

Aus dem Institut für Physiologie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Rettig)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:

**Auswirkungen der sympathischen Denervierung auf die Abhängigkeit des
Gefäßtonus kleiner Arterien von reaktiven Sauerstoffspezies und auf die
vaskuläre NADPH-Oxidaseaktivität**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2015

vorgelegt von:
André Ramm
geb. am: 24.06.1987
in: Neubrandenburg

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Olaf Grisk

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Rudolf Schubert

Ort, Raum: Karlsburg, SR 204 der Institute für Pathophysiologie und Physiologie

Tag der Disputation: 30.11.2015

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| I. Inhaltsverzeichnis | 1 |
| II. Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| 1. Einleitung | 8 |
| 2. Material und Methoden | 21 |
| 2.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung..... | 21 |
| 2.2 Neonatale Sympathektomie | 21 |
| 2.3 Katherisierung der Arteria femoralis | 23 |
| 2.4 Intraarterielle Blutdruck- und Herzfrequenzmessung..... | 24 |
| 2.5 Gewinnung des Untersuchungsmaterials | 24 |
| 2.5.1 Organentnahme | 24 |
| 2.5.2 Gefäßpräparation..... | 25 |
| 2.6 Small-Vessel-Draht-Myographie | 27 |
| 2.6.1 Prinzip der Drahtmyographie und Kalibrierung..... | 27 |
| 2.6.2 Normalisierungsprozedur | 28 |
| 2.6.3 Konzentrationswirkungskurven..... | 30 |
| 2.6.4 Versuchsprotokolle der Myographie-Experimente | 32 |
| 2.7 NADPH-Oxidase mRNA-Gehalt | 34 |
| 2.7.1 Einführung..... | 34 |
| 2.7.2 RNA-Isolation | 34 |
| 2.7.3 DNase I - Verdau | 35 |
| 2.7.4 cDNA-Synthese..... | 35 |
| 2.7.5 real-time-RT-PCR | 36 |
| 2.8 Die luminometrische Bestimmung der Superoxidbildung..... | 40 |
| 2.8.1 Prinzip | 40 |
| 2.8.2 Versuchsansatz und Versuchsdurchführung..... | 41 |
| 2.9 Geräte und Materialien | 43 |
| 2.10 Statistische Auswertung | 47 |
| 3. Ergebnisse | 49 |
| 3.1 Charakteristika der Versuchstiere | 49 |
| 3.1.1 Alter und Körpergewicht | 49 |
| 3.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz | 49 |
| 3.2 Maximale Wandspannung Kalium-induzierter Kontraktion | 51 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.3 | Vasokonstriktion..... | 52 |
| 3.3.1 | Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die erhöhte Noradrenalin-sensitivität arterieller Widerstandsgefäße sympathektomierter Tiere | 52 |
| 3.3.2 | Bedeutung α_1 - und α_2 -Adrenonrezeptor-vermittelter Prozesse an der Denervierungssupersensitivität | 59 |
| 3.4 | Vasodilatation | 64 |
| 3.4.1 | Einführung..... | 64 |
| 3.4.2 | Endothelabhängige Vasodilatation mit und ohne Tironeinfluss | 64 |
| 3.4.3 | Endothelunabhängige Vasodilatation mit und ohne Tironeinfluss..... | 66 |
| 3.5 | Effekte von Wasserstoffperoxid auf die Gefäßwandspannung renaler Widerstandsarterien | 69 |
| 3.6 | NADPH-Oxidase mRNA Gehalte | 71 |
| 3.6.1 | mRNA Gehalt der NADPH-Oxidase Isoformen in intrarenalen Arterien. | 71 |
| 3.6.2 | mRNA Expression der NADPH-Oxidase Isoformen in mesenterialen Arterien | 74 |
| 3.7 | NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung | 76 |
| 4. | Diskussion | 79 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 98 |
| III. | Literaturverzeichnis | 100 |
| IV. | Eidesstattliche Erklärung | 120 |
| V. | Lebenslauf | 121 |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------|--|
| α | Alpha |
| A. | Arteria |
| Aa. | Arteriae |
| Abb. | Abbildung |
| ACE | Angiotensin-Converting-Enzym |
| Ach | Acetylcholin |
| ADH | Adiuretin/ Antidiuretisches Hormon |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AG | Aktiengesellschaft |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ANG I | Angiotensin I |
| ANG II | Angiotensin II |
| ANP | Atriales natriuretisches Peptid |
| Anti-NGF | Antikörper gegen den Nerve Growth Factor |
| AP-1 | Aktivator Protein-1 |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ANP | atriales natriuretisches Peptid |
| ATPase | Adenosintriphosphatase |
| AT ₁ -Rezeptor | Subtyp 1 des Angiotensin-Rezeptors |
| β | Beta |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| Ca ²⁺ | Kalziumion |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CaCl ₂ •2H ₂ O | Kalziumchloriddihydrat |
| cDNA | zyklische Desoxyribonukleinsäure |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| Co KG | Compagnie Kommanditgesellschaft |
| CTR | Kontrollgruppe |
| CYP P450 | Cytochrom P450 |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNase | Desoxyribonuklease |

| | |
|-----------------|---|
| DUOX | Dual-Oxidase als Isoform der NADPH-Oxidase |
| e^- | Elektron |
| EDGF | Epidermal-growth-factor-Rezeptor |
| E_{max} | maximaler Effekt |
| eNOS | endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase |
| g | Gramm |
| G | Erdbeschleunigung |
| GBZ | Guanabenz |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| GFR | glomeruläre Filtrationsrate |
| GTPase | Guanosintriphosphatase |
| H^+ | Wasserstoffkation |
| HIF-1 | Hypoxia-inducible factor-1 |
| HS | Hemmstoff |
| H_2O | Wasser |
| H_2O_2 | Wasserstoffperoxid |
| I.E. | Internationale Einheit |
| JAK2 | Janus Kinase 2 |
| K^+ | Kaliumkation |
| K^+ -Kanäle | Kaliumkanäle |
| K125-Lösung | Kalium-reiche Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| KH_2PO_4 | Kaliumhydrogenphosphat |
| KRB-Lösung | Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung |
| KRH-Lösung | Krebs-Ringer-Hepes-Lösung |
| l | Liter |
| L-NAME | N ω -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester |
| $\log EC_{50}$ | Logarithmus der halbmaximalen effektiven Konzentration als Maß für die Sensitivität |
| Luc^{2+} | Lucigeninkation |
| $\bullet Luc^+$ | Lucigenin-Kation-Radikal |
| MAP | mittlerer arterieller Blutdruck |

| | |
|--------------------------------------|---|
| MAPK | mitogen-aktivierte Proteinkinasen |
| mg | Milligramm |
| µg | Mikrogramm |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | Magnesiumsulfatheptahydrat |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| MLCK | Myosin-leichte-Ketten-Kinase |
| MLCP | Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase |
| mm | Millimeter |
| µm | Mikrometer |
| mmol/l | Millimol pro Liter |
| µmol/l | Mikromol pro Liter |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| µmol | Mikromol |
| mN | Millinewton |
| mol | Mol |
| M-Rezeptor | muskarinischer Rezeptor |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MR-Rezeptor | Mineralkortikoid-Rezeptor |
| mV | Millivolt |
| n | Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe |
| NA | Noradrenalin |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD | Nikotinamidadenindinukleotid |
| NAD ⁺ | oxidierte Form des Nikotinamidadenindinukleotid |
| NADPH | Nikotinamidadenindinukleotiddiphosphat |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogenkarbonat |
| NGF | Nerve Growth Factor |
| NFκB | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells |
| nmol | Nanomol |
| nmol/l | Nanomol pro Liter |
| NO | Stickstoffmonoxid |

| | |
|-----------------------------|---|
| NOS | Stickstoffmonoxidsynthase |
| NOX | Isoform der NADPH-Oxidase |
| NP | Nitroprussid-Natrium |
| NTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| NYP | Neuropeptid Y |
| O ₂ | Sauerstoff |
| O ₂ ⁻ | Superoxidanion |
| OH ⁻ | Hydroxylradikal |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| PBGD | Porphobilinogen Desaminase |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDGF | Platelet-derived Growth Factor |
| PE | Phenylephrin |
| PEG SOD | Polyethylenglykol-konjugierte Superoxid-Dismutase |
| PGE ₂ | Prostaglandin E ₂ |
| PI3K | Phosphoinositol-3-Kinase |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKG | Proteinkinase G |
| Pyk2 | Protein Tyrosin Kinase 2 |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| Ras | Rat sarcoma, spezifisches Proto-Onkogen |
| RBF | Renaler Blutfluss |
| RLU | relative Lichteinheiten |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAse | Ribonuklease |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Reverse-Transkriptase |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion |
| s | Sekunde |
| SERCA | Sarkoendoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -Transport ATPase |
| SEM | Standartfehler des Mittelwertes |
| SHR | spontan hypertensive Ratten |

| | |
|------------------|---|
| Src | spezifische Tyrosin Kinase |
| SOD | Superoxid-Dismutase |
| SX | sympathektomierte Versuchstiere |
| Tab. | Tabelle |
| TGF | Tubuloglomerulärer Feedback Mechanismus |
| TGF- β | Transforming Growth Factor- β |
| Tir | Tiron |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TXA ₂ | Thromboxan A ₂ |
| u. a. | unter anderem |
| V. | Vena |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| vs. | versus |
| Vv. | Venae |
| WKY | Wistar-Kyoto-Ratten |
| z.B. | zum Beispiel |

1. Einleitung

Das autonome Nervensystem ist ein wichtiger Regulator des Herz-Kreislaufsystems. Insbesondere durch die Kontrolle des Herzzeitvolumens, des peripheren Blutgefäßwiderstandes, des Tonus venöser Kapazitätsgefäße und der Nierenfunktion trägt es zur Aufrechterhaltung eines adäquaten arteriellen Blutdruckes bei [1]. Beeinflusst durch das sympathische Nervensystem kommt es unter anderem zu Veränderungen des peripheren Gefäßwiderstandes und der Nierenfunktion. In der Niere ist das sympathische Nervensystem an der Regulation der Natriumreabsorption, der Reninsekretion und der renalen Hämodynamik beteiligt, wodurch der Wasser- und Elektrolyt-haushalt beeinflusst wird [1]. Diese Veränderungen führen zu kurz- wie auch längerfristigen Anpassungen des arteriellen Blutdruckes [2-4]. Das parasympathische Nervensystem hingegen beeinflusst den Blutdruck vor allem durch herzfrequenzabhängige Änderungen des Herzzeitvolumens. Einen direkten Effekt des parasympathischen Nervensystems auf den Tonus renaler Widerstands- oder Segmentarterien und eine damit verbundene direkte Beeinflussung des peripheren Widerstandes wurde nicht nachgewiesen [1, 5].

Bereits 1859 wies der Franzose Claude Bernard die Beeinflussung der Nierenfunktion durch das Nervensystem nach. Er zeigte, dass aus renaler Denervierung eine vermehrte Urinsekretion und aus Stimulation renaler Nerven eine verminderte Urinsekretion resultierte [6]. Viele weitere Regulationsmechanismen des sympathischen Nervensystems wurden in den folgenden 100 Jahren aufgeklärt, jedoch fehlte bis 1972 der Beweis des synaptischen Kontaktes zwischen sympathischen Nerven und renalen Strukturen. Diesen erbrachte die Arbeitsgruppe um Barajas und Müller, indem sie synaptische Kontakte zwischen intrarenalen Nervenendigungen und renalen Gefäßen, Tubulusepithelien und juxtaglomerulärem Apparat zeigten [7, 8].

Die efferenten und afferenten Nerven erreichen bzw. verlassen die Niere entlang der venösen und arteriellen Blutgefäße [9]. Bereits zum Zeitpunkt der Geburt ist die afferente Innervation bei Ratten vollkommen entwickelt, die Efferenzen erreichen erst am 21. postnatalen Tag ihre intrarenalen Zielgebiete [10, 11]. Die efferente postganglionäre sympathische Innervation der Nieren erfolgt bei Ratten aus dem Plexus coeliacus, dem Plexus intermesentericus und den Nervi splanchnici lumbales [12], deren präganglionäre neuronale Versorgung aus den thorakalen Rückenmarksegmenten T₅ bis T₁₃ stammen [13]. An der Regulation der sympathischen Aktivität sind absteigen-

de Bahnen der rostralen venterolateralen und venteromedialen Medulla oblongata, aus den kaudalen Raphekernen, aus der kaudalen venterolateralen Pons, aus der pontinen noradrenergen Zellgruppe A5 sowie paraventriculären Kernen des Hypothalamus beteiligt [14]. Die zumeist unmyelinisierten afferenten Nervenfasern der Rattenniere enden in den Laminae III bis VII des thorakalen und lumbalen Rückenmarkes [1, 15, 16] und verlaufen von hier über spinothalamische Bahnen zum Hypothalamus [17], den Nuclei supraopticus und paraventricularis [18, 19] sowie zum Nucleus tractus solitarii [20].

Die längerfristig wirksamen Prozesse der Blutdruckregulation erfolgen über Veränderungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes [2-4]. Damit leistet die Niere einen wesentlichen Beitrag, den Blutdruck länger als nur einige Tage auf konstantem Niveau zu halten [3]. Die Niere unterliegt dabei verschiedenen Einflüssen, wie Hormonen und dem sympathischen Nervensystem [21]. Das Prinzip der langfristigen Blutdruckregulation durch die Nieren beschrieb Guyton als „Kidney-fluid System“, bei dem bei gesteigertem Blutdruck die renale Wasser- und Elektrolytausscheidung gesteigert wird und die ursprünglichen Blutdruckwerte durch eine vorübergehende negative Wasser- und Elektrolytbilanz des Organismus wieder eingestellt werden [3, 4]. Umgekehrt wird bei zu niedrigem Blutdruck die renale Wasser- und Elektrolytausscheidung verringert, so dass vorübergehend eine positive Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz resultiert, bis der normale Blutdruck des Organismus wiederhergestellt ist [3, 4]. Dieses System hat somit Einfluss auf den gesamten Wasser- und Elektrolythaushalt des Körpers, was es verständlich macht, dass der Blutdruck über diesen Mechanismus im Vergleich zu reflektorischen Mechanismen der Kreislaufregulation langsamer, dafür aber über einen längeren Zeitraum geregelt werden kann [4]. Die erhöhte Wasser- und Elektrolytausscheidung infolge eines erhöhten arteriellen Blutdruckes wird Druckdiurese bzw. Drucknatriurese genannt [5]. Im Einzelnen spielen bei der Blutdruckregulation unter anderem die Hormone Adiuretin (ADH) und atriales natriuretisches Peptid (ANP) sowie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine wichtige Rolle.

Bei einem Druckabfall in den renalen afferenten Arteriolen unter 80 mmHg, verminderter Natrium- und Chloridreabsorption an der Macula densa und erhöhter sympathischer Nervenaktivität wird die Renin-Sekretion aus den granulären Zellen des juxtaglomerulären Apparates in den systemischen Kreislauf erhöht. Es folgt die durch Renin katalysierte Spaltung von Angiotensionogen in Angiotensin I (ANG I), welches

seinerseits durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) durch die Abspaltung zweier Aminosäuren zu Angiotensin II (ANG II) umgewandelt wird [4]. ANG II führt zu einer peripheren Vasokonstriktion und beeinflusst durch Veränderungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes auch langfristig die Blutdruckregulation [5]. So erfolgt durch ANG II eine präglomeruläre Vasokonstriktion der afferenten renalen Arteriolen mit konsekutiver Abnahme des renalen Blutflusses und der glomerulärer Filtrationsrate, woraus wiederum eine Erhöhung des intravasalen Volumens und damit des Blutdruckes resultiert [22]. Außerdem ruft Angiotensin II auch eine Vasokonstriktion der postglomerulären efferenten Arteriolen der Nierenrinde und der Vasa recta des Nierenmarks hervor, was den peritubulären hydrostatischen Druck verringert [22]. Durch den verringerten peritubulären hydrostatischen Druck werden mehr Natriumchlorid und Wasser resorbiert, wodurch das intravasale Volumen und damit der Blutdruck wiederum ansteigen [3, 22]. ANG II hat zudem einen direkten Effekt auf die Tubuluszellen die Wasser- und Natriumchloridresorption zu steigern [5]. Des Weiteren induziert ANG II die Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde, was durch eine verstärkte renale Natriumresorption und Wasserretention im Extrazellulärraum, eine Erhöhung des intravasalen Volumens und damit des Blutdruckes bewirkt [1, 4].

Die kurzfristige Blutdruckregulation erfolgt neuronal und hormonell durch Veränderungen des Gefäßwiderstandes und des Herzzeitvolumens [4]. Die neuronale Regulation erfolgt innerhalb von Sekunden über das autonome Nervensystem mittels Volumenrezeptoren des Niederdrucksystems, Barorezeptoren des Hochdrucksystems und Chemorezeptoren im Sinne von Kreislaufreflexen [4]. So werden Blutdruckänderungen anhand der Gefäßwanddehnung von Barorezeptoren in der Tunica media sowie Tunica adventitia des Aortenbogens und der Carotiden registriert und innerhalb von Sekunden über den Barorezeptorreflex durch Variation des Herzzeitvolumens und des peripheren Gefäßwiderstandes ausgeglichen [3, 4]. Bei zunehmender Stimulation der arteriellen Barorezeptoren wird die Aktivität des sympathischen Nervensystems gehemmt, woraufhin der periphere Gefäßwiderstand und die Herzfrequenz sinken [4]. In benachbarter Lokalisation finden sich außerdem Chemorezeptoren, die den Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruck registrieren, um bei Hypoxie bzw. Hyperkapnie neben Änderungen des Atemminutenvolumens über das autonome Nervensystem Änderungen des peripheren Widerstandes und damit des Blutdruckes zu initiieren [4]. Auch im Niederdrucksystem finden sich Dehnungsrezeptoren. Sie liegen in den herznahen großen venösen Gefäßen, den Pulmonalarterien, den

Vorhöfen sowie den Ventrikeln und dienen der Überwachung des Niederdrucksystems und damit der Registrierung des Blutvolumens [21]. Weitere Rezeptoren sind im zentralen Nervensystem lokalisiert, um Blutdruckabfälle zu registrieren und bei einer kritischen Sauerstoffversorgung des Gehirns über das sympathische Nervensystem zu Änderungen der Auswurfleistung des Herzens zu führen und den Gefäßwiderstand anzupassen [4].

Wie schon oben genannt, ist das RAAS nicht nur im Rahmen der langfristigen Blutdruckregulation sondern auch für die kurz- bis mittelfristige Blutdruckregulation wichtig [4]. Es reagiert innerhalb von Minuten und schließt sich damit an die Akutregulation durch das autonome Nervensystem an [4]. So führt jegliche Sympathikusaktivierung über die Reninfreisetzung zur Entstehung von ANG II. ANG II erhöht unter anderem über eine Konstriktion der Widerstandsgefäße den peripheren Gefäßwiderstand und damit den Blutdruck [5, 21]. Außerdem sinkt durch die präkapilläre Vaskonstriktion der Widerstandsgefäße der hydrostatische Kapillardruck, was über die erhöhte Reabsorption extravasaler Flüssigkeit zu einer Zunahme des intravasalen Volumens und des Blutdruckes führt [5, 21]. Des Weiteren erfolgt durch ANG II auch eine Tonuszunahme in den venösen Kapazitätsgefäßen, was den venösen Rückstrom zum Herzen fördert [5]. Weitere Mechanismen zur kurzfristigen Blutdruckregulation sind mechanischer Natur und beruhen auf einer Dehnung der Gefäßwände bei erhöhtem Blutdruck. Durch diese sogenannte Stress-Relaxation erfolgt eine Vergrößerung des Gefäßquerschnitts und damit eine Verringerung des Blutdruckes [4]. Die Kraft, die die Blutströmung auf das Endothel ausübt, wird als Wandschubspannung bezeichnet und induziert eine verstärkte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), was eine Vasodilatation und damit eine Blutdrucksenkung hervorruft [3]. Außerdem erfolgt bei erhöhtem Blutdruck eine druckbedingte Hämofiltration in das Interstitium, was zur Verringerung des intravasalen Volumens und damit des Blutdruckes führt, während bei niedrigem Blutdruck eine Reabsorption von Flüssigkeit von extra- nach intravasal erfolgt [4].

Die Gefäßwand ist ein wichtiges Element der Blutdruckregulation. Sie besteht aus drei Schichten, der inneren Tunica interna (Intima), der Tunica media (Media) und der äußeren Tunica externa (Adventitia) [23, 24]. Die Intima wird in Richtung Gefäßlumen vom Endothel und zur Media hin, von der Membrana elastica interna begrenzt [23, 24]. Die vor allem aus glatten Muskelzellen und zu geringen Teilen aus elastischen Fasern aufgebaute Media wird durch die Membrana elastica externa von der

Adventitia abgegrenzt. Diese wiederum ist aus lockerem Bindegewebe und elastischen Fasern aufgebaut [23, 24].

Verschiedene endotheliale, hormonelle und neuronale Mechanismen sind über kurzfristige Änderungen des Gefäßtonus an der Blutdruckregulation beteiligt. Sie führen über die Zunahme des Gefäßtonus zu einer Vasokonstriktion, andere Mechanismen bewirken über eine Abnahme des Ruhetonus, eine Vasodilatation. Die kontraktilen Elemente sind Aktin- und Myosinfilamente. Sie verschieben sich gegeneinander und bewirken die Muskelkontraktion. Bei sympathischer Stimulation der Gefäßmuskulatur und Depolarisation der postsynaptischen Membran erfolgt eine Öffnung spannungsabhängiger Kalziumionen-Kanäle (Ca^{2+} -Kanäle) in der Zellmembran mit konsekutivem Ca^{2+} -Einstrom von extra- nach intrazellulär und eine Inositol-tri-phosphat- sowie Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Bei einer zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von mehr als 10^{-7} mol/l bindet Ca^{2+} an Calmodulin zum $(\text{Ca}^{2+})_4$ -Calmodulin-Komplex, welcher die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosins, die daraufhin das Myosinköpfchen für den Ablauf des Querbrückenzyklus freigibt. Der Querbrückenzyklus verläuft unter Anlagerung von Adenosintriphosphat (ATP) am Myosinköpfchen, das sich daraufhin vom Aktinfilament löst. Nach hydrolytischer Spaltung des ATP geht das Myosinköpfchen erneut eine Bindung zum Aktin ein. Unter Abdissoziation der Reaktionsprodukte Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat erfolgt der Kraftschlag des Myosinköpfchens und somit die Verschiebung der Aktin- und Myosinfilamente gegeneinander, eine Vasokonstriktion entsteht [25]. Bei abnehmender Ca^{2+} -Konzentration unter 10^{-6} mol/l dissoziiert Ca^{2+} wieder vom Calmodulin ab, die MLCK wird inaktiviert, die leichte Kette des Myosins durch die aktivierte Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) dephosphoryliert und die glatte Muskulatur relaxiert [25].

Die Vasokonstriktion hängt neben der Ca^{2+} -Konzentration auch vom Aktivitätsgrad der MLCK und deren Gegenspieler der MLCP ab. Beide Enzyme werden über verschiedene Signalkaskaden moduliert. Sie tragen zur Tonuszunahme der glatten Muskulatur infolge α_1 -Adrenorezeptor-Aktivierung, Proteinkinase C (PKC) und RhoA/Rho-Kinase abhängige Phosphorylierungen der MLCP bei. Die MLCP wird dadurch inaktiviert [25]. Vasokonstriktorisch wirken beispielsweise Noradrenalin durch Aktivierung von α_1 - und α_2 -Adrenorezeptoren [26, 27] und seine Cotransmitter ATP sowie

Neuropeptid Y (NPY) [28, 29]. Außerdem wirkt ANG II über AT₁-Rezeptoren [30] vasokonstriktorisch.

Die Vasodilatation wird, wie auch die Vasokonstriktion, über die Ca²⁺-Konzentration sowie über den Aktivitätsgrad der MLCK und MLCP und deren modulierende Signalkaskaden geregelt. Eine Relaxation der glatten Muskulatur erfolgt beispielsweise durch Aktivierung von β₂-Rezeptoren und anschließender cAMP- (zyklisches Adenosinmonophosphat) vermittelter Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und Inaktivierung der MLCK oder nach Bindung von Acetylcholin an muskarinische Rezeptoren (M-Rezeptoren) des Endothels [25]. Die endothelabhängige Vasodilatation wird unter anderem durch die Aktivierung von M-Rezeptoren und durch Scherkräfte am Endothel hervorgerufen und u. a. durch die Bildung von NO vermittelt [25, 31]. Durch die Aktivierung der Rezeptoren wird die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) zur verstärkten NO-Produktion aus L-Arginin stimuliert [32, 33]. NO diffundiert vom Endothel in die glatte Gefäßmuskulatur und aktiviert dort einen cGMP- (zyklisches Guanosinmonophosphat) vermittelten Signalweg, der wiederum über die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) zu einer Aktivierung der MLCP und einer Vasodilatation führt [25, 34].

Ebenso wie kurzfristige Änderungen des Gefäßtonus den Blutdruck beeinflussen, können chronische Veränderungen der Gefäßstrukturen zu langfristigen Änderungen des Blutdruckes führen. Die sympathische Innervation ist von großer Bedeutung für die Entwicklung chronischer Veränderungen der Gefäßstruktur und -funktion. Noradrenalin als Transmitter des sympathischen Nervensystems wirkt sich auf das Wachstum und die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen aus [35, 36]. Einen Hinweis darauf liefern Untersuchungen an spontan hypertensiven Ratten (SHR), deren sympathisches Nervensystem eine höhere Aktivität als bei normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) hat [1, 37, 38]. Dies zeigt sich auch in einer Hyperinnervation, im Sinne einer erhöhten Anzahl an sympathischen Nervenendigungen in mesenterialen und renalen Widerstandsgefäßen von SHR [39, 40]. Diese mesenterialen Widerstandsgefäße weisen schon in der prähypertensiven Phase eine größere Intima-, Media- und Adventitiadicke, bei verringertem Lumen auf [40-43]. Für renale Widerstandsgefäße zeigte sich bei gleichbleibender Intima- und Adventitiadicke, eine signifikant größere Mediadicke [44, 45]. Die Anzahl an Gefäßmuskelzellen der Media war dabei im Sinne einer Hyperplasie vermehrt, sie wiesen jedoch keine Hypertrophie auf [40, 45]. Der größere Gehalt an kontraktilem Gewebe zeigt sich in Myographieexpe-

rimenten, bei denen Gefäßsegmente von SHR auf Kalium-induzierte Depolarisation stärker kontrahieren als entsprechende Gefäße der WKY [43]. Bei vergrößerter Wanddicke bei Gefäßen von SHR unterschied sich der Gesamtquerschnitt der Gefäße von SHR und WKY jedoch nicht [40]. Dies zeigt, dass die strukturellen Veränderungen bei SHR zu einer Lumenverringerng führen [40]. Dieses Verhältnis von starker Wand zu engem Gefäßlumen kann als vergrößerte „wall-to-lumen-ratio“ beschrieben werden. Mit Hilfe der Sympathektomie waren diesbezüglich intensivere Untersuchungen möglich. Sympathektomie führte an mesenterialen Widerstandsgefäßen von SHR wie auch normotensiven WKY durch Verringerung der Anzahl an Muskelzellen zu einer Abnahme der Mediadicke und dadurch zu einer Vergrößerung des Lumens [41, 46, 47]. Diese Abnahme der „wall-to-lumen-ratio“ konnte auch für renale Widerstandsgefäße nachgewiesen werden [2]. Die Dicke der Adventitia vergrößerte sich jedoch bei sympathektomierten SHR im Vergleich zu deren unbehandelten Kontrollen [41, 46]. Schlussfolgernd lässt sich somit sagen, dass das sympathische Nervensystem einen inhibitorischen Effekt auf die Kollagensynthese ausübt [48, 49]. Im Gegensatz zu den mesenterialen Widerstandsgefäßen hat Sympathektomie auf die Anzahl von Gefäßmuskelzellen in großen Leitarterien keinen Einfluss, was möglicherweise an deren vergleichsweise geringer sympathischer Innervation liegen mag [41].

Das sympathische Nervensystem hat nicht nur Einfluss auf strukturelle Veränderungen des Gefäßsystems sondern auch auf funktionelle. So verringert sich die Noradrenalin-induzierte maximale Kontraktionsantwort mesenterialer Gefäßsegmente sympathektomierter SHR und WKY im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, die Noradrenalinsensitivität ist hingegen erhöht [41, 42]. Für renale Gefäße konnte bei gleicher maximaler Kontraktionsantwort ebenso eine erhöhte Noradrenalinsensitivität nachgewiesen werden [50].

Auch pathophysiologische Aspekte beeinflussen die Blutdruckregulation. So ist beispielsweise die Störung der endothelabhängigen Vasodilatation ein wesentlicher Teilaspekt der endothelialen Dysfunktion [51, 52] und kann über die Erhöhung des Gefäßtonus zu einer Erhöhung des Blutdruckes beitragen [53, 54]. Eine Ursache des Verlustes der vasodilatierenden Wirkungen des Endothels ist die chemische Reaktion des NO mit anderen freien Radikalen, beispielsweise reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu Peroxynitrit [55, 56], welches wiederum den NOS-Kofaktor Tetrahydrobiopterin oxidiert und Kinasen stimuliert, welche die endotheliale NOS (eNOS) hemmen

[57]. Dieser Mangel an NO und die dadurch überwiegende systemische sowie renale Vasokonstriktion bzw. verringerte endothelabhängige Vasodilatation wird als wichtiger Faktor in der Entstehung und Unterhaltung der arteriellen Hypertonie angesehen [57, 58]. Bestätigt wird der Zusammenhang des NO-Mangels mit zunehmender ROS-Freisetzung unter anderem durch Beobachtungen bei Patienten mit chronischer Granulomatose, bei denen eine Genmutation zu einem Funktionsverlust der NADPH-Oxidase führt [59]. Patienten mit dieser Erkrankung haben eine deutlich erhöhte vaskuläre NO-Freisetzung und einen verringerten Gehalt an ROS [59].

Zur Gruppe der ROS gehören das relativ stabile Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie die sehr reaktiven Hydroxylradikale (OH^\cdot) und Superoxidanionen (O_2^\cdot) [22, 60]. Durch ihre kurze Halbwertszeit, starke Reaktivität und Ladung sind OH^\cdot und O_2^\cdot lediglich in der Lage unmittelbar am Ort ihrer Freisetzung zu wirken, H_2O_2 hingegen ist durch seine chemischen Eigenschaften befähigt Membranen zu durchdringen [61]. ROS werden unter physiologischen Bedingungen während des oxidativen Metabolismus gebildet und durch antioxidative Systeme eliminiert. Bei oxidativem Stress, einer Imbalance von ROS-Produktion und ROS-Elimination, ist die biologische Wirksamkeit von ROS erhöht [22]. Als Quellen von ROS gelten bei beeinträchtigter Substrat- bzw. Kofaktorenzufuhr die NO-Synthasen [62, 63], die mitochondriale Atmungskette [64], die Xanthin-Oxidase [65], Cyclooxygenasen [66], Cytochrom-P450-Reduktasen [67], Lipoxygenasen [68] sowie Häm-Oxygenasen und Peroxidasen [69]. Hier entsteht O_2^\cdot ausschließlich als Nebenprodukt [70]. Die Hauptquelle von ROS, insbesondere von O_2^\cdot ist hingegen die NADPH-Oxidase [61, 70, 71]. Sie ist das einzige bekannte Enzymsystem, dessen primäre Funktion die O_2^\cdot -Produktion ist [70].

Die NADPH-Oxidase ist ein Enzym, das zuerst in Phagozyten bei der Charakterisierung des oxidativen Burst entdeckt wurde [72] und nimmt im Immunsystem eine zentrale Rolle in der Bakterienabwehr ein [73]. Später konnte die NADPH-Oxidase außerdem in vaskulären Fibroblasten, Gefäßmuskelzellen und endothelialen Zellen, inklusive renaler Blutgefäße nachgewiesen werden [22, 74-76]. Bisher sind 7 Isoformen der NADPH-Oxidase bekannt [70]. Die Isoformen der NADPH-Oxidase besitzen unterschiedliche katalytische Untereinheiten, die integrale Membranproteine sind und werden nach diesen mit NOX bzw. DUOX bezeichnet [70]. Es gibt die NOX1 bis 5 sowie die DUOX1 und 2 [77, 78], von denen vier Enzyme in Blutgefäßen nachgewiesen wurden. Dies sind die NOX1, NOX2, NOX4 sowie NOX5 [70], wobei die Verteilung sich bei den unterschiedlichen Spezies, verschiedenen Gefäßbetten und zwi-

schen den Schichten der Gefäßwand unterscheidet [79]. Die NOX4 scheint dabei in allen vaskulären Zellen vorzukommen [80, 81], die NOX2 hingegen vor allem in der Adventitia und dem Endothel von großen Leitarterien [82, 83] und die NOX1 überwiegend in der muskulären Media [84]. Zur vollen Funktionsfähigkeit benötigen die katalytischen Untereinheiten, bis auf die NOX5, Regulatorproteine [70]. Die NOX1 und NOX2 benötigt zum Beispiel das Membranprotein p22phox sowie die zytosolischen Regulatorproteine p47phox, p67phox und die GTPase Rac1, die NOX4 benötigt zur ordnungsgemäßen Funktion lediglich die p22phox [70]. Aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist die NADPH-Oxidase befähigt Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen und Superoxid zu bilden [70].

In Anwesenheit kardiovaskulärer Risikofaktoren konnte gezeigt werden, dass einige NADPH-Oxidase Isoformen verstärkt exprimiert werden. So fanden sich in Nagetiermodellen mit Arteriosklerose, Diabetes mellitus und Hypertonie verstärkt NOX1 sowie NOX2 [81, 85-87] und bei Menschen mit koronarer Herzkrankheit eine erhöhte Expression der NOX2 [80, 88]. Ein wichtiger G-Protein-vermittelter Stimulus der NADPH-Oxidase ist die Aktivierung des AT₁-Rezeptors durch ANG II [73, 74, 89, 90]. Als weitere Stimuli der NADPH-Oxidase gelten Aldosteron über Mineralokortikoid-(MR) Rezeptoren [91], α₂-Adrenorezeptoragonisten [92], Dopamin über Dopamin₃-Rezeptoren [93], Wachstumsfaktoren, wie der Platelet-derived Growth Factor (PDGF), als auch der Transforming Growth Factor-β (TGF-β) [79] und der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [73], Thrombin [94], H₂O₂ [95, 96], Tumor Nekrose Faktor (TNF) [97], Hyperglykämie [98] und erhöhte Wandschubspannung [31, 99]. Auch eine erhöhte Natriumchlorid-Zufuhr scheint zu einer NADPH-Oxidase-Aktivierung in den Zellen der Macula densa zu führen [100, 101]. Das freigesetzte O₂⁻ hemmt direkt durch Stimulation der Adenosinsynthese, als auch indirekt über die Reaktion mit NO, den tubuloglomerulären Feedback Mechanismus (TGF) und führt dadurch zu einer Vasokonstriktion der afferenten renalen Arteriolen mit daraus resultierender verringerter glomerulärer Filtrationsrate (GFR) [100-102]. Über diesen Mechanismus wird das intravasale Volumen erhöht und somit kann O₂⁻ an der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung der Hypertonie beteiligt sein. Neben der Beeinträchtigung der NO-vermittelten Endothelfunktion, kann O₂⁻ die endotheliale Zellmembran auch direkt schädigen [103]. Die O₂⁻-Freisetzung der NADPH-Oxidase scheint somit eine große Rolle in der Entstehung bzw. Unterhaltung verschiedener kardiovaskulärer Erkrankung, vor allem der arteriellen Hypertonie einzunehmen [90, 104].

Die Elimination von physiologisch entstehenden ROS erfolgt über verschiedene antioxidative Systeme. Dies sind unter anderem die Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase, aber auch Ubiquinon und die Glutathion-Peroxidase sowie exogen mit der Nahrung zugeführte Antioxidantien wie L-Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E) und β -Carotin [55, 105, 106]. Die SOD katalysiert die chemische Reaktion zweier O_2^- mit zwei H^+ zu O_2 und H_2O_2 , was wiederum mit einem weiteren Molekül H_2O_2 , katalysiert durch das Enzym Katalase, zu O_2 und H_2O reagiert [55, 105, 106]. Wie bereits oben beschrieben wird eine Dysbalance zwischen ROS-Produktion und ROS-Elimination hin zur vermehrter Produktion als oxidativer Stress bezeichnet [22].

Die Funktionen von ROS sind vielfältig. Sie regulieren Zellwachstum und Zelldifferenzierung, inaktivieren NO und stimulieren verschiedene Kinasen [69]. So stimulieren ROS beispielsweise über die Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) die Kollagensynthese und das Gefäßmuskelwachstum [61, 107], vermitteln die Wirkung von ANG II am AT_1 -Rezeptor über die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Epidermal-growth-factor-Rezeptor (EGFR) und Platelet-derived Growth Factor- β (PDGF- β) [108, 109]. ROS sind aber nicht nur bekannt als Teil verschiedener Signalkaskaden [110], sondern sie wurden in unterschiedlichen Studien auch als vasoaktive Substanzen charakterisiert. Für H_2O_2 sind sowohl vasokonstriktorische als auch vasodilatatorische Gefäßantworten beschrieben. So wirkt H_2O_2 konstriktorisch unter anderem in der Aorta, in intrarenalen Arterien sowie in der Arteria mesenterica superior von Ratten [111-115]. Die H_2O_2 -vermittelte Vasokonstriktion erfolgt am ehesten Ca^{2+} -vermittelt [114-116] und scheint von der Aktivität verschiedener Kalium-Kanäle (K^+ -Kanäle) abhängig zu sein [117, 118]. Außerdem scheinen ROS über Ca^{2+} -Sensitivierungsprozesse die Vasokonstriktion zu modulieren [115, 119, 120].

Die vasodilatatorischen Effekte von H_2O_2 konnten an verschiedenen Gefäßbetten nachgewiesen werden [117, 121-126]. H_2O_2 verursacht sowohl eine endothelabhängige [126-128], als auch eine endothelunabhängige Vasodilatation [117, 121, 127, 129]. Die endothelabhängige Vasorelaxation scheint über die Freisetzung von NO sowie über Cytochrom-P450-Metabolite Ca^{2+} -abhängig und cGMP-vermittelt unter anderem durch Freisetzung endogenen Acetylcholins zu erfolgen [126-128]. Eine direkte Guanylatcyclase-Aktivierung und cGMP-Erhöhung in der Gefäßmuskelzelle als auch die direkte Aktivierung von K^+ -Kanälen wird als Vermittler der endothel-

unabhängigen Vasodilatation betrachtet [117, 121, 127, 129]. Sowohl die endothelabhängigen, als auch die endothelunabhängigen Prozesse scheinen an der Gefäßmuskulzelle über Ca^{2+} -abhängige, ATP-abhängige und spannungsabhängige K^+ -Kanälen eine Vasodilatation zu bewirken [121, 122, 125-127, 129]. Neben ihrer Beteiligung an der endothelialen Dysfunktion sind ROS auch Mediatoren in Signaltransduktionswegen, die zu vaskulärer Hypertrophie führen [74, 130]. In verschiedenen Experimenten konnte die Beteiligung von ROS an arterieller Hypertonie gezeigt werden [131-134]. So führte die Aufnahme bleihaltigen Trinkwassers durch Blei-induzierte ROS-Bildung bei Ratten zu arterieller Hypertonie [132, 133]. Ebenso zu arterieller Hypertonie führte die Hemmung der H_2O_2 -abbauenden Glutathion-Peroxidase [134] und die Gendeletion der O_2^- -abbauenden SOD [131]. Die Vermeidung von oxidativem Stress und die Verringerung von ROS waren in anderen Studien in der Lage hypertensive Blutdruckwerte Richtung Normotension zu verschieben [135-137]. Diese komplexen Interaktionen zeigen eindrücklich die Beteiligung von ROS an der Blutdruckregulation unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen.

Die Anzahl der Menschen, die unter kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere arterieller Hypertonie leidet, steigt jährlich. Dabei zeigt sich, dass prämenopausale Frauen deutlich seltener betroffen sind, als gleichaltrige Männer oder postmenopausale Frauen [138-140]. Die Blutdruckregulation scheint also geschlechtsabhängig zu differieren. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten Unterschiede in der Blutdruckregulation männlicher, im Vergleich zu weiblichen Versuchstieren nachweisen [141-144]. So zeigten Studien, dass Gefäßmuskulzellen männlicher Tiere im Vergleich zu deren weiblichen Kontrollen zu einer verstärkten Vasokonstriktion neigen [141-144]. Hieran scheinen neben Unterschieden in der Menge der Noradrenalinfreisetzung und in der Sensitivität auf adrenerge Nervenstimulation [141, 142] auch Unterschiede in der Expression und Aktivität der NADPH-Oxidase [145, 146] sowie der NOS beteiligt zu sein [147]. Kausale und übergeordnete Modulatoren dieser Unterschiede scheinen Östrogene und Östrogenrezeptoren zu sein [143]. Langfristige und geschlechtsabhängige Effekte der sympathischen Innervation auf die renale Expression und Aktivität Superoxid-bildender Systeme sind bisher kaum untersucht.

Abweichungen in der kurz-, wie auch der langfristigen Blutdruckregulation können zu chronischen Veränderungen des Blutdruckniveaus führen. Der arteriellen Hypertonie können sowohl hormonelle, strukturell-anatomische als auch neuronale Ursachen zu

Grunde liegen. Ebenso vielfältig sind deren Behandlungsmöglichkeiten. Schon vor der medikamentösen Therapie des Bluthochdruckes wurde versucht, die chirurgische Sympathektomie zur Blutdrucksenkung einzusetzen [148, 149]. Man erkannte, dass bei Menschen mit arterieller Hypertonie die Aktivität des sympathischen Nervensystems erhöht und ursächlich für erhöhten peripheren und renalen Gefäßwiderstand, tubuläre Natriumresorption sowie Renin-Sekretion ist [1, 3]. In Experimenten mit SHR, bei denen ein erhöhter Ruhetonus des sympathischen Nervensystems zum erhöhten Blutdruck beiträgt, konnte nachgewiesen werden, dass nach neonataler Sympathektomie durch Verringerung des Gefäßwiderstandes in mesenterialen und renalen Stromgebieten eine langfristige Absenkung des Blutdruckes erfolgte [2, 41, 46, 50, 150]. Renale Denervierung bei Menschen zeigte eine Verringerung der Reninfreisetzung und der sympathischen Aktivität des gesamten autonomen Nervensystems [151, 152]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit schwer einzustellender arterieller Hypertonie eine antihypertensive Medikation in Verbindung mit einer renalen Denervierung zu signifikant niedrigeren Blutdrücken führt, als bloße medikamentöse Behandlung [153]. Diese Erkenntnisse fanden Eingang in die derzeitige Hypertonietherapie. So wird bei Patienten mit schwerer Hypertonie, bei denen auch unter drei oder mehr antihypertensiven Medikamenten keine suffiziente Blutdruckreduktion erzielt werden konnte, die katheterbasierte renale Denervierung angewendet [154, 155]. Die Ergebnisse der aktuellen Symplicity HTN-3 Studie stellen den langfristigen Effekt dieser Methode jedoch in Frage [156, 157].

Vor dem Hintergrund der starken Beteiligung des sympathischen Nervensystems an der Regulation der Gefäßfunktion und des Blutdruckes hat die vorliegende Arbeit das Ziel, langfristige Effekte der sympathischen Innervation auf die Funktion von Widerstandsarterien und deren Abhängigkeit von reaktiven Sauerstoffspezies zu untersuchen. Hierzu wurde das Modell der neonatalen Sympathektomie bei Ratten genutzt. Die Untersuchungen erfolgten hauptsächlich an isolierten Widerstandsarterien der Niere und des Mesenteriums.

Im Einzelnen wurde getestet:

- ob die sympathische Denervierung unterschiedliche langfristige Effekte auf die Adrenorezeptor-vermittelte Vasokonstriktion renaler und mesenterialer Widerstandsarterien hat,
- ob chronische Sympathektomie Einfluss auf die endothelabhängige sowie endothelunabhängige Vasodilatation von Widerstandsarterien hat,
- welche Bedeutung die chronische Sympathektomie für die Expression und Aktivität ROS-produzierender Systeme hat,
- ob es Geschlechtsunterschiede in der Supersensitivitätsentwicklung und in der Aktivität sowie Expression ROS-produzierender Systeme von Widerstandsarterien gibt,
- ob chronische Sympathektomie zu Veränderungen in der Bedeutung von ROS für die Agonist-induzierte Vasokonstriktion und -dilatation von Widerstandsarterien führt,
- ob chronische Sympathektomie zu Veränderungen der Sensitivität von Widerstandsgefäßen gegenüber den prokontraktilen Effekten der reaktiven Sauerstoffspezies H_2O_2 führt.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten eingesetzt. Diese Tiere wurden am Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Greifswald gezüchtet. Es handelte sich um Nachkommen der ersten Generation von Zuchttieren, die von der Firma Charles River GmbH Sulzfeld, Deutschland bezogen wurden. Die Wistar-Ratten wurden entsprechend ihrer Größe in Typ 3 bzw. in Typ 4 Macrolonkäfigen in Gruppen von 3 Tieren im institutseigenen Tierstall gehalten. Der Tag-Nachtrhythmus gliederte sich in eine 12-stündige Lichtphase (6:00-18:00 Uhr) und eine 12-stündige Dunkelphase. Die Temperatur in der Tierhaltung betrug 22°C, die relative Luftfeuchtigkeit 60%. Die Käfige waren mit Weichholzeinstreu versehen und die Ratten hatten freien Zugang zu standardisiertem Futter in Form von Pellets als Trockennahrung (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser aus Trinkflaschen. Die Tierexperimente und Organentnahmen wurden beim Landesamt für Lebensmittelsicherheit, Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern beantragt bzw. angezeigt und durch dieses genehmigt.

2.2 Neonatale Sympathektomie

Die neonatale Sympathektomie postganglionärer sympathischer Neurone erfolgte durch hochdosierte Guanethidinbehandlung und chirurgische Entfernung des Nebennierenmarks [2, 50, 158, 159]. Die neugeborenen Ratten wurden vom 5. bis zum 28. Lebenstag, mit einer täglichen intraperitonealen Injektion von 50 µg Guanethidin (Guanethidinmonosulfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) je Gramm Körpergewicht behandelt [2, 158]. Das Guanethidin wurde in isotoner Natriumchloridlösung gelöst und mit Hilfe eines pH-Meters (MP220 Basic pH/mV/°C Meter, Mettler-Toledo GmbH, Giessen Deutschland) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Für die Injektionen wurden die Tiere einzeln aus ihren Käfigen entnommen und in der linken Hand so gehalten, dass der Rücken des Tieres der Handfläche des Experimentators auflag und das Abdomen der Tiere frei zugänglich war. Die Nadel der Spritze wurde dann transkutan in die Abdominalhöhle vorgeschoben und die Guanethidin-Lösung intraperitoneal appliziert. Nach der letzten Injektion am 28. Lebens-

tag wurden die Jungtiere vom Muttertier abgesetzt und in Kleingruppen nach Geschlechtern getrennt gehalten.

Am 29. Lebenstag erfolgte die bilaterale Entfernung des Nebennierenmarks. Für diesen Eingriff wurden die Versuchstiere, mit Hilfe eines offenen Systems in Ethernarkose (Diethylether, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland) versetzt. Die narkotisierten Tiere wurden bilateral an den Flanken rasiert und mit Hilfe von Pflaster (Leukosilk S, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) in Seitenlage auf dem Operationstisch fixiert. Die desinfizierte (Softasept[®] N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) Haut wurde anschließend mit einer Schere eröffnet und von der Muskelfaszie mobilisiert. Um in den Retroperitonealraum zu gelangen, wurde anschließend die Muskelfaszie sowie die Muskulatur durchtrennt und pararenales Gewebe mit Hilfe von Wattestäbchen so mobilisiert, dass sich Niere und Nebenniere frei darstellten. Die Nebenniere wurde nun mit einer Kanüle inzidiert und das Nebennierenmark unter leichtem Druck der Wattestäbchen aus der Nebennierenrinde entfernt. Zuletzt wurden die Muskelschicht und die Haut jeweils mit fortlaufenden Nähten wieder verschlossen und mit einer Wundantiseptik (Braunol[®], B. Braun AG Melsungen, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Daraufhin wurde der Eingriff auf der anderen Seite wiederholt. Nach Abschluss des 20 Minuten andauernden Eingriffes, wurden die Versuchstiere in den Käfig zurückgesetzt und erwachten aus der Narkose.

Die Kontrollgruppen wurden scheinsympathektomiert [2]. Die Scheinsympathektomie bestand analog zur Sympathektomie aus zwei Schritten, erstens einer intraperitonealen Injektion und zweitens einer Operation. Die intraperitonealen Injektionen erfolgten in der gleichen Weise wie die Guanethidininjektionen vom 5. bis zum 28. Lebenstag. Anstelle von Guanethidin-Lösung wurde isotone Kochsalzlösung appliziert. Auch die Narkose und die Vorbereitungen des operativen Eingriffes verliefen wie bereits beschrieben. Nach Eröffnung der Haut, Muskelfaszie sowie Muskelschicht und Darstellung der Nebenniere erfolgte wieder der Verschluss der eröffneten Schichten ohne die Nebenniere zu inzidieren und ohne das Nebennierenmark zu entfernen. Auch die Kontrolltiere wurden nach Naht und Desinfektion der Operationswunden in den eigenen Käfig zum Aufwachen aus der Narkose verbracht.

2.3 Katherisierung der Arteria femoralis

Aus jeder Behandlungsgruppe wurde eine Untergruppe von Tieren einen Tag vor der Versuchsdurchführung für eine intraarterielle Blutdruckmessung katheterisiert [160]. Die Blutdruckmessung war notwendig, um mögliche Effekte der Sympathektomie auf den mittleren arteriellen Druck zu untersuchen. Außerdem war die Erhebung der Blutdruckdaten für die Normalisierungsprozedur mit dem Drahtmyographen notwendig, da der Blutdruck ein wichtiger Parameter zur Ermittlung der optimalen Wandspannung ist. Vorbereitend wurden die Tiere narkotisiert (Pentobarbital-Natrium, 50 mg/kg intraperitoneal), in der rechten Leistengegend rasiert und in Rückenlage mit abgespreizten Extremitäten mittels Pflaster auf dem Operationstisch fixiert. Nach Desinfektion des rasierten Areals erfolgten ein Hautschnitt im inguinalen Bereich und das stumpfe Darstellen der Femoralgefäße mit Hilfe von Wattestäbchen. Die Arteria femoralis wurde mit Fäden proximal sowie distal angeschlungen, um den Blutfluss zu regulieren. Durch Zug am proximalen Faden wurde der Blutfluss durch die Arteria femoralis unterbrochen und sie wurde mit Hilfe einer Schere inzidiert. Nun folgte die Punktion der Inzisionsstelle mit einem mit isotoner Kochsalzlösung gefüllten Katheter, der dann drei Zentimeter weit nach proximal über die Arteria femoralis in den kaudalen Abschnitt der Aorta abdominalis vorgeschoben wurde. Zur Lagekontrolle des Katheters wurde ein kleines Volumen isotoner Kochsalzlösung durch ihn gespritzt. Anschließend konnte er bei Durchgängigkeit am Gefäß befestigt werden. Nach Drehen des Tieres in Bauchlage wurde von der Leistenregion aus das freie Ende des Katheters subkutan bis in den Nackenbereich vorgeschoben und über einen kleinen Hautschnitt an die Körperoberfläche geführt. Somit konnte das Versuchstier den Katheter nach dem Erwachen aus der Narkose nicht durch Nagen und Putzen beschädigen. Der Wundverschluss erfolgte im Nackenbereich mit Einzelknopf-, im Leistenbereich, nach Drehung des Tieres in Rückenlage, mit fortlaufenden Nähten. Zum Abschluss wurde der Katheter noch mit heparinierter Kochsalzlösung (Heparin-Natrium Braun[®] 25000 I.E./5ml, B. Braun AG Melsungen, Melsungen, Deutschland) gespült und verschlossen. Nach der Katheterimplantation erfolgte die Haltung der Tiere in Einzelkäfigen.

2.4 Intraarterielle Blutdruck- und Herzfrequenzmessung

Zu Beginn eines Versuchstages wurde an den wachen, sich frei in ihrem eigenen Käfig bewegendem Wistar-Ratten eine Blutdruck- und Herzfrequenzmessung durchgeführt [160]. Damit das Versuchstier ausreichend Zeit hatte sich an die veränderte Umgebung zu gewöhnen, wurde es etwa eine Stunde vor der Messung im eigenen Käfig in das Labor gebracht. Der Katheter, der im Nackenbereich von außen zugänglich war, wurde mit einem Druckwandler (Isotec[®], Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) verbunden, der seinerseits mit einem zuvor kalibrierten Brückenverstärker (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) verbunden wurde. Der arterielle Druck und die Herzfrequenz wurden für 30 Minuten mit einem LabVIEW (LabVIEW 5.0, National Instruments, Austin, USA) -basierten Datenerfassungssystem (Top Universal Acquisition Program 0.7, Michael Navakatikyan, University of Auckland, Auckland, Neuseeland) aufgezeichnet, woraufhin der Katheter wieder abgeklemmt, vom Druckwandler gelöst und verschlossen werden konnte. Im Anschluss an die Blutdruckmessungen erfolgte die Organentnahme zur Gewinnung isolierter Arteriensegmente.

2.5 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

2.5.1 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte in tiefer Ethernarkose. Für die Experimente wurden beide Nieren, Dünndarm mit Mesenterialwurzel sowie die thorakale und abdominale Aorta verwendet. Zuerst erfolgte die Wägung der narkotisierten Tiere (Laborwaage OWA Labor, Nagema, Dresden, Deutschland), eine Rasur der ventralen Rumpfseite und die Fixierung auf dem Operationstisch in Rückenlage. Nach medianem Hautschnitt wurde die Muskulatur des Abdomens entlang der Linea alba bis zum Brustkorb eröffnet. Anschließend konnte der Darm mit angefeuchteten Wattestäbchen aus der Abdominalhöhle herausgehoben und auf der linken Körperseite auf einer angefeuchteten Kompresse abgelegt werden. Die nun freigelegte rechte Seite des Abdomens wurde zum Zwecke der Übersichtlichkeit mit Hilfe eines Hakens offen gehalten. Die dargestellte rechte Niere wurde von den zuführenden Gefäßen, dem Ureter und dem umliegenden Fettgewebe getrennt, entnommen und in ein mit Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung (KRB-Lösung) gefülltes Becherglas gelegt. Dieses war auf Eis

platziert, um eine ständige Kühlung der Organe zu gewährleisten. Um die linke Niere freizulegen wurden der Darm sowie der Haken auf die rechte Körperhälfte umgelagert. Die linke Niere wurde analog der rechten entnommen und in ein mit KRB-Lösung gefülltes Becherglas gelegt. Nach der Entnahme beider Nieren wurde das Jejunum inklusive seines Mesenteriums aus der Bauchhöhle entfernt und in KRB-Lösung überführt. Für die Entnahme der Aorta wurde der Thorax median eröffnet und die Leber sowie die übrigen Organpakete, das Zwerchfell und die Lungen vorsichtig entfernt, ohne die Aorta zu verletzen. Das nun dargestellte Herz wurde mit einer Pinzette vorsichtig angehoben, so dass sich die Aorta von der dahinter befindlichen Wirbelsäule leicht abhob. Entlang der Wirbelsäule wurde die Aorta von kranial nach kaudal von umliegendem Gewebe abgesetzt und im abdominalen Bereich knapp über der Bifurkation abgetrennt. Anschließend wurde sie vom Herz getrennt und in KRB-Lösung verbracht. Die Tiere verstarben während des Eingriffes in tiefer Narkose durch Verbluten.

2.5.2 Gefäßpräparation

Für die in vitro Untersuchungen wurden Nieren- und Mesenterialarteriensegmente sowie Aortenringe benötigt. Die Präparation der Gefäße fand in einer mit KRB-Lösung gefüllten Petrischale statt [50]. Die Petrischale stand während der Präparation auf Eis unter einem Stereomikroskop (Leica Wild M3Z, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland) und wurde mit einer Kaltlichtquelle (faseroptische Lichtquelle, Leica KL 1500 LCD, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland) beleuchtet. Der Boden der Petrischale war mit Silikon ausgegossen, auf diesem konnten die Präparate mit Hilfe kleiner Nadeln fixiert werden. Um die distalen Interlobararterien der Nieren freizulegen, wurde im ersten Schritt die Nierenkapsel vom Hilus aus mit Hilfe einer gebogenen Pinzette abgestreift. Anschließend wurde die Niere mit einem Skalpell in frontaler Ebene durch den Hilus geteilt. Eine Hälfte wurde zurück in das Becherglas gegeben, die andere verblieb in der mit KRB-Lösung gefüllten Petrischale und wurde mit Hilfe von Nadeln auf dem Silikon fixiert. Unter dem Stereomikroskop erfolgte mit einer Schere und einer Dumontpinzette die Entfernung der Nierenpapille, sodass die renalen Blutgefäße zu erkennen waren. Diese wurden vorsichtig, ohne Berührung der Gefäßwand, vom umgebenen Nierenparenchym frei präpariert und an einem Segment dritter Aufzweigungsgeneration, welches möglichst keine Gefäßabzweigungen aufwies, mit einer kleinen Schere eingeschnitten. In diese

entstandene Öffnung wurde ein Edelstahl Draht von 40 µm Durchmesser eingeführt und etwa zwei Millimeter im Gefäß vorgeschoben, ohne dabei das Gefäßendothel zu verletzen. Am distalen Ende wurde das Gefäß durchtrennt und der Draht wurde weiter vorgeschoben, damit das Gefäßsegment in etwa der Mitte des Edelstahldrahtes zum Liegen kam. Nun konnte das Blutgefäß auch am proximalen Abschnitt, direkt an der Eintrittsstelle des Edelstahldrahtes durchtrennt werden. Der Draht mit dem darauf befindlichen, etwa zwei Millimeter langen Gefäßabschnitt, wurde in einer anderen Petrischale mit KRB-Lösung bis zum Myographieexperiment kühl gelagert. Die Präparation der Arteriensegmente für die Messung der Superoxid-Bildung und die real-time-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (real-time-RT-PCR) erfolgte wie für die Myographieexperimente beschrieben. Es wurde darauf geachtet, dass den Gefäßsegmenten kein Nierenparenchym bzw. kein mesenteriales Fettgewebe mehr anhaftete und dass das Gefäß über einen möglichst langen Abschnitt präpariert und entnommen wurde. Anschließend wurden die Arteriensegmente in die Wells der Chemilumineszenzplatte (LIA-Platte, WEISS, TC, steril, Greiner Bio-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland) oder in Eppendorfgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gefüllt mit RNA later™ (Ambion, Huntingdon, UK) überführt.

Zur Präparation der Mesenterialarterien wurde ein Stück Darm mit seinem Mesenterium analog zur Niere in eine Petrischale gegeben und auf dem Silikon mit Hilfe von Nadeln so fixiert, dass sich das Mesenterium sternförmig aufspannte und man jede einzelne Arterie von proximal bis distal an die Darmwand verfolgen konnte. Nach der vorsichtigen Präparation der Einzelgefäße und der Entfernung des umliegenden Fettgewebes konnte nun eine Mesenterialarterie vierter Aufzweigungsgeneration mit einer Schere eingeschnitten werden und der 40µm dicke Edelstahl Draht wurde analog zu den renalen Widerstandsgefäßen vorgeschoben. Anschließend wurde das Gefäßsegment distal und proximal abgetrennt und für die Myographieexperimente verwendet. Die für die Chemilumineszenz-Messungen benötigte Aorta wurde in einer Petrischale unter einem Stereomikroskop platziert und fixiert. Mit Hilfe von Schere und Skalpell wurde das umliegende Bindegewebe entfernt und die Aorta von anhaftenden Geweberesten gesäubert. Um geronnene Blutreste aus dem Aortenlumen zu entfernen, wurde diese mit einer Spritze gespült. Anschließend konnte die Aorta bis zur Durchführung der Chemilumineszenz bei 70°C tief gefroren oder sofort in kleine Ringe von etwa zwei Millimetern Länge geschnitten werden, um diese sofort in die Wells der Lumineszenzplatte zu verbringen.

2.6 Small-Vessel-Draht-Myographie

2.6.1 Prinzip der Drahtmyographie und Kalibrierung

Mit Hilfe der Small-Vessel-Draht-Myographie lässt sich die Wandspannung von Blutgefäßen registrieren. Der in den folgenden Versuchen verwendete Drahtmyograph (Model 410A, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dänemark) ist ein Apparat mit einem Organbad, in dem sich zwei Untersuchungskanäle befinden, so dass zwei Gefäße gleichzeitig untersucht werden können (Abb. 1). Wie 1976 erstmals von Mulvaney und Halpern [43, 161] beschrieben, werden bei der Drahtmyographie Kräfte gemessen, die von einem Blutgefäß erzeugt werden, welches auf zwei Edelstahldrähten aufgespannt ist. Über diese Edelstahldrähte werden die erzeugten Kräfte an einen mechanoelektrischen Wandler weitergegeben und als elektrischer Spannungswert registriert. Der Myograph besteht aus einem Organbad (Fassungsvermögen 15 ml), mit dazugehöriger Carbogenbegasung (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid), Absaugung und Temperaturmesseinheit sowie zwei in diesem Organbad befindlichen Untersuchungskanälen mit je zwei Trägerbacken, von denen eine mit einer Mikrometerschraube und die andere mit einem elektromechanischen Wandler verbunden ist (Abb. 1). Über die Mikrometerschraube lässt sich der Abstand der beiden Trägerbacken und somit auch der Abstand der beiden eingespannten Edelstahldrähte voneinander verändern, sodass man über diesen Mechanismus die Möglichkeit hat, die Vordehnung des Blutgefäßes zu variieren. Die entwickelte aktive Wandspannung (in mN/mm) als Antwort auf Pharmaka-Applikationen wurde mit Hilfe des Datenerfassungsprogramms Myodaq Version 2.01 (Universität Maastricht, Maastricht, Niederlande), welches auf LabVIEW (National Instruments, Austin, Texas USA) basiert, in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. Sie ergibt sich aus der gemessenen Kraftänderung dividiert durch die zweifache Länge des Gefäßsegmentes.

Vor Beginn der Myographieexperimente wurde der Myograph kalibriert. Zu diesem Zweck wurde das Organbad mit 10 ml destilliertem Wasser gefüllt und ein Edelstahldraht in die beiden Halteschrauben der Trägerbacken eingespannt, welche sich jeweils an den elektromechanischen Wandlern zur Kraftmessung befanden. Nachdem das Organbad auf 37°C aufgeheizt war, wurde ein Hebelarm mit Kalibrierungswaage über dem Organbad platziert. Das Pendel der Kalibrierungswaage schwebte dabei frei zwischen eingespanntem Draht und Trägerbacke. Nachdem die Kalibrierungs-

waage mit 2 g beschwert wurde, drückte der Pendelarm gegen den Draht und erzeugte eine Kraft von 9,81 mN, die der Kalibrierung des Gerätes diente.

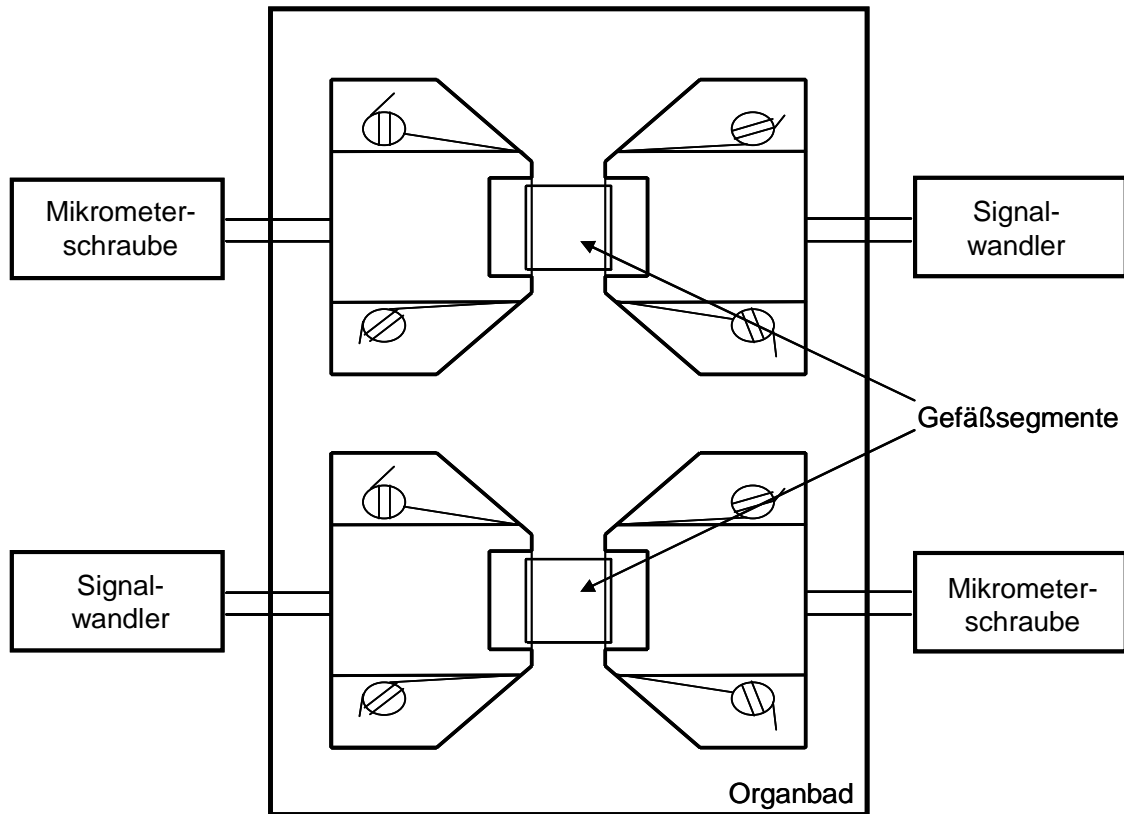


Abb. 1. Schematische Zeichnung des Small-Vessel-Draht-Myographen

2.6.2 Normalisierungsprozedur

Im Anschluss an die Kalibrierung des Myographen wurde das destillierte Wasser gegen 10 ml, in einem Wasserbad vorgeheizte, KRB-Lösung ausgetauscht. In diese wurde der Edelstahl Draht mit dem etwa zwei Millimeter langen Gefäßabschnitt gelegt. Mit Hilfe eines Stereomikroskopes, eines Schraubendrehers und einer Pinzette wurde nun der Draht mit dem Präparat an einer Trägerbacke befestigt. Im Folgenden wurde ein zweiter Edelstahl draht gleichen Durchmessers durch das Gefäßlumen geschoben, ohne jedoch das Endothel zu verletzen. Dieser Draht wurde dann an der gegenüberliegenden Trägerbacke befestigt, straff gespannt und parallel zum gegenüberliegenden Draht ausgerichtet. Das Gefäßsegment wurde somit durch die beiden Edelstahldrähte gehalten. Über die Mikrometerschraube konnten nun beide Trägerbacken soweit einander angenähert werden, dass sich beide Drähte gerade nicht berührten. In dieser Stellung übten die Edelstahldrähte keine Kraft auf das Gefäßsegment aus, sodass sich die Gefäßmuskelschicht im Ruhezustand befand. Mit Hilfe einer Okularstrichplatte, konnte die exakte Länge des Gefäßabschnittes ermittelt

werden, um diese dann für die Berechnung der Kraftänderung in das Daten verarbeitende Programm einzugeben. Anschließend erfolgten dieselben Arbeiten am zweiten Untersuchungskanal. Die nun folgende mechanische Vordehnung der Gefäßsegmente wurde schrittweise durchgeführt, um die optimale Vordehnung der Gefäßmuskelschicht zu ermitteln, bei der die maximale Kontraktionskraft erreicht werden konnte (Abb. 2). Die optimale Vordehnung befindet sich bei 90% der Wandspannung, die der mittlere arterielle Druck auf die Gefäßwände ausübt [43]. Nach dem Erreichen der maximalen Dehnung der Gefäße, die zur automatischen Erstellung einer exponentiellen Ruhe-Dehnungs-Kurve durch das Datenerfassungssystem benötigt wurde, erfolgte durch das Programm Myodaq die Berechnung der Gefäßdurchmesser, bei dem die Wandspannung der untersuchten Gefäße 90% der Wandspannung betrug, die durch den mittleren arteriellen Druck auf die Gefäße in vivo ausgeübt wurde. Diese Durchmesser wurden mit den Mikrometerschrauben eingestellt. Die nun optimal vorgedehnten Gefäße wurden durch Austausch der KRB-Lösung gegen eine Kaliumreiche KRB-Lösung (K125-Lösung) depolarisiert. Wie in Abb. 2 dargestellt, reagierte die Gefäßmuskulatur auf diese Depolarisation mit einer starken Kontraktionsantwort. Auf diese durch Kalium induzierte Zunahme der Gefäßwandspannung wurden im weiteren Verlauf der Experimente die Spannungsänderung nach Pharmakaapplikation bezogen und als relative Wandspannung dargestellt. Im Anschluss wurde die Kaliumreiche Pufferlösung abgesaugt und es erfolgte ein dreimaliges Waschen mit KRB-Lösung. Im Folgenden schloss sich eine Ruhezeit von 15 Minuten in KRB-Lösung an, in der die Spannung der Gefäßsegmente wieder auf Ausgangsniveau abfiel, ehe die Konzentrationswirkungskurven erstellt wurden.

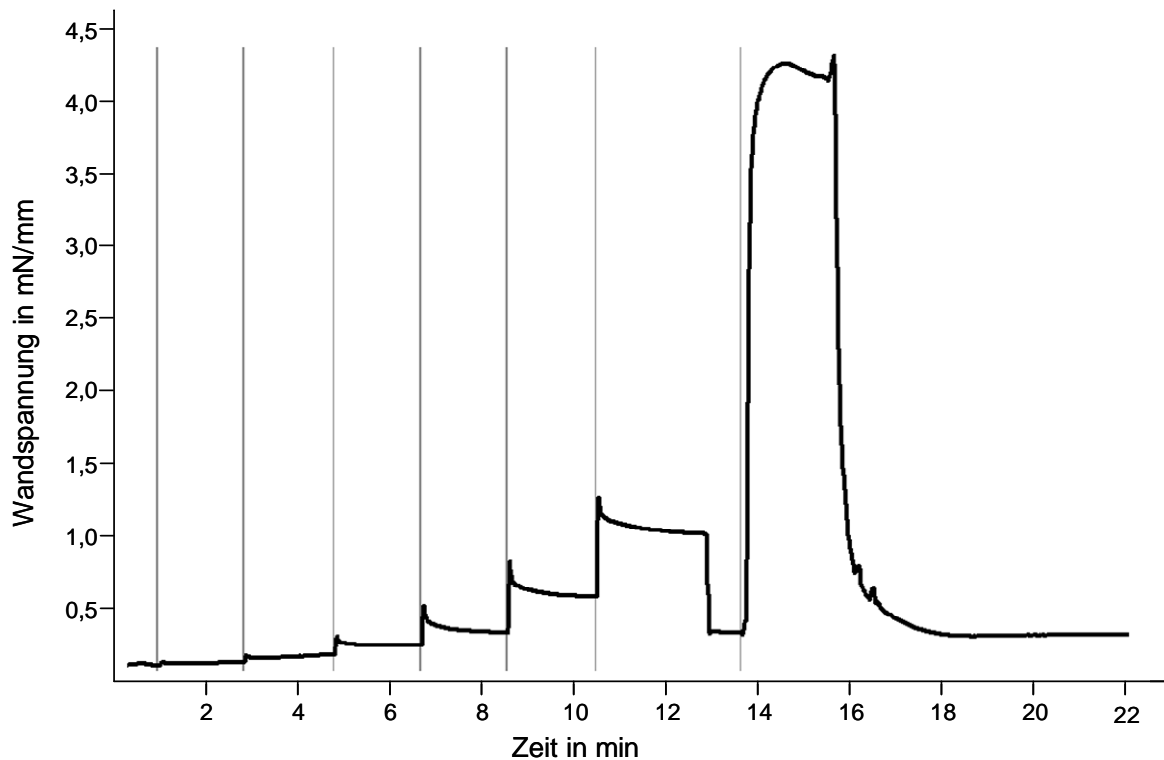


Abb. 2. Originalaufnahme einer Normalisierungsprozedur eines mesenterialen Gefäßsegmentes eines weiblichen scheinsympathektomierten Kontrolltieres. Die Vordehnung (in mN/mm) erfolgte durch Drehen der Mikrometerschrauben in 20 µm Schritten in einem Intervall von 2 Minuten. Nach dem 6. Vordehnungsschritt erfolgte die Einstellung der optimalen Vordehnung. Die letzte Kurve zeigt die Kalium-induzierte Kontraktion.

2.6.3 Konzentrationswirkungskurven

Applikation von Vasokonstriktoren

Die Untersuchung der Vasokonstriktion mesenterialer und renaler Arteriensegmente erfolgte durch Erstellung kumulativer Konzentrationswirkungskurven mit den Adrenorezeptoragonisten Noradrenalin (NA), Phenylephrin (PE) und Guanabenz (GBZ) [162]. Die Vasokonstriktoren wurden in einem Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l in halblogarithmischen Schritten, beginnend mit der kleinsten Konzentration kumulativ eingesetzt. Die nächsthöhere Konzentration wurde appliziert, sobald die Vasokonstriktion ihr Maximum erreicht hatte. Diese Zeiten betragen für Noradrenalin sowie Phenylephrin 2 Minuten und für Guanabenz 4 Minuten. Nach der letzten der sieben kumulativ verabreichten Substanzmengen wurde wiederum das Wirkintervall abgewartet und dann das Organbad abgesaugt, dreimalig gespült und durch frische KRB-Lösung ersetzt. Die genannten Konzentrationen beziehen sich auf die Konzentration im Organbad und werden im weiteren Verlauf, soweit nicht anders angegeben, analog verwendet. Der ersten kumulativen Konzentrationswirkungskurve, dem Badwechsel sowie der Pause folgten die Applikation von 2×10^{-3} mol/l Tiron und eine wei-

tere Pause von 5 Minuten. Danach wurde die zweite Konzentrationswirkungskurve für Noradrenalin analog der ersten durchgeführt. Tiron oder auch 1,2-Dihydroxybenzol-3,5-disulfonsäure-dinatriumsalz ist ein zellpermeabler Superoxid-Radikalfänger der, ähnlich der SOD, O_2^- mit Hilfe von H^+ zu H_2O_2 umwandelt [74, 163]. Zeitkontrollexperimente fanden ohne die Verwendung des Radikalfängers Tiron statt, um zu prüfen, ob nach der ersten Konzentrationswirkungskurve eine Ermüdung des Gefäßmuskels eingesetzt hat und eventuell dadurch eine veränderte zweite Konzentrationswirkungskurve hervorgerufen wurde. Auf die kumulativ erhobene Konzentrationswirkungskurve mit Phenylephrin folgte nach Badwechsel und Pause die Konzentrationswirkungskurve mit Guanabenz.

Applikation von Vasodilatoren

Für die Überprüfung der vasodilatatorischen Eigenschaften der Gefäßmuskulatur mesenterialer und renaler Gefäße wurden die Substanzen Acetylcholin (Ach) [164] und Nitroprussid-Natrium (NP) [165] zur Erstellung kumulativer Konzentrationswirkungskurven verwendet. Nach Vordehnung, Kalium-induzierter Kontraktion und Ruhephase schloss sich eine Vorkontraktion des Gefäßsegmentes mit Noradrenalin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l an. Nachdem sich die daraufhin erzielte Kontraktion auf einem Plateau stabilisiert hatte, erfolgte die kumulative Gabe der Vasodilatoren alle 2 Minuten. Acetylcholin wurde in einer Konzentration von 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l beginnend mit der kleinsten Konzentration in halblogarithmischen Schritten kumulativ appliziert. Im Anschluss an die erste Konzentrationswirkungskurve folgten nach Badwechsel sowie Pause von 15 Minuten die Applikation von 2×10^{-3} mol/l Tiron und eine weitere Pause von 5 Minuten. Nach dieser wurden erneut eine Vorkontraktion mit Noradrenalin und die zweite Konzentrationswirkungskurve mit Acetylcholin durchgeführt. Nach Badwechsel, Wechsel der Gefäßsegmente, Vordehnung, erneuter Kalium-induzierter Kontraktion und Vorkontraktion mit Noradrenalin erfolgte die Erstellung kumulativer Konzentrationswirkungskurven mit Nitroprussid-Natrium in einer Konzentration von 10^{-9} bis 10^{-6} mol/l in der gleichen Weise wie für Acetylcholin beschrieben.

Applikation von Wasserstoffperoxid

Um die Effekte von Wasserstoffperoxid auf renale Interlobararterien zu überprüfen, wurde ein zweiteiliger Versuchsansatz verwendet. Nach Einbau der Gefäßsegmente in den Myographen und deren mechanischer Vordehnung bestand der erste Versuchsteil aus einer kumulativen Konzentrationswirkungskurve mit Wasserstoffperoxid, welches in einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-4} mol/l, beginnend mit der niedrigsten Konzentration verwendet wurde. Es folgten in halblogarithmischen Schritten alle fünf Minuten die weiteren Applikationen. Nach der letzten Wasserstoffperoxidgabe und dessen Wirkintervall von fünf Minuten wurde das Organbad dreimalig gespült und durch frische KRB-Lösung ersetzt. Nach einer Ruhepause von 15 Minuten wurden nun im zweiten Versuchsteil die Gefäßsegmente der scheinsympathektomierten Kontrolltiere mit einer Konzentration von 3×10^{-6} mol/l Phenylephrin und die der sympathektomierten Tiere mit einer Konzentration von 3×10^{-7} mol/l Phenylephrin vorkontrahiert. Dieser Konzentrationsunterschied ergab sich aus Vorversuchen und bisherigen Studien, bei denen Gefäßsegmente sympathektomierter Tiere supersensitiv gegenüber Adrenorezeptoragonisten waren und damit schon bei geringeren Konzentrationen ausreichende Kontraktionen erreicht wurden [50]. Nachdem sich die Kontraktion auf einem konstanten Niveau stabilisiert hatte, begann die kumulative Wasserstoffperoxidgabe wie oben beschrieben mit der niedrigsten Konzentration.

2.6.4 Versuchsprotokolle der Myographie-Experimente

Experiment 1: Prüfung der adrenorezeptorvermittelten Vasokonstriktion

- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Noradrenalin 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l
- einmalige Applikation von Tiron 2×10^{-3} mol/l
- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Noradrenalin 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l

Experiment 2: Zeitkontrollen der adrenorezeptorvermittelten Vasokonstriktion

- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Noradrenalin 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l
- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Noradrenalin 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l

Experiment 3: Beitrag α_1 - und α_2 -Adrenorezeptor-vermittelter Prozesse zur Denervierungssupersensitivität

- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Phenylephrin 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l
- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Guanabenz 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l

Experiment 4: Prüfung der endothelabhängigen Vasodilatation

- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Acetylcholin 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l nach Vorkontraktion mit Noradrenalin 10^{-5} mol/l
- einmalige Applikation von Tiron 2×10^{-3} mol/l
- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Acetylcholin 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l nach Vorkontraktion mit Noradrenalin 10^{-5} mol/l

Experiment 5: Prüfung der endothelunabhängigen Vasodilatation

- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Nitroprussid-Natrium 10^{-9} bis 10^{-6} mol/l nach Vorkontraktion mit Noradrenalin 10^{-5} mol/l
- einmalige Applikation von Tiron 2×10^{-3} mol/l
- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Nitroprussid-Natrium 10^{-9} bis 10^{-6} mol/l nach Vorkontraktion mit Noradrenalin 10^{-5} mol/l

Experiment 6: Prüfung der Gefäßreaktion auf Wasserstoffperoxidapplikation

- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Wasserstoffperoxid 10^{-7} bis 10^{-4} mol/l
- kumulative Konzentrationswirkungskurve mit Wasserstoffperoxid 10^{-7} bis 10^{-4} mol/l nach Vorkontraktion mit Phenylephrin 3×10^{-6} mol/l bei Gefäßsegmenten der scheinsympathektomierten Kontrolltiere, mit Phenylephrin 3×10^{-7} mol/l bei denen der sympathektomierten Versuchstiere

2.7 NADPH-Oxidase mRNA-Gehalt

2.7.1 Einführung

Der Einfluss der Sympathektomie auf die vaskulären mRNA-Gehalte der verschiedenen NADPH-Oxidase-Isoformen wurde mittels real-time-RT-PCR untersucht. Hierfür waren die RNA-Isolation, der DNase I-Verdau, die cDNA-Synthese mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) und die eigentliche real-time-RT-PCR notwendig.

2.7.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus den entnommenen Arteriensegmenten männlicher und weiblicher Kontroll- bzw. sympathektomierter Tiere erfolgte unter Verwendung des RNA-Isolations-Kit RNAqueous[®]-4PCR, DNA free RNA Isolation for RT-PCR (Ambion, Huntingdon, UK). Zu Beginn der RNA Extraktion wurde jedes, mit drei bis vier Gefäßsegmenten eines Tieres versehene Eppendorfgefäß mit 100 µl Lyse/Bindungs-Lösung aufgefüllt. Nach Homogenisierung des Gewebes wurden weitere 50 µl Lyse/Bindungs-Lösung in die Gefäße gegeben und der Reaktionsansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor ein Volumenteil (1 µl Ethanol/ 1 µl Probe) Ethanol 64% hinzu gegeben wurde. Es folgte ein intensives Mischen der Reagenzien. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 200 G und 4°C über 5 Minuten. Der erhaltene Überstand wurde dann auf einen Filter gegeben und erneut zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte hier mit 13000 G über 1 Minute. Nach dem Verwerfen des Durchlaufs wurden dem Reaktionsgemisch 700 µl der Wasch-Lösung 1 zugesetzt. Dem folgte wiederum eine Zentrifugation mit 13000 G über 1 Minute. Anschließend wurden 500 µl Wasch-Lösung 2/3 zum Ansatz pipettiert und erneut unter den zuletzt genannten Bedingungen zentrifugiert, bevor der Durchlauf wiederum verworfen wurde. Es erfolgte eine weitere Wasch-Lösung Zugabe und Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Nach dem Verwerfen des Durchlaufes und Verbringen des Filters in ein neues Eppendorfgefäß konnte mit der Elution begonnen werden. Hierfür wurden 40 µl Elutionslösung auf 75°C erwärmt und auf die Filtermitte pipettiert, nach dessen Durchtritt durch den Filter, wurden weitere 10 µl Elutionslösung auf die Filtermitte gegeben. Diesem Schritt folgte, wie auch der nächsten Elutionslösung, eine 30-sekündige Zentrifugation bei 13000 G.

2.7.3 DNase I - Verdau

Im Folgenden führten wir, um die RNA vollständig von DNA-Kontamination zu reinigen, den DNase I Verdau durch. Zu den 80 µl Eluat der Proben wurden 8 µl DNase I Puffer sowie 1 µl DNase I hinzu gegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C über 30 Minuten folgte dann die Zugabe von 9 µl DNase Inaktivierungsreagenz, welches für 2 Minuten bei Raumtemperatur einwirken konnte, um den Verdauungsprozess wieder zu stoppen und die DNase zu inaktivieren. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 10000 G wurden die 90 µl Überstand nun in ein neues 1,5 ml fassendes Eppendorfgefäß gefüllt. Zu den 90 µl Eluat wurden nun nacheinander ein Volumenteil Ammonium-Acetat-Lösung (5 mol/l) und 0,015 Volumenteile lineares Acrylamid gegeben. Dem anschließenden Mischen folgte die Zugabe von 2,5 Volumenteilen, auf Eis gekühltem 100% Ethanol, bevor der Reaktionsansatz für 12 Stunden bei -20°C gelagert wurde. Danach wurde das gefüllte Eppendorfgefäß für 20 Minuten bei 10000 G und 4°C zentrifugiert, ehe der Überstand mit Hilfe einer Pipette abgesaugt und das gewonnene Pellet kurz getrocknet werden konnte. Dieses wurde in 15 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und für 10 Minuten in ein 60°C warmes Wasserbad verbracht. Anschließend wurde das Pellet kurz auf Salzeis abgekühlt und auf Eis gelagert, bis mit der cDNA Synthese fort gefahren werden konnte.

2.7.4 cDNA-Synthese

Die cDNA- Synthese wurde mit Hilfe der High-Capacity cDNA reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) laut Herstellerangaben durchgeführt. Die gewonnene RNA sowie ein Premix wurden für die Reverse-Transkriptase (RT) Reaktion und somit für die Durchführung der cDNA-Synthese benötigt. Es wurden 10 µl Premix, welcher zuvor auf Eis angesetzt werden musste, zu je 10 µl isolierter RNA hinzu pipettiert. Der Premix bestand aus 10x RT-Puffer (pro Reaktion und Eppendorfgefäß waren dies 2,0 µl), 25x dNTP Mix (100 mM)(pro Probe 0,8 µl), 10x RT Random Primers (2,0 µl), RNase Inhibitor (1,0 µl), Nuklease-freiem Wasser (3,2 µl) und MultiScribe[®]™ Reverse Transkriptase (1,0 µl). Das nun 20 µl umfassende Gemisch aus RNA und Premix wurde anschließend gemischt und kurz zentrifugiert. In einem Thermocycler erfolgten nun die 3 Phasen der eigentlichen cDNA-Synthese, beginnend mit 10 Minuten bei 25°C, über eine zweite Phase von 120 Minuten bei 37°C und endeten mit der dritten Phase von 5 Minute n bei 85°C. Im Anschluss wurde die gewonnene cDNA mit 0,05xTE-Puffer 20-fach verdünnt und ebenso wie die

verbleibenden 5 µl cDNA bei -20°C tiefgekühlt. Zusätzlich wurden 8 Eppendorfgefäße mit -RT-Proben zusammengestellt, die keine Reverse Transkriptase enthielten, um zu überprüfen, ob im DNase I-Verdau die gesamte DNA abgebaut worden war. Diese -RT-Proben bestanden jeweils aus einem Gemisch von RNA 6 verschiedener Tiere. Von der Probe eines jeden Tieres wurden somit 1,7 µl RNA entnommen und in ein Eppendorfgefäß pipettiert, sodass ein Gemisch von 10 µl entstand. Zu diesen 10 µl gepoolten Proben wurde folglich auch 10 µl Premix hinzu gegeben, welcher keine MultiScribe[®]™ Reverse Transkriptase enthielt. Der Premix setzte sich somit aus 2 µl RT Puffer, 0,8 µl dNTP Mix (100 mM), 2 µl RT Random Primers, 1 µl RNase Inhibitor und 4,2 µl Nuklease-freiem Wasser zusammen. Das weitere Verfahren der Zentrifugation und im Thermocycler lief wie beschrieben auch hier ab. Für die Verdünnung wurden 15 µl der -RT Probe und 135 µl des 0,05xTE-Puffers benötigt. Anschließend folgte ebenso die Tiefkühlung bei -20°C.

2.7.5 real-time-RT-PCR

Die real-time-RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren schon während deren Bildung. Basis dieser Erfassungsmethode ist eine Fluoreszenzmesung während jedes Reaktionszyklus, wobei die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt ist. Dies lässt den Rückschluss auf die Quantität an eingesetzter Zielnukleinsäure zu. Die relative Quantifizierung gibt das Verhältnis der Ziel- zu einer bekannten Referenzsequenz wieder. Über die Referenzsequenz lassen sich die relativen Unterschiede der Menge der interessierenden mRNAs zwischen Versuchsgruppen ableiten [166]. Wir verwendeten die real-time-RT-PCR mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen.

Bei der real-time-RT-PCR mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen lagern sich Farbstoffmoleküle, wie z.B. SYBR[®] Green, zwischen die beiden helikalen Stränge doppelsträngiger DNA ein und emittieren ein Fluoreszenzsignal, welches wiederum proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt ist [166]. Die Referenzgene β -Actin und Porphobilinogen Desaminase (PBGD) sowie die katalytischen NADPH-Oxidase-Isoformen NOX1, NOX2 und NOX4 wurden mit Hilfe dieser Methode quantifiziert. Für die PCR wurde der Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) nach Herstellerangaben genutzt und in Verbindung mit Nuklease-freiem Wasser, Reference Dye und spezifischen Primern ein genspezifischer Premix erstellt. Dieser Premix wurde zu der cDNA Probe, zu den

-RT-Proben sowie zu einer internen Referenz cDNA des Labors, welche zur Überprüfung des Leerwertes diente, hinzu gegeben. Die erhaltenen Ansätze wurden zu je 22 µl in drei Wells der Mikrottestpatte überführt, in den GeneAmp®5700 PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verbracht und die PCR durchgeführt. Zu Beginn der PCR wurde die DNA-Polymerase über 10 Minuten bei 95°C aktiviert, anschließend erfolgte über 40 Zyklen zu je 15 Sekunden die Denaturierung bei 95°C und über 1 Minute bei 60°C das Annealing und die Extension. In der folgenden Tabelle (Tab. 1) sind die GenBank® accession numbers der untersuchten Gene sowie deren Primer und die dazugehörigen Endkonzentrationen im Reaktionsgemisch aufgelistet.

Tab. 1. Mittels real-time-RT-PCR untersuchte NADPH-Oxidase-Isoformen und Referenzgene

| Gen | GenBank® accession number | Richtung | Primer, 5` - 3` | Endkonzentration in nmol/l |
|---------|---------------------------|-----------|------------------------------------|----------------------------|
| NOX1 | NM_053683 | sense | TCC CTT TGC TTC CTT CTT GA | 900 |
| | | antisense | AGG CAC CCG TCT CTC TAC AA | 900 |
| NOX2 | NM_023965 | sense | GCC AGT GAA GAT GTG TTC AGC TAT G | 300 |
| | | antisense | CCT GCA CAG CCA GTA GAA GTA GAT C | 300 |
| NOX4 | NM_053524 | sense | CTG TAC CTC AGT CAA ACA GAT GGG AT | 900 |
| | | antisense | ACT GTT TTC CCT CTG TTA CAT TTT GC | 50 |
| β-Actin | NM_001101 | sense | ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA | 900 |
| | | antisense | GCC ACA GGA TTC CAT ACC CA | 900 |
| PBGD | NM_X06827 | sense | TGG GCA CCC GGA AGA GT | 300 |
| | | antisense | CCT GTG GTG GAC ATA GCA ATG AT | 900 |

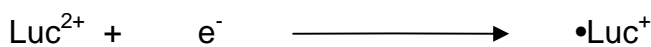
Zum PCR-Signaldetektionssystem GeneAmp[®]5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gehören eine GeneAmp[®]5700 Sequence Detection System (SDS) Software, ein GeneAmp[®]5700 Electronics, ein GeneAmp[®]5700 Sequence Detector sowie ein GeneAmp[®]5700 PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Zur Detektion des Fluoreszenzsignals wurde gefiltertes Licht einer Halogenlampe mit einer exakten Wellenlänge von 485 nm über mehrere Linsen auf die gefüllte 96-Well-Platte geworfen. Das von ihr emittierte Signal wird wiederum über Filter und Linsen in eine CCD-Kamera fokussiert, die der Signalaufnahme dient. Die hier eintreffenden Signale werden dann mittels der GeneAmp[®]5700 Sequence Detection System (SDS) Software analysiert.

Zur Auswertung der Fluoreszenz-Rohdaten der PCR wurden diese in ein Microsoft Excel Programm Data Analysis for real-time PCR (DART-PCR Version 1.0) [167] exportiert, welches auf <http://directory.gene-quantification.info/> verfügbar ist. Das DART Arbeitsprogramm wurde über den Vergleich der DNA-Amplifikationseffektivität verschiedener experimenteller Gruppen für die quantitative Analyse der PCR-Daten genutzt. Die relativen mRNA-Gehalte der NADPH-Oxidase-Isoformen wurden unter Bezug auf das geometrische Mittel der Referenzgene PBGD und β -Actin bestimmt [71].

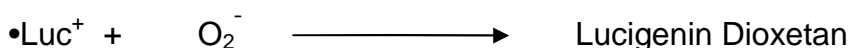
2.8 Die luminometrische Bestimmung der Superoxidbildung

2.8.1 Prinzip

Der quantitative Nachweis der Bildung von ROS durch die Aorta und renale sowie mesenteriale Widerstandsarterien erfolgte mit Hilfe der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz [71, 168]. Lucigenin (Luc^{2+}), auch bekannt als Bis-N-Methylacridiniumnitrat, wurde als Indikator für die Bildung von Superoxid (O_2^-) verwendet [71, 168-170]. Lucigenin muss zu Beginn der Reaktion durch Übertragung eines Elektrons (e^-) zu einem Lucigenin-Kation-Radikal ($\bullet\text{Luc}^+$) reduziert werden [169, 170]. Für diesen Vorgang dient NADPH als Reduktionsmittel.



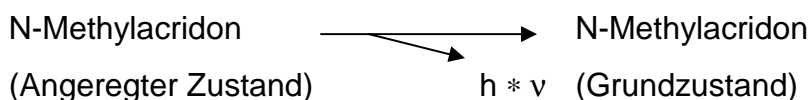
Das Lucigenin-Kation-Radikal reagiert im Folgenden mit dem Superoxid zum Lucigenin Dioxetan [169, 170].



Das gebildete Dioxetan zerfällt anschließend in 2 Moleküle N-Methylacridon, wovon sich eines in einem angeregten Zustand, das andere im Grundzustand befindet. Das sich im Grundzustand befindliche N-Methylacridon geht im Weiteren keine Reaktionen mehr ein [169, 170].



Unter Emission eines Photons ($h \cdot \nu$) charakteristischer Wellenlänge geht das N-Methylacridon vom angeregten Zustand spontan in den Grundzustand über [169, 170].



Das emittierte Photon kann nun von einem geeigneten Photonen-zähler detektiert werden [170]. Wir verwendeten das Luminometer MicroLumat Plus, Microplate Luminometer LB 96 V, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland. Dieser ultraschnelle Photonen-zähler hat einen spektralen Empfindlichkeitsbereich von 380 bis 630 nm. Die erhaltenen Werte wurden in relativen Lichteinheiten pro Minute (RLU/min) vom Programm WinGlow (Windows Software für MicroLumat Plus LB 96

V, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) aufgezeichnet. Um die einzelnen Gewebeproben miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine Normalisierung der Chemilumineszenzsignale auf das Trockengewicht der eingesetzten Proben. Die nun erhaltenen Werte wurden in relativen Lichteinheiten pro Minute pro Milligramm Trockengewicht (RLU/min·mg dry weight) angegeben.

2.8.2 Versuchsansatz und Versuchsdurchführung

Präparierte Nieren- und Mesenterialarteriensegmente wurden jeweils einzeln in Wells einer 96-Well Mikrotiterplatte (LIA-Platte, WEISS, TC, steril, Greiner Bio-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegeben, welche mit Krebs-Ringer-Hepes-Lösung (KRH-Lösung) gefüllt waren. Die Aortensegmente wurden mit einer Schere in etwa 2 Millimeter große Ringe geschnitten und anschließend ebenfalls einzeln in die mit KRH-Lösung gefüllten Wells überführt. Im Weiteren folgte die Zugabe der verschiedenen Chemikalien und Reaktionspartner, sodass, für jede Versuchsgruppe nebeneinander Mess- und Referenzansätze jeweils ohne und mit Hemmstoffen anderer Superoxid-produzierender Systeme als dem der NADPH-Oxidase entstanden. Der Referenzansatz diente der Bestimmung der Superoxid-unabhängigen Lumineszenz und war jeweils bis auf den Zusatz des Radikalfängers Tiron analog zum Messansatz zusammengesetzt. Soweit nicht anders beschrieben, waren die Reaktionspartner bis auf Rotenon (gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO)) in KRH gelöst und wurden im Folgenden, zu den mit KRH und Gefäßsegmenten vorgelegten Wells gegeben.

Der erste Messansatz diente der Erfassung der gesamten NADPH-abhängigen Superoxidproduktion der Versuchsgewebe. Hier wurden lediglich 5,0 µl DMSO zum Mess- sowie Referenzansatz hinzu gegeben, um eine Vergleichbarkeit von erstem und zweitem Messansatz zu ermöglichen, da ein Reaktionspartner des Messansatzes 2 in DMSO gelöst war. Die Zusammensetzung des dazugehörigen Referenzansatzes unterschied sich, wie oben beschrieben, lediglich durch die Zugabe von 20 mM des Radikalfängers Tiron vom Messansatz.

Der zweite Messansatz diente der Erfassung der NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxidproduktion, was die Hemmung wichtiger Enzymsysteme, die neben der NADPH-Oxidase Superoxid bilden, notwendig machte [71, 168]. Hierfür gaben wir zu unserem Versuchsansatz aus KRH und Gefäßsegmenten 50 µM Rotenon, gelöst in DMSO, 100 µM Allopurinol und 100 µM L-NAME (N ω -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester)

hinzu [71, 168]. Rotenon hemmt den mitochondrialen Elektronentransport und damit die mitochondriale Superoxidproduktion [71, 168]. Andere potenziell Superoxid bildende Systeme, wie die Xanthin-Oxidase und die NO-Synthasen wurden durch Allopurinol [71, 171] bzw. L-NAME inhibiert [71, 172]. Der dazugehörige Referenzansatz wurde, bei sonst gleicher Zusammensetzung, wiederum mit 20 mM des Radikalfängers Tiron versetzt.

Um ein mögliches Lumineszenzsignal, hervorgerufen durch eingesetzte Chemikalien und Reaktionspartner, zu erkennen, wurde die Bestimmung eines Leerwertes durchgeführt. Dieser enthielt keine Gefäßsegmente sondern bestand lediglich aus KRH-Lösung, 100 μ M Allopurinol, 100 μ M L-NAME, 50 μ M Rotenon, 20 mM Tiron.

Nach Zusammenstellung der Reaktionsgemische wurden die Gefäßsegmente 30 Minuten bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Hierauf folgte die Zugabe von Lucigenin 125 μ M, an die sich die erste Messung der Grundlumineszenz über 30 Minuten anschloss. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 37°C jeweils für eine Sekunde alle 90 Sekunden (1s/90s Taktung). Im Anschluss wurde nun 300 μ M NADPH, gelöst in KRH, als Substrat der NADPH-Oxidase über einen Autoinjektor zum Reaktionsgemisch gegeben. Die zweite Messung erfolgte unter gleichen Bedingungen wie die erste für 60 Minuten.

Nach Abschluss dieses Versuchsteils wurden die Aortenringe und Arteriensegmente mit Bromphenol-Blau gefärbt und mit Hilfe einer Pinzette in Eppendorf-Gefäße überführt, um über Nacht bei 60°C zu trocknen. Anschließend wurde mit einer Feinstwaage (Typ4431, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, Deutschland) das Trockengewicht der eingesetzten Arteriensegmente bestimmt, um die aufgezeichneten Lumineszenzsignale vergleichen zu können.

Die Differenz der Signale des ersten Mess- und Referenzansatzes ohne Hemmstoffe ergab nun den Wert, der sich dem wahren Wert der NADPH-abhängigen Superoxidbildung am ehesten nähert. Hingegen stellt die Differenz der Lumineszenzsignale des zweiten Mess- und Referenzansatzes mit Hemmstoffen den Wert der NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxidbildung dar, welcher als NADPH-Oxidaseaktivität betrachtet wird. Die Begriffe der NADPH-Oxidase abhängigen Superoxidbildung und der NADPH-Oxidaseaktivität werden im Folgenden synonym verwandt.

2.9 Geräte und Materialien

Chemikalien und Pharmaka

Die Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung sowie die kaliumreiche (K125)-Lösung wurde täglich aus Stammlösungen der Einzelbestandteile zusammengestellt. Zuvor wurde die Hydrogenkarbonat-Stammlösung für eine Stunde mit Carbogen begast. Die Pufferlösungen wurden mit einem pH-Meter (MP220 Basic pH/mV/°C Meter, Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C erwärmt. Die KRB-Lösung setzte sich aus 118,5 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l MgSO₄•7H₂O, 1,2 mmol/l KH₂PO₄, 25,0 mmol/l NaHCO₃, 2,5 mmol/l CaCl₂•2H₂O sowie 5,6 mmol/l α-D-Glukose zusammen [50]. Die K125-Lösung setzt sich aus 118,5 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l MgSO₄•7H₂O, 1,2 mmol/l KH₂PO₄, 25,0 mmol/l NaHCO₃, 2,5 mmol/l CaCl₂•2H₂O sowie 5,6 mmol/l α-D-Glukose zusammen. Außerdem wurden für die Experimente folgende Chemikalien und Pharmaka verwendet:

- α-D-Glukose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Acetylcholin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- Allopurinol (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland)
- Bromphenol-Blau (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
- CaCl₂•2H₂O (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Diethylether (Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland)
- DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Guanabenz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Guanethidin (Guanethidinmonosulfat, CFM Oskar Tropitzsch GmbH, Marktredwitz, Deutschland)
- Heparin-Natrium Braun[®] 25000 I.E./5ml (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland)
- High-Capacity cDNA reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- KCl (Serva Feinbiochemie GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- KH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- L-NAME (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

- Lucigenin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- NADPH (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- NaHCO_3 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchloridlösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumhydroxid (MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Nitroprussid-Natrium (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- Noradrenalin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Pentobarbital-Natrium (Fagron GmbH & Co KG, Barsbüttel, Deutschland)
- Phenylephrin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- RNA-Isolations-Kit RNAqueous[®]-4PCR, DNA free RNA Isolation for RT-PCR (Ambion, Huntingdon, UK)
- Rotenon (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- Salzsäure (MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Tiron (Fluka & Riedel-deHaën, Buchs, Schweiz)
- Wasserstoffperoxid (MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Geräte

- Brückenverstärker (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- Drahtmyograph (Model 410A, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dänemark)
- Druckwandler (Isotec[®], Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- Elektrischer Rasierer
- Faseroptische Lichtquelle (Leica KL 1500 LCD, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Feinstwaage (Typ4431, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, Deutschland)
- LabVIEW (LabVIEW 5.0, National Instruments, Austin, USA)-basiertes Datenerfassungssystem (Top Universal Acquisition Program 0.7, Michael Navakatiyan, University of Auckland, Auckland, Neuseeland)
- Luminometer (MicroLumat Plus, Microplate Luminometer LB 96 V, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland)
- Magnetrührer (MR1000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kehlheim, Deutschland)

- Magnetrührstäbchen oval verschiedene Größen (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kehlheim, Deutschland)
- mikrochirurgisches Instrumentarium (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland)
- pH-Meter (MP220 Basic pH/mV/°C Meter, Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland)
- Pipette (Variable Volume Macro Pipette, Model 3100, NICHIRYO AMERICA INC, Maryland Heights, Mo, US)
- Stereomikroskop (Leica Wild M3Z, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Thermal cycler (Touch Down, Hybaid, Teddington, UK)
- Thermal Cycler (Touch Down, MWG-Biotech Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH Ebersberg, Deutschland)
- Thermomixer (Thermomixer 5437, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Vortex-Schüttler (Reax 2000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kehlheim, Deutschland)
- Waage (BP 110 S, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Waage (Laborwaage OWA Labor, Nagema, Dresden, Deutschland)
- Waage (MC1 Laboratory LC 220S, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Wasserbadthermostat (JULABO EXATHERM U3 electronic, Seelbach, Deutschland)
- Zentrifuge (Hermle Z 233M, Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland)
- Zentrifuge (Mini-centrifuge/vortex Microspin FV-2400, Biosan Medical-Biological Research and Technologies, Riga, Litauen)
- Zentrifuge (Sigma Laborzentrifugen Typ 3-18K, Osterode, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien

- Chemilumineszenzplatte (LIA-Platte, WEISS, TC, steril, Greiner Bio-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Desinfektionsmittel (Softasept[®] N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Edelstahlraht (40 µm Durchmesser)

- Eppendorf-Gefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Kanülen (BD Microlance 3, BD, Drogheda, Irland)
- Katheter (Portex[®], Fine Bore Polyethene Tubing 0,28x0,61mm, Smiths Medical, Kent, UK)
- Katheter (Portex[®], Fine Bore Polyethene Tubing 0,58x0,96mm, Smiths Medical, Kent, UK)
- Mullkompressen (Lohmann & Rauscher, Neuwied, Deutschland)
- Nahtmaterial (Catgut GmbH, Markneukirchen, Deutschland)
- Pflaster (Leukosilk S, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Skalpellklinge (Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Spritzen (BD Discardit II, BD, Madrid, Spanien)
- Trockennahrung (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland)
- Wattestäbchen (Universitätsapotheke, Greifswald, Deutschland)
- Wundantiseptik (Braunol[®], B. Braun Ag Melsungen, Melsungen, Deutschland)

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software SigmaStat[®] 3.0 (SPSS inc., Chicago, USA). Für alle statistischen Tests wurde als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Die Erstellung der Konzentrationswirkungskurven anhand der myographisch erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software Myodata Version 2.02 (Universität Maastricht, Maastricht, Niederlande), Microsoft Office Excel 2003 und SigmaPlot 9.0 (SPSS Inc, Chicago Illinois, USA). Durch computergestützte Kurvenanpassung mittels Marquardt-Levenberg-Algorithmus wurden sigmoidale, vier-parametrische Konzentrationswirkungskurven für die Gefäßreaktionen auf pharmakologische Interventionen erstellt. Zum statistischen Vergleich der Gefäßreaktionen einzelner Versuchsgruppen wurden, die bei der Kurvenanpassung berechneten maximalen Effekte und die $\log EC_{50}$ -Werte der Konzentrationswirkungskurven genutzt. Die durch die Vasokonstriktoren ausgelöste Zunahme der Gefäßwandspannung wurde als prozentualer Anteil der Kalium-induzierten Wandspannung angegeben. Bei Applikation von Vasodilatoren wurde die Abnahme der Wandspannung auf die Wandspannung der Vorkontraktion bezogen. Der $\log EC_{50}$ stellt den Wendepunkt einer sigmoidalen Kurve dar und entspricht der Konzentration eines Pharmakons, bei der die halbmaximale Gefäßantwort erreicht wird. Der $\log EC_{50}$ -Wert ist somit ein Maß für die Sensitivität des Gefäßsegmentes gegenüber den verwendeten Agonisten.

Die Effekte der Faktoren Geschlecht und Sympathektomie/Scheinsympathektomie wurden mithilfe von Zwei-Weg-Varianz-Analysen für folgende Parameter untersucht:

- Körpergewicht
- Herzfrequenz
- mittlerer arterieller Blutdruck
- Maxima der relativen Wandspannung bei Kalium-induzierter Kontraktion
- Maxima der relativen Wandspannung und $\log EC_{50}$ -Werte für Konzentrationswirkungskurven mit Noradrenalin
- Minima der relativen Wandspannung und $\log EC_{50}$ -Werte für Konzentrationswirkungskurven mit Acetylcholin und Nitroprussid-Natrium

- Maxima der absoluten sowie relativen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion der Wasserstoffperoxidversuche
- Maxima der Kalium-induzierten Kontraktion der Wasserstoffperoxidversuche
- Maxima der relativen Wandspannung für Konzentrationswirkungskurven von Wasserstoffperoxid mit sowie ohne Vorkontraktion.

Die statistische Auswertung der Versuche der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz und der NADPH-Oxidase mRNA-Gehalte erfolgte mit Hilfe von Zwei-Weg-Varianz-Analysen für die Faktoren Geschlecht und Sympathektomie/Scheinsympathektomie gefolgt von einem Student-Newman-Keuls-Test.

Zwei-Weg-Varianz-Analysen mit Messwertwiederholungen wurden für die Vergleiche der Parameter $\log EC_{50}$ und E_{max} bei wiederholter Erstellung von Konzentrationswirkungskurven sowie für Gruppenvergleiche von Konzentrationswirkungskurven, für die sich kein Vier-Parameter-Modell anpassen ließ, durchgeführt für:

- Maxima der relativen Wandspannung für Konzentrationswirkungskurven mit Noradrenalin und Wasserstoffperoxid mit sowie ohne Vorkontraktion
- $\log EC_{50}$ -Werte für Konzentrationswirkungskurven mit Noradrenalin
- Minima der relativen Wandspannung und $\log EC_{50}$ -Werte für Konzentrationswirkungskurven mit Acetylcholin und Nitroprussid-Natrium

Im Weiteren wurden Zwei-Weg-Varianz-Analysen mit Messwertwiederholungen bei den Noradrenalin-Zeitkontroll-Experimenten für die Faktoren Sympathektomie/Scheinsympathektomie und 1. sowie 2. Noradrenalingabe durchgeführt.

Der Zweistichproben t-Test wurde für die Auswertung folgender Experimente für den statistischen Vergleich zwischen Kontroll- und sympathektomierten Tieren sowie für den Vergleich zwischen beiden Geschlechtern genutzt:

- maximale Spannungsentwicklung und $\log EC_{50}$ -Werte für Konzentrationswirkungskurven mit Phenylephrin
- maximale Kontraktionsantwort für Konzentrationswirkungskurven mit Guanabenz

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Versuchstiere

3.1.1 Alter und Körpergewicht

Die Ratten waren bei Versuchsdurchführung 11 bis 14 Wochen alt. Das Körpergewicht männlicher Versuchstiere war zum Zeitpunkt der Organentnahme signifikant höher, als das der weiblichen Versuchstiere (Tab. 2). Die Sympathektomie hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Gewicht der Versuchstiere.

Tab. 2. Körpergewichte der scheinsympathektomierten und sympathektomierten Versuchstiere.

| | Geschlecht | Gewicht in g |
|----------------------|----------------|--------------|
| Scheinsympathektomie | männlich, n=17 | 448 ± 15 * |
| | weiblich, n=16 | 298 ± 16 |
| Sympathektomie | männlich, n=19 | 442 ± 14 * |
| | weiblich, n=14 | 268 ± 17 |

* $p < 0,05$ vs. weibliche Tiere

3.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz

Die intraarterielle Messung des Blutdrucks von scheinsympathektomierten Kontroll- (CTR) und sympathektomierten (SX) Versuchstieren zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abb. 3). Der mittlere arterielle Blutdruck scheinsympathektomierter Kontrolltiere war mit 110 ± 2 mmHg höher, als der, der sympathektomierten Tiere (104 mmHg ± 2 mmHg). Zwischen beiden Geschlechtern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Blutdruckwerte.

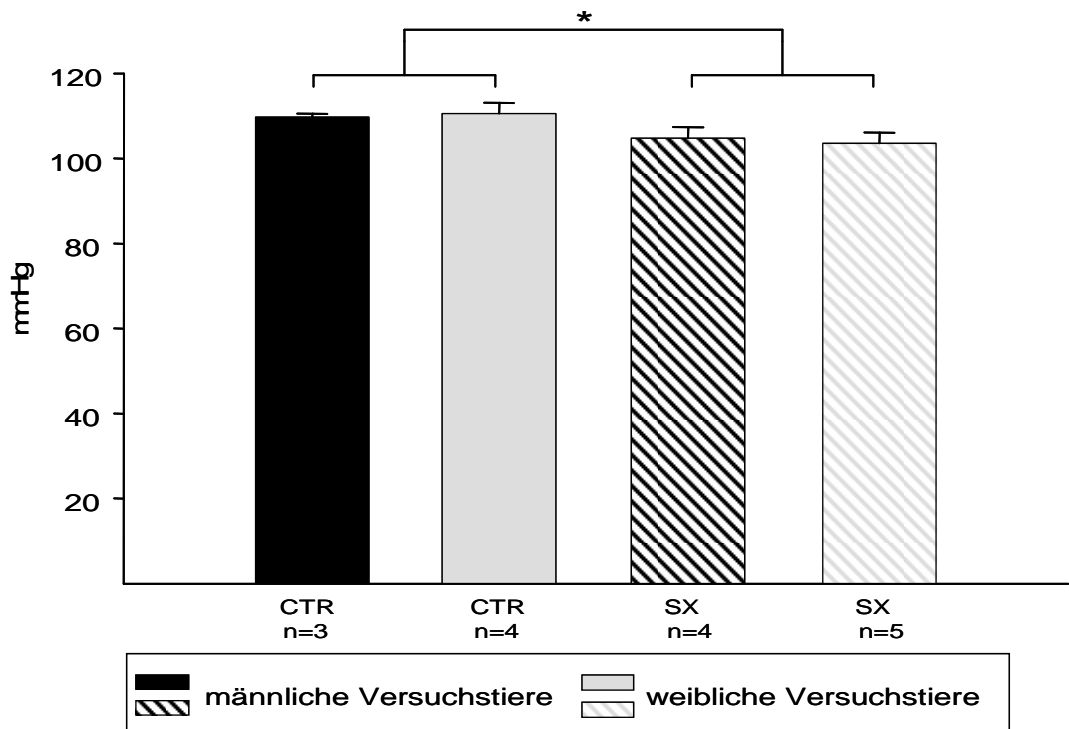


Abb. 3. Intraarteriell ermittelter mittlerer arterieller Blutdruck männlicher sowie weiblicher CTR und SX.
 * $p < 0,05$ vs. SX

Die Herzfrequenz von scheinsympathektomierten Kontroll- und sympathektomierten Versuchstieren unterschied sich statistisch nicht signifikant voneinander (Abb. 4).

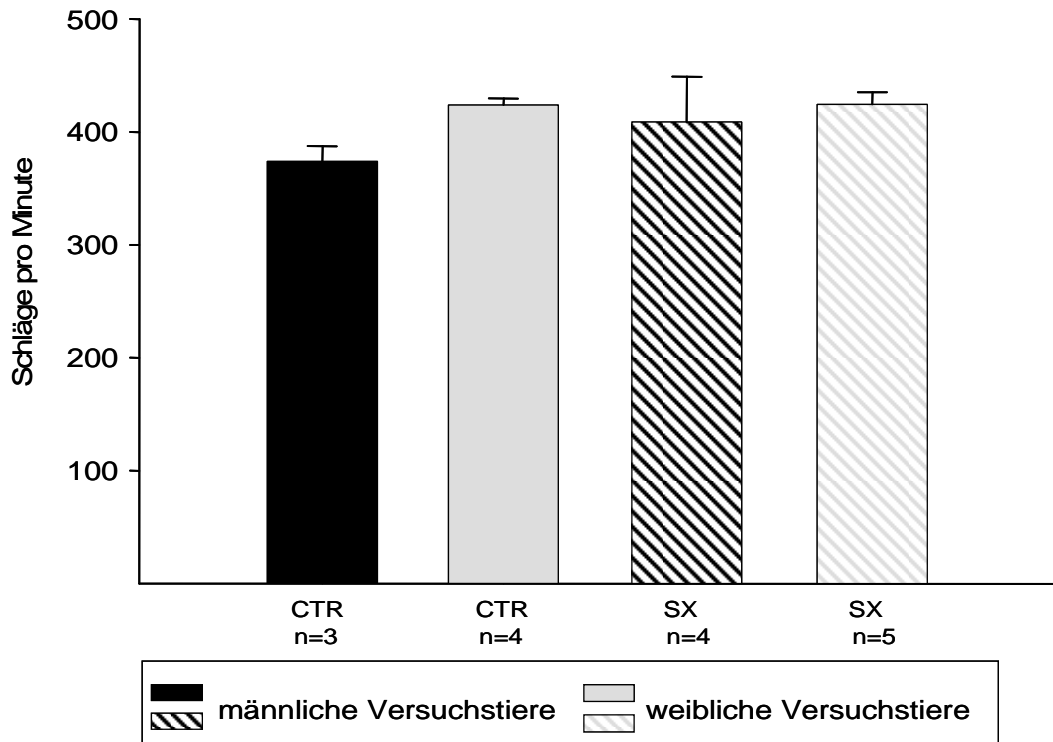


Abb. 4. Herzfrequenz männlicher sowie weiblicher CTR und SX.

3.2 Maximale Wandspannung Kalium-induzierter Kontraktion

Die untersuchten Gefäßsegmente sympathektomierter und scheinsympathektomierter Tiere reagierten mit einer Zunahme der Wandspannung auf die Applikation von K125-Lösung. Mesenteriale Gefäßsegmente männlicher sowie weiblicher Kontrolltiere zeigten eine statistisch signifikant größere Wandspannung als die, der entsprechenden sympathektomierten Versuchstiere (Tab. 3). Für renale Gefäßsegmente lagen keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Spannungsentwicklung als Antwort auf die Applikation von K125-Lösung vor (Tab. 3). Der Vergleich zwischen beiden Geschlechtern zeigte, dass die Wandspannung mesenterialer männlicher Kontrolltiere statistisch signifikant größer war, als bei den weiblichen Kontrolltieren (Tab. 3).

Tab. 3. Maximale Wandspannung renaler und mesenterialer Widerstandsarterien bei Kalium-induzierter Kontraktion

| Geschlecht | Behandlung | Wandspannung, mN/mm | |
|------------|------------|---------------------|---------------------|
| | | renale Gefäße | mesenteriale Gefäße |
| männlich | CTR, n=35 | 1,40 ± 0,12 | 3,66 ± 0,16 * ‡ |
| | SX, n=31 | 1,39 ± 0,12 | 2,97 ± 0,17 |
| weiblich | CTR, n=30 | 1,53 ± 0,13 | 3,14 ± 0,17 ♦ |
| | SX, n=28 | 1,38 ± 0,13 | 2,79 ± 0,17 |

* p < 0,05 vs. mesenteriale Gefäßsegmente männlicher SX

‡ p < 0,05 vs. mesenteriale Gefäßsegmente weiblicher CTR

♦ p < 0,05 vs. mesenteriale Gefäßsegmente weiblicher SX

3.3 Vasokonstriktion

3.3.1 Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die erhöhte Noradrenalin-sensitivität arterieller Widerstandsgefäße sympathektomierter Tiere

Renale und mesenteriale Gefäßsegmente reagierten mit einer konzentrationsabhängigen Vasokonstriktion auf die Applikation von Noradrenalin. Für renale Gefäßsegmente männlicher sowie weiblicher Versuchstiere zeigte sich, dass die Sympathektomie eine statistisch signifikant erhöhte Sensitivität gegenüber Noradrenalin bewirkte, was in einer Linksverschiebung (Abb. 5, 6) der Konzentrationswirkungskurven aufgrund signifikant niedrigerer $\log EC_{50}$ -Werte für Noradrenalin und höherer maximaler relativer Wandspannungen (E_{max}) zum Ausdruck kommt (Tab. 4). Zwischen beiden Geschlechtern gab es hinsichtlich des $\log EC_{50}$ für Noradrenalin keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die maximale relative Wandspannung sympathektomierter Versuchstiere war größer als bei scheinsympathektomierten Kontrolltieren. Dies konnte sowohl für männliche (Abb. 5), als auch für weibliche Versuchstiere (Abb. 6) nachgewiesen werden (Tab. 4). Der Vergleich zwischen den Geschlechtern zeigte, dass die E_{max} weiblicher sympathektomierter Versuchstiere signifikant größer war, als die männlicher sympathektomierter Tiere (Tab. 4). Durch Zugabe des Superoxidradikalfängers Tiron wurde weder bei sympathektomierten Versuchstieren noch bei scheinsympathektomierten Kontrolltieren eine statistisch signifikante Änderung des $\log EC_{50}$ für Noradrenalin bewirkt. Wie in Abb. 5 dargestellt, wurde die maximale Spannungsänderung renaler Gefäßsegmente männlicher sympathektomierter Tiere durch Tiron leicht aber statistisch signifikant abgeschwächt (ohne Tiron $E_{max} = 1,65 \pm 0,09$ vs. mit Tiron $E_{max} = 1,55 \pm 0,07$, $p < 0,05$). Bei männlichen scheinsympathektomierten Kontrolltieren sowie weiblichen Tieren war dieser Effekt des Tirons nicht nachweisbar.

Tab. 4. logEC₅₀-Werte und maximale relative Wandspannung (E_{max}) renaler Arteriensegmente für die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion

| Geschlecht | Behandlung | logEC ₅₀ -Werte | E _{max} |
|------------|------------|----------------------------|------------------|
| Männchen | CTR, n=10 | -6,15 ± 0,16 | 1,37 ± 0,08 |
| | SX, n=8 | -6,97 ± 0,17 * | 1,65 ± 0,09 * |
| Weibchen | CTR, n=7 | -6,25 ± 0,19 | 1,32 ± 0,1 |
| | SX, n=7 | -6,90 ± 0,19 ‡ | 2,01 ± 0,1 ‡ ♦ |

* p < 0,05 vs männliche CTR

‡ p < 0,05 vs weibliche CTR

♦ p < 0,05 vs. männliche SX

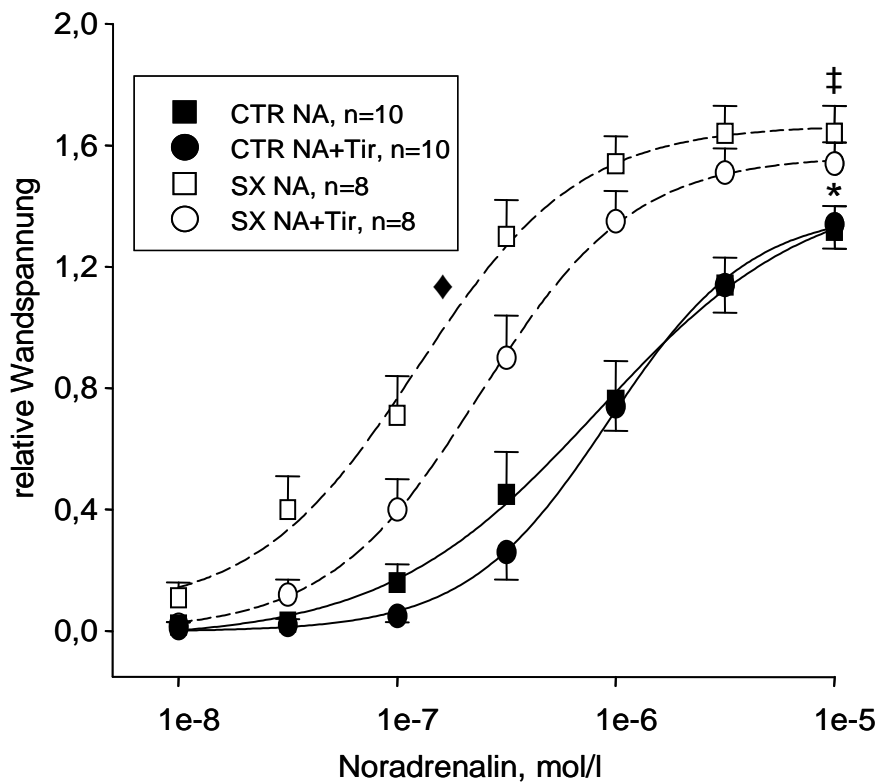


Abb. 5. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Noradrenalin (NA) und Noradrenalin nach Tiruzamidgabe (NA+Tir) bei renalen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

* p < 0,05 größere E_{max} von SX vs. CTR männlicher Versuchstiere

♦ p < 0,05 verminderte logEC₅₀ von SX vs. CTR männlicher Versuchstiere

‡ p < 0,05 verminderte E_{max} von SX NA+Tir vs. SX NA männlicher Versuchstiere

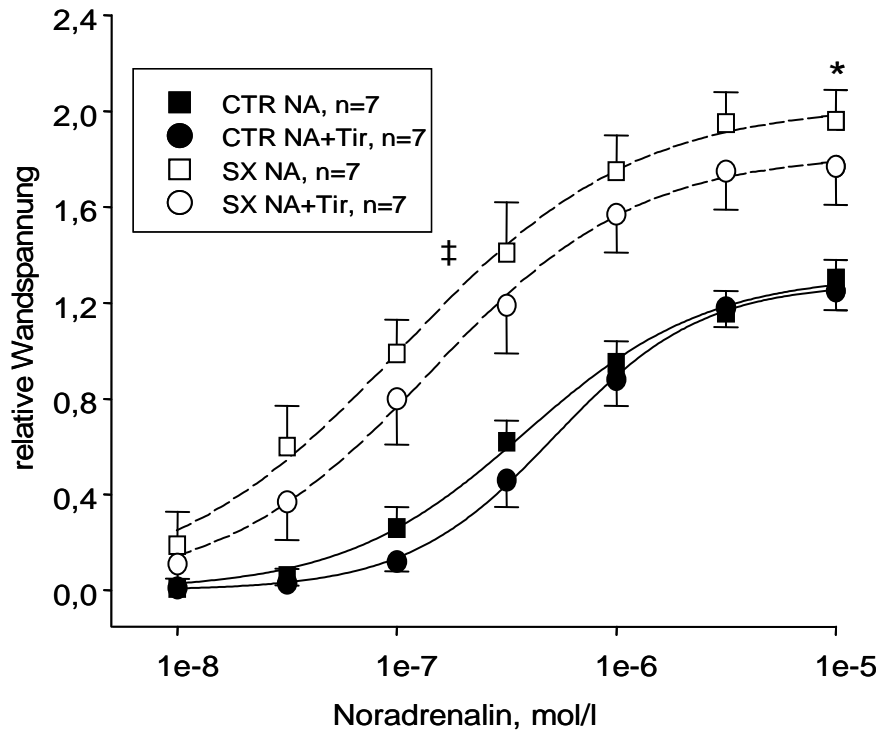


Abb. 6. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Noradrenalin (NA) und Noradrenalin nach Tirongabe (NA+Tir) bei renalen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

* $p < 0,05$ größere E_{max} von SX vs. CTR weiblicher Versuchstiere

‡ $p < 0,05$ verminderte $\log EC_{50}$ von SX vs. CTR weiblicher Versuchstiere

Nach kumulativer Gabe von Noradrenalin entwickelten mesenteriale Gefäßsegmente männlicher und weiblicher sympathektomierter Versuchstiere eine statistisch signifikant größere maximale Wandspannung als die der schein sympathektomierten Kontrolltiere (siehe Tab. 5, Abb. 7 und Abb. 8). Der $\log EC_{50}$ -Wert, als Maß der Sensitivität gegenüber Noradrenalin, zeigte sich bei mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher sympathektomierter Tiere im Vergleich zu denen männlicher schein sympathektomierter Kontrolltiere signifikant vermindert (siehe Tab. 5 und Abb. 7). Bezüglich des $\log EC_{50}$ bei mesenterialen Gefäßsegmenten weiblicher Tiere zeigte sich eine Tendenz zur Entwicklung einer Supersensitivität, jedoch waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant (Tab. 5). Dies zeigt sich auch bei dem Vergleich zwischen den Geschlechtern, bei dem Gefäßsegmente sympathektomierter männlicher Tiere eine signifikant geringere $\log EC_{50}$ aufweisen, als die weiblicher Tiere (Tab. 5). Wie in Abb. 7 dargestellt, bewirkte die Zugabe von Tiron bei mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher und weiblicher Versuchstiere keine statistisch signifikanten Veränderungen der Kontraktionsantworten auf Noradrenalin.

Tab. 5. logEC₅₀-Werte und maximale relative Wandspannung (E_{max}) mesenterialer Arteriensegmente für die Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion

| Geschlecht | Behandlung | logEC ₅₀ -Werte | E _{max} |
|------------|------------|----------------------------|------------------|
| Männchen | CTR, n=10 | -5,94 ± 0,11 | 1,11 ± 0,09 |
| | SX, n=10 | -6,97 ± 0,12 * ♦ | 1,39 ± 0,11 * |
| Weibchen | CTR, n=7 | -5,76 ± 0,14 | 1,13 ± 0,12 |
| | SX, n=7 | -5,91 ± 0,13 | 1,43 ± 0,11 ‡ |

* p < 0,05 vs männliche CTR

‡ p < 0,05 vs weibliche CTR

♦ p < 0,05 vs weibliche SX

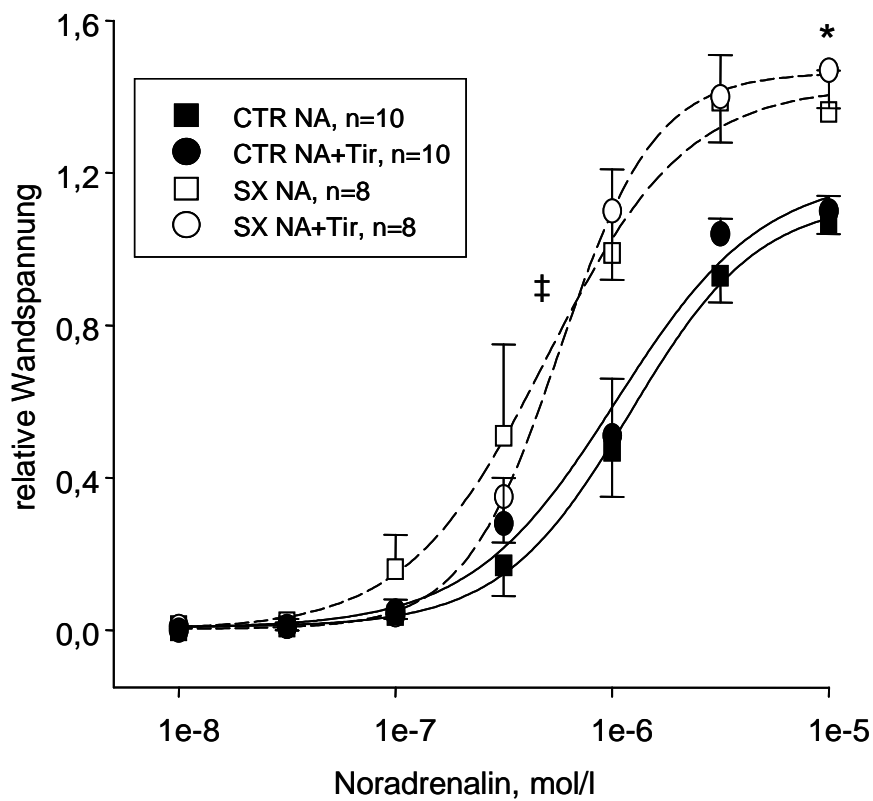


Abb. 7. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Noradrenalin (NA) und Noradrenalin nach Tirzepatide (NA+Tir) bei mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

* p < 0,05 größere E_{max} von SX vs. CTR männlicher Versuchstiere

‡ p < 0,05 verminderte logEC₅₀ von SX vs. CTR männlicher Versuchstiere

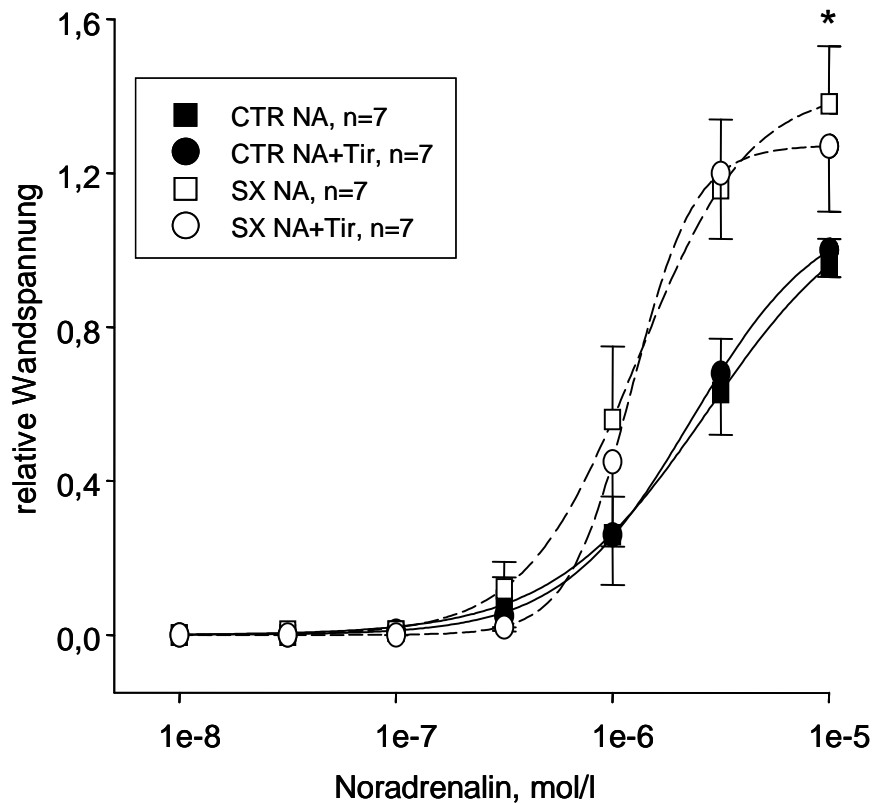


Abb. 8. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Noradrenalin (NA) und Noradrenalin nach Tirongabe (NA+Tir) bei mesenterialen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

* $p < 0,05$ größere E_{max} von SX vs. CTR weiblicher Versuchstiere

Zeitkontrollen

Zur Kontrolle, ob die durch Tiron-Applikation ausgelöste Reduktion von E_{max} durch Ermüdungsprozesse des Gefäßsegmentes hervorgerufen wurde, führten wir Zeitkontrolllexperimente durch. Diese Experimente zeigten, dass sich die Gefäßantwort nach erster sowie zweiter Noradrenalin-Applikation nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden (Abb. 9-12).

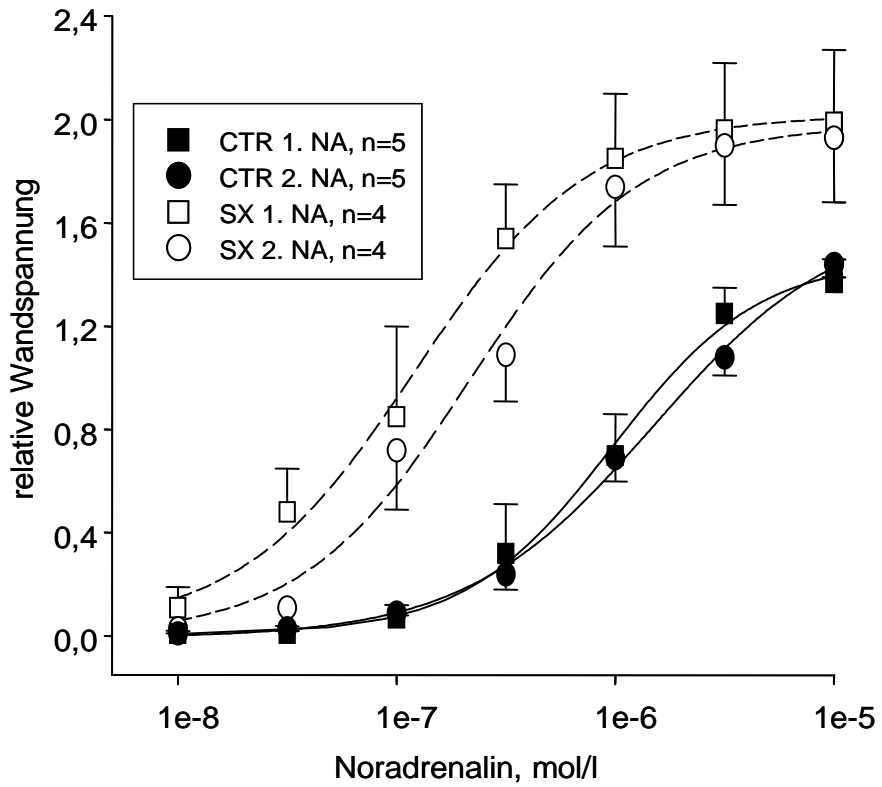


Abb. 9. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Noradrenalin. Dargestellt sind erste (1. NA) sowie zweite (2. NA) Konzentrationswirkungskurve von renalen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

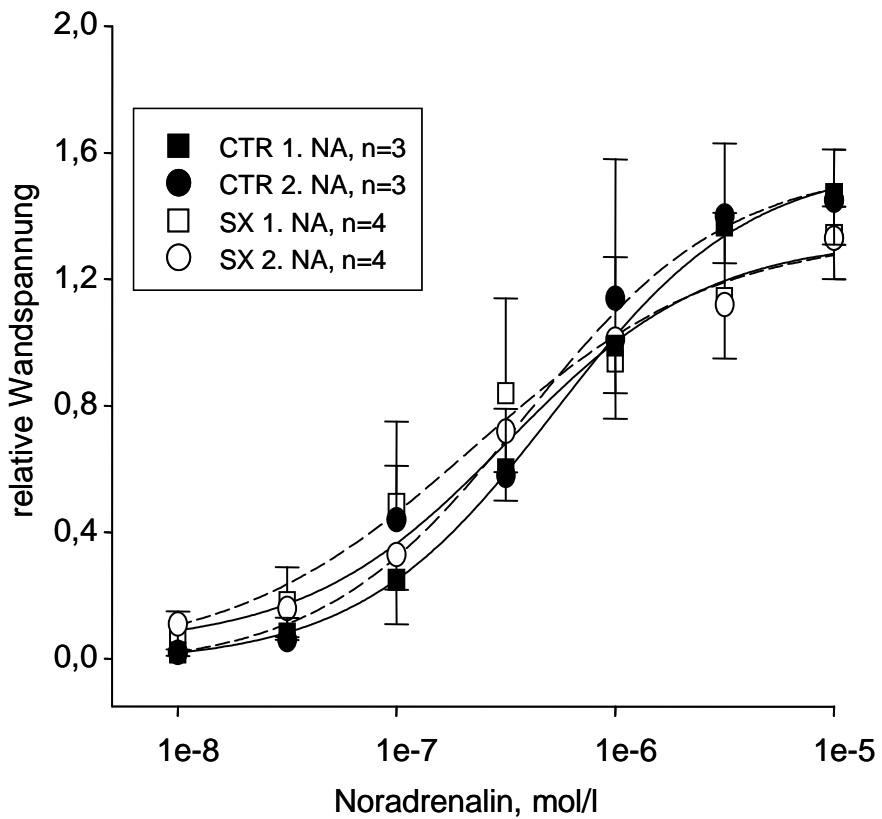


Abb. 10. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Noradrenalin. Dargestellt sind erste (1. NA) sowie zweite (2. NA) Konzentrationswirkungskurve von renalen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

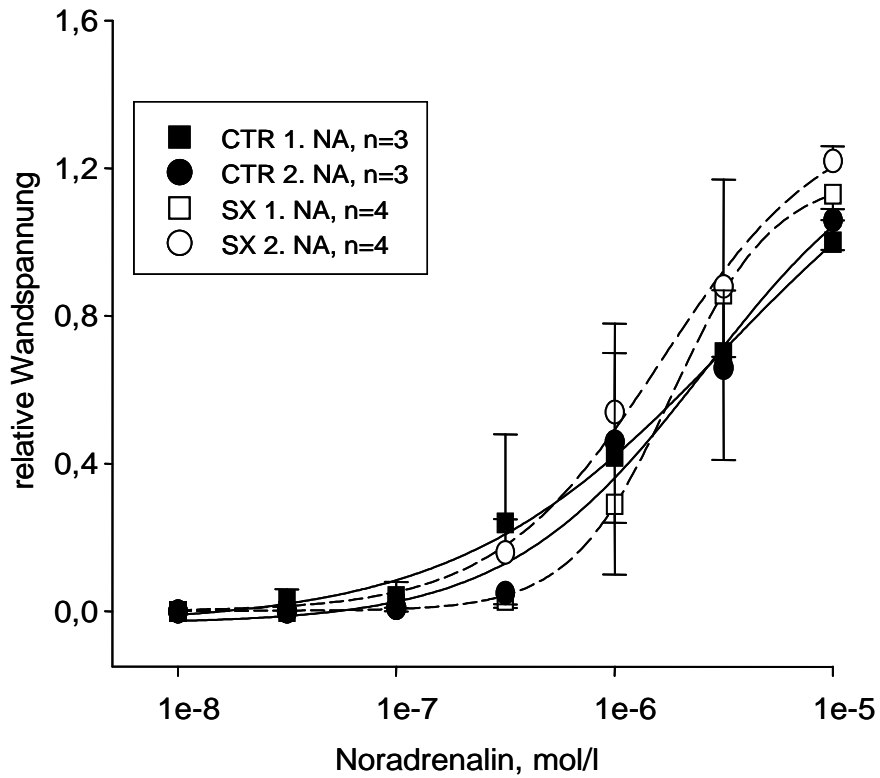


Abb. 11. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Noradrenalin. Dargestellt sind erste (1. NA) sowie zweite (2. NA) Konzentrationswirkungskurve von mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

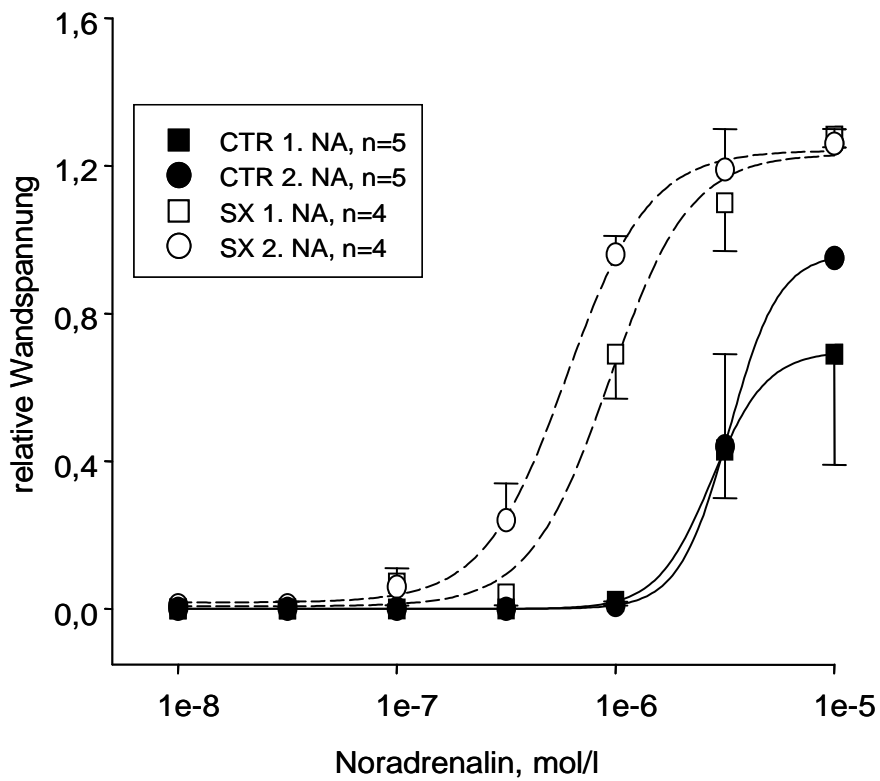


Abb. 12. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Noradrenalin. Dargestellt sind erste (1. NA) sowie zweite (2. NA) Konzentrationswirkungskurve von mesenterialen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

3.3.2 Bedeutung α_1 - und α_2 -Adrenonrezeptor-vermittelter Prozesse an der Denervierungsupersensitivität

Um zu prüfen, ob die Noradrenalin-Supersensitivität der Gefäßmuskulatur α_1 - oder α_2 -Adrenorezeptor getragen ist, wurden die Gefäßantworten auf die α_1 - und α_2 - Rezeptoragonisten Phenylephrin und Guanabenz untersucht.

Renale Gefäßsegmente männlicher (Abb. 13) und weiblicher (Abb. 14) sympathektomierter Tiere wiesen im Vergleich zu deren schein sympathektomierten Kontrollen eine statistisch signifikant erhöhte Phenylephrinsensitivität auf (Weibchen $\log EC_{50} = -6,63 \pm 0,12$ vs. $-6,29 \pm 0,15$; $p < 0,05$; Männchen $\log EC_{50} = -6,5 \pm 0,18$ vs. $-6,22 \pm 0,08$; $p < 0,05$). Auch die Phenylephrin-induzierten maximalen relativen Wandspannungen zeigten bei renalen Gefäßsegmenten männlicher und weiblicher sympathektomierter Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrollen statistisch signifikant erhöhte Werte (Abb. 13 und 14).

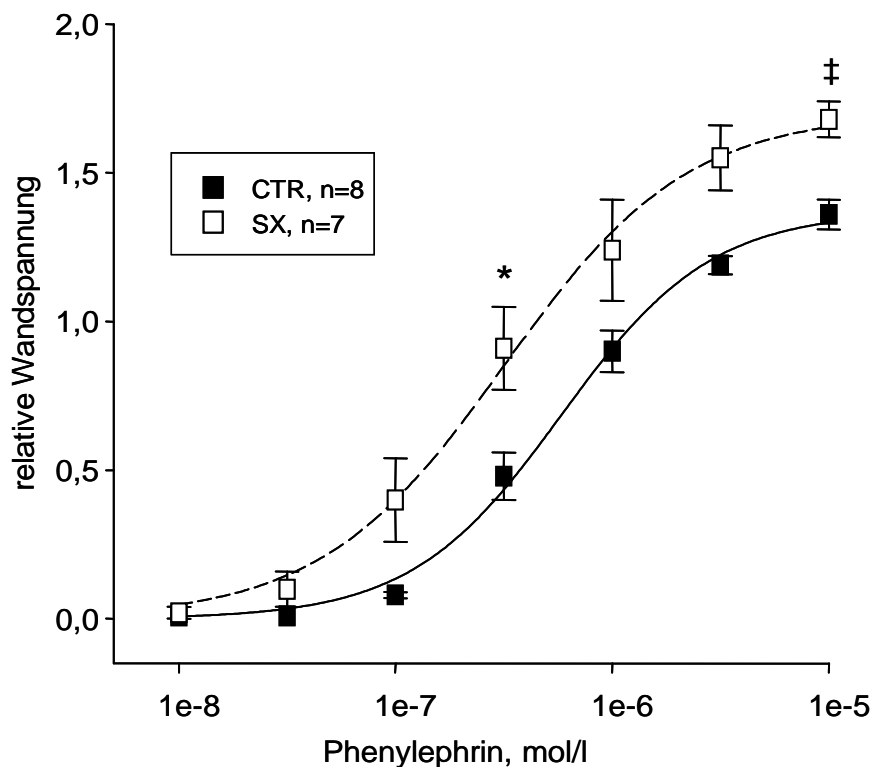


Abb. 13. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Phenylephrin bei renalen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

* $p < 0,05$ niedrigere $\log EC_{50}$ von SX vs. CTR

‡ $p < 0,05$ größere E_{max} von SX vs. CTR

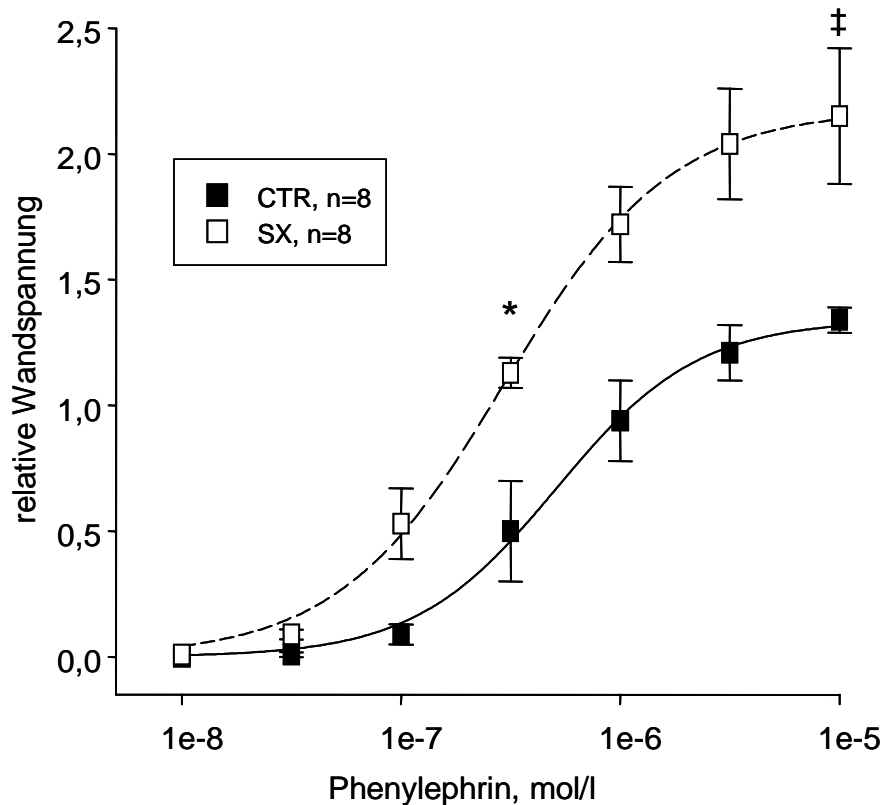


Abb. 14. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Phenylephrin bei renalen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

* $p < 0,05$ verminderte $\log EC_{50}$ von SX vs. CTR

‡ $p < 0,05$ größere E_{max} von SX vs. CTR

Die kumulative Applikation von Guanabenz zeigte eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion sympathektomierter Gefäße männlicher Versuchstiere. Die maximale Kontraktionsantwort renaler Gefäßsegmente männlicher sympathektomierter Versuchstiere war statistisch signifikant (Abb. 15). Scheinsympathektomierte Kontrolltiere entwickelten keine Guanabenz-induzierte Vasokonstriktion (Abb. 15). In der Gruppe der weiblichen Versuchstiere zeigte sich eine leichte Zunahme des Gefäßtonus bei sympathektomierten Tieren, welche jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich zu den Kontrollgefäßsegmenten war (Abb. 16).

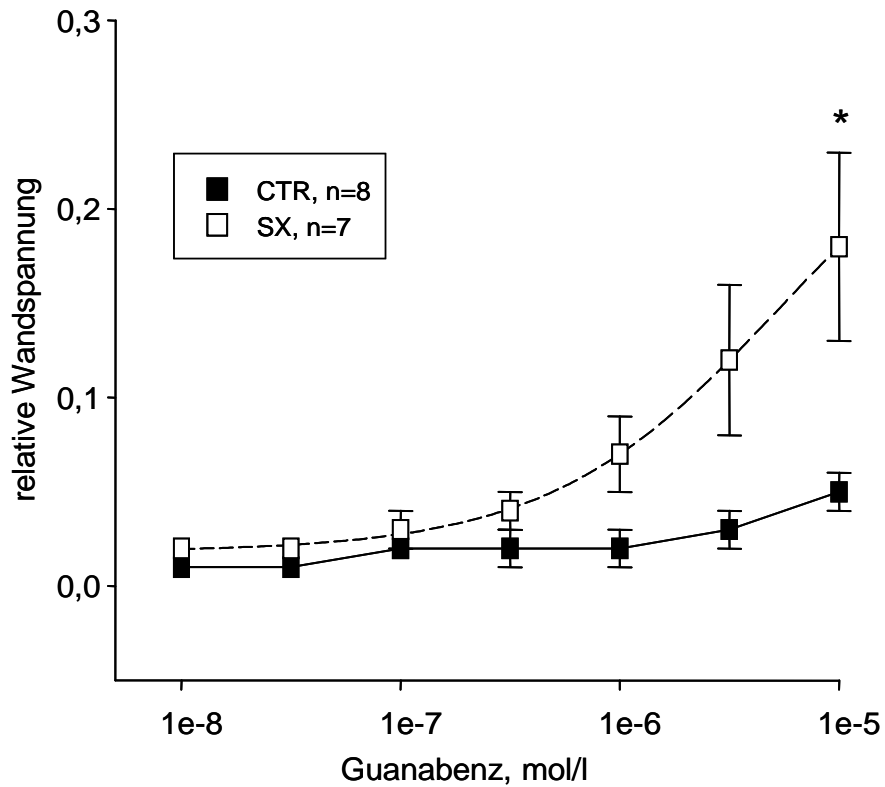


Abb. 15. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Guanabenz bei renalen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

* $p < 0,05$ größere Kontraktionsantwort vs. CTR

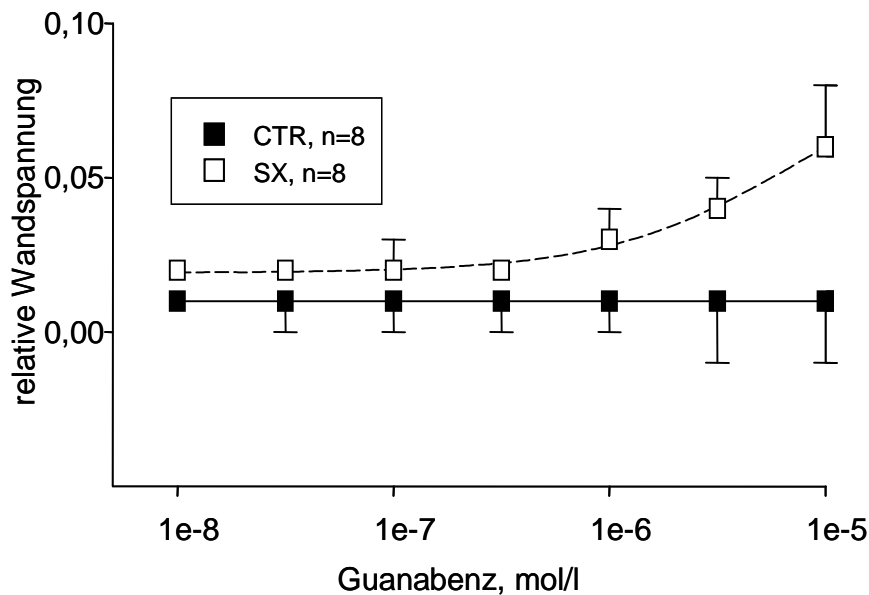


Abb. 16. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Guanabenz bei renalen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

Mesenterialarteriensegmente männlicher Kontrolltiere und sympathektomierter Tiere zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion (Abb. 17) Bei Betrachtung der maximalen Spannungsän-

derung zeigten Gefäßsegmente sympathektomierter weiblicher Versuchstiere gegenüber ihren Kontrollen signifikant höhere Werte (Abb. 18).

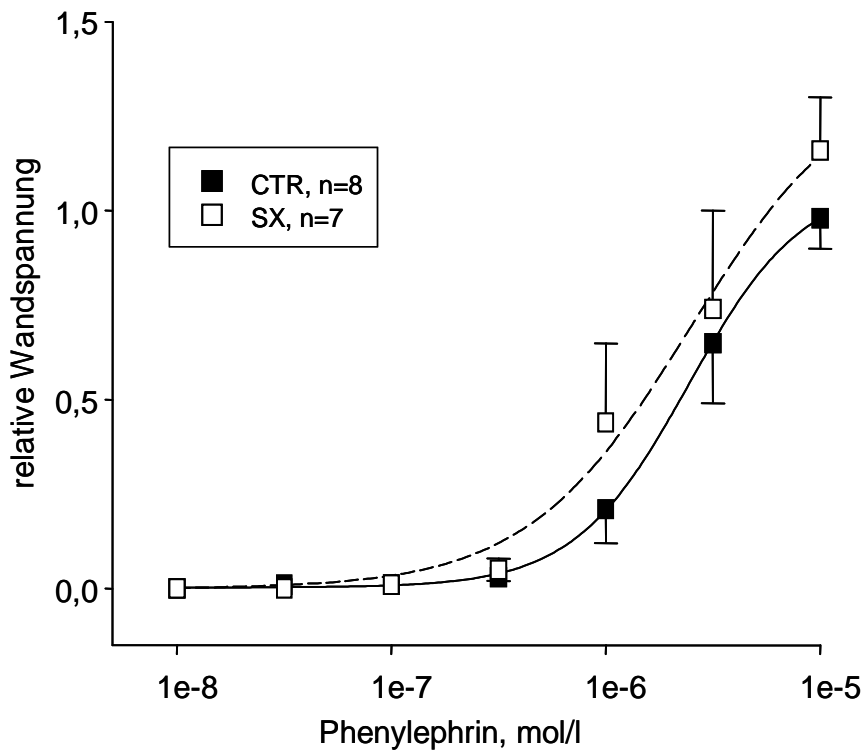


Abb. 17. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Phenylephrin bei mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

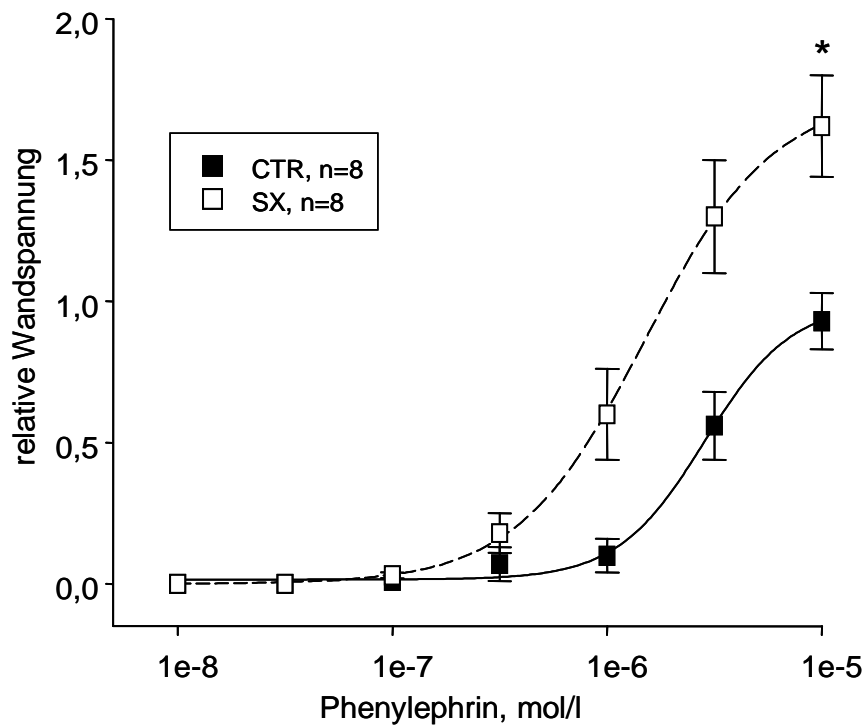


Abb. 18. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Phenylephrin bei mesenterialen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

* $p < 0,05$ größere E_{max} vs. CTR

Die Applikation von Guanabenz führte nicht zu einer signifikanten Veränderung des Tonus isolierter Mesenterialarteriensegmente (Abb. 19, 20).

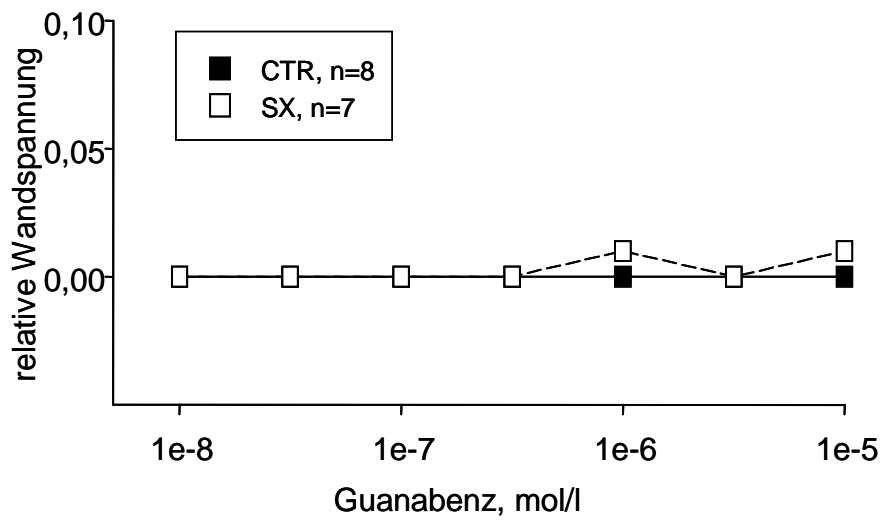


Abb. 19. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Guanabenz bei mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

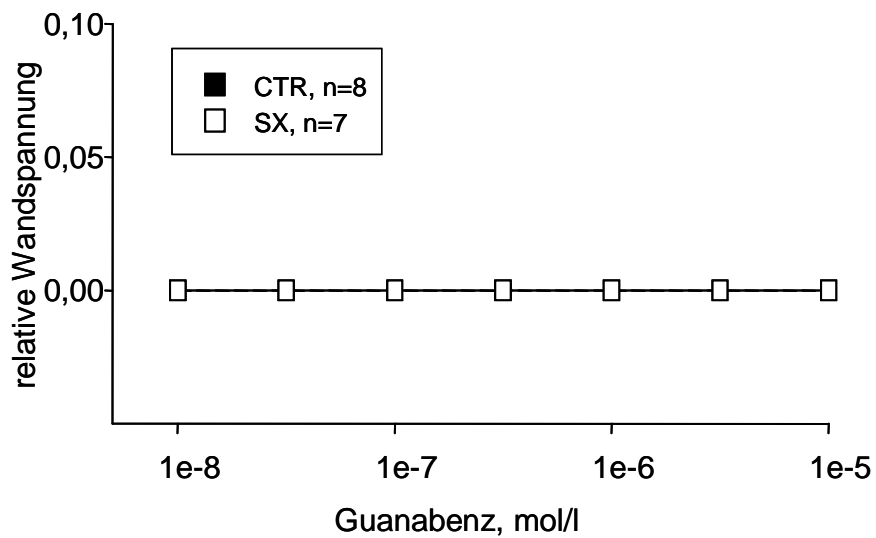


Abb. 20. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Guanabenz bei mesenterialen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

3.4 Vasodilatation

3.4.1 Einführung

Die Vorkontraktion der Gefäßsegmente sympathektomierter, wie auch scheinsympathektomierter Tiere erfolgte mit Noradrenalin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l. Auf Grund der Noradrenalin-Supersensitivität waren die Gefäßsegmente sympathektomierter Tiere stärker vorkontrahiert als die der scheinsympathektomierten Kontrollen. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da sich insbesondere bei mesenterialen Widerstandsgefäßen mit niedrigeren Noradrenalinkonzentrationen keine anhaltende stabile Vorkontraktion erreichen ließ. Zwischen beiden Gruppen ließ sich somit kein Vergleich der hervorgerufenen Vasodilatation ziehen. Lediglich die Vasodilatation vor und nach Tirongabe wurde beurteilt. Soweit nicht anders angegeben, sind alle folgenden Werte der Vasodilatation als relative Wandspannung angegeben. Diese bezieht sich auf die maximale, nach Vordehnung ermittelte, Kalium-induzierte Wandspannung.

3.4.2 Endothelabhängige Vasodilatation mit und ohne Tironeinfluss

Die endothelabhängige Vasodilatation wurde mit Acetylcholin in kumulativen Konzentrationswirkungskurven getestet.

Für renale Gefäßsegmente männlicher sowie weiblicher Versuchstiere war es durch die starke Vorkontraktion nicht möglich verlässliche Konzentrationswirkungskurven für Acetylcholin zu erstellen.

Mesenteriale Gefäßsegmente reagierten mit einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation auf die Applikation von Acetylcholin (Abb. 21, 22). Weder Sympathektomie, noch die Zugabe von Tiron hatte statistisch signifikanten Einfluss auf die Acetylcholininduzierte Vasodilatation. Auch zwischen den Geschlechtern lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Reaktion auf den Vasodilatator vor (Abb. 21, 22).

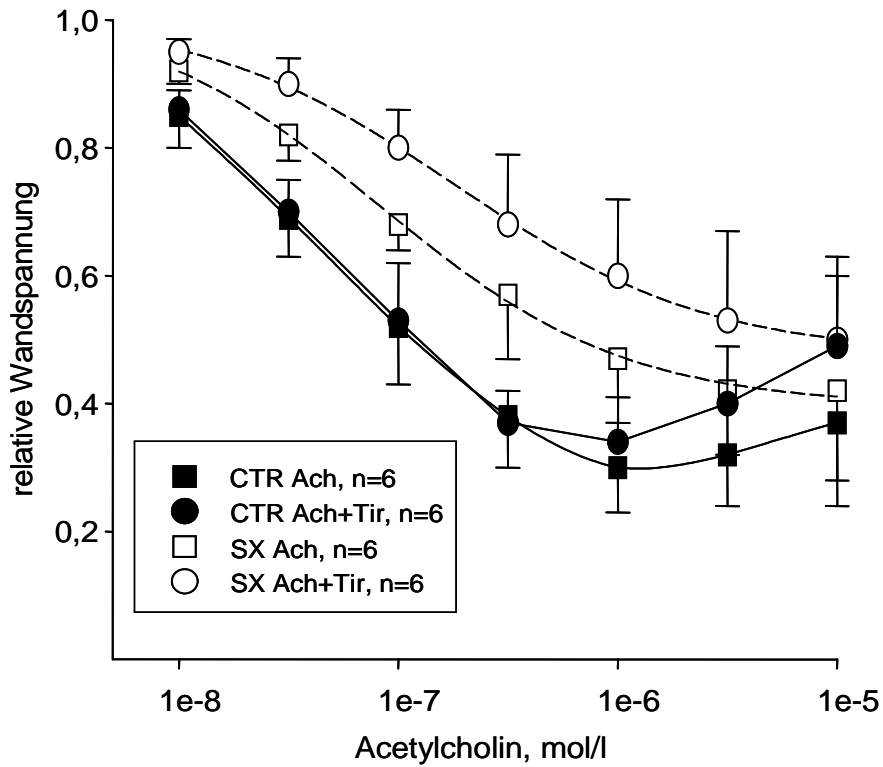


Abb. 21. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Acetylcholin (Ach) und Acetylcholin nach Tirongabe (Ach+Tir) bei mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

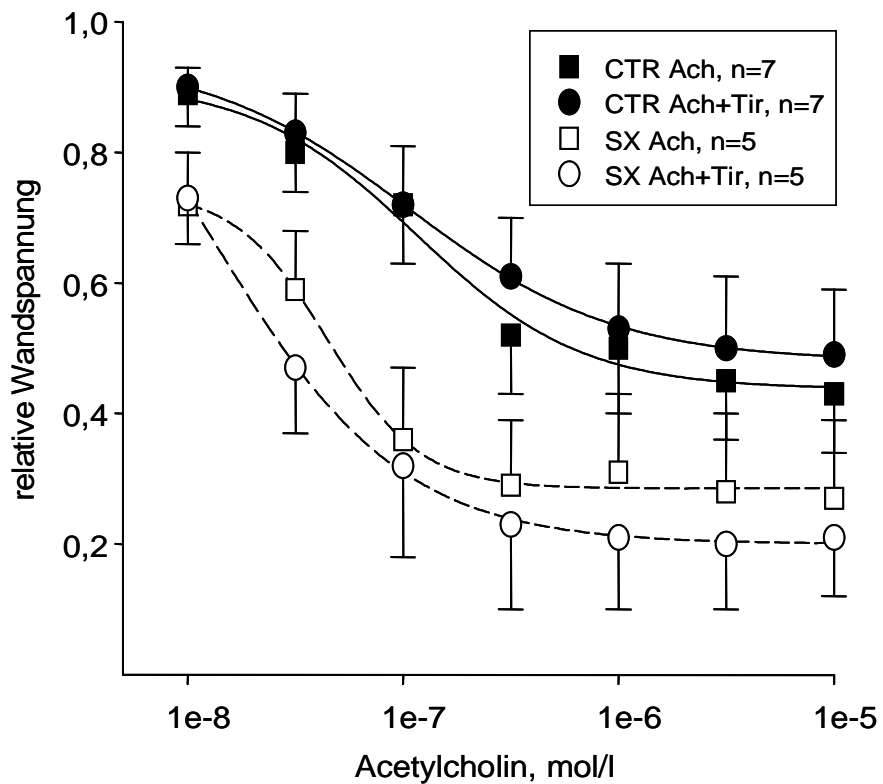


Abb. 22. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Acetylcholin (Ach) und Acetylcholin nach Tirongabe (Ach+Tir) bei mesenterialen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

3.4.3 Endothelunabhängige Vasodilatation mit und ohne Tironeinfluss

Zur Testung der endothelunabhängigen Vasodilatation wurde Nitroprussid-Natrium in kumulativen Konzentrationen verwendet. Renale sowie mesenteriale Gefäßsegmente reagierten mit einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation auf die Applikation von Nitroprussid-Natrium (Abb. 23-26).

Für renale Gefäßsegmente lagen weder innerhalb scheinsympathektomierter Kontroll- noch innerhalb sympathektomierter Versuchstiere Veränderungen im vasodilatatorischen Gefäßverhalten nach Tiron-Applikation vor. Auch zwischen männlichen und weiblichen Tieren bestanden keine signifikanten Unterschiede in der endothelunabhängigen Vasodilatation (Abb. 23, 24). Die geringere Vasodilatation bei sympathektomierten männlichen Versuchstieren im Vergleich zu deren scheinsympathektomierten Kontrollen (Abb. 23) ist auf die stärkere Vorkontraktion, verursacht durch Noradrenalin-Supersensitivität, zurückzuführen.

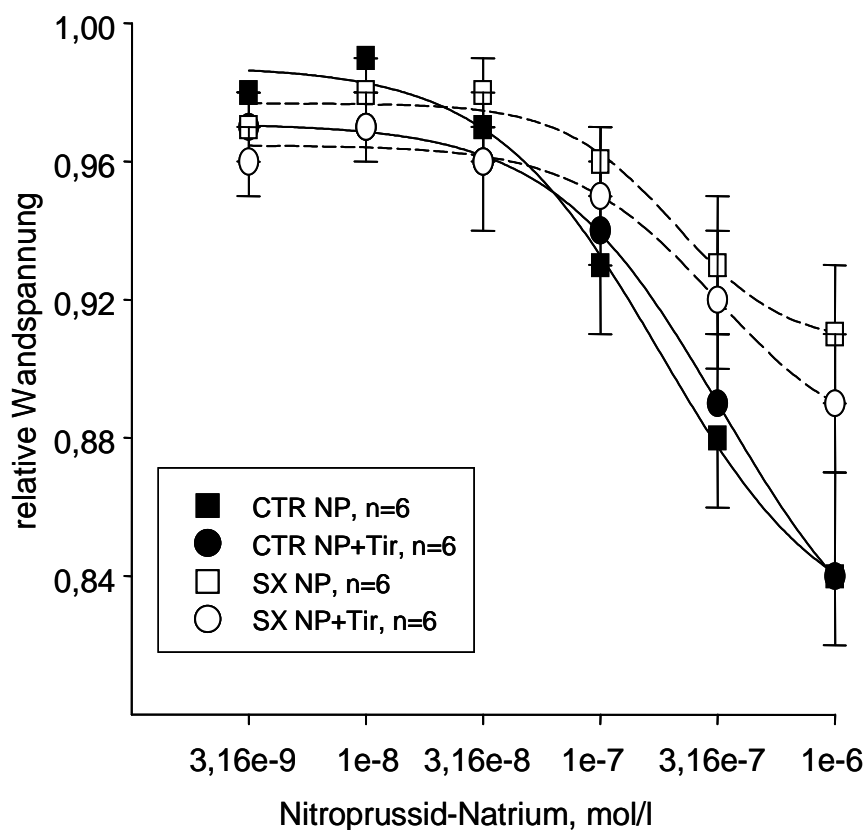


Abb. 23. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Nitroprussid-Natrium (NP) und Nitroprussid-Natrium nach Tirongabe (NP+Tir) bei renalen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

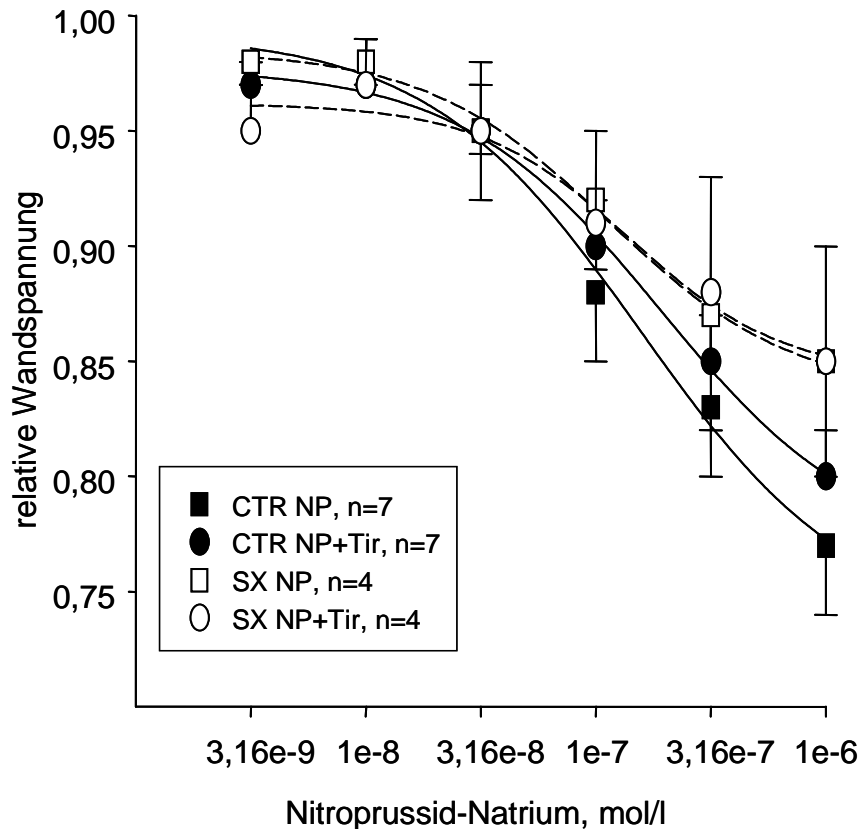


Abb. 24. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Nitroprussid-Natrium (NP) und Nitroprussid-Natrium nach Tirongabe (NP+Tir) bei renalen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

Bei mesenterialen Gefäßsegmenten bewirkte Sympathektomie keine Veränderungen der endothelunabhängigen Vasodilatation. Allerdings führte Tiron-Applikation bei weiblichen sympathektomierten Tieren zu einer statistisch signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve (Abb. 26). Die $\log EC_{50}$ -Werte mesenterialer Gefäßsegmente weiblicher sympathektomierter Tiere betragen vor Tiron-Applikation $-8,60 \pm 0,29$ und nach Tiron-Applikation $-7,17 \pm 0,13$. Bei männlichen sympathektomierten und scheinsympathektomierten Tieren waren hinsichtlich der Applikation von Tiron keine statistisch signifikanten Änderungen im vasodilatatorischen Gefäßverhalten festzustellen (Abb. 25). Auch zwischen den Geschlechtern gab es keine Unterschiede.

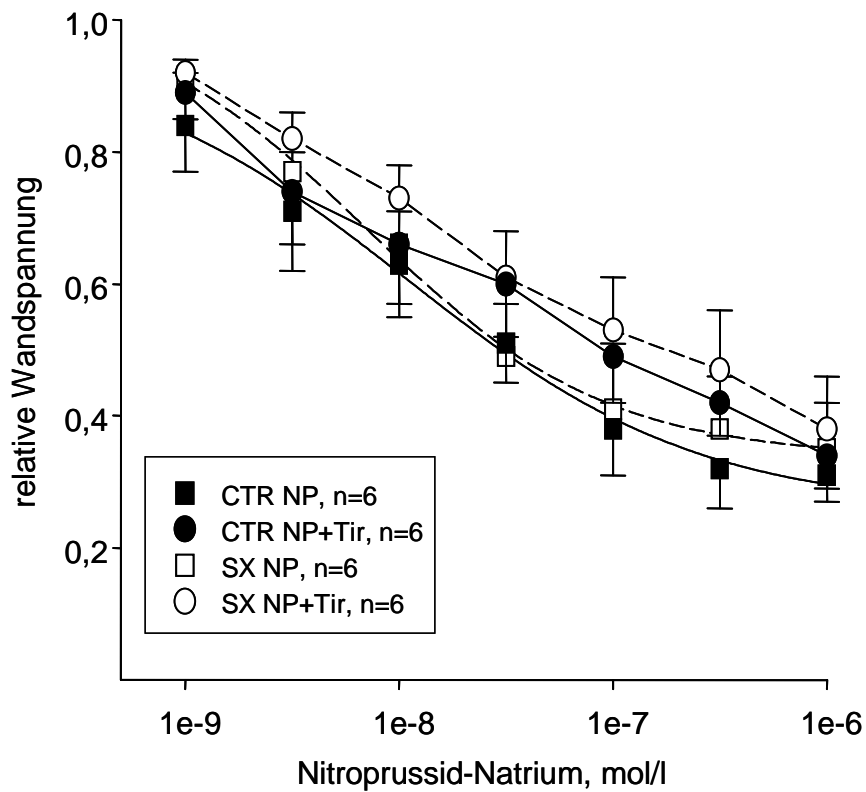


Abb. 25. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Nitroprussid-Natrium (NP) und Nitroprussid-Natrium nach Tirongabe (NP+Tir) bei mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher CTR und SX.

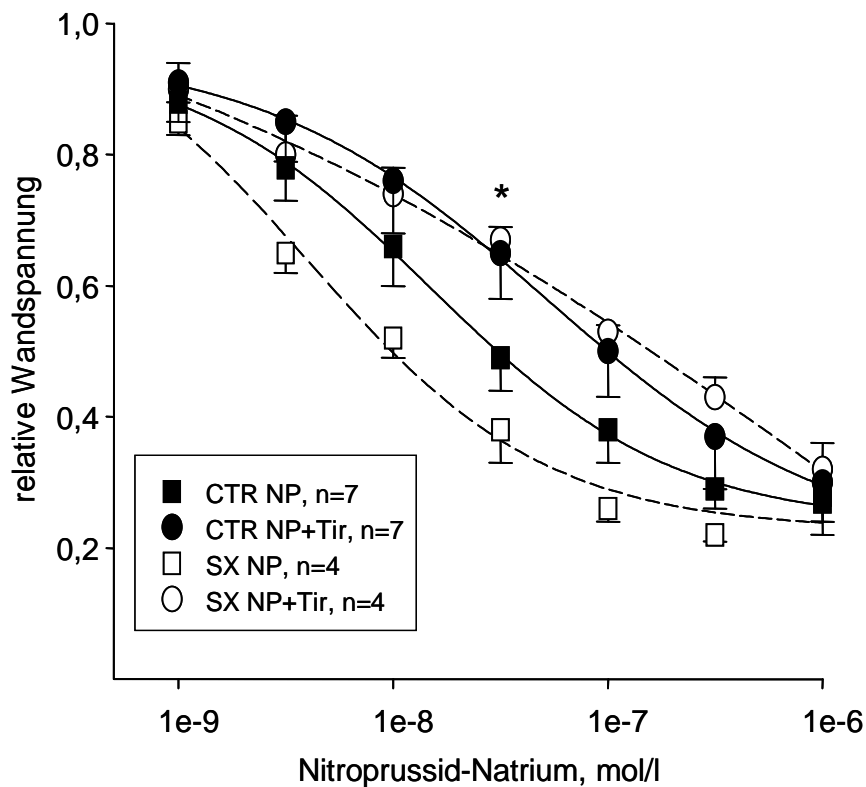


Abb. 26. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für Nitroprussid-Natrium (NP) und Nitroprussid-Natrium nach Tirongabe (NP+Tir) bei mesenterialen Gefäßsegmenten weiblicher CTR und SX.

* $p < 0,05$ größere $\log EC_{50}$ von SX NP vs. SX NP+Tir

3.5 Effekte von Wasserstoffperoxid auf die Gefäßwandspannung renaler Widerstandsarterien

Wasserstoffperoxidapplikation führte bei renalen Gefäßsegmenten beider Gruppen zu einer leichten konzentrationsabhängigen Vasokonstriktion. Diese unterschied sich zwischen sympathektomierten Versuchstieren und deren scheinsympathektomierten Kontrolltieren nicht signifikant (Abb. 27, 28). Um zu testen, ob die vasokonstriktori-schen Effekte von Wasserstoffperoxid durch eine Aktivierung vasokonstriktori-scher Mechanismen modifiziert werden kann, wurde ein Teil der untersuchten Gefäße unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber α_1 -Adrenorezep-toragonisten mit 3×10^{-6} mol/l Phenylephrin (Kontrollen) bzw. 3×10^{-7} mol/l Phenyleph-rin (Sympathektomie) submaximal vorkontrahiert. Nach Vorkontraktion mit Pheny-lephrin reagierten die Gefäßsegmente männlicher und weiblicher Versuchstiere ebenfalls mit einer konzentrationsabhängigen Vasokonstriktion. Die Gefäßsegmente männlicher und weiblicher scheinsympathektomierter Tiere reagierten auf die Was-serstoffperoxid-Applikation nach Vorkontraktion mit einer signifikant höheren Zunah-me der Wandspannung als ohne Vorkontraktion. Dies war bei sympathektomierten Versuchstieren nicht nachweisbar. Zwischen den Geschlechtern gab es keine statis-tisch signifikanten Unterschiede in der H_2O_2 -induzierten Vasokonstriktion (Abb. 27, 28).

Die H_2O_2 -induzierten Vasokonstriktionen sind in Abb. 27 und 28 als relative Wand-spannungen angegeben. Diese beziehen sich auf die maximale Kalium-induzierte Wandspannung. Zur Vergleichbarkeit vorkontrahierter und nicht vorkontrahierter Ge-fäßsegmente, wurde die Phenylephrin-induzierte Vorkontraktion selbst nicht darge-stellt, sondern nur die Gefäßreaktion auf Wasserstoffperoxid.

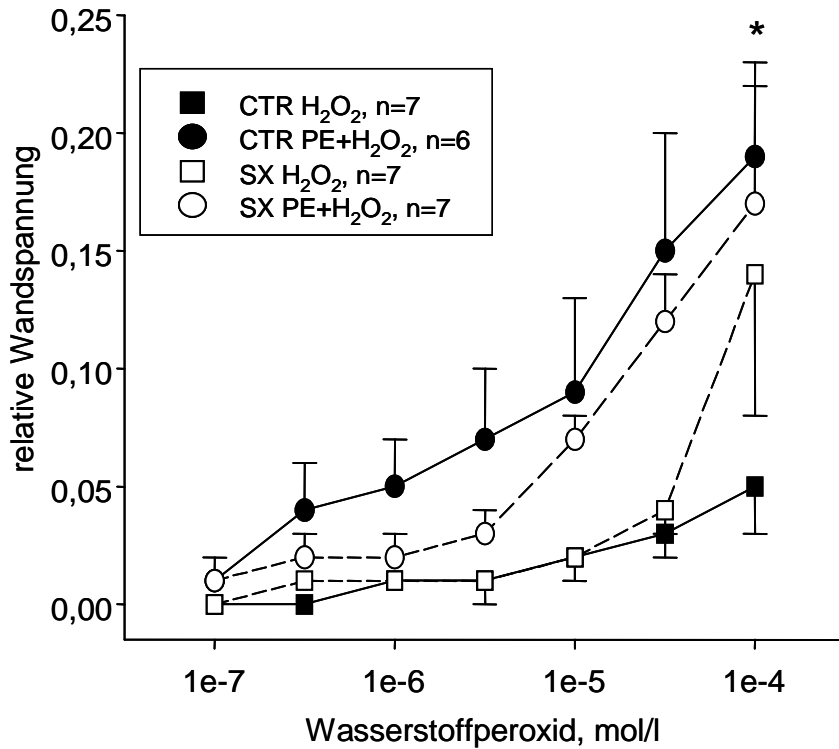


Abb. 27. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für die Wasserstoffperoxid-induzierte Vasokonstriktion ohne Vorkontraktion (H₂O₂) und nach Vorkontraktion mit Phenylephrin (PE+H₂O₂) renaler Gefäßsegmente männlicher CTR und SX.

* $p < 0,05$ größere maximale Kontraktionsantwort von CTR PE+H₂O₂ vs. CTR H₂O₂

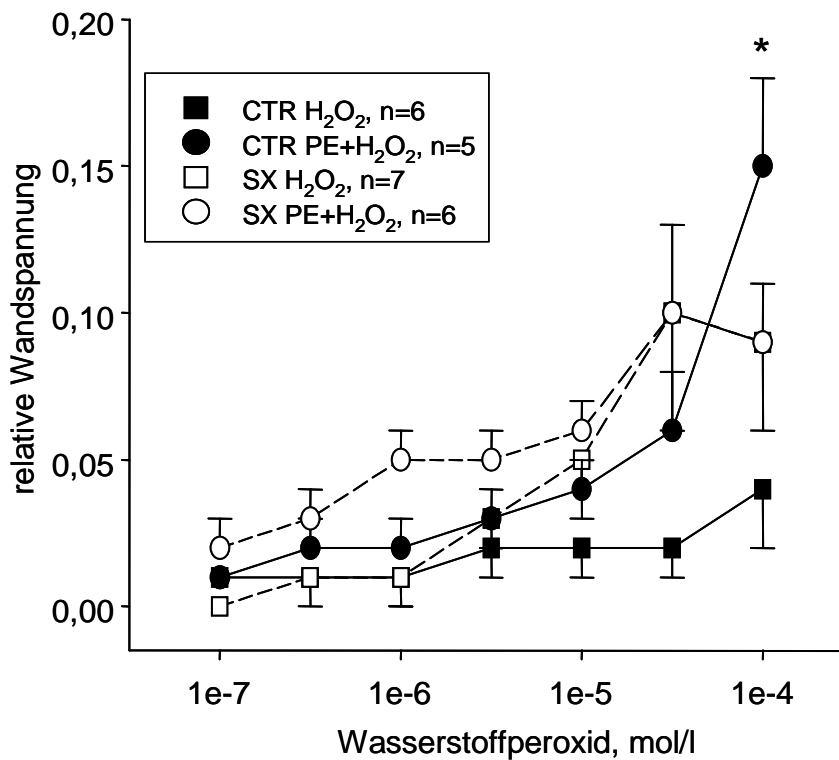


Abb. 28. Kumulative Konzentrationswirkungskurven für die Wasserstoffperoxid-induzierte Vasokonstriktion ohne Vorkontraktion (H₂O₂) und nach Vorkontraktion mit Phenylephrin (PE+H₂O₂) renaler Gefäßsegmente weiblicher CTR und SX.

* $p < 0,05$ größere maximale Kontraktionsantwort von CTR PE+H₂O₂ vs. CTR H₂O₂

3.6 NADPH-Oxidase mRNA Gehalte

3.6.1 mRNA Gehalt der NADPH-Oxidase Isoformen in intrarenalen Arterien

In den folgenden Graphen sind die mRNA Gehalte der untersuchten katalytischen Untereinheiten der NADPH-Oxidasen normalisiert als Gehalt der jeweiligen Ziel-mRNA * 1000/ geometrisches Mittel von PBGD und β -Actin mRNA Gehalt dargestellt.

Für die mRNA-Gehalte der NADPH-Oxidase-Isoform NOX1 intrarenaler Arterien-segmente sympathektomierter und schein-sympathektomierter Tiere, ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen (Abb. 29).

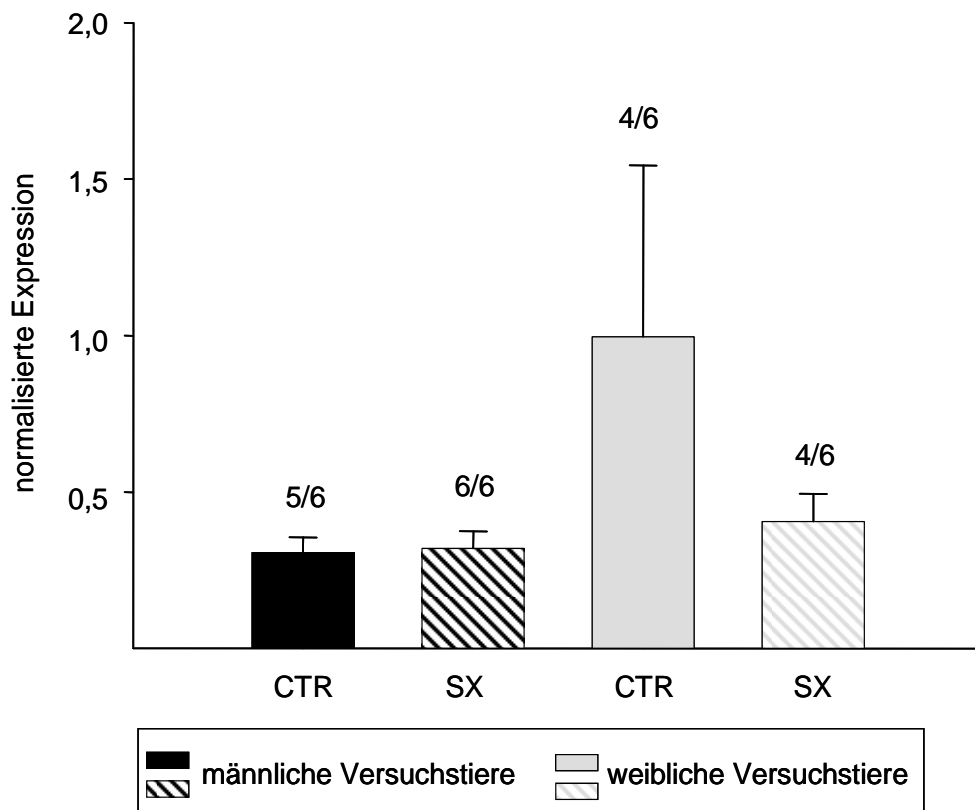


Abb. 29. Normalisierter mRNA Gehalt der NOX1 intrarenaler Arterien-segmente männlicher und weiblicher CTR und SX. 6/6 bedeutet in 6 von 6 Proben wurde Transkript nachgewiesen.

Der NOX2 mRNA Gehalt intrarenaler Arterien-segmente weiblicher Kontrolltiere war statistisch signifikant größer als in entsprechenden Proben männlicher Kontrolltiere (Abb. 30). Bei den weiblichen sympathektomierten Tieren war der NOX2 mRNA Gehalt intrarenaler Arterien-segmente signifikant niedriger im Vergleich zu denen weiblicher Kontrolltiere (Abb. 30). Neonatale Sympathektomie beeinflusste den NOX2 mRNA Gehalt in den intrarenalen Arterien männlicher Tiere nicht signifikant.

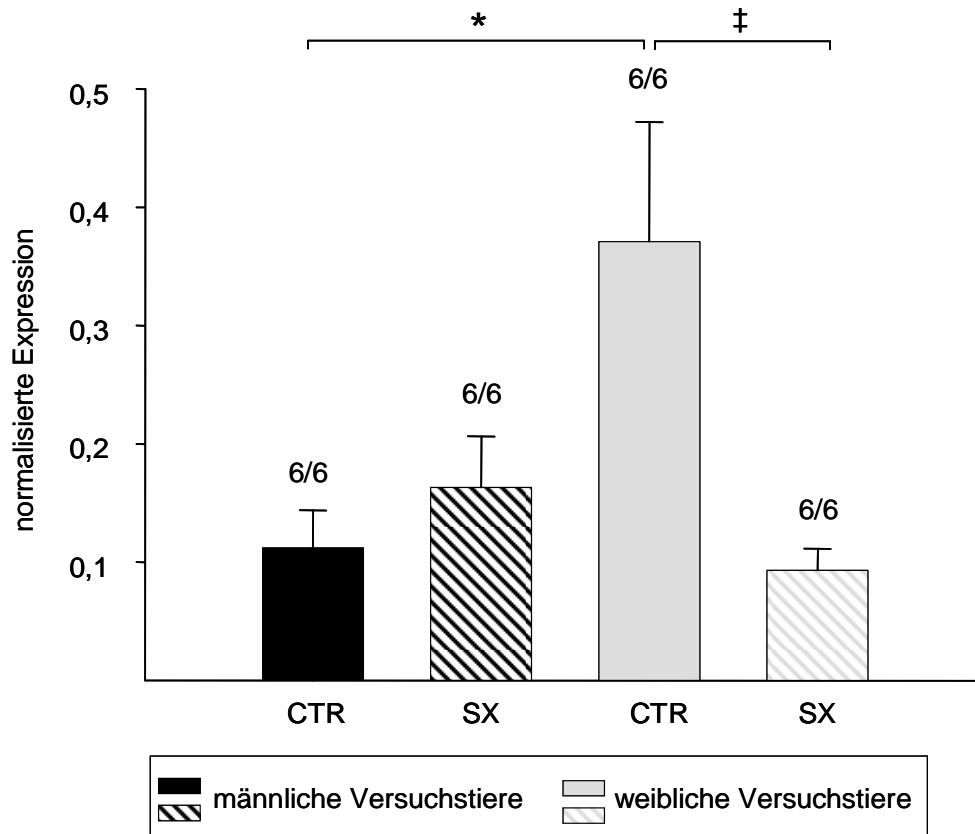


Abb. 30. Normalisierter mRNA Gehalt der NOX2 intrarenaler Arteriensegmente männlicher und weiblicher CTR und SX. 6/6 bedeutet in 6 von 6 Proben wurde Transkript nachgewiesen.
 * signifikant größerer mRNA Gehalt weiblicher CTR vs. männlicher CTR, $p < 0,05$
 ‡ signifikant größerer mRNA Gehalt weiblicher CTR vs. weiblicher SX, $p < 0,05$

mRNA Gehaltsunterschiede der NOX4 intrarenaler Arteriensegmente männlicher Kontroll- und männlicher sympathektomierter Versuchstiere lagen, wie auch zwischen denen männlicher und weiblicher sympathektomierter Versuchstiere nicht vor. Der leicht erhöhte mRNA Gehalt der NOX4 intrarenaler Arteriensegmente weiblicher Kontrolltiere gegenüber weiblicher sympathektomierter Tiere, wie auch gegenüber männlicher Kontrolltiere ist statistisch nicht signifikant (Abb. 31).

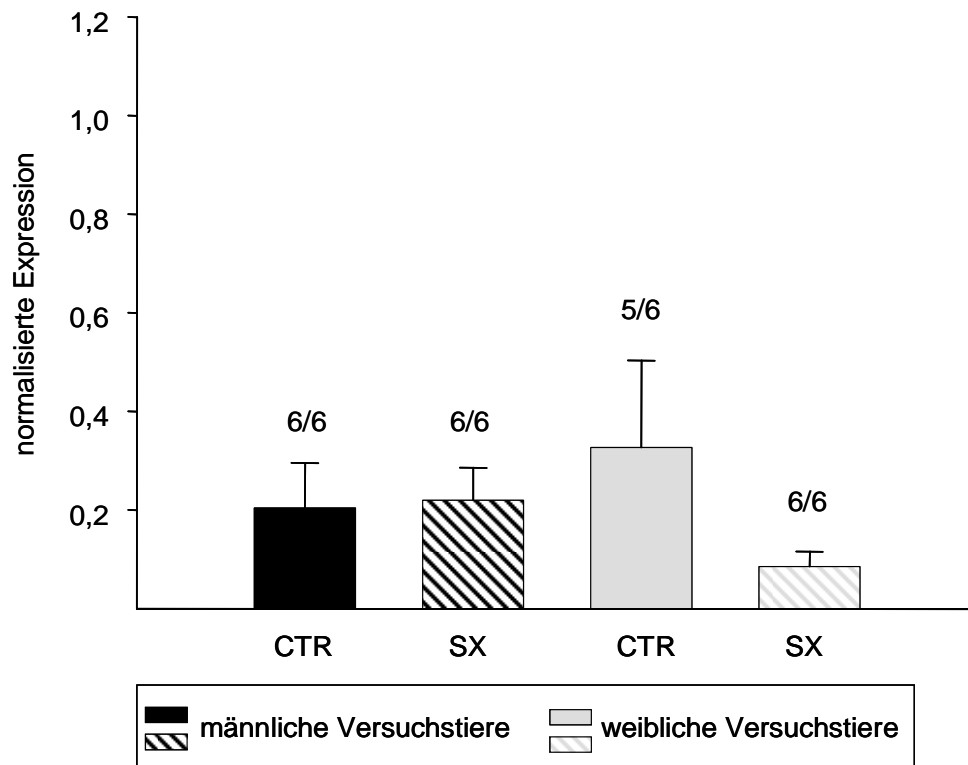


Abb. 31. Normalisierter mRNA Gehalt der NOX4 intrarenaler Arteriensegmente männlicher und weiblicher CTR und SX. 6/6 bedeutet in 6 von 6 Proben wurde Transkript nachgewiesen.

3.6.2 mRNA Expression der NADPH-Oxidase Isoformen in mesenterialen Arterien

Die Expressionsanalysen der NADPH-Oxidase-Isoformen NOX1, NOX2 und NOX4 mesenterialer Arteriensegmente zeigten weder zwischen den Geschlechtern, noch zwischen Kontrolltieren und sympathektomierten Versuchstieren statistisch signifikante Unterschiede der mRNA Gehalte (Abb. 32-34). Auffällig war, dass in vielen Proben mesenterialer Arteriensegmente kein NOX1-Transkript nachweisbar war (Abb. 32).

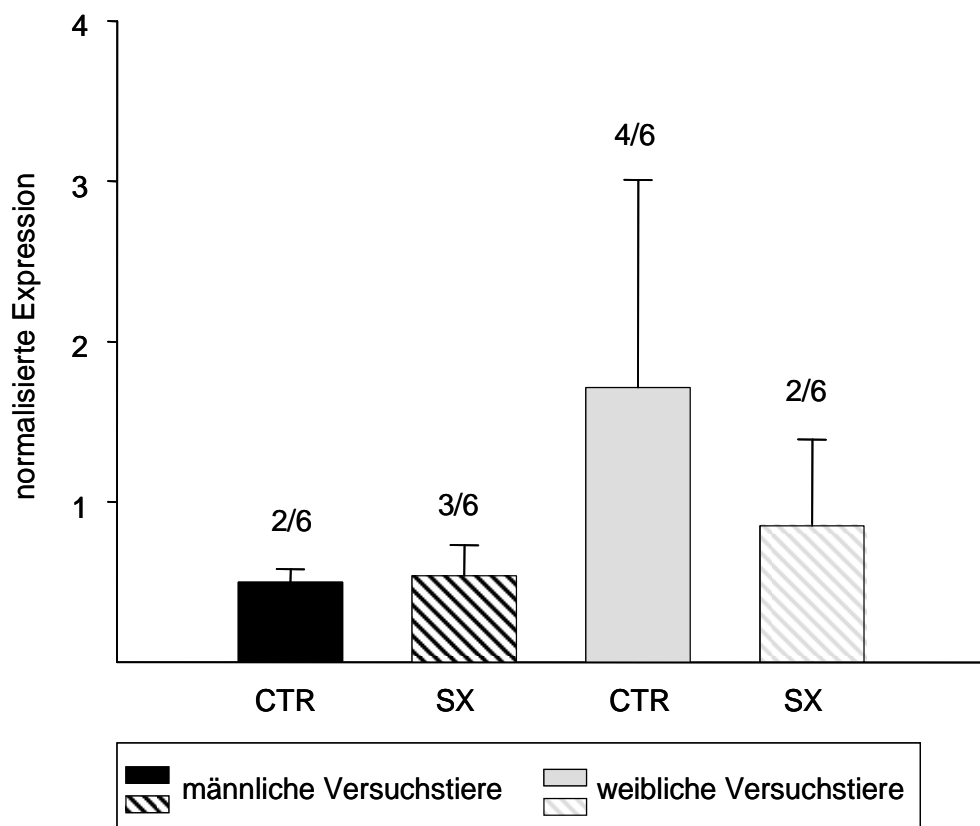


Abb. 32. Normalisierter mRNA Gehalt der NOX1 mesenterialer Arteriensegmente männlicher und weiblicher CTR und SX. 6/6 bedeutet in 6 von 6 Proben wurde Transkript nachgewiesen.

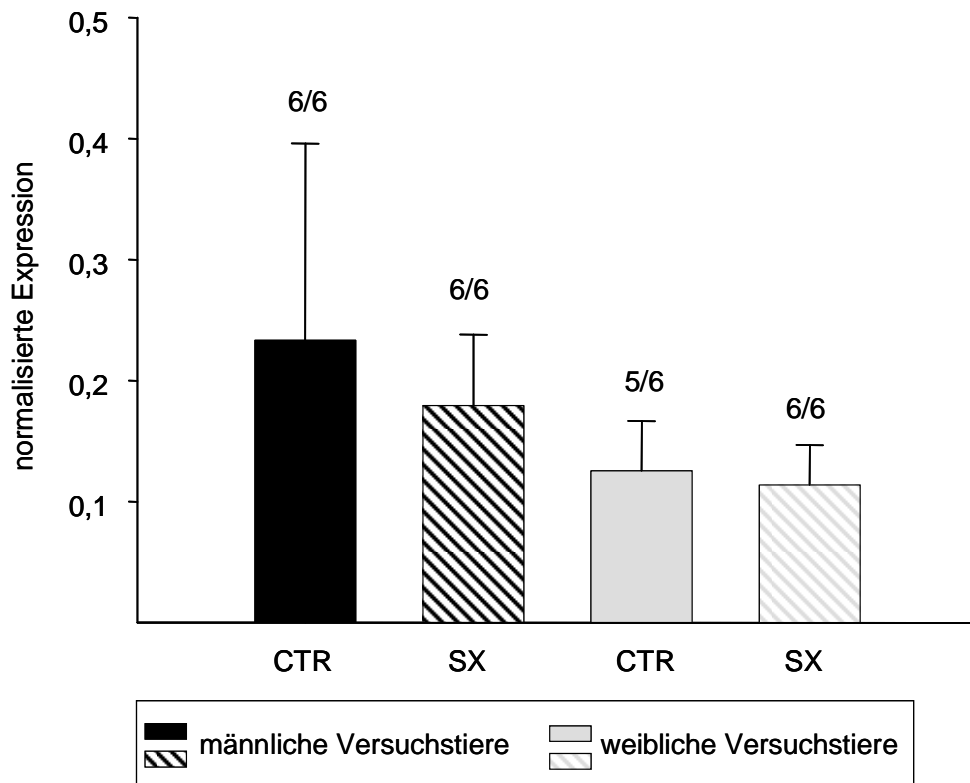


Abb. 33. Normalisierter mRNA Gehalt der NOX2 mesenterialer Arteriensegmente männlicher und weiblicher CTR und SX. 6/6 bedeutet in 6 von 6 Proben wurde Transkript nachgewiesen.

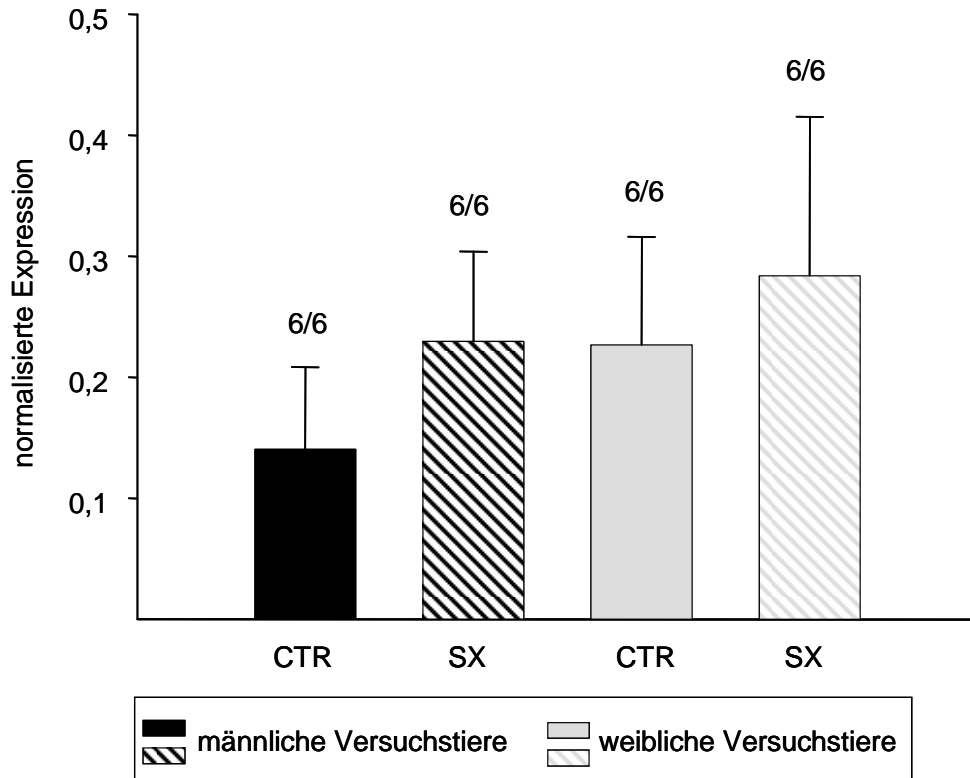


Abb. 34. Normalisierter mRNA Gehalt der NOX4 mesenterialer Arteriensegmente männlicher und weiblicher CTR und SX. 6/6 bedeutet in 6 von 6 Proben wurde Transkript nachgewiesen.

3.7 NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung

Bei den untersuchten mesenterialen Arteriensegmenten lag die Signalstärke der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz an der Nachweisgrenze der von uns genutzten Methode, so dass wir für dieses Gefäßbett keine verlässlichen Ergebnisse zur NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxidbildung erhielten.

Für die intrarenalen Arteriensegmente männlicher und weiblicher Versuchstiere zeigten sich weder zwischen den Geschlechtern, noch innerhalb eines Geschlechtes zwischen Kontroll- und sympathektomierten Tieren statistisch signifikante Unterschiede in der NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxidbildung (Abb. 35).

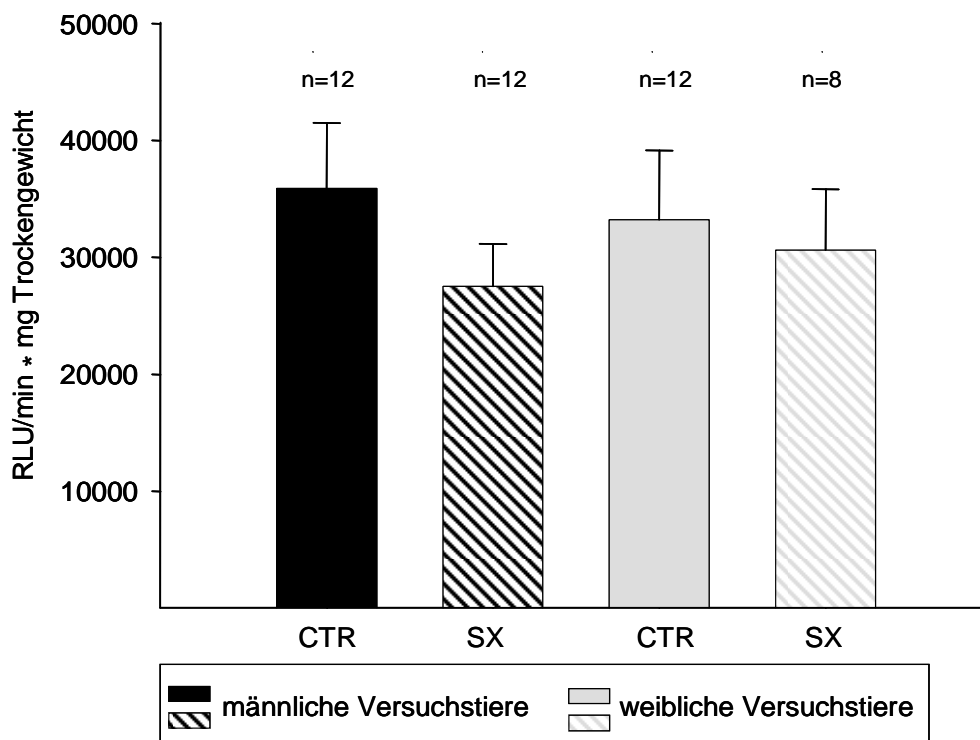


Abb. 35. NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung isolierter intrarenaler Arteriensegmente von SX sowie CTR.

Die in Abb. 36 dargestellten verminderten Chemilumineszenzsignale nach Gabe des Radikalfängers Tiron zeigten, dass die Signale überwiegend durch Superoxid getragen wurden. In die Untersuchung der Aortenringe ging Gewebe beider Geschlechter ein. Die NADPH-abhängige Superoxidbildung (ohne Hemmstoffe) der untersuchten Aortenringe unterschied sich nicht signifikant zwischen schein-sympathektomierten Kontroll- und sympathektomierten Versuchstieren. Des Weiteren bestand zwischen Kontroll- und sympathektomierten Tieren auch kein Unterschied in der NADPH-Oxi-

dase-abhängigen Superoxidbildung (mit Hemmstoffen). Der geringe Effekt der Hemmstoffe anderer potenziell Superoxid-bildender Enzymsysteme zeigte, dass der überwiegende Teil der Superoxidbildung der untersuchten Gefäße von der NADPH-Oxidase ausgeht.

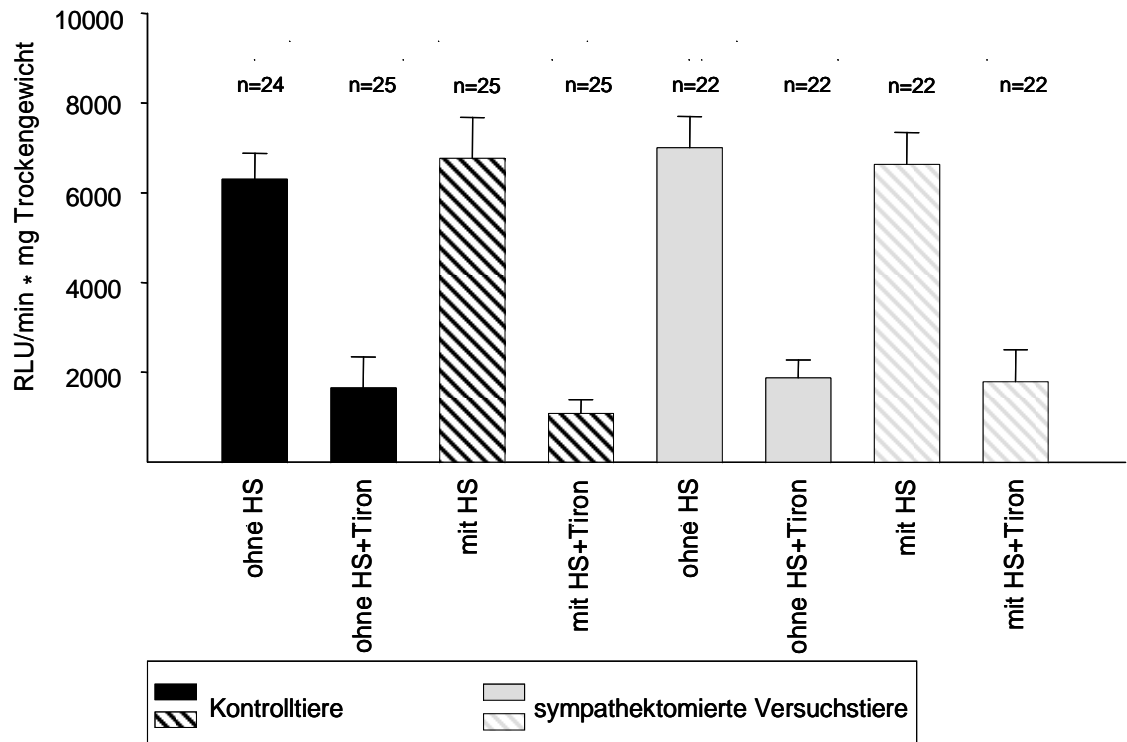


Abb. 36. NADPH-abhängige Superoxidbildung (ohne Hemmstoffe (ohne HS)) und NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung (mit Hemmstoffen (mit HS)) isolierter Aortenringe beider Geschlechter von SX sowie CTR mit und ohne Zusatz des Superoxid-Radikalfängers Tiron.

Die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung in Aortengewebe weiblicher Tiere war statistisch signifikant größer als in Aortengewebe männlicher Tiere (Abb. 37). Neonatale Sympathektomie beeinflusste die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung in Aortengewebe bei männlichen Tieren nicht, während diese bei weiblichen sympathektomierten Tieren im Vergleich zu weiblichen Kontrollen leicht aber statistisch nicht signifikant erhöht war.

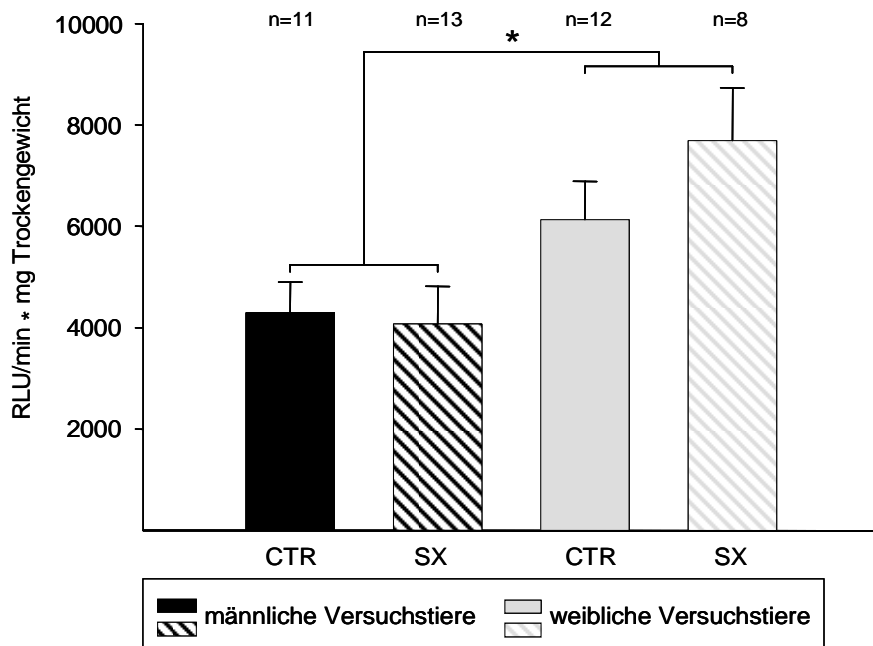


Abb. 37. NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung isolierter Aortenringe.
 * $p < 0,05$ weiblicher vs. männlicher Tiere

Ein Vergleich der NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxidbildung zwischen intrarenalen Arteriensegmenten und untersuchten Aortenringen von scheinsympathektomierten Tieren beider Geschlechter zeigte, dass die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung intrarenaler Arteriensegmente um das 6-fache größer war, als die untersuchter Aortenringe (Abb. 38).

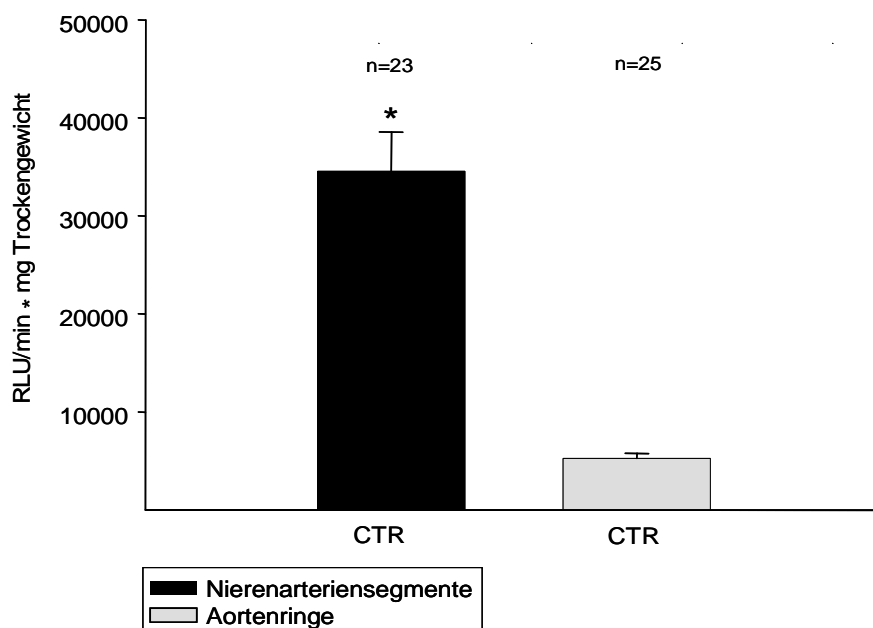


Abb. 38. NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung von intrarenalen Arteriensegmenten und Aortenringen von CTR.
 * $p < 0,05$ vs. Aortengewebe

4. Diskussion

Die komplexen Regulationsmechanismen des Tonus peripherer Blutgefäße und des Blutdruckes durch das sympathische Nervensystem sowie durch reaktive Sauerstoffspezies sind noch nicht vollständig erforscht. Insbesondere der Beitrag von ROS zur Denervierungssupersensitivität von Widerstandsgefäßen fand bisher nur geringen Eingang in experimentelle Studien. Auch weisen die Studien zu Geschlechtsdimorphismen der Gefäßregulation Lücken auf. Die vorliegenden Untersuchungen dienen im Rahmen der Grundlagenforschung dem weiteren Verständnis der Bedeutung des sympathischen Nervensystems für die Funktion von Widerstandsgefäßen, insbesondere für dessen Einfluss auf die Produktion von ROS und deren Wirkung auf den Gefäßtonus. Im Speziellen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Einfluss der neonatalen Sympathektomie von Wistar-Ratten auf die Bedeutung von α_1 - wie auch α_2 -Adrenorezeptor-gesteuerten Prozessen für die bereits bekannte Noradrenalin-Supersensitivität von Widerstandsgefäßen sympathisch denervierter Organe und Gewebe sowie mit der differentiellen Empfindlichkeit unbehandelter und chronisch denervierter Gefäße auf die prokontraktile Wirkung von ROS. Auch finden die Fragen nach Effekten der sympathischen Denervierung auf die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung und die NADPH-Oxidase-Expression sowie geschlechtsabhängige Unterschiede in der Gefäßfunktion denervierter Tiere Eingang in die Arbeit.

Für die Untersuchungen langfristiger Effekte des sympathischen Nervensystems wurden verschiedene Sympathektomiemodelle entwickelt. Ansätze für eine permanente Sympathektomie postganglionärer Neurone sind unter anderem die Immunsympathektomie, bei der ein Antikörper gegen den Nerve Growth Factor (Anti-NGF) subkutan appliziert wird und die chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin [158, 159]. NGF wirkt trophisch auf sympathische Neurone und dessen Neutralisierung durch Antikörper führt zu deren Degeneration und Apoptose [159]. Beide Methoden haben Nachteile. So erzeugt die Immunsympathektomie keine komplette periphere Sympathektomie, da beispielsweise die Funktion von kleinen adrenergen Neuronen der Blutgefäße unbeeinflusst bleibt [158, 159]. Die chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin ruft zwar eine nahezu vollständige periphere Sympathektomie hervor, aber auch eine Verminderung der Noradrenalkonzentration im Zentralnervensystem [158, 159]. Die Arbeitsgruppe um Jensen und Holm entdeckte 1968, dass Guanethidin zur Degeneration sympathischer Neurone führt [173]. Sym-

pathektomie mit Guanethidin in Kombination mit der chirurgischen Entfernung des Nebennierenmarks kann im Gegensatz zu den vorgestellten Modellen nicht nur bei neugeborenen Ratten sondern auch bei ausgewachsenen Tieren angewandt werden und bewirkt eine vollständige periphere Sympathektomie unter Aussparung der noradrenergen Neurone im Zentralnervensystem [2, 50, 158]. Die Effektivität dieser Behandlung wurde mittels Tyrosin-Hydroxylase-Aktivitätsmessungen und Messungen des Katecholamingehaltes unterschiedlicher Gewebe bestätigt [158].

Die Beteiligung des sympathischen Nervensystems an der Regulation des Wasser- sowie Elektrolythaushaltes und damit an der Regulation des Herzkreislaufsystems ist schon lange bekannt [6]. So bewirkt eine erhöhte Aktivität efferenter renaler sympathischer Nerven, über eine Verschiebung der Druck-Natriurese-Kurve in Richtung höherer Drücke, eine Blutdruckerhöhung [1]. Neonatale Sympathektomie hingegen verhindert oder schwächt bei Nachkommen genetisch hypertensiver Ratten die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie [2, 41, 46, 47, 174, 175].

Bei unseren Untersuchungen stellten wir fest, dass neonatale Sympathektomie bei Wistar-Ratten zu einer leichten Verringerung des Blutdruckes führte. Der mittlere arterielle Blutdruck sympathektomierter Wistar-Ratten war mit $104 \text{ mmHg} \pm 2 \text{ mmHg}$ niedriger, als der, der scheinsympathektomierten Kontrolltiere ($110 \pm 2 \text{ mmHg}$). Auch wenn die Blutdrucksenkung geringer als bei genetisch hypertensiven Rattenstämmen war [175, 176], so stimmen unsere Ergebnisse mit Untersuchungen, die an normotensiven WKY-Ratten durchgeführt worden sind, überein [46]. Bei normotensiven Ratten sind die Ergebnisse zu Blutdruckeffekten der neonatalen Sympathektomie nicht konsistent [41, 46, 174, 175]. So ist in der Studie von Lee et al. bei WKY-Ratten nur eine vorübergehende Blutdrucksenkung durch neonatale Sympathektomie erreicht worden [46], wohingegen andere Arbeitsgruppen chronisch reduzierte Blutdrücke gegenüber unbehandelten WKY-Ratten und New Zealand-Ratten zeigten [174, 175] oder gar keine Veränderung des Blutdruckes bei sympathektomierten normotensiven Tieren nachgewiesen haben [41].

Durch vermehrte sympathische Aktivität steigt in der Regel die Herzfrequenz und bei verminderter sympathischer Aktivität bzw. gesteigerter parasympathischer Aktivität nimmt die Herzfrequenz ab. Die Ergebnisse bisheriger Studien zum Einfluss der Sympathektomie auf die Herzfrequenz sind unterschiedlich [41, 46, 175].

In unseren Untersuchungen unterschied sich die Herzfrequenz von scheinsympathektomierten und sympathektomierten Wistar-Ratten statistisch nicht signifikant. Damit liegen unsere Ergebnisse in der Mitte der Ergebnisse anderer Studien [41, 46, 175]. Nyborg et al. zeigten an sympathektomierten WKY-Ratten, wie wir, keine Veränderungen der Herzfrequenz, wohingegen bei sympathektomierten SHR eine Erhöhung der Herzfrequenz auftrat [175]. In anderen Studien reduzierte Sympathektomie die Herzfrequenz bei WKY-Ratten, nicht aber bei SHR [41, 46]. Die unterschiedlichen Ergebnisse können durch die verschiedenen Kompensationsmechanismen zur Regulation der Herzfrequenz bedingt sein. So kann beispielsweise das Fehlen der sympathischen Innervation der Gefäße durch eine Baroreflex-vermittelte Verminderung der parasympathischen Aktivität kompensiert worden sein.

Noradrenalin als Transmitter des sympathischen Nervensystems wirkt sich auf das Wachstum und die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen aus [35, 36]. Dies wird durch Untersuchungen an SHR bestätigt, deren sympathisches Nervensystem einen höheren Aktivitätsgrad hat, als das normotensiver WKY-Ratten [1, 37, 38] und bei denen sich eine erhöhte Anzahl an sympathischen Nervenendigungen in mesenterialen und renalen Widerstandsgefäßen zeigte [39, 40]. Die mesenterialen Widerstandsgefäße von SHR weisen eine größere Intima-, Media- und Adventitiadicke, bei verringertem Lumen auf [40-43], wobei sich für renale Widerstandsgefäße lediglich eine signifikant größere Mediadicke mit hyperplastischen Gefäßmuskelzellen zeigte [40, 44, 45]. Dieser größere Gehalt an kontraktilem Gewebe zeigte sich auch in Myographieexperimenten, bei denen mesenteriale Gefäßsegmente von SHR nach Kalium-induzierter Depolarisation stärker kontrahieren als entsprechende Gefäße der WKY [43].

Unsere Untersuchungen an renalen Gefäßsegmenten von Wistar-Ratten zeigten keinen Einfluss der Sympathektomie auf die maximale Kalium-induzierte Kontraktion und stimmen mit Daten, die an renalen Gefäßsegmenten sympathektomierter SHR erhoben wurden, überein [50]. An mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher sowie weiblicher sympathektomierter Tiere konnten wir hingegen zeigen, dass chronische Sympathektomie zu einer statistisch signifikant geringeren maximalen Kalium-induzierten Kontraktion im Vergleich zu der scheinbehandelter Kontrolltiere führte und korrespondiert mit Daten von Nyborg et al., die außerdem zeigten, dass sich bei me-

mesenterialen Gefäßsegmenten sympathektomierter WKY-Ratten die Mediadicke im Vergleich zur Mediadicke unbehandelter Kontrolltiere verringerte [175].

Neben den strukturellen Veränderungen, die die sympathische Innervation hervorruft, erfolgen auch funktionelle Änderungen mit Zunahme der sympathischen Aktivität und daraus folgender Modulation der Vasokonstriktion und Dilatation. Studien, die den Effekt von Katecholaminen auf die renale Hämodynamik innervierter und denervierter Nieren untersuchten, fanden nach renaler Denervierung eine Supersensitivität gegenüber Noradrenalin [177]. Myographieexperimente zeigten Noradrenalin-Supersensitivität an distalen renalen Interlobararterien sympathektomierter SHR [50]. Auch bei in-vitro Versuchen an Mesenterialarterien von WKY-Ratten, SHR und Sprague-Dawley-Ratten konnte nach systemischer Sympathektomie eine Noradrenalin-Supersensitivität nachgewiesen werden [41, 42, 175, 178].

Unsere Untersuchungen an renalen Gefäßsegmenten männlicher sowie weiblicher Wistar-Ratten zeigten, dass neonatale Sympathektomie zu einer Erhöhung der Sensitivität der Gefäßmuskulatur gegenüber Noradrenalin führt und stimmen mit anderen Studien überein [50, 177]. Außerdem führte neonatale Sympathektomie in unseren Versuchen an renalen Gefäßsegmenten zu einer Erhöhung der maximalen Kontraktionsantwort auf Noradrenalin, was die gesteigerte Sensitivität der Gefäße gegenüber Noradrenalin widerspiegelt, denn bereits eine kleinere Noradrenalinkonzentration erzielt eine höhere Kontraktionsantwort und erreicht eher die maximal mögliche Kontraktion. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen an mesenterialen Gefäßsegmenten unterstützen unsere Ergebnisse von renalen Gefäßsegmenten, denn es zeigte sich bei männlichen Tieren eine erhöhte Sensitivität gegenüber Noradrenalin. Für die weiblichen Tiere ergab sich hingegen lediglich eine Tendenz zur Supersensitivität gegenüber Noradrenalin, was unter anderem an der größeren Streuung der Messwerte für die $\log EC_{50}$ für mesenteriale Gefäßsegmente weiblicher Tiere im Vergleich zu renalen Gefäßsegmenten liegen könnte. Diese Ergebnisse bestätigen im weiteren Sinne die bereits erhobenen Daten zur Supersensitivität mesenterialer Gefäßsegmente nach Sympathektomie [41, 175, 178, 179]. Im Weiteren fanden wir für mesenteriale Gefäßsegmente sympathektomierter Tiere wie auch schon für renale Gefäßsegmente sympathektomierter Tiere nach Gabe von Noradrenalin eine stärkere maximale Kontraktion als für schein sympathektomierte Kontrolltiere, was auch hier die Supersensitivität unterstreicht. Die verstärkte maximale Kon-

traktionsantwort mesenterialer Gefäße sympathektomierter Tiere bestätigt die Ergebnisse von Rizzoni et al.[178], widerspricht hingegen verschiedenen anderen Studien, die keine Veränderung der maximalen Kontraktion bzw. eine verminderte maximale Kontraktion beschrieben [41, 175, 179]. Gründe liegen hier beispielsweise an den unterschiedlichen Noradrenalin-Konzentrationen.

Die Vasokonstriktion durch Noradrenalin kann über α_1 - wie auch α_2 -Adrenorezeptoren vermittelt werden [162, 180]. Um zu überprüfen, ob die gefundene Noradrenalin-Supersensitivität renaler und mesenterialer Gefäße α_1 - oder α_2 -Adrenorezeptorgetragen ist, testeten wir die Kontraktionsantworten der Gefäße auf den α_1 -Adrenorezeptor-Agonisten Phenylephrin und den α_2 -Adrenorezeptor-Agonisten Guanabenz [27, 162].

Bei unseren Untersuchungen bewirkte Sympathektomie bei renalen Gefäßsegmenten männlicher sowie weiblicher Wistar-Ratten eine Supersensitivität mit Linksverschiebung der $\log EC_{50}$ und erhöhter maximaler Kontraktionsantwort auf den α_1 -Adrenorezeptoragonisten Phenylephrin. Bei α_2 -Adrenorezeptor-stimulierender Guanabenz-Applikation entwickelten lediglich renale Gefäßsegmente sympathektomierter männlicher Wistar-Ratten eine statistisch signifikante Vasokonstriktion. Bei mesenterialen Gefäßsegmenten sympathektomierter Wistar-Ratten zeigte sich bei beiden Geschlechtern eine Tendenz zur Supersensitivität auf Phenylephrin-Applikation, diese war aber lediglich für die Gefäße weiblicher Tiere statistisch signifikant. Auf die Applikation des α_2 -Adrenorezeptorstimulanz Guanabenz folgte bei mesenterialen Gefäßen keine Vasokonstriktion. Es ist bekannt, dass eine gesteigerte Menge an zirkulierenden Katecholaminen eine Herunterregulation von α_1 - und α_2 -Adrenorezeptoren hervorruft [181, 182]. Die Angaben zur Regulation der Adrenorezeptoren nach Sympathektomie differieren. So fanden Sundaresan et al. nach Entfernung des Nebennierenmarks eine gesteigerte Anzahl an Adrenorezeptoren in der Nierenrinde von Sprague-Dawley Ratten [183], während Snavely et al. nach chemischer Sympathektomie keine Veränderungen in der Anzahl sämtlicher Adrenorezeptoren [184, 185] und andere Arbeitsgruppen nach renaler Denervierung lediglich eine Erhöhung der Anzahl an α_1 -Adrenorezeptoren [186, 187] fanden. Colucci et al. zeigten, dass sich in Mesenterialarterien sympathektomierter Ratten nicht die Menge an α_1 -Adrenorezeptoren sondern deren Affinität erhöht [188]. Die Arbeitsgruppe von Flavahan et al. wies eine erhöhte α_2 -Adrenorezeptorsensitivität bei sympathektomierten Tieren nach

[189]. Sie zeigten an Beinvenen von Hunden, dass Sympathektomie die α_2 -Adrenorezeptor-vermittelte Kontraktion verstärkte, die α_1 -Adrenorezeptor-vermittelte Vasokonstriktion aber unbeeinflusst blieb [189]. Auch eine Herunterregulation gefäßerweiternder β -Rezeptoren kann theoretisch zu einer gesteigerten Sensitivität auf Vasokonstriktoren beitragen [25]. Ähnlich wie bei unseren Untersuchungen konnte an Mesenterialarterien von WKY-Ratten nach Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin eine α_1 -Adrenorezeptor-vermittelte Supersensitivität nachgewiesen werden [178]. Auch Versuche an renalen Gefäßen wiesen neben einer α_1 - auch eine α_2 -Adrenorezeptor-vermittelte Vasokonstriktion nach [190]. Diese unterschiedlichen Beispiele zeigen, dass sich die Regulation von Rezeptoren, als auch die Prozesse, die die Supersensitivität vermitteln zwischen den verschiedenen Gefäßbetten unterscheiden.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass in renalen Gefäßen männlicher Tiere Veränderungen an α_1 - wie auch an α_2 -Adrenorezeptor-vermittelten und in renalen Gefäßen weiblicher Tiere Veränderungen an α_1 -Adrenorezeptor-vermittelten Prozessen an der Entstehung der Noradrenalin-Supersensitivität beteiligt sind. Auf Grund der fehlenden mesenterialen Vasokonstriktion auf Guanabenz-Applikation muss vermutet werden, dass hier lediglich Veränderungen der α_1 -Adrenorezeptoren vorliegen und zur Noradrenalin-Supersensitivität beitragen. Weitere Mechanismen, die zur Supersensitivität vasokonstriktorischer Mechanismen beitragen können, wie zum Beispiel die Herunterregulation gefäßerweiternder β -Adrenorezeptor-abhängiger Prozesse, die hier nicht untersucht worden sind, sind jedoch möglich. Diese Ergebnisse deuten neben der differentiellen Vermittlung der Supersensitivität zwischen den unterschiedlichen Gefäßbetten auch auf den Einfluss geschlechtsabhängiger Faktoren für die Entstehung der Denervierungssupersensitivität hin.

Wie zuvor bereits erwähnt, reguliert das sympathische Nervensystem den Tonus von Widerstandsgefäßen und hat damit Einfluss auf die Vasodilatation. Die Studienlage zur Untersuchung der Vasodilatation zeigt je nach Gefäßsystem und Versuchsansatz unterschiedliche Ergebnisse [50, 178, 180].

Unsere Untersuchungen zeigten eine konzentrationsabhängige Acetylcholin- wie auch Nitroprussid-Natrium-vermittelte Vasodilatation von Widerstandsgefäßen. Im Weiteren waren unsere Ergebnisse ähnlich den Ergebnissen zur endothelabhängigen und endothelunabhängigen Vasodilatation an distalen Interlobararterien neonatal sympathektomierter SHR und zur endothelunabhängigen Vasodilatation an cerebra-

len Gefäßen von WKY, die keine Veränderungen der Vasodilatation bei sympathektomierten Tieren im Vergleich zu scheinbehandelten Kontrolltieren nachwies [50, 178]. Sympathektomie hatte bei unseren Versuchen weder auf die endothelabhängige Vasodilatation mesenterialer Gefäße, noch auf die endothelunabhängige Vasodilatation renaler und mesenterialer Gefäße einen signifikanten Einfluss. Die durch uns gefundene Blutdrucksenkung bei sympathektomierten Wistar-Ratten scheint somit nicht auf einer verstärkten Vasodilatation der von uns untersuchten Widerstandsgefäße zu beruhen. Die Acetylcholin-induzierte endothelabhängige Vasodilatation wird durch muskarinische Rezeptoren, vor allem M_3 -Rezeptoren, vermittelt [164, 180] und scheint in anderen Studien durch die Aktivität des sympathischen Nervensystems beeinflusst zu werden [178]. Bei in-vitro Versuchen an Mesenterialarterien von mit 6-Hydroxydopamin sympathektomierten WKY-Ratten, wurde im Gegensatz zu unseren Untersuchungen eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation nachgewiesen [178]. Versuche zur endothelunabhängigen Vasodilatation zeigen wie die Versuche zur endothelabhängigen Vasodilatation unterschiedliche Ergebnisse. So war bei Versuchen an Mesenterialarterien akut sympathektomierter WKY-Ratten die endothelunabhängige Vasodilatation im Vergleich zu der scheinbehandelter Kontrollen vermindert und steht im Widerspruch zu unseren Ergebnissen [178]. Myographie-Experimente distaler Interlobararterien neonatal sympathektomierter SHR zeigten hingegen keine Veränderungen der endothelunabhängigen Vasodilatation im Vergleich zu Kontrollen [50]. Die Ergebnisse an Interlobararterien stimmen mit unseren Untersuchungen und Befunden an Cerebralarterien von WKY überein, die keinen Einfluss der Sympathektomie auf die endothelunabhängige Vasodilatation zeigten [178].

ROS sind an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der Gefäßmuskulatur beteiligt. Sie vermitteln und modulieren Wachstumsprozesse, Zellmigration, Sekretion von inflammatorischen Zytokinen, Zelldifferenzierung und die Apoptose [191]. Hier fungieren sie als intrazelluläre Second Messenger [61, 191, 192]. Sie können verschiedene Regulationsmechanismen über Protein Tyrosinkinase, wie zum Beispiel Src, Ras, JAK2, Pyk2, PI3K, EGFR, PDGF aber auch über MAPK beeinflussen, Phosphatasen inhibieren, die Aktivität von Ca^{2+} - und K^+ -Kanälen modulieren und die Expression von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, AP-1 und HIF-1 regulieren [61, 191, 192]. Untersuchungen zeigten im Weiteren, dass H_2O_2 an der ANG II-

vermittelten Vasokonstriktion über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle direkt beteiligt ist, denn nach Entfernung von H_2O_2 durch Katalase war an Cerebralarterien von Sprague-Dawley Ratten keine ANG II-vermittelte Vasokonstriktion mehr nachweisbar [193]. ROS inhibieren auch die Prostacyclin-Synthase-Aktivität, was zu verringerter Prostacyclinsynthese und damit zu einer verminderten Vasodilatation führt [113]. Unter physiologischen Bedingungen wird bei einer Vasokonstriktion, beispielsweise durch ANG II, Thromboxan oder Endothelin auch die NO-Produktion stimuliert, was die Vasokonstriktion begrenzt [113]. Dieser Mechanismus scheint durch ROS gestört zu werden und den Gefäßtonus weiter zu erhöhen [194]. ROS wirken auch direkt als vasoaktive Substanzen auf das Gefäßverhalten, ohne, dass die Gefäße durch übliche Agonisten, wie z.B. Noradrenalin, Phenylephrin, Acetylcholin, Nitroprussidnatrium, konstringiert oder dilatiert werden. So konnte beispielsweise eine H_2O_2 -vermittelte Vasokonstriktion in unterschiedlichen Gefäßbetten verschiedener Rattenstämme beobachtet werden [95, 111, 112, 114, 115, 118, 119, 193, 195, 196]. Es erfolgten Versuche an Widerstandarterien, wie Mesenterialarterien, sowie an großen Leitarterien und Aortensegmenten unter anderem von SHR und WKY aber auch an intrarenalen Arterien von Ratten und Menschen [71, 114, 115, 196]. Hier führte exogen zugeführtes H_2O_2 bei mit Phenylephrin vorkontrahierten Gefäßen, wie auch bei nicht vorkontrahierten Gefäßen, zu einer konzentrationsabhängigen Vasokonstriktion [71, 95, 114, 115, 118, 196]. Der vasodilatatorische Effekt von ROS zeigte sich unter anderem bei Cerebral-, Koronar-, Femoral- und Mesenterialarterien sowie Aortensegmenten [117, 121-126].

Unsere Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Gefäßsegmente gegenüber der reaktiven Sauerstoffspezies H_2O_2 an renalen Widerstandsarterien zeigten, dass H_2O_2 -Applikation in das Organbad des lediglich mechanisch vorgedehnten Gefäßsegmentes, eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion bewirkte und stimmt damit mit Versuchen an humanen intrarenalen Gefäßen überein [71]. Die Stärke der Vasokonstriktion unterschied sich dabei zwischen sympathektomierten oder scheinsympathektomierten Tieren, wie auch zwischen Männchen und Weibchen nicht signifikant voneinander. Auch nach Vorkontraktion mit Phenylephrin und anschließender kumulativer H_2O_2 -Applikation reagierten die renalen Gefäße aller Gruppen mit einer Zunahme der Kontraktion, was in Einklang mit den Ergebnissen von Schlüter et al. sowie Gao et al. ist [71, 197], jedoch anderen Versuchen, die eine H_2O_2 -vermittelte Vasodilatation beschrieben, widerspricht [121, 123, 124, 198]. Dabei kontrahierten

die Gefäßsegmente männlicher und weiblicher scheinsympathektomierter Kontrolltiere auf die Wasserstoffperoxid-Applikation nach Vorkontraktion mit einer signifikant höheren Wandspannung als ohne Vorkontraktion. Mit diesem zweigeteilten Versuchsansatz konnten wir unterschiedliche Wirkungsweisen von H_2O_2 nachweisen. Im Versuch ohne Vorkontraktion zeigte sich die direkte H_2O_2 -induzierte Kontraktion der Gefäße, im Versuch mit Phenylephrin-Vorkontraktion zeigte sich, dass H_2O_2 prokontraktile Mechanismen aktiviert und eine bereits begonnene Vasokonstriktion verstärkt.

Gründe für die duale Gefäßreaktion mit Konstriktion und Dilatation können in den unterschiedlichen Gefäßbetten, den eingesetzten ROS und deren Konzentrationen sowie der Präparation der Gefäße (mit oder ohne Endothel) liegen [126, 196, 199, 200]. Miller et al. beispielsweise applizierten NADPH ins Wasserbad eines Drahtmyographen zur Verstärkung der NADPH-abhängigen Superoxidfreisetzung durch die NADPH-Oxidase [145, 201]. Die mit Serotonin vorkontrahierten Gefäßsegmente reagierten darauf mit einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation [145, 201]. Die Stärke der Vasodilatation differierte dabei je nach Gefäßbett. So war die Vasodilatation nach NADPH-Applikation bei Cerebral- und Basilararterien größer, als bei systemischen Gefäßen [201]. Exogenes H_2O_2 führte bei den verschiedenen Gefäßbetten initial bei niedrigen Konzentrationen zu einer Vasokonstriktion, dann aber bei steigenden Konzentrationen zu einer Vasodilatation [145, 201]. Basilararteriensegmente weiblicher Tiere zeigten eine geringere Vasodilatation als die männlicher Tiere [145]. Andere Untersuchungen zeigten hingegen keine vasoaktiven Effekte von H_2O_2 . So reagierten Mesenterialarterien in der Studien von Hubel et al. weder mit einer Vasokonstriktion noch mit einer Dilatation auf H_2O_2 [202].

Die durch H_2O_2 ausgelöste Vasokonstriktion scheint in den verschiedenen Gefäßtypen unter anderem Ca^{2+} -abhängig zu erfolgen [114-116, 193, 196, 199, 203] und bei SHR größer als bei WKY zu sein [111, 196]. Die Entfernung von extrazellulärem Ca^{2+} und der Einsatz von Ca^{2+} -Kanalblockern verhindern die H_2O_2 -induzierte Vasokonstriktion bzw. schwächen diese ab [115, 116, 196]. H_2O_2 erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und den konsekutiven Einstrom extrazellulären Ca^{2+} [114, 115, 193, 196, 203] sowie durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum [114, 116]. Dies scheint über die Inhibierung der sarkoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -Transport ATPase (SERCA) [195, 204], durch Aktivierung des Inositol-tri-phosphatweges sowie direkte Ca^{2+} -Frei-

setzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum [205, 206], durch Cyclooxygenaseprodukte wie das Thromboxan A₂ [95], durch die Proteinkinase C und durch Tyrosinkinasen [115] vermittelt zu werden. Die durch H₂O₂ regulierten spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle scheinen am ehesten L-Typ Ca²⁺-Kanäle, weniger T-Typ Ca²⁺-Kanäle zu sein [193, 196, 199]. Die Vasokonstriktion kann allerdings auch ohne Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration durch Ca²⁺-Sensitivierungsprozesse moduliert werden [207]. So können ROS die Rho-Kinase aktivieren die MLCP zu phosphorylieren [119]. Diese wird dadurch gehindert, die phosphorylierte leichte Kette des Myosins zu dephosphorylieren. Die Vasokonstriktion wird somit nicht beendet [119]. Außerdem aktivieren ROS die mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK), welche ihrerseits die MLCP hemmt und die MLCK aktiviert, mehr leichte Myosinketten zu phosphorylieren [120]. Im Weiteren scheint H₂O₂ bei inhibierten hyperpolarisierenden Kaliumkanälen zu einer Depolarisation und wiederum zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle [117, 118, 193] sowie über die Aktivierung weiterer depolarisierender Ionenkanäle [203] und durch Oxidation und Modulation kontraktile Proteine [112] zu einer Vasokonstriktion zu führen. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Endothel einen hemmenden Einfluss auf die H₂O₂-Wirkung ausübt. So zeigten unterschiedliche Arbeitsgruppen an Aortensegmenten und Segmenten der A. mesenterica superior nach Entfernung des Endothels eine verstärkte Vasokonstriktion [111, 114, 115]. Dies lässt vermuten, dass das Endothel als eine Art Schutzmechanismus vor zu starker H₂O₂-induzierter Vasokonstriktion dient, welcher unter physiologischen Bedingungen unter anderem durch NO und Prostazyklin vermittelt wird [208, 209]. Gegenteilige Ergebnisse lieferten Versuche an Basilararterien von Kaninchen, die eine abgeschwächte H₂O₂-induzierte Vasokonstriktion nach Entfernung des Endothels zeigten [198]. Außer der H₂O₂-induzierten Vasokonstriktion scheint H₂O₂ auch eine Vasodilatation zu vermitteln [117, 121-126]. Sowohl endothelvermittelte, als auch endothelunabhängige vasodilatatorische Prozesse scheinen an der Gefäßmuskulatur in einer Aktivierung Ca²⁺-abhängiger, ATP-abhängiger und spannungsabhängiger K⁺-Kanäle zu münden, die über eine Hyperpolarisation des Membranpotentials eine Vasodilatation bewirken [121, 122, 125-127, 129]. Es scheint, als vermittele H₂O₂-Einfluss bei funktionsfähigen K⁺-Kanälen eine Vasorelaxation und bei inhibierten K⁺-Kanälen eine Vasokonstriktion [117, 118].

Um die Bedeutung von ROS als Modulator der Agonist-induzierten Vasokonstriktion und -dilatation von Widerstandsarterien zu überprüfen, untersuchten wir diese unter Einfluss des zellpermeablen ROS-Fängers Tiron [74, 163].

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zur ROS-Abhängigkeit der Vasokonstriktion und Dilatation sind nicht einheitlich. So hat Tiron-Applikation auf die maximale Kontraktionsantwort auf Noradrenalin bei mesenterialen Gefäßsegmenten sympathektomierter und scheinsympathektomierter Tiere keinen Effekt, hingegen schwächte sich die maximale Kontraktionsantwort bei renalen Gefäßsegmenten männlicher sympathektomierter Tiere leicht ab und bestätigt den vasokonstriktorischen Charakter von ROS. Vorausgegangene Studien zum Einfluss verschiedener ROS-Fänger auf die Vasokonstriktion zeigen differierende Ergebnisse. An Mesenterialarterien von Sprague-Dawley Ratten und WKY sowie an humanen renalen Arteriensegmenten beeinflusste Tiron die Phenylephrin-vermittelte Vasokonstriktion nicht [71, 210, 211]. Untersuchungen an anderen Rattenstämmen zeigten hingegen, dass Tiron und Polyethylenglykol-konjugierte Superoxid-Dismutase (PEG SOD) bei mineralkortikoidhypertensiven Ratten die Sensitivität gegenüber Phenylephrin erhöhte [210], dass PEG SOD die Sensitivität und maximale Kontraktion auf Phenylephrin bei SHR reduzierte [211] und auch der Einsatz von DMSO als Radikalfänger bei Aortensegmenten von Wistar-Ratten die Vasokonstriktion verminderte [115]. Andere Studien zeigten, dass es unter dem kumulativen Einfluss von PEG SOD auf mit Phenylephrin vorkontrahierten Gefäßsegmenten humaner Gefäße konzentrationsabhängig zu einer geringen Vasodilatation kam [212].

Gegenüber den Ergebnissen von Schlüter et al. und Westhoff et al., die keine Beeinflussung der endothelunabhängigen Vasodilatation durch Tiron nachgewiesen haben [71, 213], zeigten unsere Untersuchungen, dass Tiron bei mesenterialen Gefäßsegmenten weiblicher sympathektomierter Tiere zu einer reduzierten endothelunabhängigen Vasodilatation führte. Dies könnte auf einer verminderten Oxidation und damit verbundenen verminderten Aktivierung der PKG durch ROS unter Tironeinfluss zurückzuführen sein [71]. Westhoff et al. fanden an Aortenringen von WKY-Ratten, bei denen durch Blutverlust eine Hypotension erzeugt wurde, unter Tiron-Einfluss eine verstärkte endothelabhängige Vasodilatation sowie eine deutlich verbesserte Sensitivität gegenüber Acetylcholin, bei unveränderter Vasodilatation normotensiver Kontrolltiere [213]. Unsere Untersuchungen hingegen haben keine Beeinflussung der endothelvermittelten Vasokonstriktion durch Tiron gezeigt. Bei anderen Spezies wur-

den ähnliche Ergebnisse wie bei Westhoff et al. gefunden [213]. So konnte unter Tiron-Einfluss an Koronararterien von Schweinen [123, 214] und Hunden [215] ebenso eine verbesserte endothelvermittelte Vasodilatation nachgewiesen werden, wie an Aorten [216] und Cerebralarterien von Mäusen [217] sowie an menschlichen Mesenterialarterien [218]. Die endothelunabhängige Vasodilatation blieb auch dabei jeweils unbeeinflusst [71, 214, 215, 218]. Die Ergebnisse der verbesserten endothelvermittelten Vasodilatation und unbeeinflussten endothelunabhängigen Vasodilatation unter Tiron-Einfluss lassen vermuten, dass ROS vor allem die Endothelfunktion, nicht aber direkt die Gefäßmuskulatur beeinflussen [218]. Andere Studien zeigten hingegen unter Tironeinfluss eine Verminderung der maximalen endothelvermittelten Vasodilatation [71]. Somit lässt sich postulieren, dass ROS eine Rolle im Signalweg der endothelvermittelten Vasodilatation spielt. Daran scheinen unter anderem PKG-abhängige Prozesse beteiligt zu sein, die durch ROS aktiviert werden können [71, 219]. ROS wirken dabei als direkter Aktivator der PKG, die wiederum die MLCP phosphoryliert und zu einer verstärkten Vasodilatation führt [219].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ROS je nach Spezies, Gefäßbett und Tonus der entsprechenden Gefäße zur Modulation sowohl der Vasodilatation als auch Vasokonstriktion in unterschiedlicher Ausprägung und Richtung beitragen. Das unterschiedliche Gefäßverhalten auf die verschiedenen ROS-Fänger kann unter anderem an deren unterschiedlichen Reaktionsmechanismen und chemischen Eigenschaften liegen.

Die wichtigste Quelle von H_2O_2 in Blutgefäßen ist die NADPH-Oxidase [61, 71, 73-75]. Um zu überprüfen, ob chronische Denervierung Einfluss auf die NADPH-Oxidase-Expression hat, bedienten wir uns der real-time-RT-PCR zur Bestimmung des mRNA-Gehaltes der NOX1, NOX2 und NOX4 in mesenterialen und renalen Arteriensegmenten.

Bei mesenterialen Gefäßsegmenten fanden wir keine Unterschiede in den NOX1-, NOX2- oder NOX4-mRNA-Gehalten zwischen neonatal sympathektomierten und schein sympathektomierten Tieren. Auffällig war allerdings, dass wir in beiden Gruppen bei Mesenterialarterien kaum NOX1 mRNA nachweisen konnten. Andere Untersuchungen von Nierengewebe wiesen die Expression verschiedener NADPH-Oxidase Untereinheiten nach. So wurden $p22^{phox}$, $p67^{phox}$, $gp47^{phox}$ sowie NOX1, NOX2 und NOX4 in Nierengewebe von SHR [168] und in der Nierenrinde von Sprague-

Dawley-Ratten gefunden [220]. An humanen renalen Gefäßsegmenten und glutealen Gefäßmuskelzellen konnten $p22^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, NOX2 und NOX4 nachgewiesen werden, in aortalen Gefäßmuskelzellen zusätzlich auch die NOX1 [71, 221]. Dies unterstreicht die Heterogenität des Aufbaus und der Funktion der verschiedenen Gefäßbetten. Übereinstimmend mit Befunden von Schlüter et al. zum Effekt der neonatalen Sympathektomie auf renomedulläre mRNA-Gehalte bei SHR [168], war in unseren Experimenten an weiblichen Wistar-Ratten der mRNA-Gehalt der NADPH-Oxidase Untereinheit NOX2 bei renalen Gefäßen sympathektomierter Tiere verringert. Der mRNA-Gehalt der NOX1 und NOX4 renaler Gefäßsegmente unterschied sich zwischen sympathektomierten und schein sympathektomierten Tieren allerdings nicht. Schlüter et al. untersuchten auch den Einfluss der Sympathektomie auf die Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten bei SHR [168]. Sie fanden heraus, dass die Expression der Untereinheiten $gp47^{\text{phox}}$ und NOX2 im Nierenmark sympathektomierter SHR um mehr als 40% geringer war, als bei deren Hydralazin-behandelten Kontrolltieren [168]. Bei Untersuchungen an Nierenrindengewebe bestanden keine Unterschiede in der Genexpression zwischen sympathektomierten und scheinbehandelten Tieren [168]. In-vitro Experimente haben gezeigt, dass α_1 -Adrenorezeptoraktivierung die $p47^{\text{phox}}$ mRNA Expression in Gefäßmuskulatur steigert [222]. Die vermehrte Expression von NADPH-Oxidase-Untereinheiten findet auch unter pathophysiologischen Bedingungen statt. So werden beispielsweise die NOX1 und NOX2 bei Hypertonie, Arteriosklerose und Diabetes mellitus vermehrt exprimiert [81, 85-87].

Zusammenfassend scheinen verschiedene NADPH-Oxidase-Isoformen in unterschiedlichen Gefäßbetten vorzukommen und deren Expression durch physiologische und pathophysiologische Prozesse verändert zu werden.

Über die NADPH-Oxidase ist bekannt, dass sie bereits durch physiologische Konzentrationen unter anderem von ANG II, Thromboxan, Endothelin, Noradrenalin und damit auch durch Stimulation des sympathischen Nervensystems aktiviert wird [113]. Mittels Lucigenin-vermittelter Chemilumineszenz überprüften wir, ob chronische Denervierung Einfluss auf die O_2^- -Freisetzung renaler, mesenterialer und aortaler Gefäßsegmente hat.

Mit unseren Experimenten konnten wir nachweisen, dass der überwiegende Teil der O_2^- -Freisetzung in renalen Gefäßen sowie Aortensegmenten von der NADPH-Oxidase stammt. Damit stimmen unsere Ergebnisse mit Untersuchungen an humanen re-

nalenen GefäÙen [71] sowie aortalen GefäÙmuskelzellen von Ratten [74] und GefäÙmuskelzellen aus Rinderkoronarien [75] überein. Bei den Untersuchungen renaler und aortaler GefäÙsegmente männlicher und weiblicher Wistar-Ratten fanden wir keine Unterschiede der NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxidbildung zwischen GefäÙen sympathektomierter Tiere und deren scheinbehandelten Kontrollen. In-vitro Experimente haben gezeigt, dass α_1 -Adrenorezeptoraktivierung die NADPH-Oxidaseaktivität in der GefäÙmuskulatur steigert [222]. Weitere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die O_2^- -Produktion in der A. carotis und Aorta von SHR größer war, als bei Wistar-Ratten, was die Vermutung zulässt, dass die größere sympathische Aktivität bei SHR die Superoxidbildung beeinflusst [81, 223]. Allerdings konnten wir an GefäÙbetten von schein sympathektomierten Kontrolltieren zeigen, dass die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung intrarenaler Arteriensegmente um das 6-fache größer war, als die untersuchter Aortenringe, was unter anderem an der stärkeren sympathischen Innervation von Widerstandsarterien im Vergleich zu Leitarterien [41, 224], an dem differierenden GefäÙaufbau oder den bisher kaum untersuchten segmentalen Unterschieden in den unterschiedlichen GefäÙbetten zu Regulationsmechanismen der NADPH-Oxidaseaktivität liegen könnte. Die Heterogenität in der unterschiedlichen Menge der ROS-Freisetzung durch die NADPH-Oxidase in den verschiedenen GefäÙbetten wird durch die Studien von Miller et al. gestützt die in Cerebralarterien und Basilararterien von Sprague-Dawley Ratten eine deutlich größere ROS Freisetzung nachwies, als in Aorten, Mesenterialarterien oder renalen Arterien [201]. Eine Abhängigkeit der NADPH-Oxidaseaktivität vom sympathischen Nervensystem konnten Schlüter et al. allerdings an anderem Untersuchungsmaterial nachweisen [168]. Die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung war in Gewebeproben des Nierenmarks sowie der Nierenrinde neonatal sympathektomierter SHR geringer als bei deren Hydralazin-behandelten und scheinbehandelten Kontrolltieren [168].

Zusammenfassend können wir nicht bestätigen, dass Sympathektomie einen signifikanten Effekt auf mRNA Expression und Aktivität der vaskulären NADPH-Oxidase hat.

Bezüglich des GefäÙtonus scheinen GefäÙmuskelzellen männlicher Tiere zu einer verstärkten Vasokonstriktion [141-144] und GefäÙmuskelzellen weiblicher Tiere zu einer verstärkten Vasodilatation zu neigen [225]. Die Neigung zur Vasokonstriktion

von Gefäßen männlicher Tiere konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen u. a. an isolierten aortale Gefäßmuskelzellen bestätigt werden [144, 226, 227]. Zur besseren Beurteilung von Geschlechtsdimorphismen hinsichtlich des Gefäßverhaltens insbesondere in Hinblick auf geschlechtsabhängige Unterschiede zwischen sympathektomierten und scheinsympathektomierten Tieren schlossen wir beide Geschlechter in unsere Untersuchungen ein.

Beim Vergleich der Kalium-induzierten Kontraktion fanden wir bei unseren Untersuchungen eine stärkere Kalium-induzierte Vasokonstriktion mesenterialer Gefäßsegmente männlicher Kontrolltiere im Vergleich zu denen weiblicher Kontrolltiere, was mit den Befunden von Ma et al. an Sprague-Dawley-Ratten und von Murphy et al. sowie Crews et al. an WKY-Ratten übereinstimmt [143, 226, 227]. Ma et al. zeigten an isolierten aortalen Gefäßmuskelzellen von männlichen Sprague-Dawley-Ratten verstärkte Gefäßantworten auf die Kalium-induzierte Depolarisation des Membranpotentials sowie auf die Vasokonstriktoren Phenylephrin und ANG II gegenüber weiblichen Tieren [143]. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen von Crews et al. [226]. Wenn man davon ausgeht, dass mit zunehmender Körpergröße auch die Größe der untersuchten Widerstandsgefäße und damit der Gefäßmuskulatur zunimmt, können die Ergebnisse auch durch den unterschiedlichen Gehalt an kontraktilen Gewebe bedingt sein. So war das Körpergewicht männlicher Ratten bei unseren Versuchen sowohl für scheinsympathektomierte (448 ± 15 vs 298 ± 16) als auch für sympathektomierte Tiere (442 ± 14 vs 268 ± 17) deutlich größer als das der weiblichen Ratten. Bei Nierenarterien war die Kalium-induzierte Vasokonstriktion in unseren Untersuchungen nicht geschlechtsabhängig verändert. Bezüglich der Versuche mit Noradrenalin-Applikation zeigte sich allerdings eine größere maximale Kontraktionsantwort renaler Gefäßsegmente sympathektomierter weiblicher Tiere im Vergleich zu sympathektomierten männlichen Tieren, was wiederum ein Beispiel für das differentielle Verhalten unterschiedlicher Gefäßbetten ist.

Auch die unterschiedliche Vermittlung der Noradrenalin-Supersensitivität deutet auf den Einfluss geschlechtsabhängiger Prozesse auf die Gefäßfunktion hin. So zeigte sich in unseren Untersuchungen, dass in renalen Gefäßen männlicher Tiere Veränderungen an α_1 - wie auch α_2 -Adrenorezeptoren, in renalen Gefäßen weiblicher Tiere lediglich Veränderungen an α_1 -Adrenorezeptoren an der Entstehung der Noradrenalin-Supersensitivität beteiligt sind.

Die Vermutung, dass Androgene den Gefäßtonus erhöhen und Östrogene den Gefäßtonus herabsetzen wird durch verschiedene Studien bestätigt [141-143, 226-230]. Bezüglich der prokontraktiven Wirkung von Androgenen zeigten Untersuchungen an konsomen Ratten einen Anstieg des Noradrenalinspiegels und der Noradrenalinfreisetzung verschiedener Gewebe mit der Menge an appliziertem Testosteron sowie mit dem Vorhandensein eines Y-Chromosoms einer SHR [141]. Wie unsere Experimente an mesenterialen Gefäßsegmenten, zeigten Li et al. an Schwanzarterien männlicher Ratten eine stärkere Vasokonstriktion als bei weiblichen Tieren [142]. Im Speziellen scheint daran ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle männlicher Gefäße beteiligt zu sein [143, 226, 227]. Unter physiologischen Bedingungen kann in der Gefäßmuskulatur weiblicher Ratten eine erhöhte Expression von Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden [143, 228]. Bezüglich der vermuteten vasodilatatorischen Effekte von Östrogenen zeigten Versuche mit Östrogenrezeptorantagonisten eine Verminderung der maximalen Vasokonstriktion bei beiden Geschlechtern [143]. Eine erhöhte Expression von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen in der Herzmuskulatur von Östrogenrezeptor-defizienten Mäusen lässt vermuten, dass Östrogenrezeptoren die Dichte von Ca^{2+} -Kanälen herunterregulieren [229]. Außerdem ist Östrogen in der Lage Ca^{2+} -Kanäle zu blockieren [230]. Zusammenfassend scheint unter anderem die verminderte Expression von Östrogenrezeptoren zu einer erhöhten Expression von Ca^{2+} -Kanälen und der verminderte Östrogenspiegel zu einer geringeren Blockade der Ca^{2+} -Kanäle zu führen, was jeweils eine verstärkte Kontraktion der Gefäßmuskulatur männlicher Ratten ermöglicht.

Studien zu geschlechtsabhängigen Unterschieden der Vasodilatation zeigen, dass Blutgefäße weiblicher Ratten zu einer verstärkten Vasodilatation neigen [225].

Unsere Untersuchungen zu den Gefäßantworten auf Vasodilatoren unterscheiden sich allerdings zwischen den Geschlechtern nicht signifikant. Dies wird durch andere Arbeitsgruppen gestützt [142, 145]. Sie konnten keine Unterschiede in der endothelunabhängigen oder der endothelvermittelten Vasodilatation zwischen den Geschlechtern oder in Abhängigkeit von Östrogen feststellen [142, 145]. Die durch andere Studien beschriebene verstärkte Vasodilatation von Gefäßen weiblicher Tiere scheint in östrogenbedingten Unterschieden in der NO-Freisetzung bzw. der NO-Aktivität begründet zu sein [147, 225]. So zeigten Huang et. al., dass die Gefäßquerschnitte von Widerstandarterien bei männlichen sowie ovariectomierten weiblichen Ratten geringer waren als bei unbehandelten weiblichen Tieren und bei ovariecto-

mierten Tieren unter Östrogensubstitution [147]. Die Behandlung mit einem NOS-Inhibitor führte bei ersteren Tieren lediglich zu einer geringen Abnahme des Gefäßquerschnittes, bei der 2. Gruppe jedoch zu einer deutlichen Abnahme des selbigen, was auf einen größeren Gehalt an NO, bzw. auf eine größere NOS-Aktivität unter Östrogeneinfluss hinweist [147]. Die Steigerung der NOS-Aktivität bzw. Erhöhung der NO-Freisetzung unter Östrogeneinfluss konnte auch in anderen Studien gezeigt werden [231, 232]. Östrogene führen vermutlich über einen Anstieg der endothelialen Ca^{2+} -Konzentration zu einer Aktivierung der eNOS und zu einer daraus resultierenden Erhöhung der NO-Freisetzung [225]. Außerdem scheinen die Aktivität der eNOS und die Anzahl der sie aktivierenden Ca^{2+} -Kanäle im Endothel weiblicher Blutgefäße erhöht zu sein [225].

Bezüglich der Gefäßdimorphismen in der NADPH-Oxidase-Expression fanden Miller et al. heraus, dass diese geschlechtsabhängig zu sein scheint [145]. So war in ihren Untersuchungen die Expression der NOX1 und NOX4 in Basilararterien männlicher Sprague-Dawley-Ratten größer, als in denen weiblicher Ratten [145]. Die Expression der NOX2 differierte nicht [145]. Miller et al. stellten daraufhin die Vermutung an, dass für die geringere NADPH-abhängige Superoxidbildung bei weiblichen Tieren die verminderte Expression der NOX1 und NOX4 ursächlich ist [145].

Unsere Untersuchungen an intrarenalen und mesenterialen Gefäßsegmenten können diese an Basilararterien gewonnenen Erkenntnisse nicht bestätigen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Miller et al. [145] unterschied sich bei unseren Studien die Expression der NOX1 und NOX4 nicht zwischen beiden Geschlechtern, hingegen war die NOX2 Expression intrarenaler Arteriensegmente weiblicher schein-sympathektomierter Tiere größer als die männlicher Tiere.

Im Weiteren scheinen auch Unterschiede in der Menge der O_2^- -Freisetzung an den Gefäßdimorphismen beteiligt zu sein. Brandes et al. fand bei Aortengewebe männlicher Wistar-Ratten höhere Konzentrationen von O_2^- als in Aortengewebe weiblicher Tiere [146]. Gestützt werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen an Cerebralarterien von Sprague-Dawley-Ratten von Miller et al. [145]. Sie fanden heraus, dass die NADPH-abhängige Superoxid-Produktion in Cerebralarterien männlicher Sprague-Dawley-Ratten größer war, als die in weiblichen Gefäßen [145].

Die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung in Aortengewebe weiblicher Tiere, war in unseren Untersuchungen größer, als in dem männlicher Tiere. Dies wurde vor

allem beim Vergleich sympathektomierter Tiere deutlich. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu anderen Untersuchungen [145, 233, 234] und könnte am Rattenstamm oder dem Alter der verwendeten Tiere liegen. Die aus anderen Studien bekannte größere vaskuläre NADPH-abhängige Superoxidbildung männlicher Tiere im Gegensatz zu weiblichen Tieren schien östrogenbedingt zu sein, da die NADPH-abhängige Superoxidbildung weiblicher Tiere nach Ovariectomie deutlich anstieg [145, 234]. Behandlung der ovariectomierten Tiere mit Östrogen führte wieder zu einer Verringerung der NADPH-abhängigen Superoxidbildung [145, 233, 234]. Östrogene scheinen somit einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität der NADPH-Oxidase zu haben und zu einer verringerten Freisetzung vasoaktiven O_2^- zu führen.

Im Gesamten betrachtet hat Sympathektomie laut unseren Ergebnissen keinen wesentlichen Einfluss auf geschlechtsabhängige Prozesse zur Modulation des Gefäßtonus.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse unserer Untersuchungen die bekannte Supersensitivität renaler und mesenterialer Gefäßsegmente auf Noradrenalin. Vertiefend konnten wir aufzeigen, dass an der Entstehung der Noradrenalin-Supersensitivität männlicher renaler Gefäße Veränderungen an α_1 - wie auch α_2 -Adrenorezeptoren beteiligt sind, die Supersensitivität weiblicher renaler Gefäße und mesenterialer Gefäße neben anderen Mechanismen unter anderem auf Veränderungen der α_1 -Adrenorezeptoren, nicht aber auf Veränderungen von α_2 -Adrenorezeptoren beruht. Unsere Untersuchungen zur Kalium-induzierten Vasokonstriktion zeigten bei mesenterialen Gefäßsegmenten männlicher sowie weiblicher scheinsympathektomierter Tiere eine stärkere Vasokonstriktion als bei sympathektomierten Tieren, was auf einen geringeren Gehalt an kontraktilen Gewebe bei sympathektomierten Tieren hindeutet. Diese Schlussfolgerung muss durch die verstärkte Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion bei sympathektomierten mesenterialen und renalen Gefäßsegmenten männlicher und weiblicher Tiere gegenüber ihren scheinsympathektomierten Kontrollen trotz Beachtung von Supersensitivität kritisch gesehen werden. Auf die Vasodilatation, sowohl endothelabhängig als auch endothelunabhängig, renaler und mesenterialer Gefäßsegmente, hatte Sympathektomie keinen Einfluss.

Wir bestätigten mit unseren Untersuchungen die bisherigen Erkenntnisse, dass der überwiegende Teil der ROS-Freisetzung von der NADPH-Oxidase stammt. Sympathektomie hatte weder auf die NADPH-Oxidaseaktivität, noch auf deren Expression

einen eindeutigen Einfluss. Renale Gefäßsegmente setzten dabei deutlich mehr ROS frei als Aortensegmente. In renalen Gefäßsegmenten konnten NOX1, NOX2 und NOX4 nachgewiesen werden, in mesenterialen Gefäßsegmenten NOX2 und NOX4, aber kaum NOX1. Sympathektomie verringerte den NOX2-mRNA-Gehalt bei Gefäßsegmenten sympathektomierter weiblicher Tiere.

Die Frage, ob chronische Sympathektomie zu Veränderungen in der Bedeutung von ROS für die Agonist-induzierte Vasokonstriktion- und dilatation von Widerstandsarterien führt, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Der ROS-Fänger Tiron schwächte lediglich die maximale Kontraktionsantwort bei renalen Gefäßsegmenten männlicher sympathektomierter Tiere, wie auch die endothelunabhängigen Vasodilatation mesenteriale Gefäßsegmente weiblicher sympathektomierter Tiere leicht ab.

Chronische Sympathektomie führte nicht zu signifikanten Veränderungen der Sensitivität von Widerstandsgefäßen gegenüber den prokontraktiven Effekten von H_2O_2 . In unseren Untersuchungen bewirkt H_2O_2 sowohl bei mechanisch vorgedehnten als auch bei pharmakologisch vorkontrahierten renalen Gefäßsegmenten, eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion. Dabei kontrahierten die Gefäßsegmente scheinsympathektomierter Tiere nach pharmakologischer Vorkontraktion mit einer signifikant höheren Wandspannung als ohne Vorkontraktion.

Zu der eingangs gestellten Frage, ob es Geschlechtsunterschiede in der Supersensitivitätsentwicklung und in der Aktivität sowie Expression ROS-produzierender Systeme von Widerstandsarterien gibt, ergaben sich unterschiedliche Aspekte. Zusammenfassend fanden wir eine verstärkte Kalium-induzierte Vasokonstriktion mesenterialer Gefäßsegmente männlicher gegenüber weiblicher scheinsympathektomierter Tiere, eine stärkere Supersensitivität mesenterialer Gefäßsegmente männlicher sympathektomierter Tiere gegenüber weiblichen Tieren und eine geringere maximale Noradrenalin-vermittelte Vasokonstriktion renaler Gefäßsegmente männlicher sympathektomierter Tiere gegenüber weiblichen Tieren. Außerdem war bei männlichen Tieren die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung in Aortengewebe und die NOX2 Expression in scheinsympathektomierten intrarenalen Arterien kleiner als bei weiblichen Tieren.

5. Zusammenfassung

Das sympathische Nervensystem ist an der Regulation des Herz-Kreislaufsystems beteiligt und beeinflusst wesentlich die Struktur und Funktion von Widerstandsgefäßen. Die vorliegende Arbeit untersuchte chronische Effekte der sympathischen Innervation auf die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und deren Regulation des Gefäßtonus anhand des Modells der neonatalen Sympathektomie.

Untersucht wurde Gewebe von 11-14 Wochen alten Wistar-Ratten. Es erfolgten pharmakologische und physiologische Untersuchungen isolierter mesenterialer und intrarenaler Widerstandsarteriensegmente sowie aortaler Gefäßsegmente mit Hilfe der Small-Vessel-Draht-Myographie sowie Untersuchungen zur vaskulären NADPH-Oxidase-mRNA-Expression und NADPH-Oxidaseaktivität mittels real-time-RT-PCR und Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz. Zur Beurteilung von Geschlechtsdimorphismen hinsichtlich der untersuchten Prozesse wurden Tiere beider Geschlechter in die Studie einbezogen.

Die Kalium-induzierte Vasokonstriktion zeigt sich durch chronische Sympathektomie bei mesenterialen Gefäßsegmenten erniedrigt, was auf geringeren Gehalt an kontraktilen Gewebe infolge der Sympathektomie hindeutet. Weitere Untersuchungen zeigten neben einer Noradrenalin-Supersensitivität renaler Gefäßsegmente chronisch sympathektomierter männlicher Tiere, an der sowohl α_1 - wie auch α_2 -Adrenorezeptor-vermittelte Prozesse beteiligt sind, auch eine Noradrenalin-Supersensitivität renaler Gefäßsegmente weiblicher Tiere und mesenterialer Gefäßsegmente, die unter anderem α_1 -Adrenorezeptor, nicht aber α_2 -Adrenorezeptor getragen ist. Die endothelvermittelte und endothelunabhängige Vasodilatation wurden unter Applikation von Acetylcholin und Nitroprussidnatrium untersucht und zeigte sich durch chronische Sympathektomie unbeeinflusst. Weitere Small-Vessel-Myographie-Experimente erfolgten zur Beurteilung der Bedeutung von ROS für die Modulation Agonist-induzierter Vasokonstriktion- und dilatation von Widerstandsarterien chronisch sympathektomierter Wistar-Ratten. Der Einsatz des Radikalfängers Tiron lässt jedoch keine allgemeingültigen Aussagen zur ROS-abhängigen Modulation der Gefäßfunktion zu. Lediglich bei renalen Gefäßsegmenten männlicher und mesenterialen Gefäßsegmenten weiblicher sympathektomierter Tiere schwächte sich nach Tirongabe bei erstgenannter Gruppe die maximale Kontraktionsantwort, bei zweitgenannter Gruppe die endothelunabhängige Vasodilatation leicht ab. Experimente zu Veränderungen

des Gefäßtonus durch H_2O_2 zeigten sowohl eine direkte durch H_2O_2 ausgelöste Kontraktion, als auch die Verstärkung prokontraktiler Mechanismen durch H_2O_2 , wobei die Empfindlichkeit der Gefäße gegenüber H_2O_2 nicht durch chronische Sympathektomie beeinflusst wurde. Die Untersuchungen zum Einfluss chronischer Sympathektomie auf die NADPH-Oxidaseaktivität zeigten weder an renalen, mesenterialen, noch aortalen Gefäßsegmenten unter Inhibierung anderer ROS-produzierender Systeme mit Rotenon, Allopurinol und L-NAME, Veränderungen in der NADPH-Oxidaseaktivität durch chronische Sympathektomie. Auch hatte chronische Denervierung keinen eindeutigen Einfluss auf die NADPH-Oxidase-Expression, lediglich der NOX2-mRNA-Gehalt intrarenaler Arteriensegmente weiblicher sympathektomierter Tiere war niedriger als der scheinbehandelter Kontrollen. Die differenzierte Betrachtung der Ergebnisse lässt zwischen beiden Geschlechtern bezüglich der Gefäßfunktion keine globalen Aussagen zu. Vergrößert, gegenüber der weiblichen Versuchsgruppe, war die Kalium-induzierte Vasokonstriktion mesenterialer Gefäßsegmente schein sympathektomierter männlicher Tiere, vermindert die maximale Noradrenalin-induzierte Vasokonstriktion renaler Gefäßsegmente sympathektomierter männlicher Tiere im Vergleich zu weiblichen. Außerdem war die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung in Aortengewebe männlicher Tiere und der NOX2-mRNA-Gehalt bei renalen Gefäßsegmenten schein sympathektomierter männlicher gegenüber weiblicher Tiere verringert.

Aus den Ergebnissen lassen sich Hinweise ableiten, dass chronisch sympathektomiertere Tiere möglicherweise einen geringeren Gehalt an kontraktilen Gewebe der Gefäßmuskulatur aufweisen. Außerdem beruht die bekannte Noradrenalin-Supersensitivität chronisch denervierter renaler Gefäßsegmente männlicher Tiere, auf α_1 - wie auch α_2 -Adrenorezeptor-vermittelten Prozessen, die von chronisch denervierten renalen Gefäßen weiblicher Tiere und mesenterialen Gefäßen unter anderem auf α_2 -, nicht aber auf α_1 -Adrenorezeptoren-vermittelten Prozessen. Der eher diskrete Einfluss des Radikalfängers Tiron auf die Gefäßfunktion, der geringe, wenn überhaupt vorhandene Einfluss der Sympathektomie auf die Expression der NADPH-Oxidase-Isoformen und die fehlenden Effekte der Sympathektomie auf die NADPH-Oxidaseaktivität sprechen dafür, dass ROS-abhängige Prozesse, wenn überhaupt nur eine untergeordnete Bedeutung für die Denervierungssupersensitivität kleiner Widerstandsarterien haben.

III. Literaturverzeichnis

1. **DiBona, G.F. and U.C. Kopp**, Neural control of renal function. *Physiol Rev*, 1997. 77(1): p. 75-197.
2. **Grisk, O., et al.**, Sympathetic-renal interaction in chronic arterial pressure control. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002. 283(2): p. R441-50.
3. **Guyton, A.C.**, Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol*, 1990. 259(5 Pt 2): p. R865-77.
4. **Guyton, A.C.**, Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science*, 1991. 252(5014): p. 1813-6.
5. **Guyton, A.C.**, Hall, J.E., Dominant Role of the Kidney in Long-Term Regulation of Arterial Pressure and in Hypertension: The Integrated System for Pressure Control. In: *Textbook of Medical Physiologie*. Vol. 11. 2006, Elsevier Saunders: Pennsylvania. 216-231.
6. **Bernard, C.**, ed. *Lecons sur les Propriétés & Physiologiques et les Altérations Pathologiques des Liquides de l'Organisme*. Vol. 2. 1859, Baillière et Fils: Paris. 170-171.
7. **Barajas, L. and J. Muller**, The innervation of the juxtaglomerular apparatus and surrounding tubules: a quantitative analysis by serial section electron microscopy. *J Ultrastruct Res*, 1973. 43(1): p. 107-32.
8. **Muller, J. and L. Barajas**, Electron microscopic and histochemical evidence for a tubular innervation in the renal cortex of the monkey. *J Ultrastruct Res*, 1972. 41(5): p. 533-49.
9. **Barajas, L., L. Liu, and K. Powers**, Anatomy of the renal innervation: intrarenal aspects and ganglia of origin. *Can J Physiol Pharmacol*, 1992. 70(5): p. 735-49.
10. **Barajas, L. and L. Liu**, The renal nerves in the newborn rat. *Pediatr Nephrol*, 1993. 7(5): p. 657-66.
11. **Barajas, L., L. Liu, and C. Nishiyama**, Prenatal and postnatal development of the CGRP-immunoreactive innervation in the rat kidney. *Neurosci Lett*, 1991. 133(2): p. 219-24.
12. **Sripairojthikoon, W. and J.M. Wyss**, Cells of origin of the sympathetic renal innervation in rat. *Am J Physiol*, 1987. 252(6 Pt 2): p. F957-63.

13. **Taylor, R.B. and L.C. Weaver**, Spinal stimulation to locate preganglionic neurons controlling the kidney, spleen, or intestine. *Am J Physiol*, 1992. 263(4 Pt 2): p. H1026-33.
14. **Strack, A.M., et al.**, Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Res*, 1988. 455(1): p. 187-91.
15. **Donovan, M.K., S.R. Winternitz, and J.M. Wyss**, An analysis of the sensory innervation of the urinary system in the rat. *Brain Res Bull*, 1983. 11(3): p. 321-4.
16. **Knuepfer, M.M. and L.P. Schramm**, The conduction velocities and spinal projections of single renal afferent fibers in the rat. *Brain Res*, 1987. 435(1-2): p. 167-73.
17. **Ciriello, J. and F.R. Calaresu**, Hypothalamic projections of renal afferent nerves in the cat. *Can J Physiol Pharmacol*, 1980. 58(5): p. 574-6.
18. **Ciriello, J. and F.R. Calaresu**, Central projections of afferent renal fibers in the rat: an anterograde transport study of horseradish peroxidase. *J Auton Nerv Syst*, 1983. 8(3): p. 273-85.
19. **Calaresu, F.R. and J. Ciriello**, Renal afferent nerves affect discharge rate of medullary and hypothalamic single units in the cat. *J Auton Nerv Syst*, 1981. 3(2-4): p. 311-20.
20. **Felder, R.B.**, Excitatory and inhibitory interactions among renal a cardiovascular afferent nerves in dorsomedial medulla. *Am J Physiol*, 1986. 250(4 Pt 2): p. R580-8.
21. **Klinke, R., Pape, H-C., Silbernagel S.**, Das Kreislaufsystem. In: *Physiologie*. P. Gaetgens, Ehmke, H. Vol. 5. 2005, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. 175-222.
22. **Ponnuchamy, B. and R.A. Khalil**, Cellular mediators of renal vascular dysfunction in hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. 296(4): p. R1001-18.
23. **Mulvany, M.J.**, Structure and function of small arteries in hypertension. *J Hypertens Suppl*, 1990. 8(7): p. S225-32.
24. **Welsch, U.**, Kreislauforgane und Lymphgefäße. In: *Sobotta Lehrbuch Histologie*. U. Welsch. Vol. 2. 2006, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag: München. 236-258.

25. **Klinke, R., Pape, H-C., Silbernagel S.**, Muskulatur. In: *Physiologie*. R. Brenner. Vol. 5. 2005, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. 101-136.
26. **Hirst, G.D., et al.**, Transmission by post-ganglionic axons of the autonomic nervous system: the importance of the specialized neuroeffector junction. *Neuroscience*, 1996. 73(1): p. 7-23.
27. **Piascik, M.T., et al.**, Alpha-adrenoceptors and vascular regulation: molecular, pharmacologic and clinical correlates. *Pharmacol Ther*, 1996. 72(3): p. 215-41.
28. **Morris, J.L.**, Peptides as neurotransmitters in vascular autonomic neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1995. 22(11): p. 792-802.
29. **Lundberg, J.M., et al.**, Evidence for co-transmitter role of neuropeptide Y in the pig spleen. *Br J Pharmacol*, 1989. 96(3): p. 675-87.
30. **Caputo, L., A. Tedgui, and B.I. Levy**, Control of carotid vasomotor tone by local renin-angiotensin system in normotensive and spontaneously hypertensive rats. Role of endothelium and flow. *Circ Res*, 1995. 77(2): p. 303-9.
31. **Harrison, D.G., et al.**, Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*, 2006. 259(4): p. 351-63.
32. **Hibbs, J.B., Jr., R.R. Taintor, and Z. Vavrin**, Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 1987. 235(4787): p. 473-6.
33. **Schmidt, H.H., et al.**, No. NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(25): p. 14492-7.
34. **Lincoln, T.M., N. Dey, and H. Sellak**, Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol*, 2001. 91(3): p. 1421-30.
35. **Damon, D.H.**, Sympathetic innervation promotes vascular smooth muscle differentiation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2005. 288(6): p. H2785-91.
36. **Yu, S.M., et al.**, Mechanism of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 1996. 94(3): p. 547-54.
37. **Caplea, A., et al.**, Noradrenergic content and turnover rate in kidney and heart shows gender and strain differences. *J Appl Physiol*, 2002. 92(2): p. 567-71.

38. **Judy, W.V., et al.**, Sympathetic nerve activity and blood pressure in normotensive backcross rats genetically related to the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 1979. 1(6): p. 598-604.
39. **Head, R.J.**, Hypernoradrenergic innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood vessels*, 1989. 26(1): p. 1-20.
40. **Lee, R.M.**, Vascular changes at the prehypertensive phase in the mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Blood vessels*, 1985. 22(3): p. 105-26.
41. **Lee, R.M., et al.**, Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1987. 10(3): p. 328-38.
42. **Mulvany, M.J., C. Aalkjaer, and J. Christensen**, Changes in noradrenaline sensitivity and morphology of arterial resistance vessels during development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1980. 2(5): p. 664-71.
43. **Mulvany, M.J. and W. Halpern**, Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*, 1977. 41(1): p. 19-26.
44. **Simon, G.**, Pathogenesis of structural vascular changes in hypertension. *Journal of hypertension*, 2004. 22(1): p. 3-10.
45. **Smeda, J.S., R.M. Lee, and J.B. Forrest**, Structural and reactivity alterations of the renal vasculature of spontaneously hypertensive rats prior to and during established hypertension. *Circulation research*, 1988. 63(3): p. 518-33.
46. **Lee, R.M., et al.**, Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 1991. 69(3): p. 714-21.
47. **Korner, P., et al.**, Sympathoadrenal system is critical for structural changes in genetic hypertension. *Hypertension*, 1993. 22(2): p. 243-52.
48. **Bevan, R.D.**, Trophic effects of peripheral adrenergic nerves on vascular structure. *Hypertension*, 1984. 6(6 Pt 2): p. III19-26.
49. **Fronek, K., et al.**, Effect of long-term sympathectomy on the arterial wall in rabbits and rats. *Experimental and molecular pathology*, 1978. 28(3): p. 279-89.

50. **Grisk, O., et al.**, Influence of neonatal sympathectomy on proximal renal resistance artery function in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch*, 2005. 449(4): p. 364-71.
51. **Harrison, D.G.**, Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, 1997. 100(9): p. 2153-7.
52. **Busse, R. and I. Fleming**, Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*, 1996. 33(3): p. 181-94.
53. **Rees, D.D., R.M. Palmer, and S. Moncada**, Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(9): p. 3375-8.
54. **Tresham, J.J., et al.**, Haemodynamic and hormonal effects of N-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide biosynthesis, in sheep. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1991. 18(5): p. 327-30.
55. **Katusic, Z.S.**, Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med*, 1996. 20(3): p. 443-8.
56. **Langenstroer, P. and G.M. Pieper**, Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol*, 1992. 263(1 Pt 2): p. H257-65.
57. **Brandes, R.P.**, Vascular functions of NADPH oxidases. *Hypertension*. 56(1): p. 17-21.
58. **Haynes, W.G., et al.**, L-NMMA increases blood pressure in man. *Lancet*, 1993. 342(8876): p. 931-2.
59. **Violi, F., et al.**, Hereditary deficiency of gp91(phox) is associated with enhanced arterial dilatation: results of a multicenter study. *Circulation*, 2009. 120(16): p. 1616-22.
60. **Knight, J.A.**, Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab Sci*, 1998. 28(6): p. 331-46.
61. **Paravicini, T.M. and R.M. Touyz**, Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*, 2006. 71(2): p. 247-58.
62. **Landmesser, U., et al.**, Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, 2003. 111(8): p. 1201-9.

63. **Vasquez-Vivar, J., et al.**, Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(16): p. 9220-5.
64. **Chen, Q., et al.**, Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*, 2003. 278(38): p. 36027-31.
65. **McNally, J.S., et al.**, Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(6): p. H2290-7.
66. **Touyz, R.M., G. Yao, and E.L. Schiffrin**, c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(6): p. 981-7.
67. **Fleming, I., et al.**, Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res*, 2001. 88(1): p. 44-51.
68. **Kukreja, R.C., et al.**, PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res*, 1986. 59(6): p. 612-9.
69. **Griendling, K.K., et al.**, Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(10): p. 2175-83.
70. **Selemidis, S., et al.**, NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther*, 2008. 120(3): p. 254-91.
71. **Schluter, T., et al.**, Intrarenal artery superoxide is mainly NADPH oxidase-derived and modulates endothelium-dependent dilation in elderly patients. *Cardiovasc Res*. 85(4): p. 814-24.
72. **Rossi, F. and M. Zatti**, Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia*, 1964. 20(1): p. 21-3.
73. **Brandes, R.P. and J. Kreuzer**, Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res*, 2005. 65(1): p. 16-27.

74. **Griendling, K.K., et al.**, Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1994. 74(6): p. 1141-8.
75. **Mohazzab, K.M., P.M. Kaminski, and M.S. Wolin**, NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*, 1994. 266(6 Pt 2): p. H2568-72.
76. **Zou, A.P., N. Li, and A.W. Cowley, Jr.**, Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension*, 2001. 37(2 Pt 2): p. 547-53.
77. **Lambeth, J.D., T. Kawahara, and B. Diebold**, Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med*, 2007. 43(3): p. 319-31.
78. **Ris-Stalpers, C.**, Physiology and pathophysiology of the DUOXes. *Antioxid Redox Signal*, 2006. 8(9-10): p. 1563-72.
79. **Lassegue, B. and R.E. Clempus**, Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 285(2): p. R277-97.
80. **Sorescu, D., et al.**, Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*, 2002. 105(12): p. 1429-35.
81. **Paravicini, T.M., et al.**, Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ Res*, 2002. 91(1): p. 54-61.
82. **Rey, F.E. and P.J. Pagano**, The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(12): p. 1962-71.
83. **Gorlach, A., et al.**, A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*, 2000. 87(1): p. 26-32.
84. **Lassegue, B., et al.**, 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(9): p. 888-94.
85. **Mollnau, H., et al.**, 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(4): p. E58-65.

86. **Bengtsson, S.H., et al.**, Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003. 30(11): p. 849-54.
87. **Wendt, M.C., et al.**, Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free Radic Biol Med*, 2005. 39(3): p. 381-91.
88. **Guzik, T.J., et al.**, Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(2): p. 333-9.
89. **Sohn, H.Y., et al.**, Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br J Pharmacol*, 2000. 131(4): p. 667-72.
90. **Touyz, R.M.**, Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2003. 1(1): p. 91-106.
91. **Wei, Y., et al.**, Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates vascular apoptosis and injury via rescuing protein kinase B activation. *Hypertension*, 2009. 53(2): p. 158-65.
92. **Jackson, E.K., et al.**, Alpha2-adrenoceptors enhance angiotensin II-induced renal vasoconstriction: role for NADPH oxidase and RhoA. *Hypertension*, 2008. 51(3): p. 719-26.
93. **Everett, P.B. and S.E. Senogles**, D3 dopamine receptor activates phospholipase D through a pertussis toxin-insensitive pathway. *Neurosci Lett*, 2004. 371(1): p. 34-9.
94. **Brandes, R.P., et al.**, The vascular NADPH oxidase subunit p47phox is involved in redox-mediated gene expression. *Free Radic Biol Med*, 2002. 32(11): p. 1116-22.
95. **Garcia-Redondo, A.B., et al.**, Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. 328(1): p. 19-27.
96. **Li, W.G., et al.**, H₂O₂-induced O₂⁻ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem*, 2001. 276(31): p. 29251-6.

97. **Chen, X.L., et al.**, Superoxide, H₂O₂, and iron are required for TNF- α -induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(3): p. H1001-7.
98. **Inoguchi, T., et al.**, High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 2000. 49(11): p. 1939-45.
99. **De Keulenaer, G.W., et al.**, Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circulation research*, 1998. 82(10): p. 1094-101.
100. **Liu, R., et al.**, Superoxide enhances tubuloglomerular feedback by constricting the afferent arteriole. *Kidney Int*, 2004. 66(1): p. 268-74.
101. **Zhang, R., et al.**, Isoforms and functions of NAD(P)H oxidase at the macula densa. *Hypertension*, 2009. 53(3): p. 556-63.
102. **Carlstrom, M. and A.E. Persson**, Important role of NAD(P)H oxidase 2 in the regulation of the tubuloglomerular feedback. *Hypertension*, 2009. 53(3): p. 456-7.
103. **Darley-Usmar, V. and B. Halliwell**, Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm Res*, 1996. 13(5): p. 649-62.
104. **Kishi, T., et al.**, Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, 2004. 109(19): p. 2357-62.
105. **Chaudiere, J. and R. Ferrari-Iliou**, Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*, 1999. 37(9-10): p. 949-62.
106. **Ichikawa, I., S. Kiyama, and T. Yoshioka**, Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int*, 1994. 45(1): p. 1-9.
107. **Touyz, R.M., et al.**, p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. *Hypertension*, 2001. 37(2 Pt 2): p. 574-80.
108. **Sundaresan, M., et al.**, Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 1995. 270(5234): p. 296-9.

109. **Saito, Y. and B.C. Berk**, Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. 33(1): p. 3-7.
110. **Forman, H.J., M. Maiorino, and F. Ursini**, Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 49(5): p. 835-42.
111. **Gao, Y.J. and R.M. Lee**, Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br J Pharmacol*, 2001. 134(8): p. 1639-46.
112. **Pelaez, N.J., et al.**, H₂O₂ mediates Ca²⁺- and MLC(20) phosphorylation-independent contraction in intact and permeabilized vascular muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. 279(3): p. H1185-93.
113. **Schnackenberg, C.G.**, Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002. 282(2): p. R335-42.
114. **Sotnikova, R.**, Investigation of the mechanisms underlying H₂O₂-evoked contraction in the isolated rat aorta. *Gen Pharmacol*, 1998. 31(1): p. 115-9.
115. **Yang, Z.W., et al.**, Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol*, 1998. 344(2-3): p. 169-81.
116. **Bielefeldt, K., et al.**, Reactive oxygen species and calcium homeostasis in cultured human intestinal smooth muscle cells. *The American journal of physiology*, 1997. 272(6 Pt 1): p. G1439-50.
117. **Lucchesi, P.A., S. Belmadani, and K. Matrougui**, Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens*, 2005. 23(3): p. 571-9.
118. **Thakali, K., et al.**, Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, 2006. 47(3): p. 482-7.
119. **Jin, L., Z. Ying, and R.C. Webb**, Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 287(4): p. H1495-500.
120. **Klemke, R.L., et al.**, Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol*, 1997. 137(2): p. 481-92.

121. **Barlow, R.S. and R.E. White**, Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol*, 1998. 275(4 Pt 2): p. H1283-9.
122. **Gao, Y.J., et al.**, Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, 2003. 138(6): p. 1085-92.
123. **Schuijt, M.P., et al.**, Superoxide does not mediate the acute vasoconstrictor effects of angiotensin II: a study in human and porcine arteries. *J Hypertens*, 2003. 21(12): p. 2335-44.
124. **Thomas, G. and P. Ramwell**, Induction of vascular relaxation by hydroperoxides. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. 139(1): p. 102-8.
125. **Wei, E.P., H.A. Kontos, and J.S. Beckman**, Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *The American journal of physiology*, 1996. 271(3 Pt 2): p. H1262-6.
126. **Yang, Z., et al.**, Hydrogen peroxide-induced endothelium-dependent relaxation of rat aorta involvement of Ca²⁺ and other cellular metabolites. *Gen Pharmacol*, 1999. 33(4): p. 325-36.
127. **Thengchaisri, N. and L. Kuo**, Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(6): p. H2255-63.
128. **Yang, Z.W., et al.**, Endothelium-dependent relaxation to hydrogen peroxide in canine basilar artery: a potential new cerebral dilator mechanism. *Brain Res Bull*, 1998. 47(3): p. 257-63.
129. **Hayabuchi, Y., et al.**, Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Heart Vessels*, 1998. 13(1): p. 9-17.
130. **Baas, A.S. and B.C. Berk**, Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1995. 77(1): p. 29-36.
131. **Chu, 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(4): p. 461-8.

132. **Ding, Y., H.C. Gonick, and N.D. Vaziri**, Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am J Hypertens*, 2000. 13(5 Pt 1): p. 552-5.
133. **Vaziri, N.D., et al.**, Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney Int*, 2003. 63(1): p. 186-94.
134. **Vaziri, N.D., et al.**, Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension*, 2000. 36(1): p. 142-6.
135. **Fukai, T., et al.**, Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 2002. 55(2): p. 239-49.
136. **Griendling, K.K. and G.A. FitzGerald**, Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*, 2003. 108(17): p. 2034-40.
137. **Kitiyakara, C. and C.S. Wilcox**, Antioxidants for hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1998. 7(5): p. 531-8.
138. **Gilligan, D.M., A.A. Quyyumi, and R.O. Cannon, 3rd**, Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation*, 1994. 89(6): p. 2545-51.
139. **Lerner, D.J. and W.B. Kannel**, Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *American heart journal*, 1986. 111(2): p. 383-90.
140. **Nabulsi, A.A., et al.**, Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *The New England journal of medicine*, 1993. 328(15): p. 1069-75.
141. **Jones, T.J., et al.**, Testosterone effects on renal norepinephrine content and release in rats with different Y chromosomes. *Hypertension*, 1998. 32(5): p. 880-5.
142. **Li, Z. and S.P. Duckles**, Influence of gender on vascular reactivity in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. 268(3): p. 1426-31.
143. **Ma, Y., et al.**, Gender-specific reduction in contraction is associated with increased estrogen receptor expression in single vascular smooth muscle cells of female rat. *Cell Physiol Biochem*. 26(3): p. 457-70.

144. **Stallone, J.N., J.T. Crofton, and L. Share**, Sexual dimorphism in vasopressin-induced contraction of rat aorta. *Am J Physiol*, 1991. 260(2 Pt 2): p. H453-8.
145. **Miller, A.A., et al.**, Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen. *Stroke*, 2007. 38(7): p. 2142-9.
146. **Brandes, R.P. and A. Mugge**, Gender differences in the generation of superoxide anions in the rat aorta. *Life Sci*, 1997. 60(6): p. 391-6.
147. **Huang, A., et al.**, Gender difference in myogenic tone of rat arterioles is due to estrogen-induced, enhanced release of NO. *Am J Physiol*, 1997. 272(4 Pt 2): p. H1804-9.
148. **Hoobler, S.W., et al.**, The effects of splanchnicectomy on the blood pressure in hypertension; a controlled study. *Circulation*, 1951. 4(2): p. 173-83.
149. **Page, I.H. and G.J. Heuer**, A Surgical Treatment of Essential Hypertension. *J Clin Invest*, 1935. 14(1): p. 22-6.
150. **Grisk, O. and R. Rettig**, Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovasc Res*, 2004. 61(2): p. 238-46.
151. **Schlaich, M.P., et al.**, Renal sympathetic-nerve ablation for uncontrolled hypertension. *N Engl J Med*, 2009. 361(9): p. 932-4.
152. **Hering, D., et al.**, Substantial reduction in single sympathetic nerve firing after renal denervation in patients with resistant hypertension. *Hypertension*. 61(2): p. 457-64.
153. **Krum, H., et al.**, Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *Lancet*, 2009. 373(9671): p. 1275-81.
154. **Esler, M.D., et al.**, Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 376(9756): p. 1903-9.
155. **Esler, M.D., et al.**, Renal sympathetic denervation for treatment of drug-resistant hypertension: one-year results from the Symplicity HTN-2 randomized, controlled trial. *Circulation*. 126(25): p. 2976-82.
156. **Wienemann, H., et al.**, Treating resistant hypertension with new devices. *Minerva Cardioangiol*. 62(3): p. 235-41.

157. **Bhatt, D.L., et al.**, A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *N Engl J Med.* 370(15): p. 1393-401.
158. **Johnson, E.M., Jr., F. O'Brien, and R. Werbitt**, Modification and characterization of the permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats. *Eur J Pharmacol*, 1976. 37(1): p. 45-54.
159. **Picklo, M.J.**, Methods of sympathetic degeneration and alteration. *J Auton Nerv Syst*, 1997. 62(3): p. 111-25.
160. **Grisk, O., H.J. Rose, and R. Rettig**, The development of post-transplantation hypertension in recipients of an SHR kidney is independent of reinnervation of the graft. *Pflugers Arch*, 1999. 438(4): p. 502-7.
161. **Mulvany, M.J. and W. Halpern**, Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature*, 1976. 260(5552): p. 617-9.
162. **Brunton, L.L., J.S. Lazo, and K.L. Parker**, Adrenergic Agonists and Antagonists. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. T.C. Westfall and D.P. Westfall. Vol. 11. 2006, McGRAW-HILL: New York. 237-296.
163. **Ledenev, A.N., et al.**, A simple assay of the superoxide generation rate with Tiron as an EPR-visible radical scavenger. *Biochem Int*, 1986. 13(2): p. 391-6.
164. **Brunton, L.L., Lazo, John S., Parker, Keith L.**, Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. J.H. Brown, Taylor, P. Vol. 11. 2006, McGRAW-HILL: New York. 183-200.
165. **Brunton, L.L., Lazo, John S., Parker, Keith L.**, Therapy of Hypertension. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. B.B. Hoffman. Vol. 11. 2006, McGRAW-HILL: New York. 845-868.
166. **Jahnson, M., Rothhämel, S.**, Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: *Gen-technische Methoden*. H. Schmidt, Rothhämel, S. Vol. 5. 2012, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Heidelberg. 161-168.
167. **Peirson, S.N., J.N. Butler, and R.G. Foster**, Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(14): p. e73.

168. **Schluter, T., et al.**, Neonatal sympathectomy reduces NADPH oxidase activity and vascular resistance in spontaneously hypertensive rat kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. 291(2): p. R391-9.
169. **Faulkner, K. and I. Fridovich**, Luminol and lucigenin as detectors for O₂. *Free Radic Biol Med*, 1993. 15(4): p. 447-51.
170. **Li, Y., et al.**, Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem*, 1998. 273(4): p. 2015-23.
171. **Brunton, L.L., Lazo, John S., Parker, Keith L.**, Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents; Pharmacotherapy of Gout. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. A. Burke, Smyth, Emer M., FitzGerald, Garret A. Vol. 11. 2006, McGRAW-HILL: New York. 708-710.
172. **Rees, D.D., et al.**, Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 1990. 101(3): p. 746-52.
173. **Jensen-Holm, J. and P. Juul**, Changes of the rat superior cervical ganglion induced by guanethidine (histology and cholinesterase histochemistry). *British journal of pharmacology*, 1968. 34(1): p. 211P-212P.
174. **Clark, D.W., et al.**, Blood pressure and vascular resistance in genetically hypertensive rats treated at birth with 6-hydroxydopamine. *Circ Res*, 1978. 43(2): p. 293-300.
175. **Nyborg, N.C., N. Korsgaard, and M.J. Mulvany**, Neonatal sympathectomy of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats with 6-hydroxydopamine: effects on resistance vessel structure and sensitivity to calcium. *J Hypertens*, 1986. 4(4): p. 455-61.
176. **Touw, K.B., et al.**, Contribution of the sympathetic nervous system to vascular resistance in conscious young and adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1980. 2(4): p. 408-18.
177. **Krayacich, J., R.L. Kline, and P.F. Mercer**, Supersensitivity to NE alters renal function of chronically denervated rat kidneys. *Am J Physiol*, 1987. 252(5 Pt 2): p. F856-64.
178. **Rizzoni, D., et al.**, Enhanced vascular reactivity in the sympathectomized rat: studies in vivo and in small isolated resistance arteries. *J Hypertens*, 2000. 18(8): p. 1041-9.

179. **Ralevic, V. and G. Burnstock**, Effects of short- and long-term sympathectomy on vasoconstrictor responses of the rat mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol*, 1996. 119(7): p. 1347-54.
180. **Hill, C.E., J.K. Phillips, and S.L. Sandow**, Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. *Med Res Rev*, 2001. 21(1): p. 1-60.
181. **Lefkowitz, R.J.**, Direct binding studies of adrenergic receptors: biochemical, physiologic, and clinical implications. *Ann Intern Med*, 1979. 91(3): p. 450-8.
182. **Snavely, M.D., M.G. Ziegler, and P.A. Insel**, Subtype-selective down-regulation of rat renal cortical alpha- and beta-adrenergic receptors by catecholamines. *Endocrinology*, 1985. 117(5): p. 2182-9.
183. **Sundaresan, P.R., M.M. Guarnaccia, and J.L. Izzo, Jr.**, Adrenal medullary regulation of rat renal cortical adrenergic receptors. *Am J Physiol*, 1987. 253(5 Pt 2): p. F1063-7.
184. **Snavely, M.D. and P.A. Insel**, Characterization of alpha-adrenergic receptor subtypes in the rat renal cortex. Differential regulation of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors by guanyl nucleotides and Na. *Mol Pharmacol*, 1982. 22(3): p. 532-46.
185. **Snavely, M.D., et al.**, beta-Adrenergic receptor subtypes in the rat renal cortex. Selective regulation of beta 1-adrenergic receptors by pheochromocytoma. *Circ Res*, 1982. 51(4): p. 504-13.
186. **Thomson, S.C., et al.**, Glomerular hemodynamics and alpha 2-adrenoreceptor stimulation: the role of renal nerves. *Am J Physiol*, 1990. 258(1 Pt 2): p. F21-7.
187. **Woodcock, E.A., et al.**, Specific increase in renal alpha 1-adrenergic receptors following unilateral renal denervation. *J Recept Res*, 1985. 5(2-3): p. 133-46.
188. **Colucci, W.S., M.A. Gimbrone, Jr., and R.W. Alexander**, Regulation of the postsynaptic alpha-adrenergic receptor in rat mesenteric artery. Effects of chemical sympathectomy and epinephrine treatment. *Circ Res*, 1981. 48(1): p. 104-11.
189. **Flavahan, N.A., et al.**, Denervation augments alpha-2 but not alpha-1 adrenergic responses in canine saphenous veins. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987. 240(2): p. 589-93.

190. **Wolff, D.W., R.E. Colindres, and J.W. Strandhoy**, Unmasking sensitive alpha 2-adrenoceptor-mediated renal vasoconstriction in conscious rats. *Am J Physiol*, 1989. 257(6 Pt 2): p. F1132-9.
191. **Clempus, R.E. and K.K. Griendling**, Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 2006. 71(2): p. 216-25.
192. **Droge, W.**, Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002. 82(1): p. 47-95.
193. **Amberg, G.C., S. Earley, and S.A. Glapa**, Local regulation of arterial L-type calcium channels by reactive oxygen species. *Circulation research*. 107(8): p. 1002-10.
194. **Schnackenberg, C.G., W.J. Welch, and C.S. Wilcox**, TP receptor-mediated vasoconstriction in microperfused afferent arterioles: roles of O₂(-) and NO. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. 279(2): p. F302-8.
195. **Lounsbury, K.M., Q. Hu, and R.C. Ziegelstein**, Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free radical biology & medicine*, 2000. 28(9): p. 1362-9.
196. **Tabet, F., et al.**, Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004. 44(2): p. 200-8.
197. **Gao, Y.J. and R.M. Lee**, Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *Br J Pharmacol*, 2005. 146(8): p. 1061-8.
198. **Yang, Z.W., et al.**, Hydrogen peroxide induces contraction and raises [Ca²⁺]_i in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1999. 360(6): p. 646-53.
199. **Chaplin, N.L. and G.C. Amberg**, Hydrogen peroxide mediates oxidant-dependent stimulation of arterial smooth muscle L-type calcium channels. *American journal of physiology Cell physiology*. 302(9): p. C1382-93.
200. **Katusic, Z.S., et al.**, Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery. *Am J Physiol*, 1993. 264(3 Pt 2): p. H859-64.
201. **Miller, A.A., et al.**, NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circ Res*, 2005. 97(10): p. 1055-62.

202. **Hubel, C.A., S.T. Davidge, and M.K. McLaughlin**, Lipid hydroperoxides potentiate mesenteric artery vasoconstrictor responses. *Free Radic Biol Med*, 1993. 14(4): p. 397-407.
203. **Earley, S., S.V. Straub, and J.E. Brayden**, Protein kinase C regulates vascular myogenic tone through activation of TRPM4. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2007. 292(6): p. H2613-22.
204. **Bonev, A.D., et al.**, Activators of protein kinase C decrease Ca²⁺ spark frequency in smooth muscle cells from cerebral arteries. *The American journal of physiology*, 1997. 273(6 Pt 1): p. C2090-5.
205. **Grover, A.K. and S.E. Samson**, Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. *Am J Physiol*, 1988. 255(3 Pt 1): p. C297-303.
206. **Suzuki, Y.J. and G.D. Ford**, Superoxide stimulates IP₃-induced Ca²⁺ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology*, 1992. 262(1 Pt 2): p. H114-6.
207. **Kitazawa, T., et al.**, Reconstitution of protein kinase C-induced contractile Ca²⁺ sensitization in triton X-100-demembrated rabbit arterial smooth muscle. *The Journal of physiology*, 1999. 520 Pt 1: p. 139-52.
208. **Matoba, T., et al.**, Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *The Journal of clinical investigation*, 2000. 106(12): p. 1521-30.
209. **Mohazzab, H.K., R.P. Fayngersh, and M.S. Wolin**, Nitric oxide inhibits pulmonary artery catalase and H₂O₂-associated relaxation. *Am J Physiol*, 1996. 271(5 Pt 2): p. H1900-6.
210. **Sasser, J.M., et al.**, Reduced NOS3 phosphorylation mediates reduced NO/cGMP signaling in mesenteric arteries of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*, 2004. 43(5): p. 1080-5.
211. **Alvarez, Y., et al.**, Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol*, 2008. 153(5): p. 926-35.
212. **Hamilton, C.A., et al.**, NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*, 2002. 40(5): p. 755-62.
213. **Westhoff, T.H., et al.**, A physiogenomic approach to study the regulation of blood pressure. *Physiol Genomics*, 2005. 23(1): p. 46-53.

214. **Matoba, T., et al.**, Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(7): p. 1224-30.
215. **Arimura, K., et al.**, Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(1): p. H68-75.
216. **Jung, O., et al.**, gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation*, 2004. 109(14): p. 1795-801.
217. **Dayal, S., et al.**, Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke*, 2004. 35(8): p. 1957-62.
218. **Morikawa, K., et al.**, Important role of superoxide dismutase in EDHF-mediated responses of human mesenteric arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004. 44(5): p. 552-6.
219. **Burgoyne, J.R., et al.**, Cysteine redox sensor in PKG α enables oxidant-induced activation. *Science*, 2007. 317(5843): p. 1393-7.
220. **Chabrashvili, T., et al.**, Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 285(1): p. R117-24.
221. **Touyz, R.M., et al.**, Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*, 2002. 90(11): p. 1205-13.
222. **Bleeke, T., et al.**, Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. *Circ Res*, 2004. 94(1): p. 37-45.
223. **Zalba, G., et al.**, Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2000. 35(5): p. 1055-61.
224. **Bevan, J.A.**, Some bases of differences in vascular response to sympathetic activity. *Circulation research*, 1979. 45(2): p. 161-71.
225. **Knot, H.J., et al.**, Gender differences in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial Ca $^{2+}$ and eNOS activity. *Am J Physiol*, 1999. 276(3 Pt 2): p. H961-9.

226. **Crews, J.K., J.G. Murphy, and R.A. Khalil**, Gender differences in Ca(2+) entry mechanisms of vasoconstriction in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1999. 34(4 Pt 2): p. 931-6.
227. **Murphy, J.G. and R.A. Khalil**, Gender-specific reduction in contractility and [Ca(2+)](i) in vascular smooth muscle cells of female rat. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. 278(4): p. C834-44.
228. **Collins, P., et al.**, 17 beta-Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation*, 1995. 92(1): p. 24-30.
229. **Johnson, B.D., et al.**, Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol*, 1997. 110(2): p. 135-40.
230. **Nakajima, T., et al.**, 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca2+ currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 1995. 294(2-3): p. 625-35.
231. **Darkow, D.J., L. Lu, and R.E. White**, Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *Am J Physiol*, 1997. 272(6 Pt 2): p. H2765-73.
232. **Rahimian, R., et al.**, Estrogen and selective estrogen receptor modulator LY117018 enhance release of nitric oxide in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. 283(1): p. 116-22.
233. **Laufs, U., et al.**, Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem*, 2003. 278(8): p. 5956-62.
234. **Wassmann, K., S. Wassmann, and G. Nickenig**, Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res*, 2005. 97(10): p. 1046-54.

IV. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

V. Lebenslauf

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