen noch ungeklärt sind.⁵³ Um die Rolle der NADPH-Oxidase-abhängigen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der frühen Entwicklung der Hypertonie zu untersuchen wurde die Hypothese getestet, dass SHR, die von der Neonatalperiode bis zur 8. Lebenswoche mit Apocynin behandelt werden, eine langfristige Blutdrucksenkung und eine verbesserte koronare und renale Endothelfunktion zeigen. Des Weiteren wurde die Hypothese getestet, dass die Apocynin-induzierte Vasodilatation in vitro eine Folge einer vaskulären NADPH-Oxidase-Hemmung ist. Dazu wurden isolierte arterielle Gefäßpräparate von F344 Ratten sowie p47^{phox}^{-/-} Mäusen untersucht. Diese Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine NADPH-Oxidase-Hemmung durch Apocynin in isolierten Gefäßpräparaten. Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, die klären sollten, ob die vasodilatierenden Wirkungen des Apocynin durch hyperpolarisierende Effekte, durch Wechselwirkungen mit dem Einstrom des extrazellulären Kalziums in die Gefäßmuskelzellen oder Interaktionen mit Proteinkinase A-, Proteinkinase G- sowie RhoA/Rho-Kinase-abhängigen Signaltransduktionswegen vermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt. Das Versuchsvorhaben wurde vor Beginn der Arbeiten durch die zuständige Behörde des Landes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Für die Zucht spontan hypertensiver Ratten (SHR) der ersten Filialgeneration wurden männliche und weibliche SHR (SHR/NCrl) von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Normotensive Fischer Ratten (F344/Nhsd) wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Wildtyp C57BL/6 Mäuse (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) wurden von der Abteilung für Versuchstierkunde der Universität Greifswald bereitgestellt. Die p47phox^{-/-} Mäuse (C57BL/6 Hintergrund) wurden von Herrn Professor Dr. R. P. Brandes (Institut für kardiovaskuläre Physiologie, Universität Frankfurt am Main, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Ratten und Mäuse wurden in Käfigen in Gruppen von 2 bis 4 Tieren bei einer Raumtemperatur von 22°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus untergebracht. Die auf dem Boden der Käfige befindliche Streu aus feinen Holzspänen wurde zwei- bis dreimal wöchentlich gewechselt, außerdem stand den Tieren ständig frisches Trinkwasser und Trockenfutter zur Verfügung.

2.2 Chirurgische Methoden und Gefäßpräparation

Implantation von Radiotelemetriesendern: Die Implantation von Radiotelemetriesendern (TA11-PAC40, Data Sciences, St. Paul MN, USA) erfolgte in Diethylethernarkose. Um einen optimalen Zugang zur Aorta abdominalis zu erhalten wurde das Abdomen entlang der Linea alba mit Hilfe einer Präparierschere eröffnet. Die Darmschlingen wurden vorsichtig aus der Bauchhöhle verlagert und mit einer in isotoner NaCl-Lösung getränkten Kompresse umhüllt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Die abdominelle Aorta wurde kaudal der Nierenarterienabgänge vom periadventitiellen Bindegewebe freipräpariert. Im Anschluss wurde der Blutfluss durch die Aorta temporär mittels kleiner Gefäßklemmen unterbrochen. Mit Hilfe einer gebogenen Injektionsnadel wurde ein Loch in die

Gefäßwand gestochen und der am Telemetriesender befindliche Katheter ca. 1 cm in die Aorta vorgeschoben und mit Acrylatkleber fixiert. Anschließend wurden die Gefäßklemmen entfernt, damit wurde der Blutfluss durch die Aorta wieder freigegeben. Die Darmschlingen wurden in den Bauchraum zurückverlagert, der Sender mit drei Fäden an der vorderen Bauchwand fixiert und die Wunde schichtweise geschlossen. Nach der Operation erhielten die Tiere eine siebentägige Erholungsphase bis zum Beginn der Blutdruckmessungen, während der Zeit bei den Tieren eine tägliche Kontrolle des Körpergewichtes und des Allgemeinzustandes erfolgte.

Implantation von arteriellen und venösen Kathetern: Für intravenöse Substanzapplikationen und simultane Blutdruckmessungen erfolgte die Implantation je eines Polyethylenkatheters (Portex, Hythe, Großbritannien) in die rechte A. femoralis und in die rechte V. femoralis unter Ethernarkose. Die Katheter wurden durch einen subkutanen Tunnel im Nacken der Tiere an die Körperoberfläche geführt und mit je zwei Nähten an der Haut fixiert. Die Katheter wurden mit isotoner Kochsalzlösung, die 200 U Heparin/ml enthielt, gefüllt und bis zu den 48 Stunden später durchgeführten Untersuchungen verschlossen.

Gefäßpräparation: Die Organentnahme zur Gewinnung von Arteriensegmenten für in vitro Untersuchungen erfolgte in tiefer Ethernarkose. Die Tiere wurden in Rückenposition auf einem Präpariertisch gelagert. Zur Entnahme von Rattennieren wurde das Abdomen durch mediane Laparotomie eröffnet. Mit Hilfe eines Wattestäbchens wurden die Darmschlingen vorsichtig aus der Bauchhöhle verlagert, dadurch konnte eine gute Sicht auf die im Retroperitonealraum liegenden Nieren gewährleistet werden. Mit einer Pinzette wurde die Arteria renalis abgeklemmt und anschließend mit einer Schere durchtrennt. Die Nieren wurden vom umliegenden Gewebe befreit und für die folgenden Präparationsarbeiten entnommen. Zur Entnahme von Rattenherzen wurde der Thorax bilateral mit einer Präparationsschere eröffnet. Die zuführenden und abführenden Gefäße des Herzens wurden durchtrennt und das Herz aus der Brusthöhle entnommen. Die Entnahme thorakaler Aorten bei Mäusen erfolgte ebenfalls nach Eröffnung des Thorax in tiefer Ethernarkose. Alle Organe wurden unmittelbar nach der Entnahme in eisgekühlte Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung überführt.

Um die Präparation der Nierengefäße fortzusetzen, wurde zunächst die Capsula fibrosa, die die Niere umhüllt, mit zwei gebogenen Pinzetten entfernt und die Niere in zwei Hälften geteilt. Eine Nierenhälfte wurde für die Präparation der Arteriensegmente in eine mit Krebs-Ringer-Lösung gefüllte Petrischale überführt und auf einer, am Boden der Petrischale befindlichen dünnen Silikongelschicht mittels Kanülen fixiert. Die weitere Präparation der Nierengefäße wurde mit dem Stereomikroskop unter 16 facher Vergrößerung fortgesetzt. Nachdem die im Nierenparenchym liegenden Arterien der dritten Aufzweigungsgeneration (Interlobararterien) aufgesucht und freipräpariert wurden, wurde ein Stahldraht mit einem Durchmesser von 40 μm und einer Länge von 3 cm durch das freigelegte Gefäßsegment geführt. Dabei wurde darauf geachtet Endothelschäden durch Berührungen der luminalen Gefäßwand mit dem Draht zu vermeiden. Die Gefäße des Herzens und die Maus-Aortenringe wurden wie oben beschrieben präpariert, wobei in den Versuchen nur Koronararterien, die im Septum interventriculare verliefen, untersucht wurden.

2.3 Radiotelemetrie

2.3.1 Postnatale Apocyninbehandlung und Erfassung der Blutdruckdaten

Die Versuche wurden an zwei randomisierten Gruppen von ausschließlich männlichen SHR durchgeführt, um den langfristigen Einfluss von Apocynin (Fluka/Riedel-deHaën, Buchs, Schweiz) auf den arteriellen Blutdruck zu untersuchen. Die Gruppen setzten sich wie folgt zusammen:

- 1. Gruppe: 8 SHR unter Apocyninbehandlung
- 2. Gruppe: 6 SHR-Kontrolltiere

Die orale Behandlung von SHR mit Apocynin in der Neonatalperiode erfolgte, indem den säugenden Muttertieren ab dem ersten postnatalen Tag 2,5 mmol/l Apocynin über das Trinkwasser verabreicht wurde. Die Dosierung des Apocynins betrug $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ und wurde am Ende der Stillzeit aufgrund der erhöhten Flüssigkeitsaufnahme der säugenden Muttertiere auf $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ gesteigert. Die tägliche Trinkmenge wurde morgendlich durch Bestimmung des Trinkflaschengewichtes überwacht. Am 22. postnatalen Tag wurden die männlichen Jungtiere abgestillt. Anschließend wurde die orale Apocyninbehandlung ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) kontinuierlich bis zum Ende der 8. Postnatalwoche

fortgesetzt. Danach erfolgte die Implantation der Radiotelemetriesender (TA11-PAC40, Data Sciences, St. Paul MN, USA) in die SHR, die der Registrierung von Blutdruck und Herzrate in nichtnarkotisierten Tieren dienen. Diese Messmethode ermöglichte eine schonende Erfassung der physiologischen Kreislaufparameter, ohne dass die Tiere Stresssituationen ausgesetzt waren. Die Messdaten wurden in Abhängigkeit von der Zeit in 10-minütigen Abständen 24 Stunden täglich mit dem Programm Dataquest Lab Pro (Data Sciences, St. Paul MN, USA) an 8 zusammenhängenden Tagen gespeichert. Dabei galt der erste Tag als Eingewöhnungstag. Er wurde nicht in die Auswertung einbezogen. Nach der 8-tägigen Registrierung der Messdaten erfolgte eine Ruhephase von 7 Tagen. Der arterielle Blutdruck wurde bis zum Ende der 20. Postnatalwoche registriert.

Des Weiteren wurden drei unbehandelte männliche 10 Wochen alte SHR mit Telemetriesendern versehen, um den direkten, kurzfristigen Einfluss von oral verabreichtem Apocynin auf den arteriellen Blutdruck zu untersuchen. Dazu wurde eine Woche nach Implantation der Sender und vor Behandlungsbeginn der arterielle Blutdruck der SHR aufgezeichnet. Anschließend wurde den Tieren Apocynin über das Trinkwasser verabreicht. Die Dosierung des Apocynins betrug 50, 100 und 150 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ und wurde in wöchentlichen Abständen gesteigert, während der Blutdruck kontinuierlich gemessen wurde.

Darüber hinaus wurden zwei männliche SHR in einem Alter von 10 Wochen mit Gefäßkathetern wie oben beschrieben versehen. Der venöse Katheter diente der intravenösen Infusion von Apocynin. Dazu wurde das in isotonischer Kochsalzlösung gelöste Apocynin (10 mmol/l) mit einer Infusionsrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ als Bolus in kumulativer Dargabe von 4, 8, 12 und 16 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ langsam infundiert. Nach Beendigung jedes Dosierungsvorganges wurde der arterielle Blutdruck für 15 Minuten bis zur nächsten Applikation überwacht. Daraus resultierte eine verabreichte Apocynindosis von 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ innerhalb von 75 Minuten.

2.4 Small-Vessel-Myographie

2.4.1 Aufbau

Die präparierten koronaren, renalen und aortalen Gefäßsegmente wurden in einem Small-Vessel-Drahtmyographen der Firma Danish Myo Technology (DMT, Aarhus, Dänemark) untersucht. Der Myograph setzte sich aus einer säurebeständigen Edelstahlkammer, sowie aus einer integrierten Heizung und Kraftmessern zusammen. Die Edelstahlkammer des Myographen, deren Fassungsvermögen 15 ml betrug, enthielt zwei Stahlblöcke, die der Fixation der Gefäßsegmente dienten und die es ermöglichten, zwei Gefäße simultan unter isometrischen Bedingungen zu untersuchen. Die Myographenkammer wurde mit einer Plastikabdeckung verschlossen (Abbildung 1 zeigt den Kleingefäß-Myographen mit der Plastikabdeckung zur Begasung), um Verdunstungsprozesse zu reduzieren und den Sauerstoffpartial- und Kohlendioxiddruck aufrecht zu erhalten. Die in der Kammerabdeckung befindlichen Perforationen dienten der Applikation von Lösungen und Substanzen. Die Gefäßsegmente wurden in der Myographenkammer in einer physiologischen, bikarbonatgepufferten Salzlösung gehalten, die während der Versuche mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast wurde. Dadurch wurde der pH-Wert der Pufferlösungen, der vor Versuchsbeginn auf 7,4 eingestellt wurde, während der Experimente konstant gehalten. Weiterhin verfügte der Myograph über eine Heizung, die eine Kammertemperatur von 37 °C aufrecht hielt und die über eine Temperatursonde ständig überprüft wurde. Um Artefakte des Kraftmessers durch Temperaturschwankungen beim Einbringen von Lösungen in die Kammer zu verhindern, wurden die verwendeten Pufferlösungen in einem externen, thermostatisch kontrollierten Wasserbad auf 37 °C vorgeheizt. Nach Beendigung eines Waschvorganges und nach Versuchsende wurden die Lösungen durch Betätigung einer Vakuumpumpe aus der Kammer entfernt. Zur Erfassung von Wandspannungsänderungen der in der Edelstahlkammer an den Stahlblöcken befestigten Gefäßpräparationen, waren diese einerseits direkt mit dem Kraftmesser, andererseits mit einer Mikrometerschraube verbunden. Der Kraftmesser lag in einem separaten Fach im Gehäuse, das einen mechanischen Schutz vor äußeren Einwirkungen bot. Er bestand aus einem Widerstandssensor, der die Spannungsänderungen der Gefäßsegmente registrierte. Die Kraftmessernadel, die eine Verbindung zwischen Stahlblock und Kraftmesser darstellte, durchdrang die Wand der Kammer durch eine

kleine Öffnung. Diese wurde sorgfältig mit Hochvakuumfett verschlossen, um den Kraftmesser vor dem Eintritt von Pufferlösungen zu schützen. Das Myo-Interface-System stand in direkter Verbindung mit dem Kraftmesser sowie dem Datenerfassungs- und Analysesystem des Computers. Die aus den Messungen gewonnenen Daten wurden mit der LabView basierten Software (National Instruments, Austin, Texas, USA) Myodaq 2.01 und Myodata 2.02 aufgezeichnet und ausgewertet.

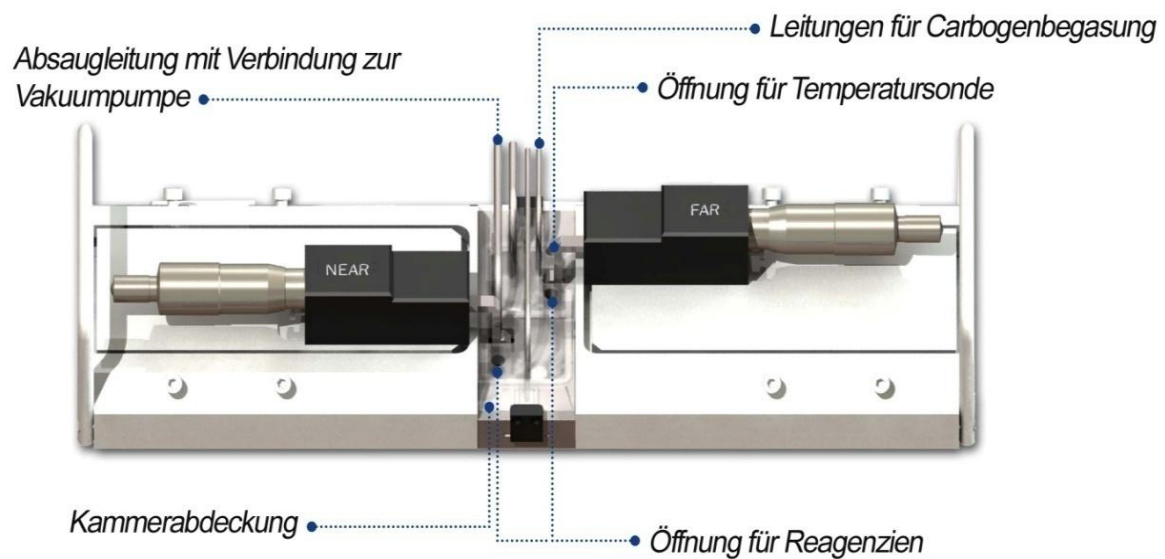


Abb. 1. Kleingefäß-Myograph Modell 410A mit Kammerabdeckung (aus User Manual, Dual Wire Myograph System, Model 410A, 2006; Version 3.2: 13, Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark).

2.5 Ablauf der Myographie

2.5.1 Kalibrierung des Kraftmessers

Vor Beginn der Versuchsreihen wurde der Kraftmesser des Small-Vessel-Myographen kalibriert. Dazu wurde die Kammer des Myographen mit destilliertem Wasser gefüllt und ein Draht an dem, auf der Seite des Kraftmessers befindlichen Stahlblockes fixiert. Die Temperatur am Myo-Interface wurde auf einen Sollwert von 37 °C eingestellt, so dass sich die Kammer erwärmte. Anschließend wurde die Kalibrierungswaage zwischen Stahlblock

und befestigtem Draht platziert (in Abbildung 2 ist die Kalibrierungswaage dargestellt). Dabei musste darauf geachtet werden, dass der Hebelarm der Kalibrierungswaage den eingespannten Draht sowie den Stahlblock nicht berührt, um Artefakte am Kraftmesser zu vermeiden. Die Kalibrierung am Myo-Interface wurde gestartet und das Wägestück (m) von 2 g vorsichtig auf der Pfanne des Kraftarms platziert. Die Kraft, die auf den Kraftmesser wirkt, soll die Spannung imitieren, die durch die Kontraktionen einer eingespannten Gefäßpräparation hervorgerufen wird. Die Gleichung, die hier zur Anwendung kommt gibt an, welche Kraft auf den Kraftmesser wirkt. Sie lautet:

$$F = \text{Kraftarmlänge} * (m * g) * \sin\theta_1 / (\text{Hebelarmlänge} * \sin\theta_2)$$

Die Länge des Kraftarms beträgt 2 cm, die des Hebelarms 4 cm. Die in der Gleichung aufgeführten Winkel ($\sin\theta_1, \sin\theta_2$) entsprechen 90° . Die Gravitationskonstante (g) beträgt $9,81 \text{ ms}^{-2}$. Daraus resultiert eine Kraft von 9,81 mN, die auf den Kraftmesser wirkt. Nachdem die Kraftmessung am Myo-Interface stabile Werte zeigte, wurde die Kalibrierung beendet.

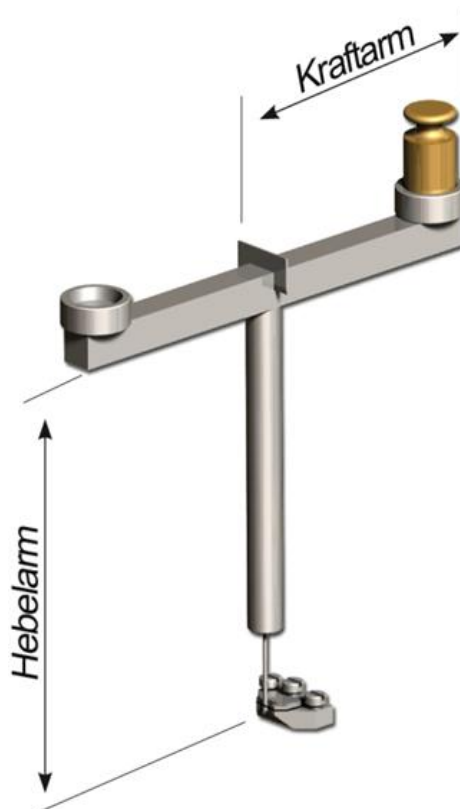


Abb. 2. Darstellung der Kalibrierungswaage (aus User Manual, Dual Wire Myograph System, Model 410A, 2006; Version 3.2: 24, Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark).

2.5.2 Fixierung und Vordehnung der Gefäßsegmente im Myographen

Der kalibrierte und vorgeheizte Myograph wurde mit erwärmter bikarbonatgepufferter Krebs-Ringer-Lösung befüllt und das präparierte Gefäßsegment einschließlich Draht mit Hilfe einer spitzen Pinzette in die Myographenkammer umgelagert. Unter mikroskopischer Sicht wurde die Gefäßpräparation eingespannt und die Drahtenden an den Schrauben der Stahlblöcke befestigt. Im Anschluss wurde ein weiterer 40 µm dünner Stahldraht durch das Gefäßlumen geführt und an den gegenüberliegenden Schrauben fixiert. Bei dieser Vorgehensweise musste darauf geachtet werden, dass der Draht nicht die Gefäßwand verletzt, um Endothelschäden zu vermeiden. Das zwischen den Stahlblöcken fixierte Gefäßsegment wurde durch Betätigung der Mikrometerschrauben so eingestellt, dass es entspannt auf den Drähten lag. Nach der Fixation beider Gefäßsegmente wurde die Länge der Gefäße mit Hilfe des kalibrierten Okulares des Mikroskops abgelesen. Die Kammer wurde mit der Abdeckung verschlossen und eine ausreichende Begasung des Kammerinhaltes ermöglicht. Um die Gefäßexperimente unter gleichen Bedingungen durchzuführen, wurden die Gefäßsegmente vor Beginn der Versuchsreihen in 4 bis 5 Schritten vorgedehnt. Durch manuelle Betätigung der Mikrometerschrauben wurde der Abstand zwischen den Drähten und folglich der Gefäßdurchmesser erhöht. Anschließend wurden die Gefäße mit kaliumreicher Pufferlösung ($[K^+] = 125 \text{ mmol/l}$) inkubiert und die aktive Spannungsentwicklung registriert. Danach wurden die Gefäße mit Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung gewaschen und der Dehnungsvorgang so lange wiederholt, bis die Gefäßsegmente durch passive Vordehnung einen Durchmesser erreichten, der durch Zugabe der kaliumreichen Pufferlösung eine maximale aktive Spannungsentwicklung ermöglichte.

2.6 Versuchsprotokolle

Vor jedem Experiment wurden die Versuchsprotokolle systematisch festgelegt. In einigen Versuchen wurden kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Phenylephrin, Vasopressin und Acetylcholin erstellt. Dabei wurden folgende halblogarithmisch aufsteigende Konzentrationen verwendet:

- Phenylephrin 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l,
- Vasopressin 10^{-10} bis $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l,
- Acetylcholin 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l

Die nächsthöhere Konzentration wurde von Phenylephrin alle 2 Minuten und von Vasopressin alle 3 Minuten nach Erreichen des Spannungsplateaus verabreicht.

Vasopressin wurde bevorzugt als Agonist für Koronararterien verwendet, da Phenylephrin auf diese Gefäße nur schwache vasokonstriktorische Wirkungen zeigt.⁵⁸ Einige Gefäße wurden mit Phenylephrin (10^{-6} mol/l, $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l), Vasopressin (10^{-8} mol/l) vokontrahiert und kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die endothelabhängige Vasodilatation mit Acetylcholin erstellt, indem alle 2 Minuten die nächsthöhere Acetylcholinmenge dazu gegeben wurde. Dadurch konnten Aussagen über das vasokonstriktorische und vasodilatatorische Verhalten der Gefäße getroffen werden. Die durch Agonisten-induzierte Vasokonstriktion wurde auf die maximale K^{+} -induzierte Spannung bezogen. Die durch Agonisten-induzierte Vasodilatation wurde in Bezug zur Spannungsentwicklung durch Vokontraktion der Gefäße mit Phenylephrin oder Vasopressin gesetzt. Nachdem ein Versuchsdurchgang eines Experimentes abgeschlossen war, wurden die Arteriensegmente mit Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung gewaschen, bis sie ihre Ausgangsspannung erreichten. Es wurde etwa 30 Minuten bis zum Beginn des nächsten Experimentes gewartet und jeweils nach 15 Minuten die Badlösung durch neue Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung ersetzt. Die Dauer der einzelnen Experimente an einem Gefäßpaar betrug etwa 3 bis 4 Stunden.

Endothelabhängige Vasodilatation der Gefäßsegmente Apocynin-behandelter und unbehandelter SHR: Die renalen Interlobar- und Koronararterien von den Apocynin-behandelten SHR und den unbehandelten SHR-Kontrolltieren wurden untersucht. Dazu wurden die renalen Interlobararterien mit dem α_1 -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin (10^{-6} mol/l), die Koronararterien mit Vasopressin (10^{-8} mol/l) vokontrahiert. Nachdem die Gefäße ein Spannungsplateau erreichten, erfolgte die Untersuchung der

endothelvermittelten Vasodilatation mit 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l Acetylcholin. Außerdem wurden die Gefäße beider Gruppen auf ihr Dilatationsverhalten bei Zugabe von Apocynin untersucht. Nachdem die Interlobararterien mit Phenylephrin, die Koronararterien mit Vasopressin vokontrahiert wurden, wurde Apocynin kumulativ (30 μ mol/l, 100 μ mol/l, 300 μ mol/l) alle 4 Minuten in die Badlösung pipettiert. Nachdem die Gefäße maximal dilatiert waren, wurde der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME (200 μ mol/l) verabreicht.

Tiron: Die renalen Interlobargefäße von F344 Ratten wurden 5 Minuten mit dem Superoxidanionenfänger Tiron (2 mmol/l) vorbehandelt, danach mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) bis zum Erreichen eines Spannungsplateaus vokontrahiert und mit Apocynin (30 μ mol/l, 100 μ mol/l, 300 μ mol/l), die Kontrollen mit isotoner Kochsalzlösung versetzt.

Katalase und Kalium: Die renalen Interlobararterien von F344 Ratten wurden 20 Minuten mit Katalase (1000 U/ml) inkubiert und mit Phenylephrin (10^{-5} mol/l) kontrahiert. Danach wurde Apocynin in Konzentrationen von 30 μ mol/l, 100 μ mol/l, 300 μ mol/l kumulativ dazu gegeben. Außerdem wurden die Interlobararterien von F344 Ratten mit 10^{-5} mol/l Phenylephrin vokontrahiert und nach Erreichen des Spannungsplateaus mit Apocynin (30 bis 300 μ mol/l) versetzt. Die Gefäße wurden mit Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung gewaschen und mit 125 mmol/l Kaliumchloridlösung vokontrahiert. Nach Erreichen eines Spannungsplateaus wurde Apocynin in den oben angegebenen Konzentrationen verabreicht.

NADPH-Oxidase-Inhibition: Weiterhin wurden renale Interlobararterien 80 Minuten mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor VAS2870 ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/l), die Kontrollen mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 % Endkonzentration im Organbad) inkubiert, danach mit Phenylephrin vokontrahiert und mit Apocynin in drei Konzentrationen (30 μ mol/l, 100 μ mol/l, 300 μ mol/l) versetzt. Außerdem wurden Aortenringe von Wildtyp C57BL/6 und p47phox^{-/-} Mäusen auf ihr Dilatationsverhalten bei Zugabe von Apocynin untersucht. Dazu wurden kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Phenylephrin im Konzentrationsbereich 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l erstellt. Die Aortenringe der p47phox^{-/-} Mäuse und der C57BL/6 Kontrollen wurden außerdem mit Acetylcholin im Konzentrationsbereich 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l endothelvermittelt dilatiert. Die Gefäße wurden mit Phenylephrin vokontrahiert und nach Erreichen des Spannungsplateaus Apocynin (30 bis 300 μ mol/l) kumulativ dazu gegeben.

Extrazelluläres Kalzium: Die renalen Interlobararterien wurden zunächst in Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung 2 Minuten mit 400 µmol/l Apocynin vorbehandelt und mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) kontrahiert. Danach wurden die Gefäße gewaschen und zur Kontrolle 2 Minuten mit 400 µl isotoner Kochsalzlösung (NaCl) inkubiert und mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) kontrahiert. Die Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung wurde durch kalziumfreie Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung, die 1 mmol/l EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure) enthielt, ersetzt. Die Arteriensegmente wurden innerhalb von 2 Minuten dreimal mit kalziumfreier Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung gewaschen, danach 2 Minuten mit 400 µmol/l Apocynin inkubiert und mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) kontrahiert. Im letzten Versuchsdurchgang wurden die Gefäße erneut innerhalb von 2 Minuten dreimal mit kalziumfreier Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung gewaschen. Nachdem sie 2 Minuten mit 400 µl isotoner Kochsalzlösung behandelt wurden, erfolgte die Vasokonstriktion mit $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l Phenylephrin.

Proteinkinase A- und Proteinkinase G- Inhibition: In weiteren Experimenten wurden Interlobar- und Koronararterien von F344 Ratten 10 Minuten mit dem Inhibitor (250 µmol/l PKA-Inhibitor Rp-8-Br-cAMPS, 100 µmol/l PKG-Inhibitor Rp-8-Br-cGMPS), die Kontrollgefäße mit isotoner Kochsalzlösung inkubiert. Danach wurden die Interlobararterien mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l), die Koronararterien mit Vasopressin (10^{-8} mol/l) bis zum Erreichen des Spannungsplateaus vorkontrahiert und kumulativ Apocynin (10 µmol/l, 30 µmol/l, 100 µmol/l, 300 µmol/l) dazu gegeben.

Rho-Kinase-Inhibition: Des Weiteren wurden mit renalen Interlobargefäßen von F344 Ratten kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Phenylephrin im Konzentrationsbereich 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l und mit Vasopressin im Konzentrationsbereich 10^{-10} bis $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l erstellt und danach die Gefäße mit Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung ausgewaschen. Anschließend wurden die Gefäße 10 Minuten mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 (3 µmol/l) inkubiert und kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Phenylephrin (10^{-8} bis 10^{-5} mol/l) und Vasopressin (10^{-10} bis $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l) erstellt. Nachdem die Gefäße erneut gewaschen wurden, wurden die Arteriensegmente 10 Minuten mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 (3 µmol/l) und mit 400 µmol/l Apocynin inkubiert und kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven wie oben beschrieben erstellt.

2.7 Lösungen und Chemikalien

2.7.1 Pufferlösungen

Tab. 1. Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung

NaCl	118,50 mmol/l
KCl	4,70 mmol/l
MgSO ₄	1,20 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,20 mmol/l
NaHCO ₃	25,00 mmol/l
CaCl ₂	2,50 mmol/l
Glucose	5,60 mmol/l

Tab. 2. Kaliumreiche Pufferlösung (K125)

KCl	125,00 mmol/l
MgSO ₄	1,20 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,20 mmol/l
NaHCO ₃	25,00 mmol/l
CaCl ₂	2,50 mmol/l
Glucose	5,60 mmol/l

Tab. 3. Kalziumfreie Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung

NaCl	118,50 mmol/l
KCl	4,70 mmol/l
MgSO ₄	1,20 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,20 mmol/l
NaHCO ₃	25,00 mmol/l
EGTA	1,00 mmol/l
Glucose	5,60 mmol/l

Die Natriumbikarbonatlösung (NaHCO₃) wurde vor Gebrauch eine Stunde mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast. Die Pufferlösungen wurden vor Versuchsbeginn frisch angesetzt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.7.2 Chemikalien

Die für das Anfertigen der Pufferlösungen verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) und der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Apocynin und Tiron stammten von der Firma Fluka/Riedel-deHaën (Buchs, Schweiz). Der PKA-Inhibitor Rp-8-Br-cAMPS sowie der PKG-Inhibitor Rp-8-Br-cGMPS wurden von Biolog Life Science (Bremen, Deutschland), der Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 von der Firma Merck Bioscience (Nottingham, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Der NADPH-Oxidase-Inhibitor VAS2870 wurde von Vasopharm Biotech (Würzburg, Deutschland) bezogen. Alle anderen Substanzen stammten von der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland).

2.8 Statistik

Die Auswertung der unter Myodaq 2.01 gespeicherten Daten erfolgte mit dem Analyseprogramm Myodata 2.02. Mit Hilfe der automatisierten Datenauswahl wurden die Ereignisse innerhalb der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die einzelnen Konzentrationsschritte markiert. Dabei wurden für die Vasokonstriktion die Maxima und für die Vasodilatation die Minima der Konzentrationsschritte ausgewählt. Für die weitere Analyse der ausgewählten Datenpunkte der kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde die sigmoidale Kurvenanpassung verwendet, mit der folgende Parameter ermittelt wurden:

- Bottom: gibt die minimale Wandspannung der Gefäße für die jeweilige Konzentrations-Wirkungs-Kurve an
- Top: kennzeichnet die maximale Wandspannung der Gefäße innerhalb der Konzentrations-Wirkungs-Kurve
- EC50: gibt den Logarithmus der Agonist-Konzentration an, bei der das Gefäßsegment halbmaximal kontrahiert bzw. dilatiert ist
- Hillkoeffizient: kennzeichnet die Anstiegssteilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (positive Werte bei aufsteigenden Kurven, negative Werte bei absteigenden Kurven)

Für die Kurvenanpassung wurde der Levenberg-Marquardt-Algorithmus verwendet. Die Berechnung der o.g. Parameter erfolgte durch Anpassung der Daten an eine sigmoidale Funktionsgleichung, die diese vier Parameter enthält.

$$Y = B + (T-B) / (1+10^{(\log EC50-X) \times H})$$

B (Bottom) und T (Top) geben jeweils die geringste und stärkste Gefäßwandspannung an. LogEC50 stellt die Konzentration dar, bei der die halbmaximale Gefäßantwort erreicht wird und ist gleichzeitig ein Maß für die Sensitivität der Gefäße gegenüber Agonisten.

H steht für Hillkoeffizient und X gibt den negativen Logarithmus der Konzentration an.

Y repräsentiert die Gefäßantwort. Die aktuell ausgewählten Datenpunkte der

Konzentrations-Wirkungs-Kurven und die Ergebnisse der Kurvenanpassung mit Hilfe des Levenberg-Marquardt-Verfahrens wurden graphisch als Kurve dargestellt. Die Anpassung sigmoidaler Funktionen an Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen zur Berechnung von logEC50 und E_{\max} wurde mit SigmaPlot Version 9.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt. E_{\max} entspricht je nach Experiment Bottom oder Top.

Alle im Text und in Abbildungen aufgeführten Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Der statistische Vergleich der Mittelwerte von zwei experimentellen Gruppen erfolgte mit Hilfe des t-Testes für unverbundene Stichproben. Der Vergleich mehrerer Mittelwerte und der Vergleich nicht-sigmoidaler Konzentrations-Wirkungs-Kurven erfolgte mittels Varianzanalyse beziehungsweise mittels Varianzanalyse für Messwertwiederholungen (SigmaStat Version 3.2, SPSS; Chicago, IL, USA). Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Blutdruckverhalten Apocynin-behandelter SHR

3.1.1 Langfristige Wirkung einer postnatalen Apocyninbehandlung auf den arteriellen Druck

In diesem Versuch wurde untersucht, ob die postnatale Apocyninbehandlung den Blutdruck bei SHR langfristig senkt. Die männlichen SHR wurden ab dem ersten postnatalen Tag bis zur 8. Lebenswoche mit oral verabreichtem Apocynin ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) behandelt und von der 10. bis zur 20. Postnatalwoche der Blutdruck und die Herzfrequenz telemetrisch registriert. In dem gesamten Beobachtungszeitraum konnte bei den mit Apocynin-behandelten spontan hypertensiven Ratten im Vergleich zu den unbehandelten SHR-Kontrolltieren kein blutdrucksenkender Effekt der Apocyninbehandlung nachgewiesen werden. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) der mit Apocynin behandelten SHR betrug zu Beginn der telemetrischen Aufzeichnung in der 10. Postnatalwoche $130 \pm 3 \text{ mmHg}$ (Abb. 3 A). Der mittlere arterielle Blutdruck der Kontrolltiere betrug zu diesem Zeitpunkt $131 \pm 3 \text{ mmHg}$ (Abb. 3 B). In der 18. Postnatalwoche wurde bei den mit Apocynin-behandelten SHR ein mittlerer arterieller Blutdruck in Höhe von $145 \pm 3 \text{ mmHg}$ (Abb. 3 A) registriert, der der Kontrolltiere betrug $152 \pm 4 \text{ mmHg}$ (Abb. 3 B). Die Blutdrücke unterschieden sich statistisch nicht signifikant voneinander. Die Herzfrequenzen waren in beiden Gruppen ebenfalls nicht signifikant verschieden. Der Vergleich beider Gruppen hinsichtlich des Blutdrucks ergab, dass die langfristige postnatale Behandlung der SHR mit Apocynin keine signifikante blutdrucksenkende Wirkung zeigte.

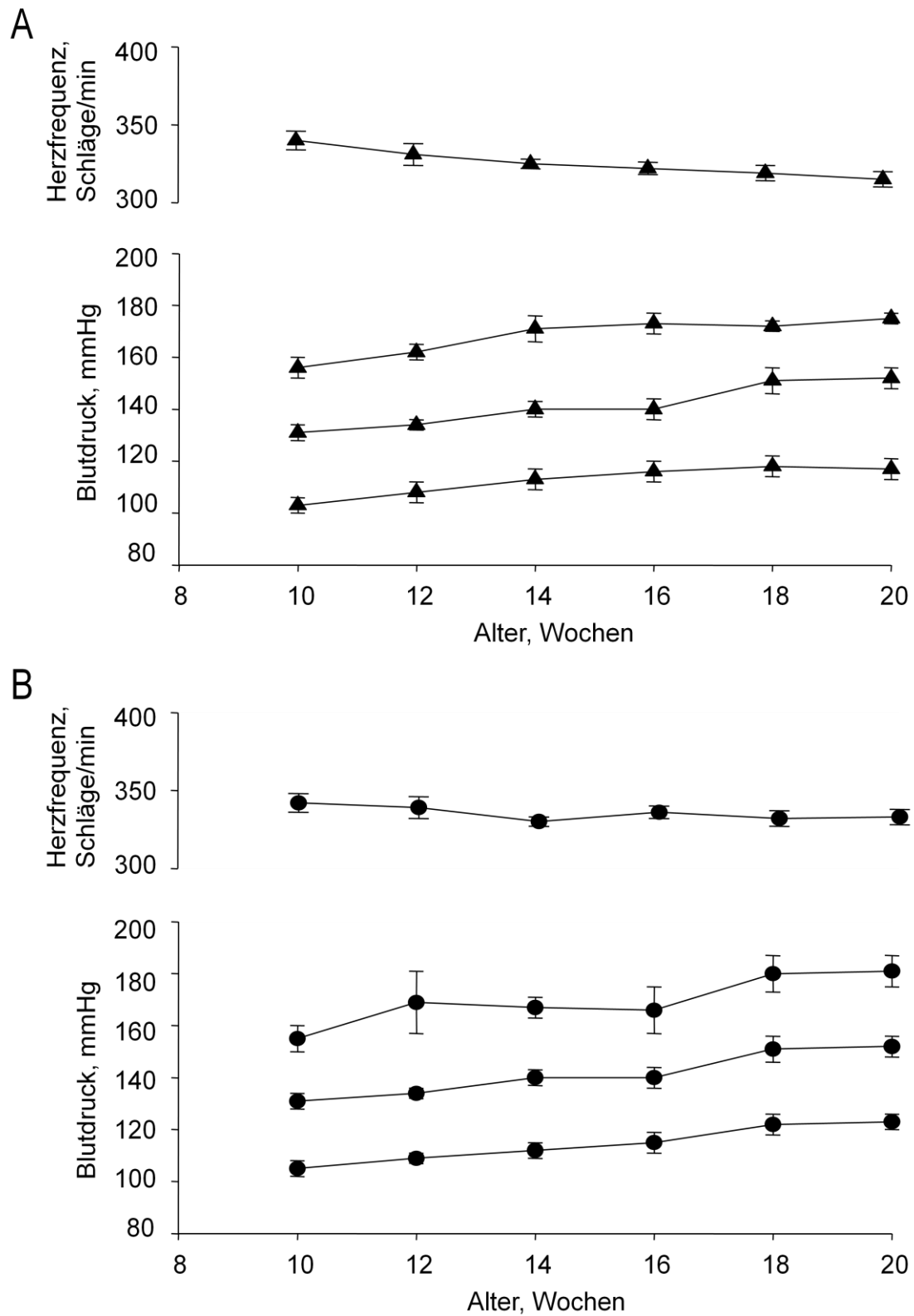


Abb. 3. Telemetrisch registrierte Daten der Herzfrequenz sowie des systolischen, mittleren und diastolischen Blutdruckes von der 10. bis zur 20. postnatalen Woche.

A: Postnatal mit Apocynin-behandelte SHR (n = 8)

B: Kontroll-SHR (n = 6)

3.1.2 Kurzfristige Wirkung von Apocynin auf den arteriellen Druck

Um den kurzfristigen Einfluss von Apocynin auf den arteriellen Blutdruck zu untersuchen, wurden drei männliche SHR über das Trinkwasser mit Apocynin in wöchentlich aufsteigenden Dosierungsschritten ($50, 100, 150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) behandelt. Zu Beginn des Beobachtungszeitraumes in der 12. Lebenswoche lag der mittlere arterielle Blutdruck der SHR bei $142 \pm 1 \text{ mmHg}$ (Abb. 4). In der 15. Lebenswoche nach Applikation aller Dosierungseinheiten wurde bei den Tieren ein mittlerer arterieller Blutdruck von $150 \pm 3 \text{ mmHg}$ (Abb. 4) registriert. Apocynin zeigte keine statistisch signifikante blutdrucksenkende Wirkung.

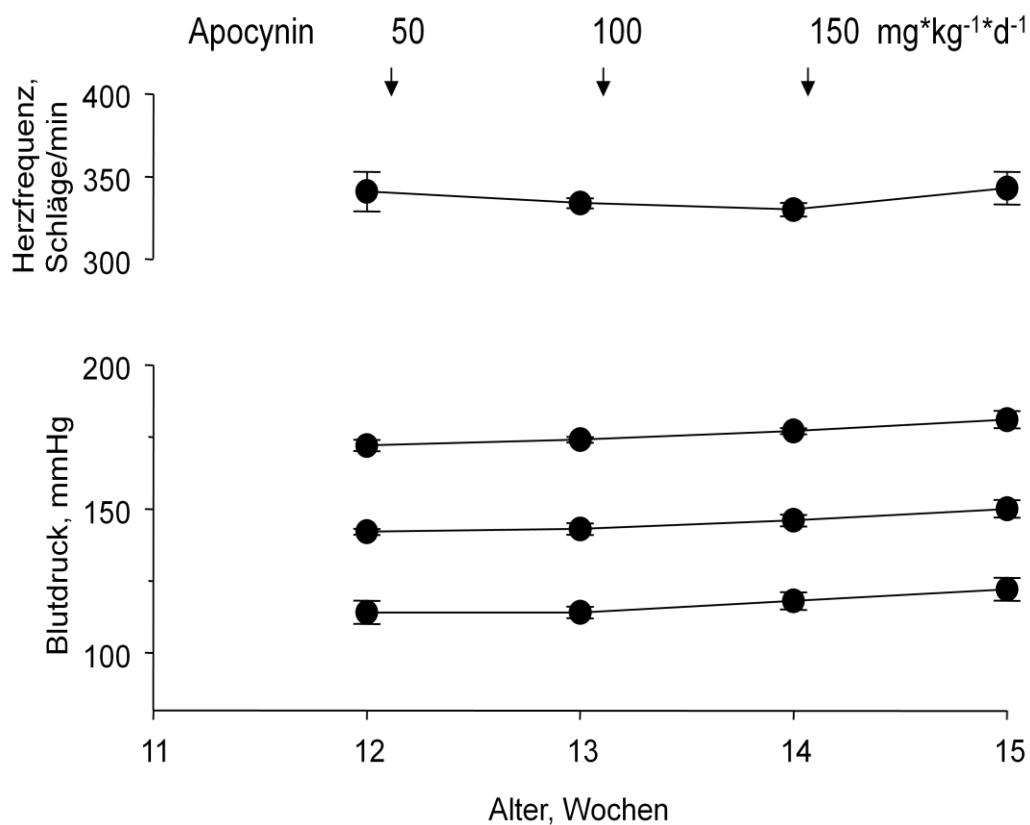


Abb. 4. Telemetrische Registrierung der Herzfrequenz, des systolischen, mittleren und diastolischen Blutdruckes in drei SHR mit oraler Apocyninbehandlung in drei aufeinanderfolgenden einwöchigen Intervallen.

Apocynin-behandelte SHR ($n = 3$)

3.1.3 Akute Blutdruckreaktion auf intravenös verabreichtes Apocynin

Zwei männlichen SHR wurde im Alter von 10 Wochen Apocynin (10 mmol/l) über einen intravenösen Gefäßkatheter in vier Dosierungsschritten (4, 8, 12, 16 mg*kg⁻¹*d⁻¹) kumulativ infundiert. Vor Beginn der Behandlung lag der mittlere arterielle Blutdruck von SHR_1 bei 140 mmHg, von SHR_2 bei 168 mmHg. Am Ende der verabreichten Apocynindosen manifestierte sich der mittlere arterielle Blutdruck von SHR_1 mit 135 mmHg, der der SHR_2 mit 159 mmHg. Die intravenöse Applikation von Apocynin zeigte keine dosisabhängige Blutdrucksenkung (Tab. 4). Nachdem den SHR die höchste Apocynindosierung verabreicht wurde, reagierten die Tiere leicht agitiert.

Tab. 4. Tabellarische Darstellung der aufgezeichneten Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) zweier SHR nach intravenöser Apocyningabe.

	SHR_1		SHR_2	
Apocynin, mg/kg	HF, Schläge/min	MAP, mmHg	HF, Schläge/min	MAP, mmHg
Vehikel	337	140	381	168
4	335	144	374	168
8	357	157	404	173
12	346	146	370	160
16	330	135	357	159

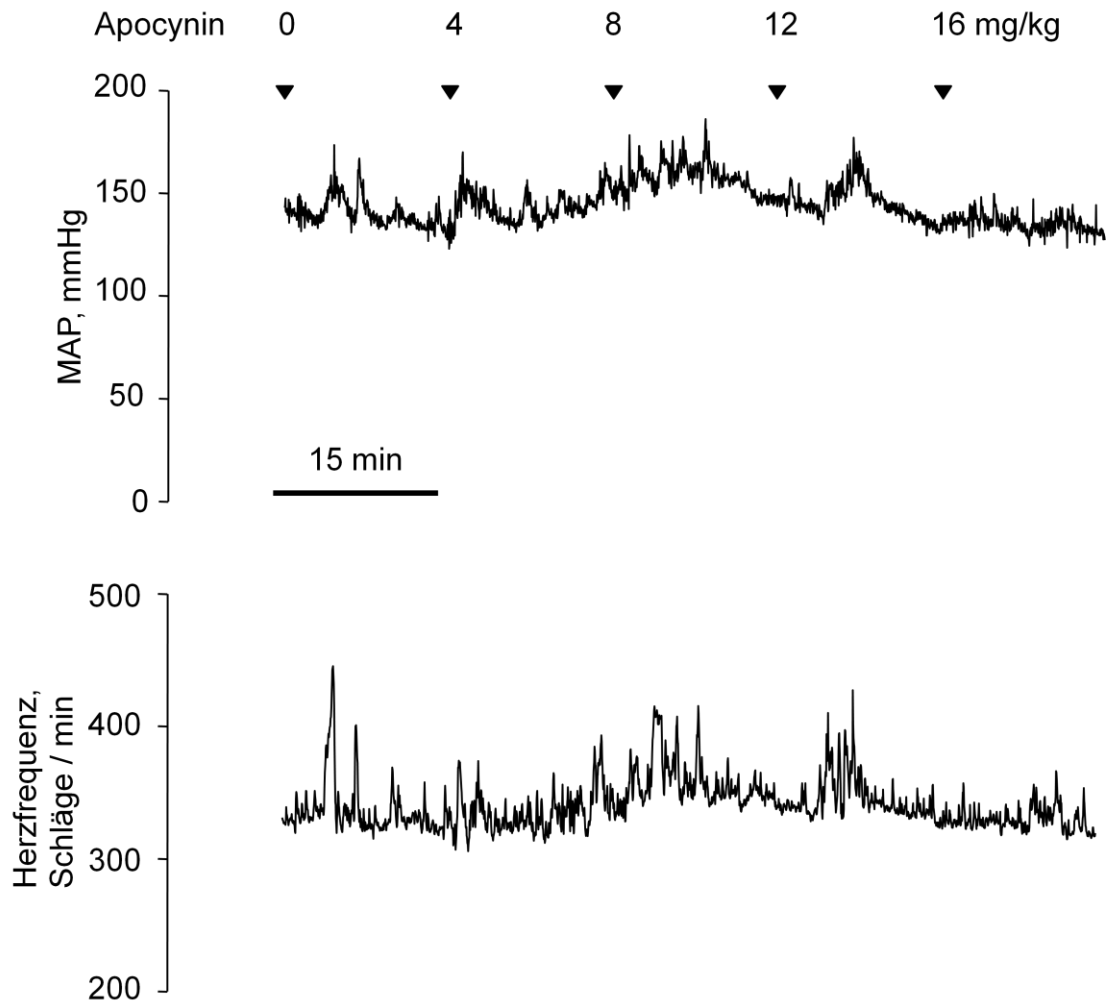


Abb. 5. Beispiel einer direkten Aufzeichnung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz bei kumulativer intravenöser Apocyninbehandlung der SHR in vier aufeinanderfolgenden Dosierungsschritten in 15 minütigen Intervallen.

3.1.4 Wirkung der Apocyninbehandlung auf die endothelabhängige und Apocynin-induzierte Vasodilatation

In diesem Versuch wurden die renalen Interlobar- und Koronararterien von Apocynin-behandelten SHR und unbehandelten SHR-Kontrolltieren untersucht und geprüft, ob die postnatale Apocyninbehandlung die endothelvermittelte Vasodilatation in SHR verbessert.

Endothelabhängige Vasodilatation von Interlobar- und Koronararterien

Die renalen Interlobararterien wurden mit 10^{-6} mol/l Phenylephrin vokontrahiert. Die Koronararterien wurden mit 10^{-8} mol/l Vasopressin vokontrahiert, da Koronararterien keine oder nur sehr geringfügige Kontraktionsantworten auf α_1 -Adrenozeptoragonisten zeigen. Nachdem die Gefäße ein Spannungsplateau erreichten, wurde die endothelvermittelte Vasodilatation mit 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l Acetylcholin getestet. Die Empfindlichkeit der renalen Interlobararterien gegenüber Phenylephrin war in der Gruppe der Apocynin-behandelten SHR (E_{\max} $1,22 \pm 0,05$, $\log EC_{50}$ $-6,04 \pm 0,07$) und der Kontroll-SHR (E_{\max} $1,08 \pm 0,04$, $\log EC_{50}$ $-6,02 \pm 0,07$) nicht signifikant verschieden. Auf die kumulative Zugabe von Acetylcholin reagierten die renalen Interlobararterien beider Gruppen mit einer vergleichbaren Dilatationsantwort. Die relative Wandspannung der Interlobararterien bei maximaler endothelvermittelter Vasodilatation betrug bei den Apocynin-behandelten SHR $0,81 \pm 0,03$ ($\log EC_{50}$ $-6,8 \pm 0,2$) bei den Kontrolltieren $0,76 \pm 0,04$ ($\log EC_{50}$ $-6,86 \pm 0,14$; Abb. 6 A), die der Koronararterien von Apocynin-behandelten SHR und Kontrolltieren lag bei $0,52 \pm 0,04$ vs. $0,56 \pm 0,1$ (Abb. 6 B). Das Dilatationsverhalten der renalen Interlobararterien und der Koronararterien von Apocynin-behandelten SHR und SHR-Kontrolltieren ergab keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied.

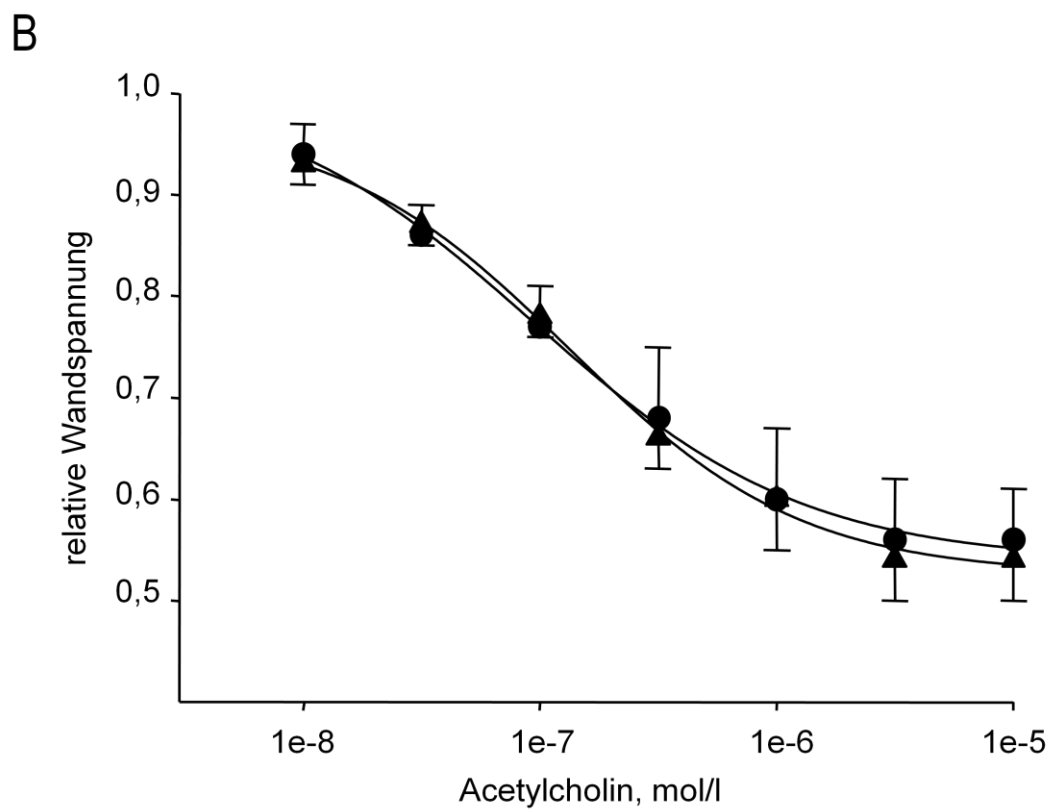
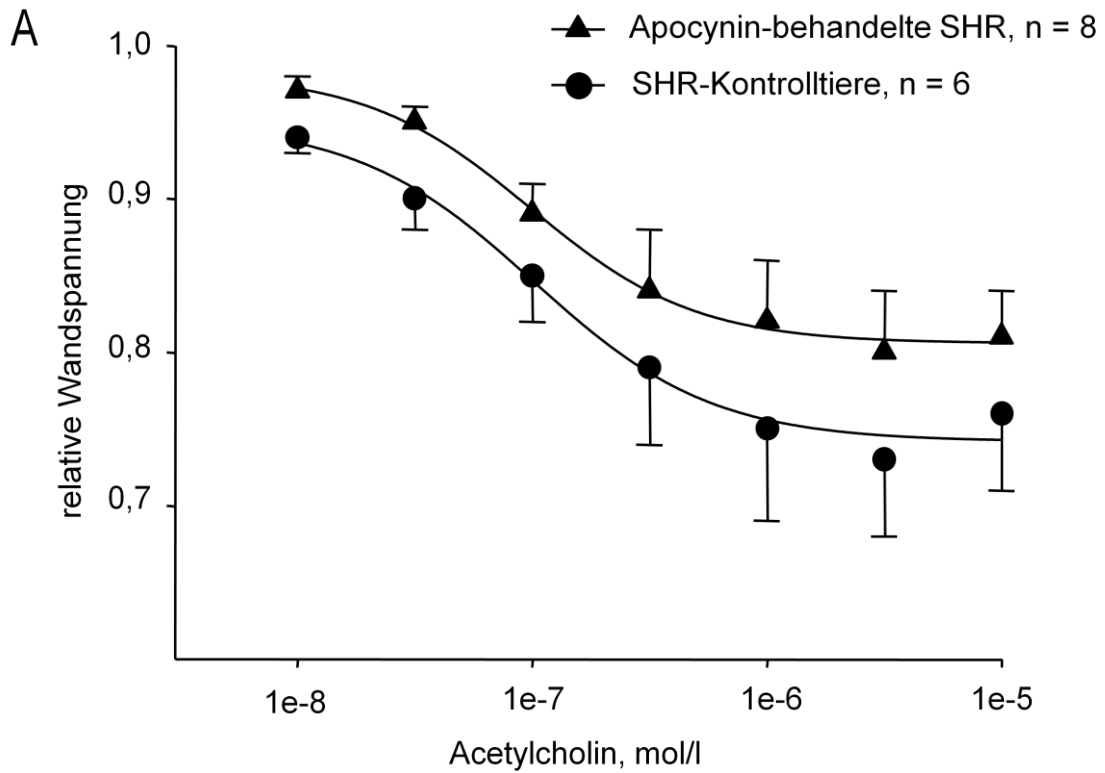


Abb. 6. Endothelvermittelte Vasodilatation mit Acetylcholin nach Vorkontraktion der Gefäßsegmente Apocynin-behandelter SHR und unbehandelter SHR-Kontrollen.

A: Renale Interlobararterien

B: Koronararterien

NO-Abhängigkeit der Apocynin-induzierten Vasodilatation

Die renalen Interlobararterien und Koronararterien der Apocynin-behandelten und unbehandelten SHR wurden auf ihr Dilatationsverhalten bei Zugabe von Apocynin und L-NAME untersucht, um zu prüfen, ob die Apocynin-induzierte Vasodilatation abhängig von der NO-Synthese ist. Die Interlobararterien wurden mit dem α_1 -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin, die Koronararterien mit Vasopressin vorkontrahiert, Apocynin kumulativ dazu gegeben und nachdem die Gefäße maximal dilatiert waren, wurde der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME (200 $\mu\text{mol/l}$) verabreicht. Auf die kumulative Zugabe von Apocynin reagierten die Interlobararterien ($0,53 \pm 0,02$ vs. $0,44 \pm 0,04$; Abb. 7 A) und Koronararterien ($0,16 \pm 0,03$ vs. $0,16 \pm 0,03$; Abb. 7 B) von Apocynin-behandelten SHR und von SHR-Kontrolltieren mit einem ähnlichen Dilatationsverhalten. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die relative Wandspannung der renalen Interlobararterien nach L-NAME Gabe lag bei den Apocynin-behandelten SHR bei $0,63 \pm 0,03$, bei den Kontrolltieren bei $0,56 \pm 0,03$ (Abb. 7 A), die der Koronararterien der mit Apocynin-behandelten SHR bei $0,37 \pm 0,08$ und der Kontrolltiere bei $0,38 \pm 0,1$ (Abb. 7 B). Die renalen Interlobar- und Koronararterien zeigten nach Zugabe von L-NAME eine nur unvollständige Rückkehr zum Ausgangstonus (* $p < 0,05$ vs. maximale Dilatation). Diese Untersuchungen zeigten, dass die Apocynin-vermittelte Vasodilatation größtenteils von der endothelialen NO-Synthese unabhängig ist.

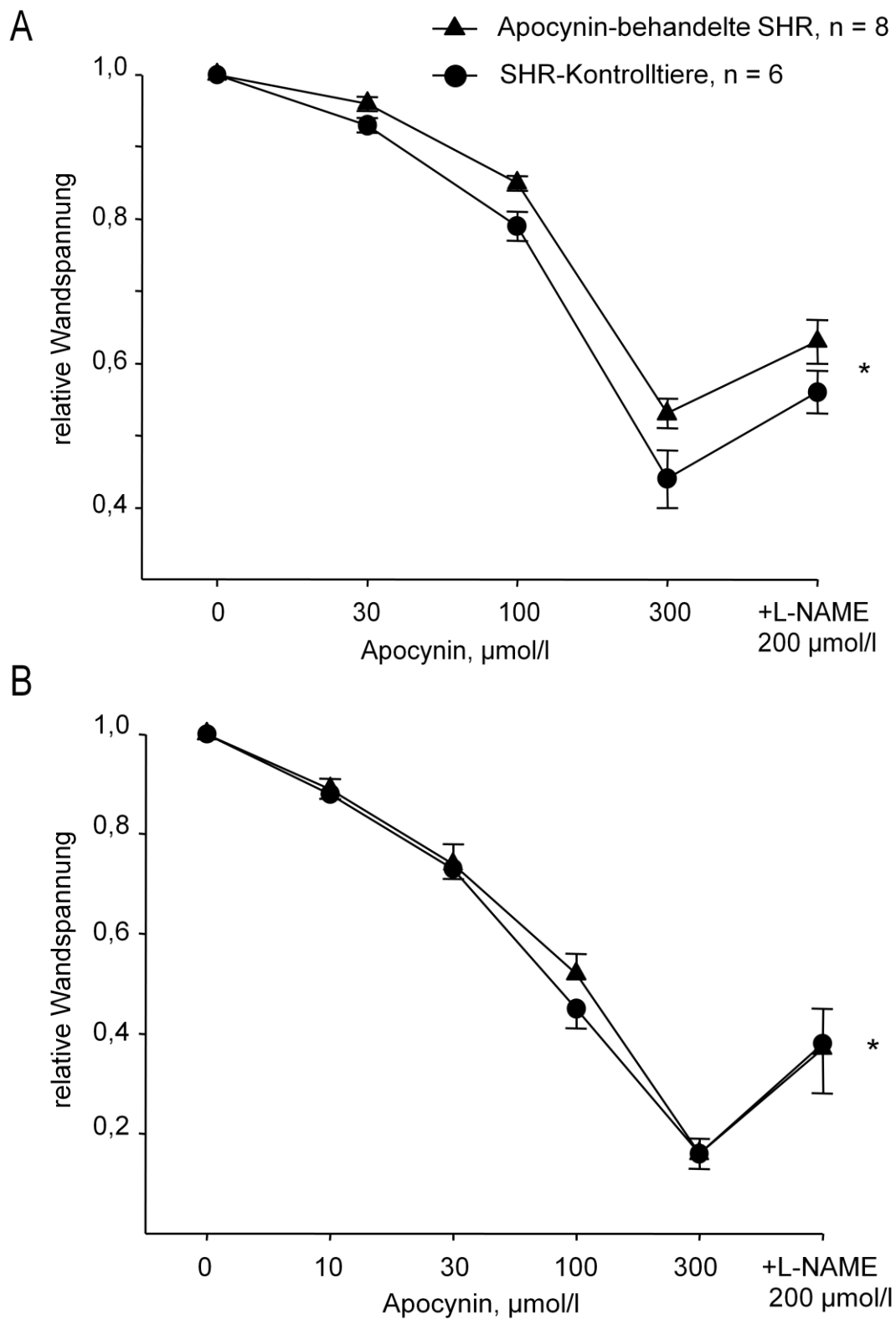


Abb. 7. Apocynin-induzierte Vasodilatation nach Vorkontraktion der Gefäßsegmente Apocynin-behandelter SHR und unbehandelter SHR-Kontrolltiere mit Phenylephrin bzw. Vasopressin.

A: Renale Interlobararterien

B: Koronararterien

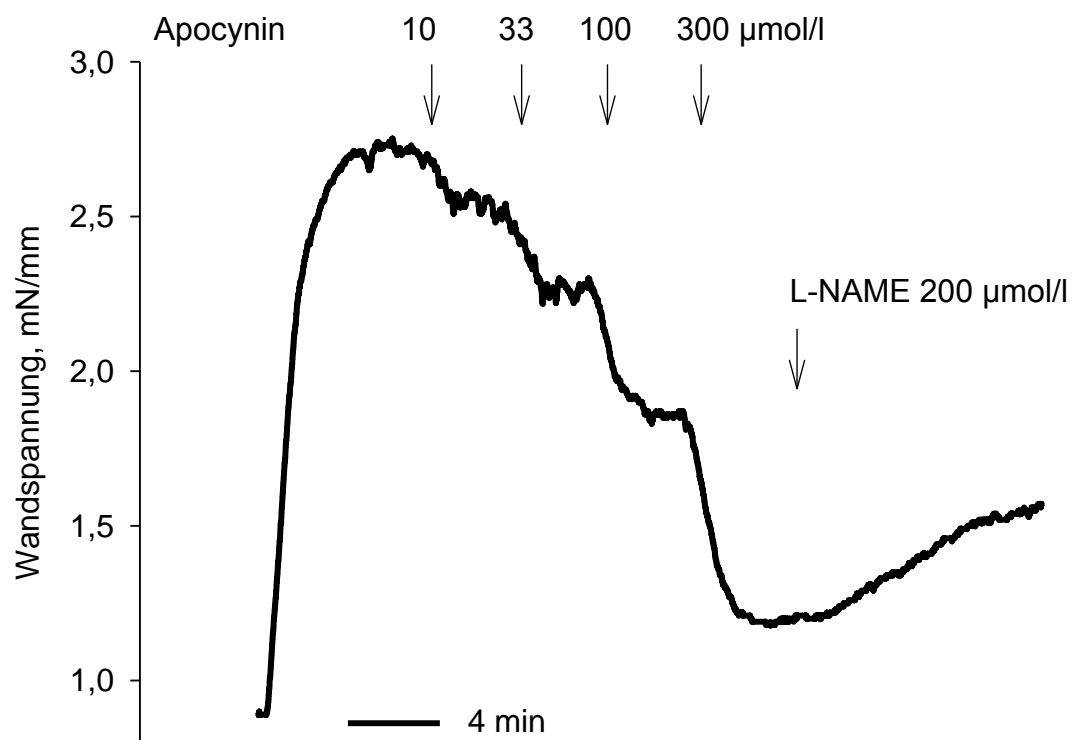


Abb. 8. Beispiel einer Aufzeichnung der Spannungsänderung eines im Small-Vessel-Myographen eingespannten Koronargefäßes bei Zugabe von Apocynin und L-NAME, nach Vorkontraktion mit Vasopressin.

3.2 Pharmakologische Untersuchungen zu vasodilatierenden Wirkmechanismen von Apocynin

3.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies und hyperpolarisierende Effekte

In den folgenden Versuchen wurde geprüft, ob die vasodilatierenden Wirkungen von Apocynin durch einen Antagonismus vasokonstriktorischer Wirkungen, die durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufen werden oder durch hyperpolarisierende Effekte vermittelt werden.

Tiron

Die renalen Interlobargefäße von F344 Ratten wurden 5 Minuten mit dem Superoxidanionenfänger Tiron (2 mmol/l) vorbehandelt, danach mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) vokontrahiert und mit Apocynin in 3 Konzentrationen versetzt. Der gleiche Versuchsdurchgang erfolgte in der Kontrollgruppe unter Abwesenheit von Tiron (Lösungsmittel, isotonische Kochsalzlösung). Die Wandspannungen der Gefäße gegenüber Phenylephrin waren in beiden Gruppen vergleichbar ($2,42 \pm 0,45$ mN/mm vs. $2,34 \pm 0,41$ mN/mm, n.s.). Auf die kumulative Zugabe von Apocynin zeigten die Gefäßsegmente beider Gruppen ein ähnliches Dilatationsverhalten (Abb. 9 A). Es gab keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied.

Katalase und Kalium

Um zu prüfen, ob die vasodilatierende Wirkung von Apocynin durch Wasserstoffperoxidspaltung beeinflusst wird, wurden Interlobararterien mit Katalase (1000 U/ml) für 20 min inkubiert, mit Phenylephrin (10^{-5} mol/l) kontrahiert und mit Apocynin in aufsteigender Konzentration versetzt. Um zu testen, ob Apocynin durch hyperpolarisierende Effekte eine Vasodilatation auslöst, wurden Versuche mit kaliumreicher Pufferlösung (K125) durchgeführt. Die absoluten Wandspannungen bei Vorkontraktion der Gefäßsegmente waren ähnlich, bei Phenylephrin lag die maximale

aktive Spannungsentwicklung bei 0.98 ± 0.09 mN/mm, bei K125 bei 0.9 ± 0.1 mN/mm. Die relative Wandspannung bei maximaler Apocynin-induzierter Vasodilatation lag bei den mit Katalase behandelten Gefäßen bei 0.53 ± 0.02 bei den Kontrollen bei 0.58 ± 0.03 (Abb. 9 B). Die Inkubation der renalen Interlobararterien mit Katalase hatte im Vergleich zu den Kontrollen keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Apocynin-vermittelte Vasodilatation. Auf die Zugabe von Apocynin zeigten die mit K125 vokontrahierten Gefäßsegmente eine signifikant stärkere Vasodilatation, als die mit Phenylephrin vokontrahierten Gefäße (0.28 ± 0.03 vs. 0.58 ± 0.03 ; Abb. 9 B). Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte eine EDHF-ähnliche Wirkung von Apocynin ausgeschlossen werden.

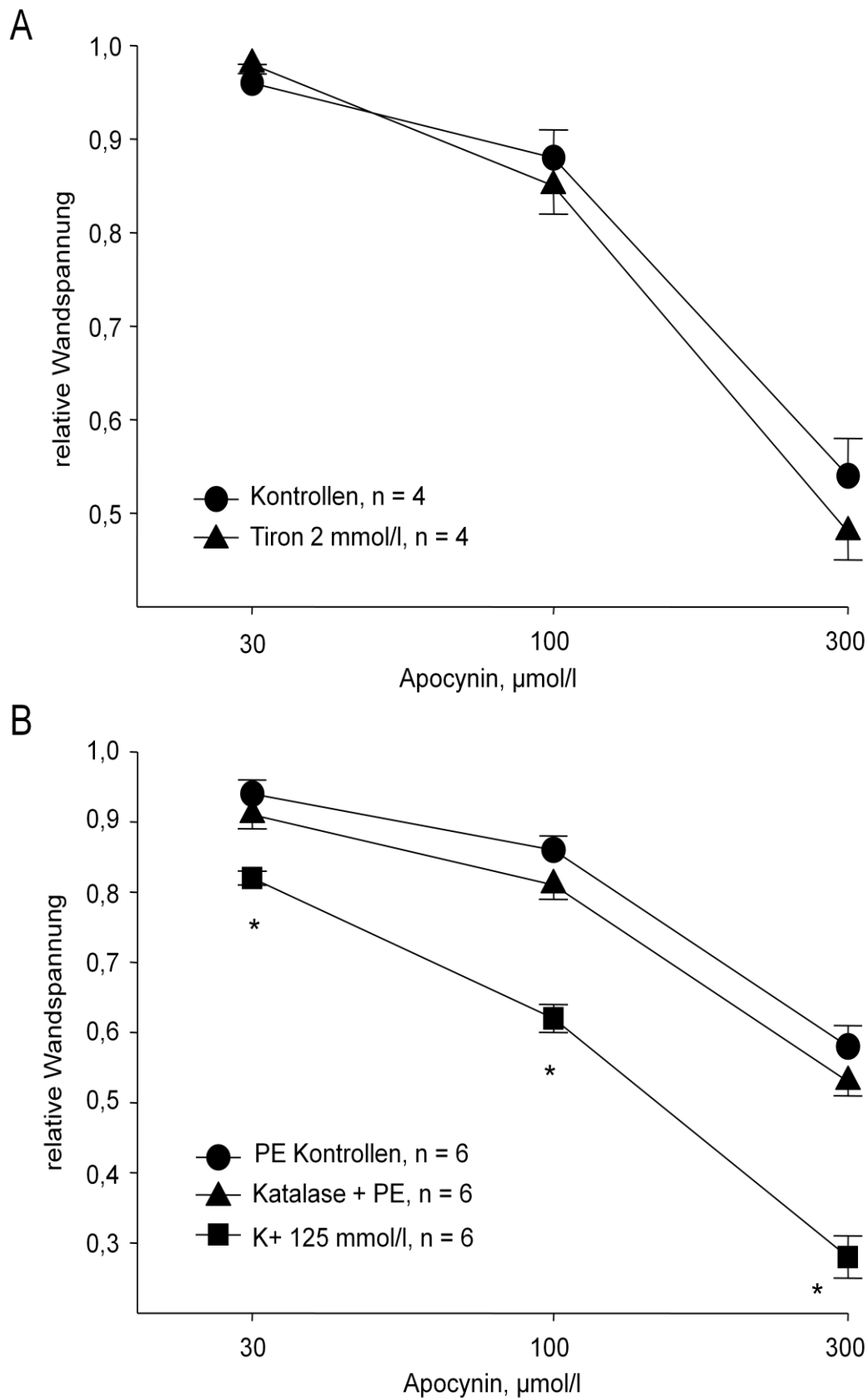


Abb. 9. Apocynin-vermittelte Vasodilatation der mit Tiron (A), Katalase und kaliumreicher Pufferlösung (B) inkubierten renalen Interlobararterien nach Vorkontraktion der Gefäße mit Phenylephrin (PE).

3.2.2 Vaskuläre NADPH-Oxidase-Hemmung

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die vasodilatierende Wirkung von Apocynin über eine direkte Hemmung der vaskulären NADPH-Oxidase vermittelt wird.

NADPH-Oxidase-Inhibitor VAS2870

Um vergleichbare Bedingungen für die Vorkontraktion der Gefäßsegmente zu ermitteln, wurden folgende Vorversuche durchgeführt. Interlobararterien von F344 Ratten wurden 80 Minuten mit dem alternativen NADPH-Oxidase-Hemmer VAS2870 (50 $\mu\text{mol/l}$), die Kontrollen mit DMSO (0.1% Endkonzentration im Organbad) inkubiert und kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Phenylephrin im Konzentrationsbereich 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l erstellt. Die Vorbehandlung der Interlobararterien mit VAS2870 führte zu einer verminderten Kontraktionsantwort im Vergleich zu den Kontrollen. Die maximale Phenylephrin-induzierte relative Wandspannung war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert ($0,73 \pm 0,13$ vs. $1,02 \pm 0,04$, $*p < 0,05$, Abb. 10 (A)). Um eine gleichartige Vorkontraktion der Gefäßsegmente zu erzielen, wurden Versuche durchgeführt, in denen die VAS2870-inkubierten renalen Interlobararterien und die Kontrollgefäße mit unterschiedlichen Phenylephrinkonzentrationen (10 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$) versetzt wurden. Daraus resultierte eine Phenylephrin-induzierte Vorkontraktion, die in beiden Gruppen gleich war (Abb. 10 B)).

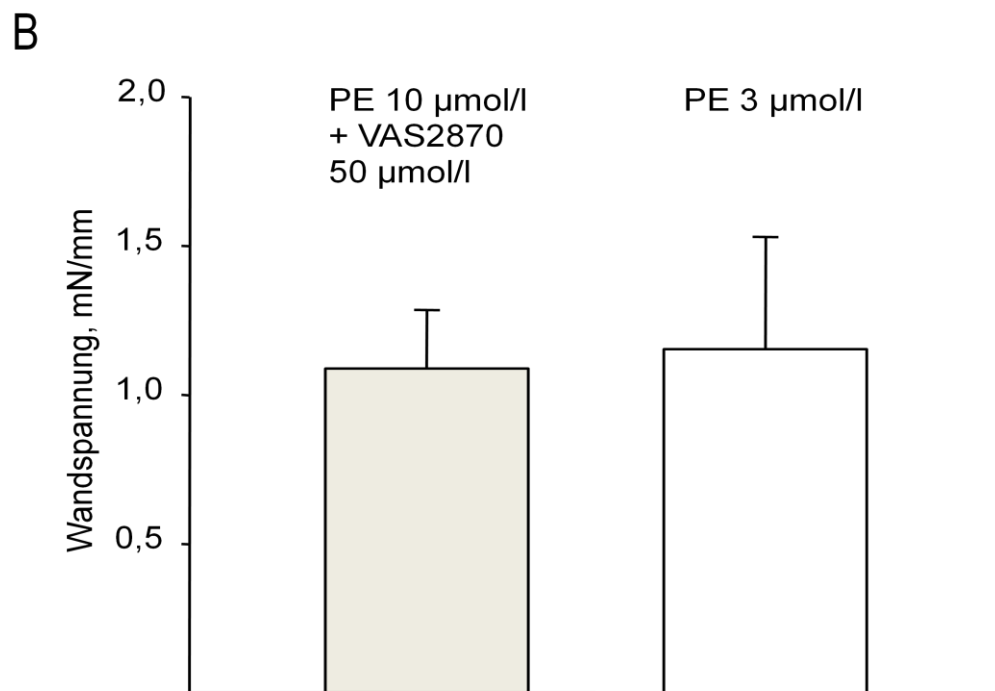
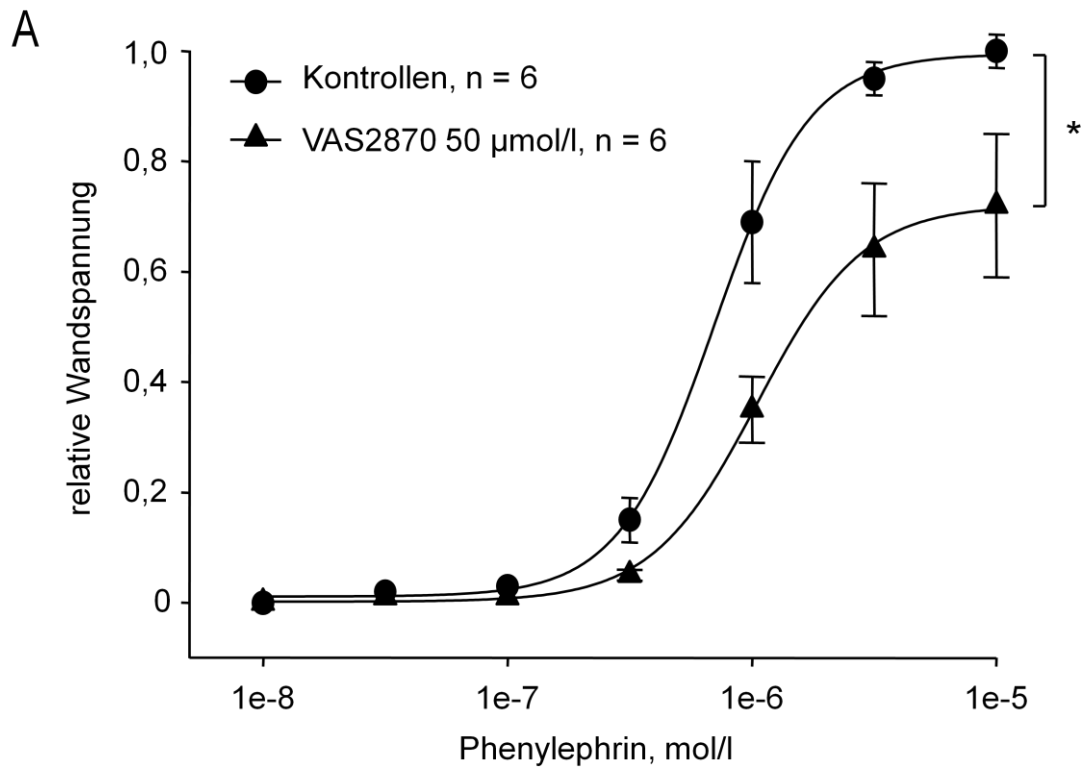


Abb. 10. A: Phenylephrin (PE)-vermittelte Vasokonstriktion renaler Interlobararterien von F344 Ratten nach Vorbehandlung mit VAS2870 und der Kontrollgruppe nach Vorbehandlung mit DMSO. B: Phenylephrin-induzierte aktive Spannungsentwicklung VAS2870-vorbehandelter Interlobararterien und der Kontrollen unter Verwendung verschiedener Phenylephrinkonzentrationen.

Die VAS2870-vorbehandelten Interlobararterien und die Kontrollgefäße wurden mit Phenylephrin in den Dosierungen, die in beiden Gruppen die gleiche Spannungsentwicklung zeigte, vorkontrahiert und mit Apocynin dilatiert. Die Wandspannung bei maximaler Apocynin-vermittelter Vasodilatation lag bei den VAS2870-behandelten Gefäßen bei $0,61 \pm 0,03$ und bei den DMSO-Kontrollarterien bei $0,51 \pm 0,03$. Es gab keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied. Durch die Behandlung der Gefäßsegmente mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor VAS2870 konnte die Apocynin-induzierte Vasodilatation nicht signifikant gehemmt werden (Abb. 11).

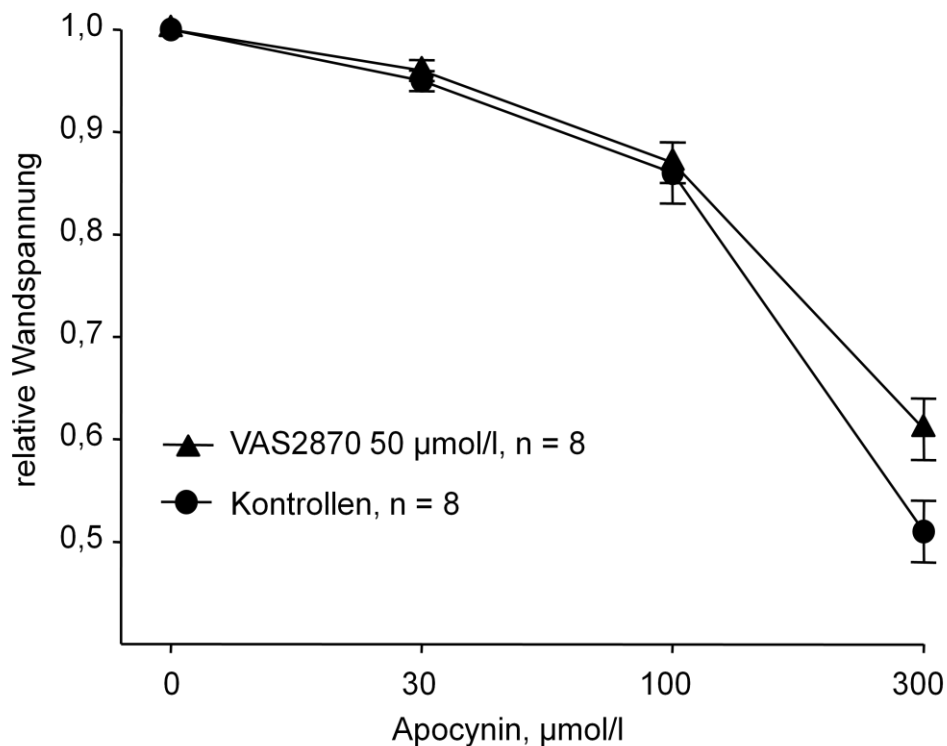


Abb. 11. Apocynin-induzierte Vasodilatation VAS2870-inkubierter renaler Interlobararterien und Kontrollarterien nach Vorkontraktion der Gefäße mit unterschiedlichen Phenylephrinkonzentrationen. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied im vasodilatatorischen Verhalten beider Gruppen.

P47phox^{-/-} Mäuse

Weitere Versuche zur Rolle der NADPH-Oxidase-Hemmung bei der Apocynin-vermittelten Vasodilatation wurden an isolierten Gefäßen p47phox-defizienter Mäuse vorgenommen. Die Wirkung von Apocynin wird über eine Interferenz mit der p47phox-Untereinheit bei der NADPH-Oxidase-Aktivierung vermittelt, indem Apocynin die Bindung der zytosolischen p47^{phox}-Untereinheit an die membrangebundene gp91^{phox}-Untereinheit verhindert.

Die Aortenringe von p47phox^{-/-} Mäusen und C57BL/6 Kontrolltieren wurden auf ihr vasokonstriktorisches Verhalten untersucht und kumulative Konzentrations-Wirkungskurven mit Phenylephrin im Konzentrationsbereich 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l erstellt. Die Kontraktionsantworten auf 125 mmol/l K⁺ waren bei beiden Gruppen vergleichbar ($1,11 \pm 0,06$ vs. $1,17 \pm 0,05$ mN/mm). Auf die kumulative Zugabe von Phenylephrin zeigten die Aortenringe beider Gruppen ein vergleichbares Kontraktionsverhalten. Die maximale relative Phenylephrin-vermittelte Spannungsentwicklung der Aortenringe der p47phox^{-/-} Mäuse lag bei $1,37 \pm 0,16$, die der Kontrollen bei $1,17 \pm 0,1$ (Abb. 12 A). Es gab keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied.

Die Aortenringe von p47phox^{-/-} Mäusen und C57BL/6 Kontrolltieren wurden mit Phenylephrin vorkontrahiert und die Gefäße mit 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l Acetylcholin versetzt. Auf die kumulative Zugabe von Acetylcholin reagierten die Aortenringe der p47phox^{-/-} Mäuse mit einer signifikant stärkeren Vasodilatation als die der Wildtypiere (*p < 0,05), die eine biphasische Reaktion auf Acetylcholin zeigten (Abb. 12 B). Die Wandspannung der Aortenringe der p47phox^{-/-} Mäuse lag nach kumulativer Zugabe aller Acetylcholin-konzentrationen bei $0,38 \pm 0,09$, die der C57BL/6 Kontrolltiere lag bei $0,65 \pm 0,09$.

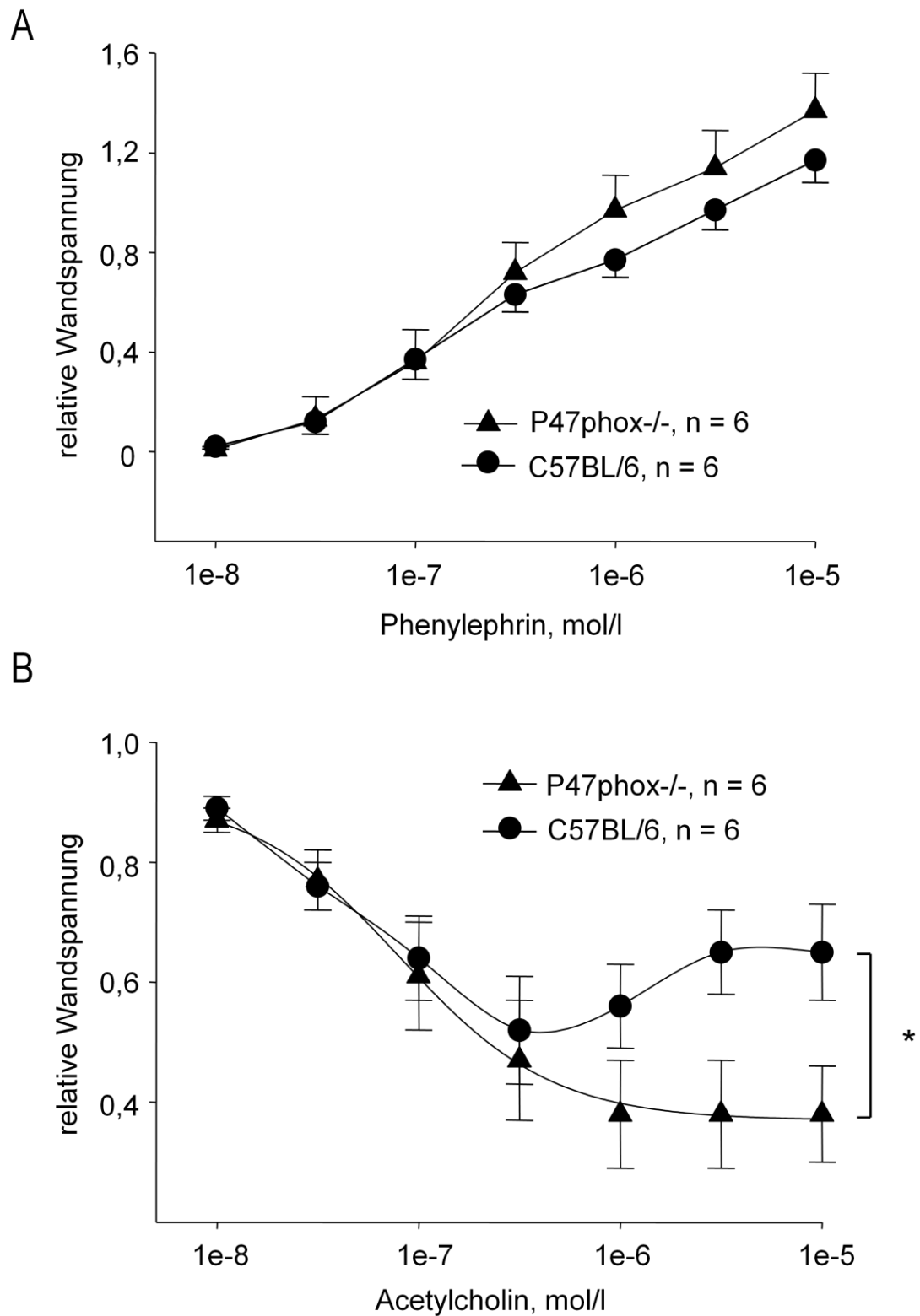


Abb. 12. A: Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion der Aortenringe von p47phox^{-/-} Mäusen und Wildtyp C57BL/6 Mäusen. B: Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation der Aortenringe von p47phox^{-/-} und Wildtyptieren nach Vorkontraktion mit Phenylephrin.

Apocynin führte bei mit Phenylephrin (1 $\mu\text{mol/l}$) vorkontrahierten Aortenringen der $p47\text{phox}^{-/-}$ Mäuse zu einer stärkeren Dilatationsantwort, als bei den Kontrolltieren. Die relative Wandspannung der Aortenringe bei maximaler Apocynin-vermittelter Vasodilatation lag bei den $p47\text{phox}^{-/-}$ Mäusen bei $0,11 \pm 0,05$, bei den Kontrolltieren bei $0,43 \pm 0,03$ (Abb. 13).

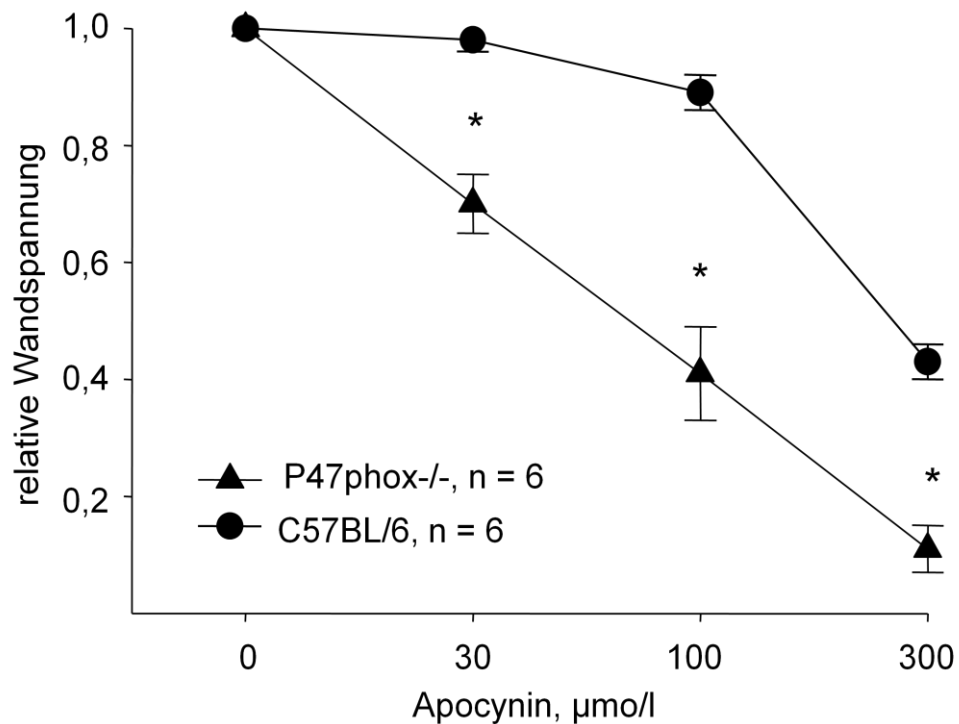


Abb. 13. Apocynin-induzierte Vasodilatation der Aortenringe von $p47\text{phox}^{-/-}$ und Wildtyp C57BL/6 Mäusen nach Vorkontraktion mit Phenylephrin. Die Aortenringe der $p47\text{phox}^{-/-}$ Mäuse reagierten auf Apocynin empfindlicher, als die Aortenringe von C57BL/6 Mäusen. * $p < 0,05$ vs. C57BL/6 Mäuse.

3.2.3 Alternative Mechanismen der Apocynin-induzierten Vasodilatation

Die oben dargestellten pharmakologischen Untersuchungen isolierter Gefäße haben die Interferenz mit reaktiven Sauerstoffspezies und eine Hemmung der vaskulären NADPH-Oxidasen als Mechanismen der Apocynin-induzierten Vasodilatation weitgehend ausgeschlossen. In weiteren Versuchsserien wurde getestet, welche alternativen Mechanismen an der durch Apocynin auslösbaren Vasodilatation beteiligt sind.

Wechselwirkung mit extrazellulärem Kalzium

In den folgenden Versuchen wurde überprüft, ob die vasodilatierende Wirkung des Apocynins auf einer Interferenz mit dem Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Gefäßmuskelzellen beruht. Die Vorbehandlung der Interlobararterien mit 400 $\mu\text{mol/l}$ Apocynin führte zu einer geringeren Kontraktionsantwort auf Phenylephrin im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Die Wandspannung betrug $1,23 \pm 0,11$ mN/mm bei den mit Apocynin vorbehandelten Gefäßen und $1,55 \pm 0,11$ mN/mm in den Kontrollgefäßen (* $p < 0,05$, Abb. 14). In kalziumfreier Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung war die Kontraktionsantwort auf Phenylephrin signifikant vermindert (Abb. 14). Apocynin führte zu einer ähnlichen Hemmung der Kontraktionsantwort in Ca^{2+} -freier Pufferlösung, wie in Ca^{2+} -haltiger Lösung (Abb. 14). Es gab keine statistisch signifikanten Interaktionen zwischen den Faktoren Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung und Apocynin auf die Kontraktionsantwort der Gefäße. Diese Befunde schließen eine Reduktion des Einstroms von extrazellulärem Ca^{2+} als Mechanismus, der der Apocynin-induzierten Vasodilatation unterliegt, weitgehend aus.

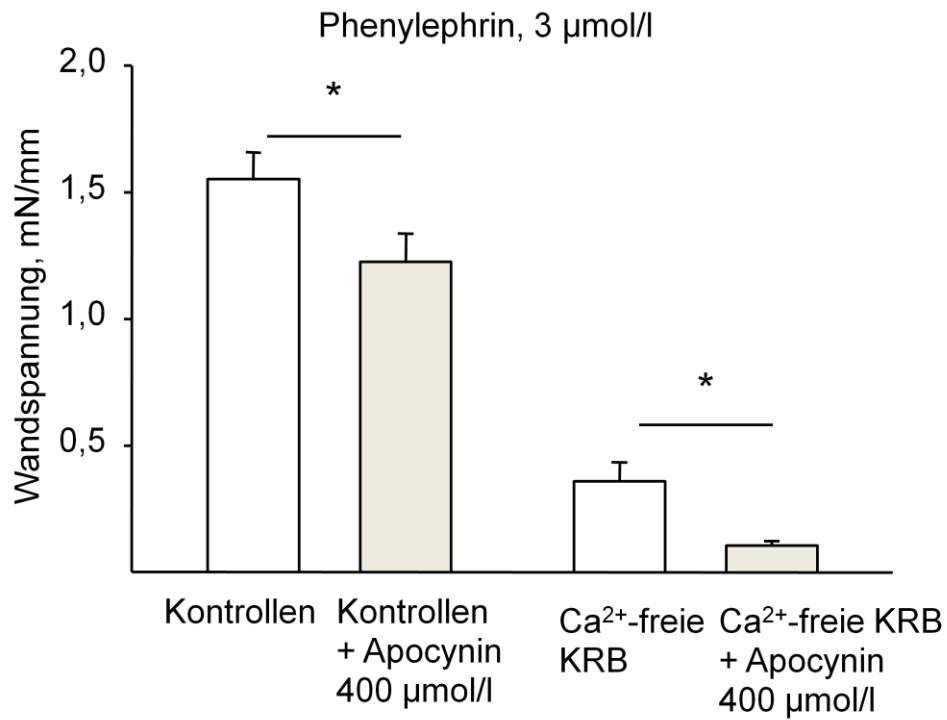


Abb. 14. Phenylephrin-induzierte maximale Spannungsentwicklung renaler Interlobararterien von F344 Ratten in Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung und in kalziumfreier Lösung nach Vorbehandlung mit Apocynin und der Kontrollen nach Vorbehandlung mit physiologischer Kochsalzlösung. Die Behandlung der Gefäße mit Apocynin führte im Vergleich zu den Kontrollen zu einer signifikanten Abnahme der Phenylephrin-vermittelten Wandspannung in physiologischer Krebs-Ringer-Hydrogenkarbonat-Lösung und in kalziumfreier Lösung.

Interaktion mit dem Proteinkinase A-Signaltransduktionsweg

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die vasodilatierende Wirkung von Apocynin durch eine Hemmung der Proteinkinase A beeinflusst wird.

Interlobar- und Koronararterien

Die renalen Interlobararterien wurden 10 Minuten mit dem PKA-Inhibitor Rp-8-Br-cAMPS (250 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert, die Kontrollgefäße mit 200 μl NaCl und mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) vorkontrahiert, danach wurde Apocynin kumulativ dazu gegeben. Die Empfindlichkeit der Gefäße gegenüber Phenylephrin war in beiden Gruppen gleich ($1,35 \pm 0,21$ mN/mm vs. $1,41 \pm 0,2$ mN/mm). Die Kontrollgefäße und die mit dem PKA-Inhibitor behandelten Gefäße reagierten auf die Apocyningabe mit einer vergleichbaren Dilatation. Die relative Wandspannung bei maximaler Apocynin-induzierter Vasodilatation betrug bei den mit dem PKA-Inhibitor behandelten Gefäßen $0,6 \pm 0,06$, die der Kontrollen lag bei $0,59 \pm 0,05$. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 15 A). Die Hemmung der Proteinkinase A beeinflusste die Apocynin-vermittelte Vasodilatation nicht.

Die Koronararterien wurden wie die Interlobararterien 10 Minuten mit dem PKA-Inhibitor Rp-8-Br-cAMPS (250 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert, die Kontrollen mit NaCl und mit Vasopressin (10^{-8} mol/l) vorkontrahiert, danach wurde Apocynin kumulativ dazu gegeben. Die Gefäßantwort auf Vasopressin war in beiden Gruppen vergleichbar ($0,98 \pm 0,24$ mN/mm vs. $1,18 \pm 0,22$ mN/mm). Auf die kumulative Zugabe von Apocynin reagierten die Gefäße beider Gruppen mit einer deutlichen Dilatation. Die Kontrollgefäße zeigten im Vergleich zu den PKA-Inhibitor-behandelten Gefäßen ein ausgeprägteres Dilatationsverhalten (* $p < 0,05$ vs. Kontrollen; Abb. 15 B). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass Apocynin bei Koronararterien eine gewisse PKA-abhängige Wirkkomponente besitzt.

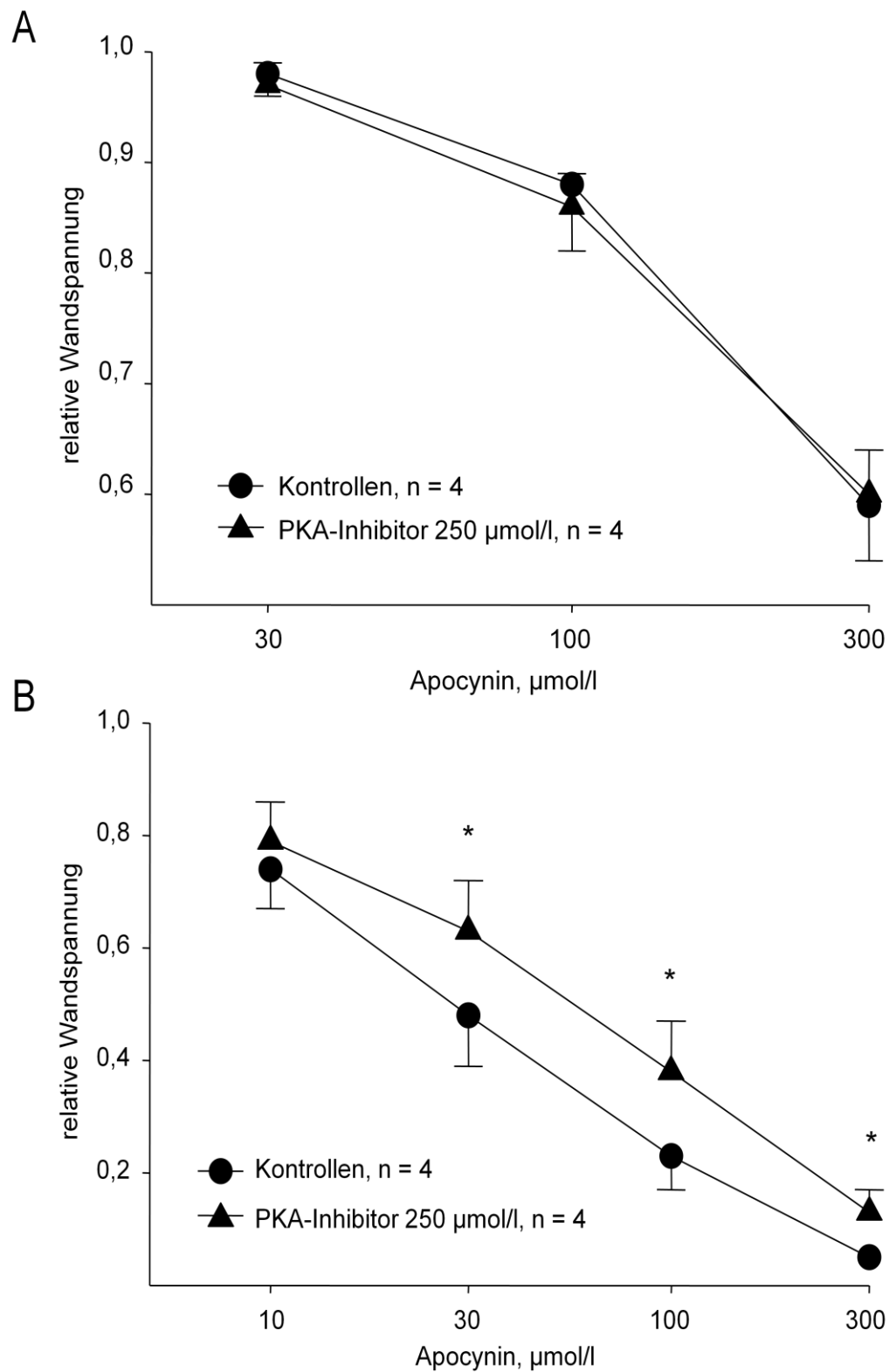


Abb. 15. Apocynin-induzierte Vasodilatation der renalen PKA-Inhibitor-vorbehandelten Interlobararterien und Koronararterien sowie der Kontrollarterien von F 344 Ratten nach Vorkontraktion der Gefäße mit Phenylephrin bzw. Vasopressin.

A: Interlobararterien

B: Koronararterien

Interaktion mit dem Proteinkinase G-Signaltransduktionsweg

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die Apocynin-induzierte Vasodilatation durch eine Hemmung der Proteinkinase G beeinflusst wird. Die renalen Interlobararterien wurden 10 Minuten mit 100 $\mu\text{mol/l}$ PKG-Inhibitor Rp-8-Br-cGMPS inkubiert, mit Phenylephrin ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) bis zum Erreichen des Spannungsplateaus vorkontrahiert und dann Apocynin dazu gegeben. Die Empfindlichkeit der Gefäße gegenüber Phenylephrin war in beiden Gruppen vergleichbar ($1,77 \pm 0,25$ mN/mm vs. $1,9 \pm 0,26$ mN/mm). Die kumulative Behandlung der Gefäße mit Apocynin führte in den PKG-Inhibitor-inkubierten Gefäßen und den Kontrollen zu einer vergleichbaren Dilatation. Die relative Wandspannung bei maximaler Dilatation durch Apocyningabe betrug bei den PKG-Inhibitor-behandelten Gefäßen $0,58 \pm 0,02$, die der Kontrollen lag bei $0,56 \pm 0,05$. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied im vasodilatatorischen Verhalten beider Gruppen (Abb. 16). Diese Untersuchungen zeigen, dass die vasodilatierende Wirkung von Apocynin nicht durch eine Hemmung der Proteinkinase G vermittelt wird.

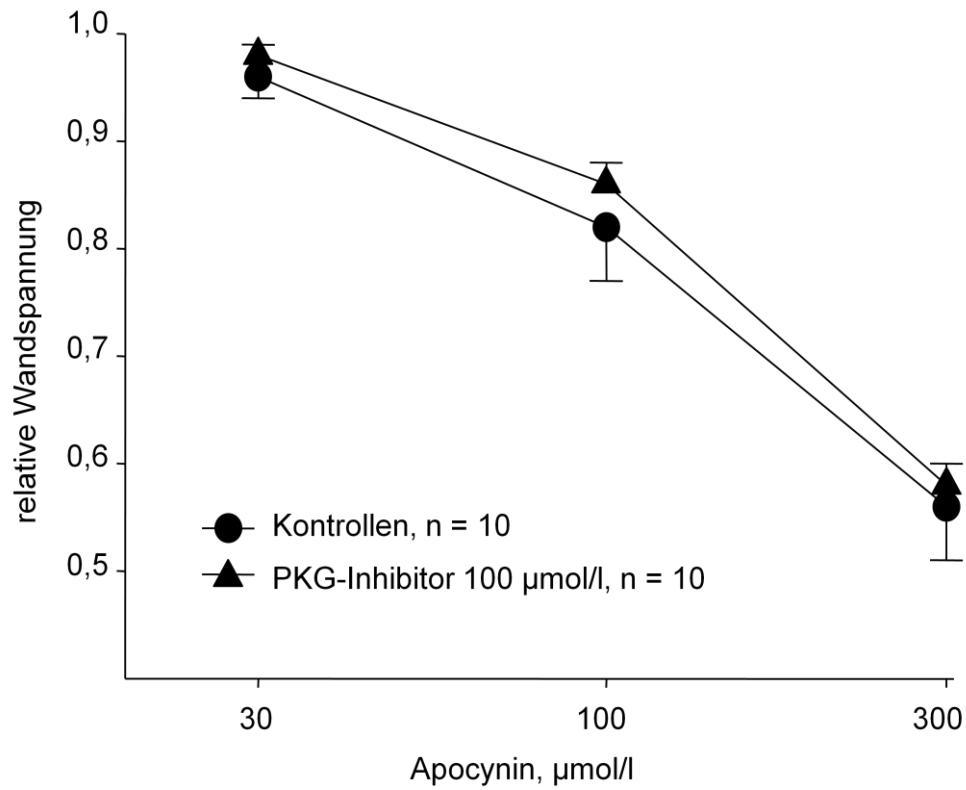


Abb. 16. Apocynin-induzierte Vasodilatation der renalen PKG-Inhibitor-vorbehandelten Interlobararterien und der Kontrollarterien von F 344 Ratten nach Vorkontraktion der Gefäße mit Phenylephrin. Die Gefäßsegmente beider Gruppen reagierten mit einer deutlichen Vasodilatation. Es gab keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied.

Interaktion mit der Rho-Kinase

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die vasodilatierende Wirkung von Apocynin durch eine Hemmung der Rho-Kinase-abhängigen Prozesse vermittelt wird.

Mit den renalen Interlobargefäßen von F344 Ratten wurden kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Phenylephrin im Konzentrationsbereich 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l erstellt, unter Abwesenheit des Inhibitors, mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 (3 μ mol/l) und unter Anwesenheit des Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 und 400 μ mol/l Apocynin. Die Hemmung der Rho-Kinase führte in Interlobararterien zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve ($\log EC_{50} -5,42 \pm 0,28$, $*p < 0,05$). Außerdem wurde die maximale Kontraktionsantwort im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert (Abb. 17, $*p < 0,05$). Unter der Behandlung mit Apocynin zeigten die mit dem Rhokinase-Hemmer inkubierten Gefäße keine weitere Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve, jedoch wurde die maximale Kontraktionsantwort vermindert ($0,7 \pm 0,04$, $\log EC_{50} -5,71 \pm 0,06$, $*p < 0,05$).

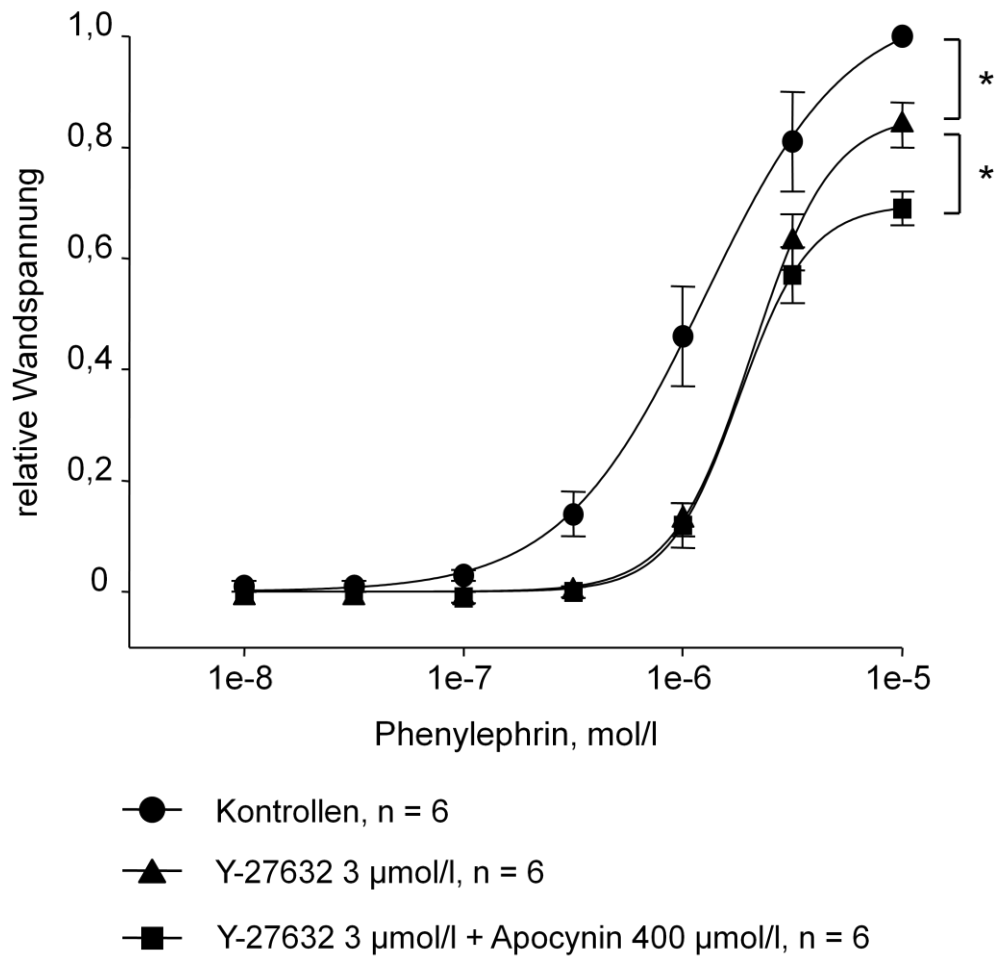


Abb. 17. Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion renaler Interlobararterien von F344 Ratten. Durch die Vorbehandlung mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 wurde die Konzentrations-Wirkungs-Kurve signifikant nach rechts verschoben ($p < 0,05$) und die maximale Kontraktionsantwort vermindert (* $p < 0,05$). Die gleichzeitige Behandlung mit dem Rho-Kinase-Inhibitor und Apocynin führte zu einer weiteren Abnahme der Kontraktionsantwort (* $p < 0,05$).

Des Weiteren wurden die renalen Interlobararterien mit Vasopressin im Konzentrationsbereich 10^{-10} bis $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l zur Erstellung kumulativer Konzentrations-Wirkungs-Kurven kontrahiert. Die Vasopressin-induzierte Konstriktion der Gefäße ließ sich durch Rho-Kinase-Inhibition stärker hemmen, als die Vasokonstriktion durch Phenylephrin (Abb. 18). Die mit Vasopressin kontrahierten Interlobararterien reagierten auf die Rho-Kinase-Inhibition mit einer signifikanten Rechtsverschiebung sowie mit einem deutlich verminderten Kontraktionsmaximum ($0,36 \pm 0,02$, $\log EC_{50} -8,57 \pm 0,07$) im Vergleich zu den Kontrollen ($0,97 \pm 0,03$, $\log EC_{50} -9,02 \pm 0,09$). Die Behandlung der renalen Interlobargefäße mit Apocynin und dem Rho-Kinase-Hemmer zeigte keine weitere Reduktion der maximalen Wandspannung ($0,32 \pm 0,02$, $\log EC_{50} -8,42 \pm 0,07$).

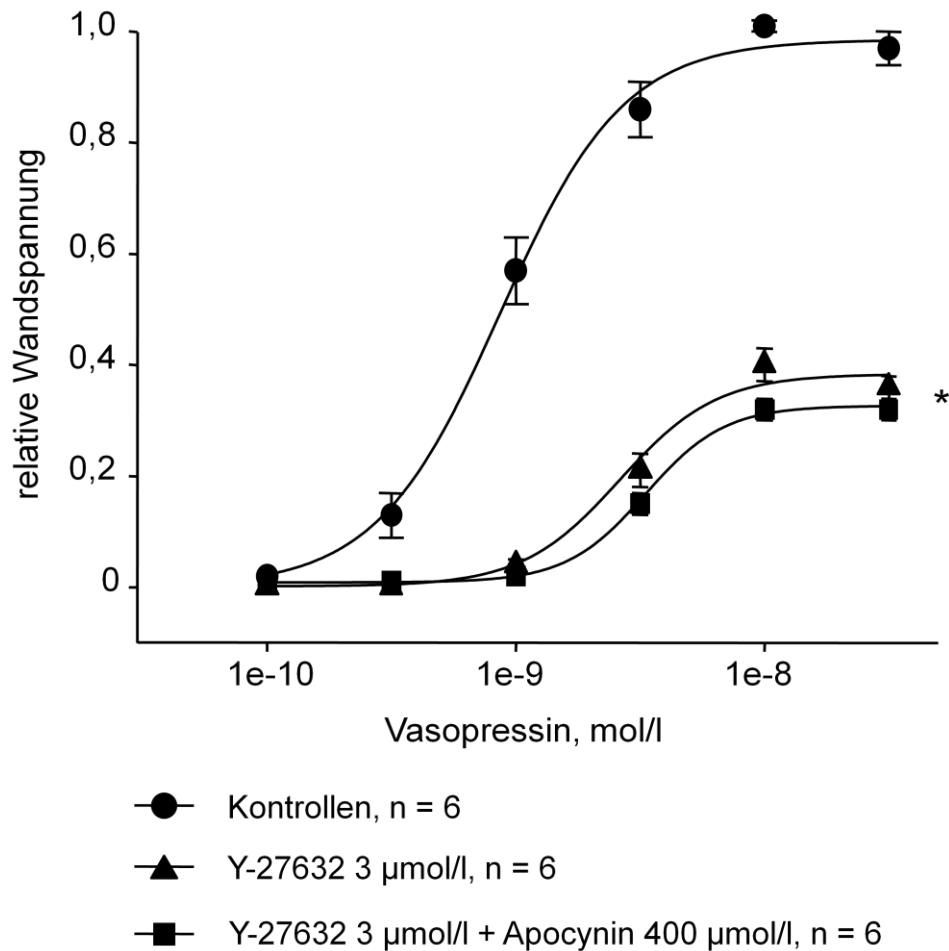


Abb. 18. Vasopressin-induzierte Vasokonstriktion der renalen Interlobararterien von F344 Ratten. Durch die Vorbehandlung mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 wurde die Konzentrations-Wirkungs-Kurve signifikant nach rechts verschoben ($p < 0,001$) und die maximale Kontraktionsantwort vermindert ($*p < 0,001$). Die gleichzeitige Behandlung mit dem Rho-Kinase-Inhibitor und Apocynin führte zu keiner weiteren Reduktion der maximalen Kontraktionsantwort.

4 Diskussion

4.1 Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie stellt eine chronische Erhöhung des Blutdruckes im arteriellen Gefäßsystem dar. Mit zunehmender Blutdruckhöhe steigt das kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko kontinuierlich an. Internationale Gremien und medizinische Fachgesellschaften haben anhand epidemiologischer Studienergebnisse Grenzwerte für die Definition einer arteriellen Hypertonie festgelegt. Nach den Richtlinien der WHO und der International Society of Hypertension liegt eine Hypertonie ab einem systolischen Blutdruck von 140 mmHg und einem diastolischen Blutdruck von 90 mmHg vor, vorausgesetzt, dass die Blutdruckmessungen mehrmals an unterschiedlichen Tagen unter Standardbedingungen durchgeführt wurden.²¹ Den größten Anteil arterieller Hypertonien macht die primäre oder essentielle Hypertonie mit 90 % aus. Bedeutend seltener treten sekundäre Hypertonien mit 10 % auf, die beispielsweise durch Erkrankungen wie Nierenarterienstenosen, Morbus Cushing, Morbus Conn oder das Phäochromozytom hervorgerufen werden und die insbesondere im Rahmen von therapieresistenten Hypertonien in Betracht gezogen werden müssen. Durch begünstigende Faktoren, wie Adipositas, fettreiche Ernährung, vermehrte Kochsalzzufuhr, Stress, Umweltbelastungen, chronischer Nikotinabusus und Bewegungsmangel steigt die Prävalenz der Hypertonie besonders in den Industrienationen stetig an. Derzeit liegt die Prävalenz der Hypertonie bei durchschnittlich 30 % und in den nächsten Jahren ist mit einem deutlichen Anstieg der Krankheitshäufigkeit zu rechnen.¹¹⁴ Dabei gibt es wichtige regionale Unterschiede in der Verteilung des Blutdruckes. So lassen sich bei beiden Geschlechtern mit einem Alter über 45 Jahre die durchschnittlich höchsten Blutdrücke in der Bevölkerung Osteuropas und Russlands finden.¹¹⁴ In Regionen, in denen überwiegend Menschen mit höherem Einkommen leben, wird die Zahl der an Hypertonie leidenden Individuen bis 2025 voraussichtlich auf 70 Millionen Menschen ansteigen, in Regionen mit einer überwiegend sozial schwachen Bevölkerung sogar auf über 500 Millionen.¹¹⁴ In einer 2003 veröffentlichten Studie wurde in 6 europäischen Ländern, Kanada sowie den USA die Krankheitshäufigkeit der Hypertonie der Bevölkerung in einem Alter zwischen 35 bis 64 Jahren und einem BMI (Body-Mass-Index) von 27 erfasst.¹⁴⁹ Während die Prävalenz der Hypertonie in Deutschland bei 55 %, in Finnland bei 49 % und in Spanien bei 47 % lag,

betrug die Prävalenz in England 42 %, in Schweden und Italien lag sie bei 38 % und in den USA und Kanada bei 28 %.¹⁴⁹ Dabei korrelierte die Prävalenz der Hypertonie mit den Hypertonie-bedingten Todesursachen durch Schlaganfall.¹⁴⁹ Die durchschnittliche durch Schlaganfall bedingte Mortalitätsrate lag in den europäischen Ländern bei 41,2 und in Kanada und den USA bei 27,6 bezogen auf 100.000 Einwohner.¹⁴⁹ Die bedeutenden regionalen Unterschiede der Prävalenz der Hypertonie werden vermutlich durch genetische Faktoren, Umwelt- und Ernährungsfaktoren verursacht.¹⁴⁹

Die Hypertonie stellt einen bedeutenden Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Schlaganfall, Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankungen und Endorganschäden wie beispielsweise die Niereninsuffizienz oder die hypertensive Retinopathie dar.⁹¹ In einer 2005 veröffentlichten Studie wurden die kardiovaskulären Risikofaktoren der Hypertonie bewertet.⁹¹ Dazu wurden 645 Männer und 702 Frauen ohne vorbestehende kardiovaskuläre Erkrankungen mit neu aufgetretener Hypertonie über 12 Jahre beobachtet und die aufgetretenen kardiovaskulären Ereignisse erfasst.⁹¹ Die kardiovaskulären Ereignisse wurden definiert, als das Auftreten von schwerwiegenden koronaren Herzerkrankungen wie Myokardinfarkt, Koronarinsuffizienz, koronar bedingter Tod, Schlaganfall, Herzinsuffizienz, Angina pectoris, intermittierende Claudicatio oder andere Ursachen eines kardiovaskulär bedingten Todes.⁹¹ Der nicht durch kardiovaskuläre Erkrankungen bedingte Tod wurde definiert als das Auftreten eines Todes durch andere Ursachen, wie beispielsweise Krebserkrankungen.⁹¹ Probanden mit neu aufgetretener Hypertonie erfuhren im Vergleich zu deren gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Kontrollen ohne Hypertonie eher ein kardiovaskuläres Ereignis, als einen nicht kardiovaskulär bedingten Tod.⁹¹ Die Inzidenz einer kardiovaskulären Erkrankung als erstes Ereignis bei hypertensiven Männern betrug 24,7 %, verglichen mit 9,8 % für einen nicht kardiovaskulär bedingten Tod.⁹¹ Bei hypertensiven Frauen lag die Inzidenz bei 16 % versus 10,1 %.⁹¹ Nicht hypertensive Männer erfuhren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als erstes Ereignis eine kardiovaskuläre Erkrankung verglichen mit einem nicht kardiovaskulär bedingten Tod (15,7 % versus 10,2 %), jedoch mit einem niedrigeren Anteil als die hypertensiven Männer (15,7 % versus 24,7 %).⁹¹ Unter den nicht hypertensiven Frauen war das Risiko für eine kardiovaskuläre Erkrankung verglichen mit einem nicht kardiovaskulär bedingten Tod gleich.⁹¹ Die häufigsten bedeutenden kardiovaskulären Ereignisse bei den männlichen Probanden waren schwerwiegende koronare Herzerkrankungen (8,2 %) und bei den Frauen Schlaganfälle (5,2 %).⁹¹ Bei den Männern (10,9 % versus 1,8 %) und

Frauen (8,6 % versus 2,1 %) mit neu aufgetretener Hypertonie zeigte sich ab einem Alter von 60 Jahren ein dramatischer Anstieg des Auftretens von Schlaganfällen als erstes kardiovaskuläres Ereignis verglichen mit unter 60-jährigen Probanden.⁹¹

Die durch eine langjährig bestehende oder unzureichend behandelte Hypertonie hervorgerufenen kardiovaskulären Komplikationen sind bedingt durch strukturelle Gefäßveränderungen, die das Gefäßendothel und die Gefäßmedia betreffen. Diese als vaskuläres Remodeling bezeichneten dynamischen Umbauvorgänge gehen mit apoptotischen, inflammatorischen und fibrotischen Veränderungen der Media einher.⁷⁴ Durch entzündliche Vorgänge in der Gefäßwand, die durch neuronale, hormonelle und parakrine Faktoren unter Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies hervorgerufen werden können, werden Wachstumsfaktor-abhängige Umbauvorgänge in der extrazellulären Matrix begünstigt, sowie die Kollagensynthese in der Weise beeinflusst, dass eine Verminderung des Gefäßlumens und eine Zunahme der Mediadicke resultiert.^{14, 74} Zahlreiche Studien demonstrieren, dass die essentielle Hypertonie mit einer Zunahme des peripheren Gefäßwiderstandes einhergeht.⁹⁴ Folkow et al. beschrieben bereits in den 50er Jahren, dass die Hypertonie mit einer strukturellen Verengung des Gefäßlumens einhergeht und dass das verminderte Gefäßlumen, verbunden mit einer Zunahme der Wanddicke beachtliche hämodynamische Auswirkungen hat.⁴² Baumbach und Heistad führten 1989 Untersuchungen an zerebralen Rattengefäßen durch und zeigten, dass stroke-prone SHR einen kleineren Lumendurchmesser sowie eine Dickenzunahme der Media im Vergleich zu den Wistar-Kyoto Ratten zeigten.¹⁴ Zu dieser Zeit wurde der Terminus „Remodeling“, als Ausdruck für die Hypertonie-bedingten strukturellen Gefäßveränderungen eingeführt.⁴² Jahrzehntelange Forschungen an Gefäßen des Menschen und von Modellorganismen führten zu der Erkenntnis, dass die arterielle Hypertonie mit hämodynamischen und morphologischen vaskulären Veränderungen in unterschiedlichen Gefäßgebieten, wie beispielsweise der Nierengefäße¹⁰¹, der zerebralen Gefäße¹⁴ und anderer einhergehen.⁴²

Der arterielle Blutdruck gewährleistet die Aufrechterhaltung der Organperfusion, die durch ein optimales Zusammenspiel komplexer Regulationsmechanismen geregelt wird. Zu diesen Mechanismen zählen die neuronale, hormonelle und lokale Regelung des Herzzeitvolumens, des Gefäßwiderstandes und des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Störungen dieser Regulationsvorgänge spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie.^{20, 29, 34, 59, 63, 64, 113} Zur Anpassung des Blutdruckes

an aktuelle Bedingungen bedient sich der Organismus kurz- und langfristig wirksamer Blutdruckregulationsmechanismen. Wichtige Funktionen in der langfristigen Blutdruckregulation üben die Nieren über Änderungen der Salz- und Wasserausscheidung aus.^{63, 64} Die Nieren sind in der Lage bei Blutdruckanstieg die renale Flüssigkeitsausscheidung zu steigern und bei Abnahme des Blutdruckes die Flüssigkeitsausscheidung zu reduzieren. An diesen Vorgängen sind das sympathische Nervensystem, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sowie ADH und natriuretische Peptide beteiligt.^{59, 63, 113}

4.2 Renale Mechanismen in der Pathogenese experimenteller Hypertonieformen

Die bedeutende Rolle renaler Mechanismen für die Entstehung und Aufrechterhaltung der essentiellen Hypertonie haben Transplantationsstudien gezeigt.¹¹⁷ Durch die Übertragung von Nierentransplantaten Dahl salzsensitiver Ratten auf normotensive Dahl salzresistente Empfänger konnte bei diesen Tieren ein erhöhter arterieller Mitteldruck registriert werden.²⁹ Darüber hinaus führte die Transplantation von Nieren des normotensiven Kontrollstammes in Dahl salzsensitiven Ratten zu einer Blutdrucksenkung.²⁹ Ähnliche Transplantationsstudien wurden mit anderen hypertensiven Rattenmodellen wie Milan hypertensive Ratten, Prague hypertensive Ratten und spontan hypertensive Ratten vorgenommen, in denen durch die Transplantation der Nieren des hypertensiven Rattenstammes auf die normotensiven Empfänger die arterielle Hypertonie übertragen wurde.^{60, 117} Die pharmakologische Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems führt zu einer effektiven Blutdrucksenkung.^{52, 68, 131} Durch Behandlung juveniler SHR mit ACE-Hemmern oder AT₁-Rezeptorantagonisten läßt sich eine langfristige über den Behandlungszeitraum hinausreichende Blutdrucksenkung erzielen.^{52, 68} In Transplantationsexperimenten wurde gezeigt, dass Nierentransplantate von adulten SHR-Spendern, die mit einem ACE-Hemmer behandelt wurden, in den unbehandelten SHR-Empfängern zu einer langfristigen Blutdrucksenkung führten.¹³¹ Diese Daten¹³¹ zeigen, dass die, durch die frühzeitige antihypertensive Intervention erzeugten Veränderungen der Nierenfunktion entscheidend zur langfristigen Blutdrucksenkung durch Blockade des Renin-Angiotensin-Systems während eines begrenzten Zeitraumes in der Postnatalperiode beitragen.

Das sympathische Nervensystem ist an der akuten und chronischen Blutdruckregulation beteiligt. Durch den Einfluss des sympathischen Nervensystems auf das Herzzeitvolumen, den peripheren Gefäßwiderstand und die Nierenfunktion kann der Organismus seinen Blutdruck an ständig wechselnde Bedingungen anpassen. Wechselwirkungen zwischen dem sympathischen Nervensystem und den Nieren sind für die Entwicklung der arteriellen Hypertonie von Bedeutung.^{33, 59} Die Nieren werden über afferente und efferente sympathische Nerven innerviert. Untersuchungen an Rattennieren konnten zeigen, dass sich die afferente Innervation der Nieren um die Geburt entwickelt, während die Entwicklung der efferenten sympathischen Innervierung vor allem während der ersten beiden Postnatalwochen stattfindet.⁹⁰ Durch die gesteigerte Aktivität renaler sympathischer Nerven kommt es zu einer erhöhten renalen Natriumreabsorption im Tubulussystem, zu einer Zunahme des renalen Gefäßwiderstandes mit Verminderung des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate sowie zur gesteigerten Renin-Sekretion, die zur Bildung von Angiotensin II führt.^{33, 34} Durch diese Effekte des sympathischen Nervensystems werden höhere renale Perfusionsdrücke zum Erzielen einer ausreichenden Natriurese und Diurese bei chronischer Überaktivität des sympathischen Nervensystems erforderlich. Diese tragen zu einer langfristigen Blutdruckerhöhung bei.^{33, 34} Bei den spontan hypertensiven Ratten konnten als pathogenetisch wichtige Faktoren in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Hypertonie renale und sympathische Mechanismen nachgewiesen werden.⁵⁹ Gattone et al. demonstrierten, dass neugeborene SHR verglichen mit gleichaltrigen Wistar-Kyoto Ratten höhere renale NoradrenalinKonzentrationen aufweisen.⁵⁰ In Untersuchungen zur Rolle des renalen sympathischen Nervensystems in der Entwicklung der Hypertonie bei SHR wurden Nieren von neonatal sympathektomierten SHR in unbehandelte SHR-Empfänger transplantiert.⁶¹ Diese SHR-Empfänger zeigten eine Abnahme des arteriellen Blutdruckes um 20 mmHg im Vergleich zu SHR mit Nieren von Hydralazin-behandelten SHR-Spendern.⁶¹ Das zeigt, dass das renale sympathische Nervensystem entscheidend an der Entstehung des Bluthochdruckes in SHR beteiligt ist.

4.3 Reaktive Sauerstoffspezies und arterielle Hypertonie

Weitere Untersuchungen legen nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies und einer gesteigerten renalen sympathischen Aktivität in spontan hypertensiven Ratten gibt.¹³⁰ Shokoji et al. konnten zeigen, dass durch die intravenöse Gabe des Superoxiddismutasemimetikums Tempol der arterielle Blutdruck in SHR um 40 mmHg, sowie die Aktivität des renalen sympathischen Nervensystems im Vergleich zu WKY reduziert werden konnte.¹³⁰ In einer von Schlüter et al. veröffentlichten Studie wurde der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die Expression renaler NADPH-Oxidase-Untereinheiten bei SHR untersucht.¹²² Die Studie zeigte, dass bei 10 Wochen alten neonatal sympathektomierten SHR die renomedulläre Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten p47^{phox} und gp91^{phox} um 40 % geringer war, als bei Hydralazin-behandelten SHR.¹²² Außerdem zeigten neonatal sympathektomierte SHR eine 30 % geringere renale kortikale und medulläre NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung, sowie einen signifikant verminderten renalen Gefäßwiderstand im Vergleich zu Hydralazin-behandelten SHR.¹²² Diese Untersuchungen sprechen für eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an den durch das sympathische Nervensystem verursachten Nierenfunktionsänderungen, die zur Hypertonie bei SHR beitragen.^{61, 122}

Zahlreiche Studien demonstrierten, dass vaskuläre und renale reaktive Sauerstoffspezies an der Entstehung der Hypertonie bei SHR beteiligt sind.^{2, 24, 137, 151} In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die frühzeitige Behandlung von SHR mit einer Substanz, die die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung hemmen kann, eine langfristige Blutdrucksenkung induziert. Zu diesem Zweck wurden SHR von der frühen Postnatalperiode bis zur 8. Lebenswoche mit Apocynin behandelt.

Apocynin¹³⁴ ist ein Acetophenon, das die intrazelluläre Translokation der NADPH-Oxidase-Untereinheiten p67^{phox} sowie p47^{phox} und damit die Aktivierung der NADPH-Oxidase beeinträchtigt und wurde in einer Vielzahl von experimentellen Studien in vivo mit dem Ziel der NADPH-Oxidase-Hemmung appliziert.^{128, 135, 148} Der Mechanismus der NADPH-Oxidase-Hemmung durch Apocynin ist noch nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Erkenntnis bezüglich der Aufklärung dieses Mechanismus war die Entdeckung, dass Apocynin über eine Peroxidase-vermittelte Oxidation in ein wirksameres Dimer umgewandelt wird.^{134, 145} Bereits im Jahre 1994 beschrieben Stolk et al., dass für die

Apocynin-vermittelte Hemmung der granulozytären NADPH-Oxidase die Aktivität der Myeloperoxidase erforderlich ist.¹³⁵ Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass Apocynin durch die Myeloperoxidase aktiviert wird, um ein Radikal zu bilden, das die NADPH-Oxidase oxidiert und damit deren Aktivität hemmt.¹³⁴ Aufgrund der Interaktionen zwischen Apocynin mit Untereinheiten, die der Aktivierung bzw. Organisation der NADPH-Oxidase dienen, sollten insbesondere die NADPH-Oxidase-Isoenzyme NOX1 und NOX2 durch Apocynin gehemmt werden, für die die Aktivierung durch zytosolische Untereinheiten von besonderer Bedeutung ist.¹²⁸

Während der Registrierung der Blutdrücke der Apocynin-behandelten SHR konnte keine blutdrucksenkende Wirkung nachgewiesen werden. Die über den Beobachtungszeitraum von der 10. bis 20. Postnatalwoche registrierten Blutdruckanstiege unterschieden sich nicht zwischen postnatal mit Apocynin behandelten und den Kontrolltieren. Die postnatale Behandlung der SHR mit Apocynin hatte langfristig nach Beendigung der Apocyninbehandlung keinen Effekt auf die mit Apocynin auslösbare Vasodilatation und die endothelvermittelte Vasodilatation bei Interlobar- und Koronararterien unter in vitro Bedingungen.

In weiteren Experimenten wurde der kurzfristige Einfluss von Apocynin auf den arteriellen Blutdruck adulter SHR untersucht, indem Apocynin in aufsteigender hoher Dosierung über das Trinkwasser und als intravenöse Infusion verabreicht wurde. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben keinen Hinweis darauf, dass die in vivo Behandlung mit Apocynin den arteriellen Blutdruck in SHR signifikant senkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den Untersuchungen von Paliege et al. überein.¹¹¹ In dieser Studie¹¹¹ wurden 7 Wochen alte SHR über 3 Wochen mit 2,5 mmol/l Apocynin über das Trinkwasser behandelt.¹¹¹ Am Ende des Behandlungszeitraumes zeigten die mit Apocynin behandelten SHR keine statistisch signifikante Abnahme des arteriellen Blutdruckes im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren.¹¹¹ Untersuchungen von Bäumer et al.¹⁵ führten zu einem anderen Ergebnis. Den 10 Wochen alten SHR wurde Apocynin (2 mmol/l) über das Trinkwasser verabreicht und der arterielle Blutdruck der Tiere vom Beginn der Behandlung über 4 Wochen gemessen.¹⁵ Bereits in der ersten Behandlungswoche führte die orale Apocyninbehandlung der SHR zu einer signifikanten Abnahme des arteriellen Blutdruckes um etwa 30 mmHg, verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren.¹⁵ Diese blutdrucksenkende Wirkung wurde auf die Abnahme reaktiver Sauerstoffspezies durch

Hemmung der NADPH-Oxidase, auf eine Verbesserung der NO-Bioverfügbarkeit sowie einer gesteigerten endothelialen NO-Synthase Aktivität zurückgeführt.¹⁵

In beiden Studien erfolgte die Blutdruckmessung unter Verwendung der Schwanz-Plethysmographie.^{15, 111} Hierbei handelt es sich um eine indirekte Methode zur Messung des arteriellen Blutdrucks, bei der eine Blutdruckmanschette an den Schwanz der Ratte platziert und über eine Änderung des Manschettendrucks der Blutdruck registriert wird.⁸⁴ Obwohl die indirekten Methoden zur Blutdruckmessung ein wichtiger und nützlicher Bestandteil bei der Erforschung der experimentellen Hypertonie sind, sollten auch deren Nachteile in Betracht gezogen werden.⁸⁴ Einerseits wird durch die relativ geringe Anzahl von Messungen nicht gewährleistet, dass alle Blutdruckschwankungen genau registriert werden, was dazu führt, dass die durch die Messungen gewonnenen durchschnittlichen Blutdruckdaten nicht die realen Blutdruckwerte widerspiegeln.⁸⁴ Andererseits verursacht das Aufpumpen der Manschette erheblichen Stress bei den Tieren, der zu Störungen im kardiovaskulären und endokrinen System führt, die wiederum Auswirkungen auf den Blutdruck, die Herzfrequenz und die Ausschüttung von Stresshormonen zur Folge haben.⁸⁴ Aus diesen Gründen sollten indirekte Messmethoden nur beschränkt Verwendung in Studien mit speziellen Fragestellungen finden. Besonders Studien, die mögliche Auswirkungen bestimmter Stoffgruppen oder Medikamente auf den Blutdruck quantifizieren, sollten nicht auf indirekte Methoden zur Blutdruckmessung zurückgreifen.⁸⁴

In der vorliegenden Arbeit wurde der arterielle Blutdruck der SHR mit Hilfe von Radiotelemetriesendern gemessen, deren Katheter in der Aorta abdominalis platziert wurde. Trotz des relativ hohen Aufwandes bezüglich der Implantation der Telemetriesender und der Nachsorge der Tiere, zeichnet sich diese direkte Messmethode durch viele Vorteile aus. Unter anderem erlauben die implantierten Radiotelemetriesender eine kontinuierliche, zuverlässige und stressfreie Blutdruckmessung ohne Behinderung der Tiere oder störende von außen angebrachte Apparaturen.⁸⁴ Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Messmethoden zur Erfassung des Blutdruckes ist es schwierig die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Daten der anderen Studien^{15, 111} zu vergleichen. In einer 2005 von Elmarakby et al. veröffentlichten Studie wurde Ratten 12 Tage über einen intravenösen Katheter Endothelin-1 infundiert, dadurch kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes.³⁶ Die Registrierung der

Blutdrücke erfolgte, wie in dieser Arbeit telemetrisch. In der Zeit der intravenösen Behandlung mit Endothelin-1 wurde den Tieren Apocynin in einer Dosierung von 1,5 mmol/l über das Trinkwasser verabreicht.³⁶ Auch in dieser Studie zeigte Apocynin keine statistisch signifikante blutdrucksenkende Wirkung.³⁶

4.4 Untersuchungen zu vasodilatierenden Wirkmechanismen von Apocynin

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und Daten anderer Autoren^{53, 71, 145} lassen vermuten, dass die schnelle vasodilatierende Wirkung von Apocynin, wie sie in vitro beobachtet wird, nicht ausschlaggebend für dessen potentielle antihypertensive Wirkung sein kann, da die für eine effektive Vasodilatation erforderlichen Apocyninkonzentrationen in vivo bei systemischer Applikation nicht annähernd erreicht werden können. Während für die in vitro Untersuchungen Apocyninkonzentrationen im hohen mikromolaren^{71, 135} oder millimolaren⁶⁵ Bereich verwendet werden, werden für in vivo Untersuchungen Apocynindosierungen im millimolaren Bereich eingesetzt,^{15, 36, 111, 145} bei denen damit wesentlich geringere Konzentrationen am Wirkort erreicht werden als in vitro.⁵³ Untersuchungen an Ratten konnten zeigen, dass bei einer intragastrisch applizierten Apocynindosis von 1 mmol/kg 97 % des Apocynins und seiner Metabolite rasch renal eliminiert werden, wobei Apocynin zu 80 % unverändert ausgeschieden wird.⁵³

Die vasodilatierende Wirkung von Apocynin wurde in mehreren Studien demonstriert und mit einer NADPH-Oxidase-hemmenden Wirkung interpretiert.^{15, 65, 87, 128, 134, 148} Bisher wurde aber nicht eindeutig gezeigt, dass die vasodilatierende Wirkung von Apocynin auf einer NADPH-Oxidase-Hemmung beruht. Daher wurden in dieser Arbeit weiterführende Untersuchungen zu vasodilatierenden Wirkmechanismen von Apocynin an isolierten Gefäßen normotensiver Ratten und genetisch modifizierter Mäuse durchgeführt.

Stickstoffmonoxid, reaktive Sauerstoffspezies und hyperpolarisierende Effekte

In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob die Apocynin-induzierte Vasodilatation über den Einfluss auf die NO-Bioverfügbarkeit, über einen Antagonismus vasokonstriktorischer Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies oder durch hyperpolarisierende Effekte vermittelt wird. Ergebnisse pharmakologischer Untersuchungen an isolierten menschlichen

Blutgefäßen und an Rattenarterien wurden von den Autoren dahingehend interpretiert, dass die Bildung NADPH-Oxidase-abhängiger Superoxidanionen durch Apocynin akut gehemmt und die endothelvermittelte Vasodilatation sowie die NO-Bildung verstärkt werden.⁶⁵ Dabei wurden in dieser Studie von Hamilton et al. ähnliche Apocyninkonzentrationen, wie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Unter der Zugabe des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME reagierten die Gefäße mit einer signifikanten Zunahme der Phenylephrin-vermittelten Kontraktionsantwort.⁶⁵ Die Ergebnisse dieser Studie, stimmen mit den Daten der vorliegenden Arbeit nur partiell überein. Die Inkubation der Gefäßsegmente mit L-NAME führte zu einer nur unvollständigen Aufhebung der Apocynin-induzierten Vasodilatation. Dies zeigt, dass die Apocynin-vermittelte Vasodilatation größtenteils von der endothelialen NO-Synthese unabhängig ist. Durch die Behandlung der renalen Interlobar- und Koronararterien von F344 Ratten mit dem Superoxidanionenfänger Tiron, Katalase und Kalium konnte die Apocynin-vermittelte Vasodilatation nicht signifikant gehemmt werden. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Apocynin-induzierte Vasodilatation in Interlobar- und Koronararterien nicht wesentlich durch eine Hemmung ROS-abhängiger Mechanismen und durch hyperpolarisierende Effekte vermittelt wird. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Apocynin als potenter Hemmer der NADPH-Oxidase fungiert, indem es die Bindung der p47^{phox}-Untereinheit an die gp91^{phox}-Untereinheit verhindert.^{134, 135, 148} Heumüller et al. konnten nachweisen, dass Apocynin die NADPH-Oxidase in HEK(Human Embryonic Kidney)-Zellen nicht hemmt.⁷¹ In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die vasodilatierenden Wirkmechanismen von Apocynin durch eine Hemmung NADPH-Oxidase-abhängiger Sauerstoffradikale vermittelt werden. Dazu wurden Untersuchungen mit dem NADPH-Oxidase-Hemmer VAS2870 und mit p47^{phox}^{-/-} Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die vasodilatierende Wirkung von Apocynin nicht über eine Hemmung NADPH-Oxidase-abhängiger Sauerstoffradikale vermittelt wird. Die Behandlung der Aortenringe des Knock-out Mäusestammes mit Apocynin zeigte zudem eine ausgeprägtere vasodilatierende Wirkung, als die Aortenringe der Wildtyp-Kontrollen. Dies weist darauf hin, dass die NADPH-Oxidase-abhängigen Sauerstoffradikale die Apocynin-induzierte Vasodilatation antagonisieren. Schlüter et al. demonstrierten, dass durch die Inkubation humaner Granulozyten mit 300 µmol/l Apocynin sowie die Behandlung mit dem NADPH-Oxidase-Hemmer VAS2870 die NADPH-Oxidase-Aktivität effektiv gehemmt wurde.¹²³ Versuche an kleinen intrarenalen Arteriensegmenten und Aorten von SHR und F344 Ratten konnten zeigen,

dass weder die Behandlung mit Apocynin noch mit VAS2870 die NADPH-Oxidase-abhängige Bildung von Superoxidanionen hemmen, wenn nicht hohe Mengen Peroxidaseaktivität exogen zugesetzt werden.¹²³ Studiendaten von in vivo und in vitro Untersuchungen über die vaskuläre Funktion von Apocynin bezüglich der NADPH-Oxidase-Hemmung sollten kritisch betrachtet werden, da ein großer Teil der vasodilatierenden Wirkung nicht der Interaktion mit den NADPH-Oxidase-Untereinheiten zuzuschreiben ist.

Alternative Mechanismen der Apocynin-induzierten Vasodilatation

Da in dieser Arbeit ein Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Apocynin-vermittelte Vasodilatation ausgeschlossen wurde, erfolgten weitere Experimente zur Untersuchung alternativer Mechanismen, die der vaskulären Wirkung von Apocynin unterliegen. Unter anderem wurden Experimente zu den Wechselwirkungen von Apocynin mit extrazellulärem Kalzium an renalen Interlobararterien von F344 Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten zeigen, dass durch die Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium die vasodilatierende Wirkung von Apocynin nicht signifikant gehemmt wurde. Das lässt darauf schließen, dass die Apocynin-induzierte Vasodilatation nicht über diese Mechanismen vermittelt wird.

Weitere Experimente zur vasodilatierenden Wirkung von Apocynin wurden mit Proteinkinase A- und Proteinkinase G-Inhibitoren durchgeführt. Proteinkinasen sind Enzyme, durch deren Fähigkeit Proteine zu phosphorylieren, zahlreiche intrazelluläre Signaltransduktionswege reguliert werden. Während die Proteinkinase A durch das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert wird,¹⁰³ wird die Aktivität der Proteinkinase G über das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) gesteuert.^{102, 121} Die intrazellulären Botenstoffe cAMP und cGMP werden mit Hilfe der Enzyme Adenylatzyklase und Guanylatzyklase aus ATP bzw. GTP gebildet und so deren Konzentrationen an die Erfordernisse in der Zelle angepasst. Besondere Bedeutung haben die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen in der Regulation des Tonus glatter Gefäßmuskelzellen.^{102, 103, 121} In der vorliegenden Arbeit wurden renale Interlobar- und Koronararterien mit Proteinkinase A- und G-Inhibitoren inkubiert und deren Einfluss auf die vasodilatierende Wirkung von Apocynin untersucht. Die mit dem PKA-Inhibitor behandelten Gefäße sowie die mit dem PKG-Inhibitor inkubierten Arteriensegmente reagierten wie die unbehandelten Kontrollgefäße auf die Zugabe von Apocynin mit einer

deutlichen Vasodilatation. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Apocynin-induzierte Vasodilatation nicht oder kaum durch Interferenz mit Proteinkinase A- und Proteinkinase G-abhängigen Signaltransduktionswegen vermittelt wird.

Die aktivierten Rho-Kinasen spielen eine besondere Bedeutung als zentrale Regulatoren der Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen.¹¹⁶ Rho-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen, die durch die Phosphorylierung der Myosinleichtketten-Phosphatase die Ca^{2+} -Empfindlichkeit des kontraktile Apparates der glatten Muskulatur steigern.^{81, 116} Erkenntnisse über die physiologischen Funktionen der Rho-Kinasen wurden in zahlreichen pharmakologischen Experimenten unter Verwendung der Rho-Kinase-Inhibitoren Y-27632 und Fasudil gewonnen.¹¹⁶ Auch in dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen zur vasodilatierenden Wirkung von Apocynin unter Einsatz des Rho-Kinase-Hemmers Y-27632. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen haben gezeigt, dass durch die Behandlung mit dem Rho-Kinase-Hemmer Y-27632 die Vasopressin-induzierte Vasokonstriktion von Interlobararterien abgeschwächt wurde. Die gleichzeitige Behandlung mit Apocynin hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die Wandspannung, so dass nahelegt, dass Apocynin vermutlich einen Einfluss auf die Rho-Kinase-Inhibition hat. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen geben einen Hinweis darauf, dass Apocynin einen intakten RhoA/Rho-Kinase Signaltransduktionsweg benötigt, um seine vasodilatierende Wirkung zu entfalten und den Gefäßtonus zu beeinflussen. Ergänzende Western Blot Untersuchungen von Schlüter et al. demonstrierten, dass die Rho-Kinase-Aktivität in aortalem Gewebe durch Vasopressin aktiviert und durch die Behandlung mit Apocynin die Vasopressin-vermittelte Rho-Kinase-Aktivierung vermindert wird.¹²³

4.5 Schlussfolgerungen

Ein unzureichend eingestellter Blutdruck gehört zu den führenden Todesursachen weltweit und ist jährlich für 7 Millionen Todesfälle verantwortlich.¹¹⁴ Diese werden vor allem durch die mit einer arteriellen Hypertonie einhergehenden kardiovaskulären Komplikationen wie Schlaganfall, Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz oder koronare Herzerkrankung ausgelöst. Um diese Risiken zu minimieren ist eine frühzeitige Erkennung und gezielte Behandlung der manifesten Hypertonie von besonderer Bedeutung. Zur effektiven Behandlung der Hypertonie stehen heute verschiedene Arzneistoffgruppen zu denen die

β -Blocker, ACE-Hemmer, AT_1 -Antagonisten, Kalziumantagonisten, Diuretika sowie die Renin-Inhibitoren zählen, zur Verfügung.³² Die Wahl der antihypertensiven Therapie sollte auf jeden Patienten individuell abgestimmt werden. Bereits eine Reduktion des systolischen Blutdruckes um 10 mmHg führt zu einer etwa 20-25%igen Abnahme bedeutender kardiovaskulärer Ereignisse (Schlaganfall, koronare Herzerkrankung).¹¹⁴ Um diesen gefürchteten kardiovaskulären Komplikationen präventiv entgegenzuwirken sollten blutdrucksenkende Medikamente mit neuen therapeutischen Angriffspunkten erforscht und etabliert werden. Ob die NADPH-Oxidasen hierfür geeignete Angriffspunkte sein können ist derzeit unsicher. Jedoch haben einige in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen etablierte Substanzen wie Statine, ACE-Hemmer, AT_1 -Rezeptorantagonisten¹²⁸ und der β -Blocker Nebivolol¹³³ pleiotrope Effekte, die die Bildung und Bioverfügbarkeit reaktiver Sauerstoffspezies reduzieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Substanz Apocynin, die NADPH-Oxidase-hemmende Eigenschaften besitzt, keinen Effekt auf den langfristigen Blutdruck spontan hypertensiver Ratten hat. Untersuchungen an isolierten Gefäßsegmenten ergaben, dass Apocynin die vaskuläre NADPH-Oxidase-Aktivität nicht hemmt. Die Apocyninwirkungen auf das Gefäßsystem sind zumindest teilweise auf die Hemmung der ROCK-Aktivierung zurückzuführen.

5 Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie stellt eine oft schleichend beginnende und häufig über viele Jahre unbemerkt verlaufende Erkrankung dar, die bei langjährigem Bestehen schwerwiegende renale, kardiale und vaskuläre Folgeerkrankungen nach sich zieht. Obwohl heute effektive Behandlungsstrategien etabliert sind, können Patienten mit schwer einstellbarer Hypertonie häufig nicht von diesen Therapien profitieren. Aus diesem Grund sollten in Zukunft neue therapeutische Ansatzpunkte bei der Behandlung der Hypertonie in Betracht gezogen werden. Zahlreiche Studien liefern Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie der Hypertonie. Besonders NADPH-Oxidase-abhängige Sauerstoffradikale wurden als wichtige krankheitserzeugende Faktoren in der Entwicklung und Aufrechterhaltung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie der arteriellen Hypertonie identifiziert und Substanzen erforscht, die zu experimentellen und therapeutischen Zwecken die NADPH-Oxidase-Aktivität hemmen. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, durch frühzeitige Behandlung spontan hypertensiver Ratten mit einer Substanz, die NADPH-Oxidase-hemmende Eigenschaften hat, eine langfristige Blutdrucksenkung und eine Verbesserung der endothelvermittelten Vasodilatation zu erreichen. Dazu wurde eine Gruppe von 8 SHR über das Trinkwasser mit dem NADPH-Oxidase-Hemmer Apocynin behandelt und mit Hilfe der Radiotelemetrie der systolische, diastolische Blutdruck sowie die Herzfrequenz registriert. Die Apocynin-behandelten SHR wurden mit einer Gruppe von 6 unbehandelten SHR-Kontrolltieren verglichen. Neben diesen Experimenten wurden Untersuchungen zur Endothelfunktion Apocynin-behandelter SHR an isolierten renalen Interlobar- und Koronararterien und zur vasodilatierenden Wirkung von Apocynin an Interlobar- und Koronararterien von F344 Ratten mit einem Small-Vessel-Myographen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Behandlung der SHR mit Apocynin bis zur 8. Lebenswoche keine langfristige Blutdrucksenkung zur Folge hatte. Der Vergleich beider Gruppen hinsichtlich der Blutdrücke ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Untersuchungen zur endothelvermittelten Vasodilatation mit Acetylcholin an isolierten renalen Interlobar- und Koronararterien Apocynin-behandelter und unbehandelter SHR zeigten, dass durch die Behandlung der SHR mit Apocynin keine Verbesserung der renalen und koronaren Endothelfunktion im Vergleich zu den Kontrollen resultierte. Die Experimente zur Klärung der Mechanismen, die die vasodilatierende Wirkung von Apocynin vermitteln ergaben, dass durch die Hemmung der NADPH-

Oxidase-abhängigen Sauerstoffradikale, durch die Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium, durch Kalium und durch die Inhibition der Proteinkinase A und G die Apocynin-induzierte Vasodilatation nicht signifikant gehemmt wurde. Durch die Inkubation der Arteriensegmente mit dem Rho-Kinase-Hemmer Y-27632 wurde die Vasopressin-induzierte Vasokonstriktion signifikant abgeschwächt und die kumulative Zugabe von Apocynin zeigte keine zusätzliche Wirkung auf die Wandspannung. Diese Ergebnisse belegen, dass die renalen Interlobar- und Koronararterien von SHR und F344 Ratten auf Apocynin mit einem ausgeprägten Dilatationsverhalten reagierten, die Vasodilatation jedoch nicht über eine Hemmung der NADPH-Oxidase, vermutlich aber über eine Hemmung der Rho-Kinase vermittelt wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Adelstein RS, Klee CB. Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol. Chem.* 1981; 256: 7501-7509.
2. Adler S, Huang H. Oxidant stress in kidneys of spontaneously hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 287: F907-F913.
3. Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K. The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *J Biol Chem.* 1999; 274: 32418-32424.
4. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res.* 2000; 261: 44-51.
5. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho kinase). *J Biol Chem.* 1996; 271: 20246-20249.
6. Arnold S, Kadenbach B. Stress modifiziert den Energiemetabolismus und verursacht Krankheiten. *BIOspektrum.* 2003; 9: 704-706.
7. Assary T. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol.* 2006; 5: 4.
8. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological Defense Mechanisms. The Production by Leukocytes of superoxide, A Potential Bacterial Agent. *J Clin Invest.* 1973; 52(3): 741-744.
9. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 397: 342-344.
10. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999; 93: 1464-1476.
11. Badyal DK, Lata H, Dadhich AP. Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian Journal of Pharmacology.* 2003; 35: 349-362.
12. Bai Y, Ye S, Mortazavi R, Campese V, Vaziri ND. Effect of renal injury-induced neurogenic hypertension on NO synthase, caveolin-1, AKt, calmodulin and soluble guanylate cyclase expressions in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292: F974-F980.
13. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demarex N, Krause KH. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *Journal of Biological Chemistry.* 2001; 276(40): 37594-37601.

14. Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension*. 1989; 13: 968-972.
15. Bäumer A, Krüger CA, Falkenberg J, ten Freyhaus H, Rösen R, Fink K et al. The NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin improves endothelial NO/superoxide balance and lowers effectively blood pressure in spontaneously hypertensive rats: comparison to calcium channel blockade. *Clin Exp Hypertens*. 2007; 29: 287-299.
16. Beck K-F, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Meßmer UK, Mühl H, Pfeilschifter J. Inducible NO synthase: role in cellular signaling. *The Journal of Experimental Biology*. 1999; 202: 645-653.
17. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci*. 1990; 87(4): 1620-4.
18. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 1998; 78(2):547-581.
19. Bevers LM, Braam B, Post JA, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, Verhaar MC, Joles JA. Tetrahydrobiopterin, but not L-Arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*. 2006; 47: 87-94.
20. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Blood pressure-dependent and independent effects of agents that inhibit the renin-angiotensin system. *J Hypertens*. 2007; 25: 951-958.
21. Bönner G. Normalwerte des Blutdruckes und Schweregrade der Hypertonie bei Erwachsenen. In: Rosenthal J und Kolloch R. Arterielle Hypertonie. Berlin Heidelberg 2004: 21-29.
22. Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care*. 2008; 31: S181-S184.
23. Cheng G, Ritsick DR, Lambeth JD. Nox3 regulation by Nox1, p47^{phox} and p67^{phox}. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 34250-34255.
24. Chu Y, Iida S, Lund DD, Weiss RM, DiBona GF, Watanabe Y et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. Role of heparin-binding domain. *Circ Res*. 2003; 92: 461-468.
25. Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*. 2006; 71(2): 216-225.

26. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu. Rev. Med.* 1997; 48: 489-509.
27. Curnutte JT. Superoxide production by phagocytic leukocytes: the scientific legacy of Bernard Babior. *J Clin Invest.* 2004; 114(8): 1054-1057.
28. Curnutte JT, Whitten DM, Babior BM. Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 1974; 290(11): 593-7.
29. Dahl LK, Heine M, Thomson K. Genetic influence of the kidneys on blood pressure. *Circ Res.* 1974; 34: 94-101.
30. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Kukai M, Ishizaka N, Griending KK. Tumor necrosis factor α activates a p22^{phox} based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J.* 1998; 329: 653-657.
31. De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griending KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state. *Circ Res.* 1998; 82: 1094-1101.
32. Deutsche Hypertonie Gesellschaft. Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten.* 2009; 38(4): 137-188.
33. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev.* 1997; 77: 75-197.
34. DiBona GF. The sympathetic nervous system and hypertension. *Hypertension.* 2004; 43: 147-150.
35. Duerschmidt N, Stielow C, Muller G, Pagano PJ, Morawietz H. NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *J Physiol.* 2006; 576(2): 557-567.
36. Elmarakby AA, Loomis ED, Pollock JS, Pollock DM. NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. *Hypertension.* 2005; 45:283-287.
37. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 1983-1992.
38. Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol.* 2003; 138(4): 532-543.
39. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 2004; 25: 581-611.
40. Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 2000; 476: 52-54.

41. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987; 235: 442-447.
42. Folkow B. Hypertensive structural changes in systemic precapillary resistance vessels: how important are they for in vivo haemodynamics? *Journal of Hypertension*. 1995; 13: 1546-1559.
43. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol*. 2008; 130: 55-70.
44. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994; 23: 1121-1131.
45. Furchgott RF, Zawadzki JV. Acetylcholine relaxes arterial smooth muscle by releasing a relaxing substance from endothelial cells. *Fed Proc*. 1980; 38: 581.
46. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-376.
47. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993; 123: 1777-1788.
48. Gaboury JP, Niu XF, Kubes P. Nitric oxide inhibits numerous features of mast cell-induced inflammation. *Circulation*. 1996; 93(2): 318-326.
49. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989; 83(5): 1774-1777.
50. Gattone VH, Evan AP, Overhage JM, Severs WB. Developing renal innervation in the spontaneously hypertensive rat: evidence for a role of the sympathetic nervous system in renal damage. *J Hypertens*. 1990; 8: 423-8.
51. Giavazzi R, Sennino B, Coltrini D, Garofalo A, Dossi R, Ronca R, Molinari Tosatti MP, Presta M. Distinct role of Fibroblast Growth Factor-2 and Vascular Endothelial Growth Factor on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol*. 2003; 162: 1913-1926.
52. Gillies LK, Lu M, Wang H, Lee RMKW. AT1 receptor antagonist treatment caused persistent arterial functional changes in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 30: 1471-1478.
53. Gjertsen FB, Solheim E, Scheline RR. Metabolism of plant ketones in rats: acetovanillone and paeonol. *Xenobiotica*. 1988; 18: 225-234.
54. Goldschmidt-Clermont PJ, Moldovan L. Stress, superoxide, and signal transduction. *Gene Expr*. 1999; 7: 255-260.

55. Griendling KK, Lyle AN. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology*. 2006; 21: 269-280.
56. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994; 74: 1141-1148.
57. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000; 86:494-501.
58. Grisk O, Frauendorf T, Schlüter T, Klötting I, Kuttler B, Krebs A, Lüdemann J, Rettig R. Impaired coronary function in Wistar Ottawa Karlsburg W rats – a new model of the metabolic syndrome. *Pflügers Arch – Eur J Physiol*. 2007; 454: 1011-1021.
59. Grisk O, Rettig R. Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004; 61: 238-246.
60. Grisk O, Rettig R. Renal transplantation studies in genetic hypertension. *News Physiol Sci*. 2001; 16: 262-265.
61. Grisk O, Rose H-J, Lorenz G, Rettig R. Sympathetic-renal interaction in chronic arterial pressure control. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; 283: R441-R450.
62. Grossmann E. Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care*. 31: S185-S189.
63. Guyton AC. Blood pressure control - special role of the kidneys and body fluids. *Science*. 1991; 252: 1813-1816.
64. Guyton AC. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol*. 1990; 259: R 865-77.
65. Hamilton CA, Brosnan MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*. 2002; 40: 755-762.
66. Hancock JT. Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules: Their production and role in disease. *Br J Biomed Sci*. 1997; 54: 38-46.
67. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(11):7124-7128.
68. Harrap SB, Van der Merwe WM, Griffin SA, Macpherson F, Lever AF. Brief angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in young spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure long-term. *Hypertension*. 1990; 16: 603-614.
69. Hartshorne DJ, Ito M, Erdödi F. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*. 1998; 19: 325-341.

70. Henderson LM, Chappell JB, Jones OTG. The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel. *Biochem J*. 1987; 246: 325-329.
71. Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HHHW, Busse R, Schröder K et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular reduced nicotin-amide dinucleotide phosphate oxidases but an antioxidant. *Hypertension*. 2008; 51: 211-217.
72. Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: The role of rac proteins. *Circ Res*. 2006; 98: 453-462.
73. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci*. 1987; 84(24): 9265-9269.
74. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: role of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001; 38: 581.
75. Introna M, Mantovani A. Early activation signals in endothelial cells: stimulation by cytokines. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997; 17: 423-428.
76. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *The EMBO Journal*. 1996; 15: 1885-1893.
77. Janssen-Heininger YMW, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, Stamler JS, Rhee SG, van der Vliet A. Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 45(1):1-17.
78. Johnston RB, Keele BB, Misra HP, Lehmeyer JE, Webb LS, Baehner RL, Rajagopalan KV. The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. *J Clin Invest*. 1975; 55: 1357-1372.
79. Kamm KE, Stull JT. Activation of smooth muscle contraction: relation between myosin phosphorylation and stiffness. *Science*. 1986; 232: 80-82.
80. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res*. 1977; 3(1): 23-35.

81. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho kinase). *Science*. 1996; 273: 245-248.
82. Kourie JJ. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1998; 275: C1-C24.
83. Krijnen PAJ, Meischl C, Hack CE, Meijer CJLM, Visser CA, Roos D, Niessen HWM. Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. *J Clin Pathol*. 2003; 56: 194-199.
84. Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE. Recommendations for blood pressure measurements in humans and experimental animals. Part 2: blood pressure measurements in experimental animals. *Hypertension*. 2005; 45: 299-310.
85. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox und Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(3): 319-331.
86. Landmesser U, Dikalov S, Russ Price S, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest*. 2003; 111: 1201-1209.
87. Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* . 2003; 285: R277–R297.
88. Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth D, Griendling KK. Novel gp91^{phox} homologues in vascular smooth muscle cells: Nox1 mediates Angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*. 2001; 88: 888-894.
89. Lee RM, Triggle CR, Cheung DW, Coughlin MD. Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1987; 10: 328-338.
90. Liu L, Barajas L. The rat renal nerves during development. *Anat Embryol*. 1993; 188: 345-61.
91. Lloyd-Jones DM, Leip EP, Larson MG, Vasan RS, Levy D. Novel approach to examining first cardiovascular events after hypertension onset. *Hypertension*. 2005; 45: 39-45.
92. Loirand G, Guérin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*. 2006; 98: 322-334.
93. Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front Biosci*. 2008; 13: 5323-5344.

94. Lund-Johansson P. Haemodynamics in essential hypertension. *Clin Sci*. 1980; 59: 343-354.
95. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993; 268(17): 12231-12234.
96. Masuo M, Reardon S, Ikebe M, Kitazawa T. A novel mechanism for the Ca^{2+} - sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Gen Physiol*. 1994; 104: 265-286.
97. Maturana A, Krause KH, Demaurex N. NOX family NADPH oxidases: Do they have built-in proton channels? *J Gen Physiol*. 2002; 120: 781-786.
98. Miller WL, Redfield MM, Burnett JC. Integrated cardiac, renal and endocrine actions of endothelin. *J. Clin. Invest*. 1989; 83: 317-320.
99. Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*. 1994; 266: H2568-H2572.
100. Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of Angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*. 2002; 90: e58-e65.
101. Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput*. 2008; 46: 461-467.
102. Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*. 2006; 355: 2003-2011.
103. Murray KJ. Cyclic AMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacology and Therapeutics*. 1990; 47: 329-345.
104. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters*. 1996; 392: 189-193.
105. Nistala R, Whaley-Connell A, Sowers JR. Redox control of renal function and hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(12): 2047-2089.
106. Nohria A, Grunert ME, Rikitake Y, Noma K, Prsic A, Ganz P, Liao JK, Creager MA. Rho kinase inhibition improves endothelial function in human subjects with coronary artery disease. *Circ Res*. 2006; 99: 1426-1432.
107. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn*

- Circ J.* 1963; 27: 282-93.
108. Okamoto K. Spontaneous hypertension in rats. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1969; 7: 227-270.
 109. Ortiz PA, Garvin JL. Superoxide stimulates NaCl absorption by the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283: F957-F962.
 110. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1): 315-424.
 111. Paliege A, Parsumathy A, Mizel D, Yang T, Schnermann J, Bachmann S. Effect of apocynin treatment on renal expression of COX-2, NOS1 and renin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *AM J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 290: R649-R700.
 112. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988; 333: 664-6.
 113. Paul M, Mehr A, Kreutz R. Physiology of local Renin-Angiotensin System. *Physiol Rev.* 2006; 86: 747-803.
 114. Perkovic V, Huxley R, Yangfeng W, Prabhakaran D, MacMahon S. The burden of blood pressure-related disease. *Hypertension.* 2007; 50: 991-997.
 115. Pfitzer G. Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol.* 2001; 91: 497-503.
 116. Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology.* 2009; 24: 342-356.
 117. Rettig R, Grisk O. The kidney as a determinant of genetic hypertension: evidence from renal transplantation studies. *Hypertension.* 2005; 46: 463-468.
 118. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 1999; 31(2):53-9.
 119. Roba JL. The use of spontaneously hypertensive rats for the study of anti-hypertensive agents. *Lab. Animal Sci.* 1976; 26: 305-319.
 120. Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by Angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of Angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1845-1851.
 121. 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

122. Schlüter T, Grimm R, Steinbach A, Lorenz G, Rettig R, Grisk O. Neonatal sympathectomy reduces NADPH oxidase activity and vascular resistance in spontaneously hypertensive rat kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 291: R391-R399.
123. Schlüter T, Steinbach AC, Steffen A, Rettig R, Grisk O. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH-Oxidase inhibition. *Cardiovasc Res*. 2008; 80(2): 271-9.
124. Schmidt K, Werner ER, Mayer B, Wachter H, Kukovetz WR. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *Biochem. J*. 1992; 281: 297-300.
125. Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase-mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*. 1998; 32: 59-64.
126. Scott-Burden T. Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 1995; 91: 248-250.
127. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*. 1993; 87: V51-V55.
128. Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HHHW, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: Molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther* 120. 2008: 254-291.
129. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp*. 2007; 55(2): 61-75.
130. Shokoji T, Nishiyama A, Fujisawa Y, Hitomi H, Kiyomoto H, Takahashi N, Kimura S, Kohno M, and Abe Y. Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003; 41: 266-273.
131. Smallegange C, Kline RL, Adams MA. Transplantation of enalapril-treated kidneys confers persistent lowering of arterial pressure in SHR. *Hypertension*. 2003; 42: 932-936.
132. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, Rho kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*. 2000; 522: 177-185.
133. Sorrentino SA, Doerries C, Manes C, Speer T, Dessy C, Lobysheva I, Mohmand W, Akbar R, Bahlmann F, Besler C, Schaefer A, Hilfiker-Kleiner D, Lüscher TF, Balligand JL, Drexler H, Landmesser U. Nebivolol exerts beneficial effects on

- endothelial function, early endothelial progenitor cells, myocardial neovascularization, and left ventricular dysfunction early after myocardial infarction beyond conventional β_1 -blockade. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57: 601-11.
134. Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: Molecular Aptitudes. *Mediators Inflamm*. 2008; 2008: 106507.
 135. Stolk J, Hiltermann TJN, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994; 11: 95-102.
 136. Sun C, Sellers KW, Sumners C, Raizda MK. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res*. 2005; 96: 659-666.
 137. Suzuki H, Swee A, Zweifach BW, Schmidt-Schönberg GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats: hydroethidine microfluorography. *Hypertension*. 1995; 25: 1083-1089.
 138. Takahashi N, Tuiki H, Saya H, Kaibuchi K. Localization of the gene coding for ROCK II/ Rho kinase on human chromosome 2p24. *Genomics*. 1999; 55: 235-237.
 139. Tatham AL, Grabtree MJ, Warrick N, Cai S, Alp NJ, Channon KM. GTP cyclohydrolase I expression, protein, and activity determine intracellular Tetrahydrobiopterin levels, independent of GTP cyclohydrolase feedback regulatory protein expression. *J Biol Chem*. 2009; 284: 13660-13668.
 140. Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280: H2482-H2488.
 141. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: Cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 10417-10422.
 142. Touyz RM, Paravicini TM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2006; 71: 247-258.
 143. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. What is the clinical significance? *Hypertension*. 2004; 44: 248-252.
 144. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circ*. 2002; 105: 546-549.
 145. Wang Q, Smith RE, Luchtefeld R, Sun AY, Simonyi A, Luo R, Sun GY. Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not

- diapocynin. *Phytomedicine*. 2008; 15: 496-503.
146. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *ADV Physiol Educ*. 2003; 27: 201-206.
 147. Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 289: R913-R935.
 148. Williams HC, Griendling KK. NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; 50: 9-16.
 149. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, et. al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European Countries, Canada, and the United States. *JAMA*. 2003; 289: 2363-2369.
 150. Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: Role of NAD(P)H Oxidase. *Hypertension*. 2001; 38: 1395-1399.
 151. Zhan CD, Sindhu RK, Vaziri ND. Up-regulation of kidney NAD(P)H oxidase and calcineurin in SHR: reversal by lifelong antioxidant supplementation. *Kidney Int*. 2004; 65:219-227.
 152. Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: the complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*. 2006; 281(23): 15694-15700.
 153. Zhou XJ, Vaziri ND, Wang XQ, Silva FG, Laszik Z. Nitric oxide synthase expression in hypertension induced by inhibition of glutathione synthase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002; 300: 762-767.

7 Publikation

Schlüter T, Steinbach AC, Steffen A, Rettig R, Grisk O. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. *Cardiovascular Research*. 2008; 80: 271-279.