

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. G. Steinbeck**

**Interaktion des ACE-Hemmers Quinaprilat
mit Endothelin und oxidativem Stress –
Untersuchungen *in vitro* und *in vivo***

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von Silke Unterlinner (geb. Steinhauff)
aus Wilhelmshaven
2003**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. W. von Scheidt

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Fichtl
Prof. Dr. F. Krombach**

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. M. Weis**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Mai 2003

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. ACE-Inhibitoren: Entwicklung und Anwendungsgebiete..	1
1.2. Das Renin-Angiotensin-System (RAS)	2
1.2.1. Komponenten des RAS	2
1.2.2. Lokale RAS	5
1.3. ACE-Hemmung: Bedeutung für Endothelfunktion und Atherogenese	6
1.3.1. Das Endothel	6
1.3.2. Endotheldysfunktion und Atherosklerose	7
1.3.3. Endotheliale Wirkmechanismen von ACE-Inhibitoren	10
1.4. Antioxidative Wirksamkeit	12
1.4.1. Vaskulärer Oxidativer Stress	12
1.4.2. Antioxidatives Potential von ACE-Inhibitoren	16
1.4.3. Glutathion	17
1.4.4. Nitrotyrosin	20
1.5. Interaktion des RAS mit dem Endothelinsystem	21
1.6. Herztransplantation und Transplantatvaskulopathie	24
1.7. Studienziel und Hypothese	27
2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	29
2.1. Geräte	29
2.2. Patientenstudie	30
2.2.1. Patienten	30
2.2.2. Blutproben: Gewinnung und Verarbeitung	30
2.2.3. Enzymatischer Assay zur Bestimmung von Gesamtglutathion	31
2.2.4. HPLC-Methode zur Bestimmung von GSH und GSSG	33

2.2.5.	Bestimmung von Endothelin-1	34
2.2.6.	Bestimmung von 3-Nitrotyrosin	35
2.2.7.	<i>In vitro</i> Test zum akuten Effekt von Quinaprilat auf GSH-Blutspiegel	36
2.3.	Zellkulturversuche	38
2.3.1.	Endothelzellprimärkultur aus Schweineaorten (PAEC)	38
2.3.2.	Zellkultur zur Bestimmung des sezernierten Endothelins	39
2.3.3.	Kultivierung einer Zelllinie humaner mikrovaskulärer Zellen (HMEC-1)	40
2.3.4.	Bestimmung der NO-Freisetzung von PAEC	41
2.3.5.	Endotheliale Endothelinproduktion	41
2.3.5.1.	ELISA	41
2.3.5.2.	RIA	42
2.3.6.	Bestimmung des intrazellulären Glutathiongehaltes in PAEC	43
2.3.7.	Endotheliale ROS-Bildung	44
2.3.7.1.	Cytochrom C/SOD-Assay	44
2.3.7.2.	DCF-Fluoreszenz	45
2.3.8.	Proteinbestimmung	46
2.4.	Statistische Auswertung	46
3.	ERGEBNISSE	47
3.1.	Patientenstudie	47
3.1.1.	Koronare Vasomotion	48
3.1.2.	Interaktion von Quinaprilat mit vaskulärem Glutathion	52
3.1.2.1.	Ergebnisse der Patientenstudie	52
3.1.2.2.	<i>In vitro</i> Test in Vollblut zum akuten Effekt von Quinaprilat auf GSH.....	55
3.1.3.	Akute Effekte von Quinaprilat auf koronare Endothelinspiegel	57

3.1.4.	Akute Effekte von Quinaprilat auf koronare 3-Nitrotyrosinspiegel	59
3.2.	Zellkultur	60
3.2.1.	Direkte Messung der NO-Freisetzung von PAEC mit DAF- 2	60
3.2.2.	Effekte von Quinaprilat auf die endotheliale Endothelinfreisetzung	62
3.2.3.	Effekte von Quinaprilat auf endotheliale Glutathionspiegel	71
3.2.4.	Antioxidative Effekte von Quinaprilat	74
3.2.4.1.	Bestimmung der Superoxidationproduktion im Cytochrom C-Assay	74
3.2.4.2.	Bestimmung der ROS-Produktion mit DCF-Fluoreszenz	74
4.	DISKUSSION	81
4.1.	Akute Wirkungen von Quinaprilat <i>in vivo</i>	81
4.2.	Endothelspezifische Effekte von Quinaprilat <i>in vitro</i>	92
4.3.	Schlussfolgerung	97
5.	ZUSAMMENFASSUNG	98
6.	VERZEICHNISSE	102
6.1.	Abbildungsverzeichnis	102
6.2.	Tabellenverzeichnis	103
6.3.	Abkürzungsverzeichnis	104
7.	LITERATUR	105

1. EINLEITUNG

1.1. ACE-Inhibitoren: Entwicklung und Anwendungsgebiete

Die Geschichte der Arzneistoffklasse der ACE-Inhibitoren beginnt mit der Beobachtung der blutdrucksenkenden Begleiteffekte peptidartiger Schlangengifte (*Roth HJ et al, 1988*). Als Wirkmechanismus konnte die Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE, E.C.3.4.15.1) ermittelt werden (*Ferreira SH, 1985*). Dieses Enzym katalysiert nicht nur die Bildung des vasokonstriktorischen Octapeptids Angiotensin II durch Abspaltung des C-terminalen Dipeptids His-Leu aus dem inaktiven Vorläufermolekül Angiotensin I, sondern ebenso den Abbau des vasodilatierenden Nonapeptids Bradykinin:

ACE und Kininase II sind identisch (*Erdös EG et al, 1962*).

Als erster oral wirksamer, kompetitiver ACE-Hemmstoff wurde 1977 Captopril entwickelt (*Cushman DW et al, 1977*). Es handelt sich um ein Dipeptid-Analogon der C-terminalen Angiotensin I-Sequenz, welches als strukturelle Besonderheit eine freie SH-Gruppe aufweist, die sich jedoch für die Affinität zum Zink-Kation im aktiven Zentrum des Konversionsenzyms als nicht essentiell erwies. Nachfolgend entwickelte Wirkstoffe gehören wie das 1984 eingeführte Tripeptid Enalapril zu den dicarboxylhaltigen ACE-Inhibitoren. Den ACE-Hemmern der zweiten Generation (Perindopril, Ramipril, Quinapril, Benazepril, Cilazapril, Trandolapril) ist dabei außerdem ein bicyclisches Ringsystem anstelle des Pyrrolidinringes der Aminosäure Prolin gemeinsam. Eine strukturelle Ausnahme bildet Fosinopril, ein Phosphinsäureester.

Um eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit zu erzielen, werden viele ACE-Hemmer als Prodrugs (Ester) eingesetzt, so auch Quinapril, das in der Leber vollständig zum aktiven Metaboliten Quinaprilat hydrolysiert wird.

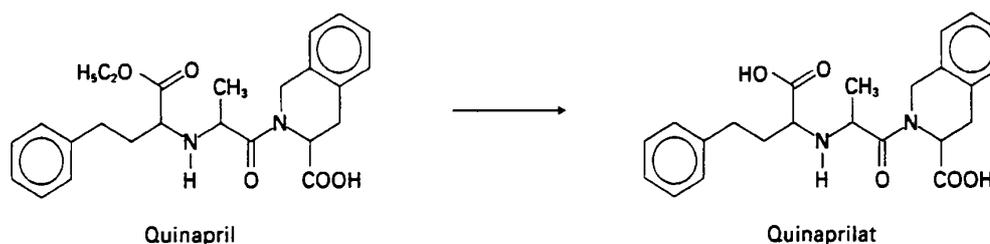


Abb.1.1.a: Strukturformel von Quinapril

ACE Inhibitoren unterscheiden sich aufgrund ihrer chemischen Struktur hinsichtlich ihrer Wirkstärke, Bioverfügbarkeit, Plasmahalbwertszeit und Eliminationswege, sowie insbesondere ihrer Verteilung im Gewebe (*Keilani T et al, 1995*) und ihrer Affinität zum Gewebe-ACE (*Brown N et al, 1998*). In diesem Zusammenhang können sich substanzspezifische Effekte ergeben.

Über die Indikation Hypertonie hinaus haben sich ACE-Inhibitoren aufgrund umfassender klinischer Studien in der Therapie der Herzinsuffizienz, der linksventrikulären Dysfunktion und nach Myokardinfarkt etabliert (*Givertz M, Circulation 2001*). Die klinische Relevanz vasoprotektiver Mechanismen, wie sie derzeit im Mittelpunkt experimenteller Forschung stehen, konnte in ersten Patientenstudien bestätigt werden (*Schölkens BA, 2001*).

In der HOPE-Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation) wurde die Auswirkung des ACE-Hemmers Ramipril (*Yusuf S et al, 2000*) auf kardiovaskuläre Ereignisse bei atherosklerotischen Risikopatienten ohne Anzeichen einer Herzinsuffizienz untersucht (9297 Patienten, 5 Jahre durchschnittliche Therapiedauer; Ramipril 10 mg/d). Das Risiko für kardiovaskuläre Todesfälle, Myokardinfarkt und Schlaganfälle gegenüber Plazebo nahm dabei - unabhängig von einem blutdrucksenkenden Effekt - signifikant ab.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind spezifische endothelprotektive und antiatherosklerotische Effekte des ACE-Hemmers Quinaprilat.

1.2. Das Renin-Angiotensin-System

Grundlage der ACE-Hemmer-Wirkung ist zunächst der Eingriff in das Renin-Angiotensin- System (RAS).

1.2.1. Komponenten des RAS

Das Renin-Angiotensin-System dient der Regulation des Blutdrucks, sowie der Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolytgleichgewichtes.

Druckabfall im Vas afferens, erhöhter Natriumverlust und β -adrenerge Stimulation führen zur regulierten Freisetzung der Protease *Renin* aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere. Renin spaltet aus dem in der Leber

gebildeten und im Plasma zirkulierenden α 2-Globulin *Angiotensinogen* das inaktive Dekapeptid *Angiotensin I* ab, welches anschließend durch das Konversionsenzym (ACE) in das aktive *Angiotensin II* umgewandelt wird. Weniger als 10% des gesamten ACE-Bestandes des Organismus zirkuliert (*Cushman DW et al, 1971*). Bestimmend für die Angiotensin II-Bildung ist die Aktivität des membrangebundenen ACE (Gewebe-ACE), wie es unter physiologischen Bedingungen auf der luminalen Endothelzelloberfläche im gesamten Gefäßsystem in unterschiedlicher Konzentration (mikrovaskulär höher als in großen Gefäßen) vorkommt (*Johnston CI et al, 1992*).

Für das RAS existieren diverse pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten:

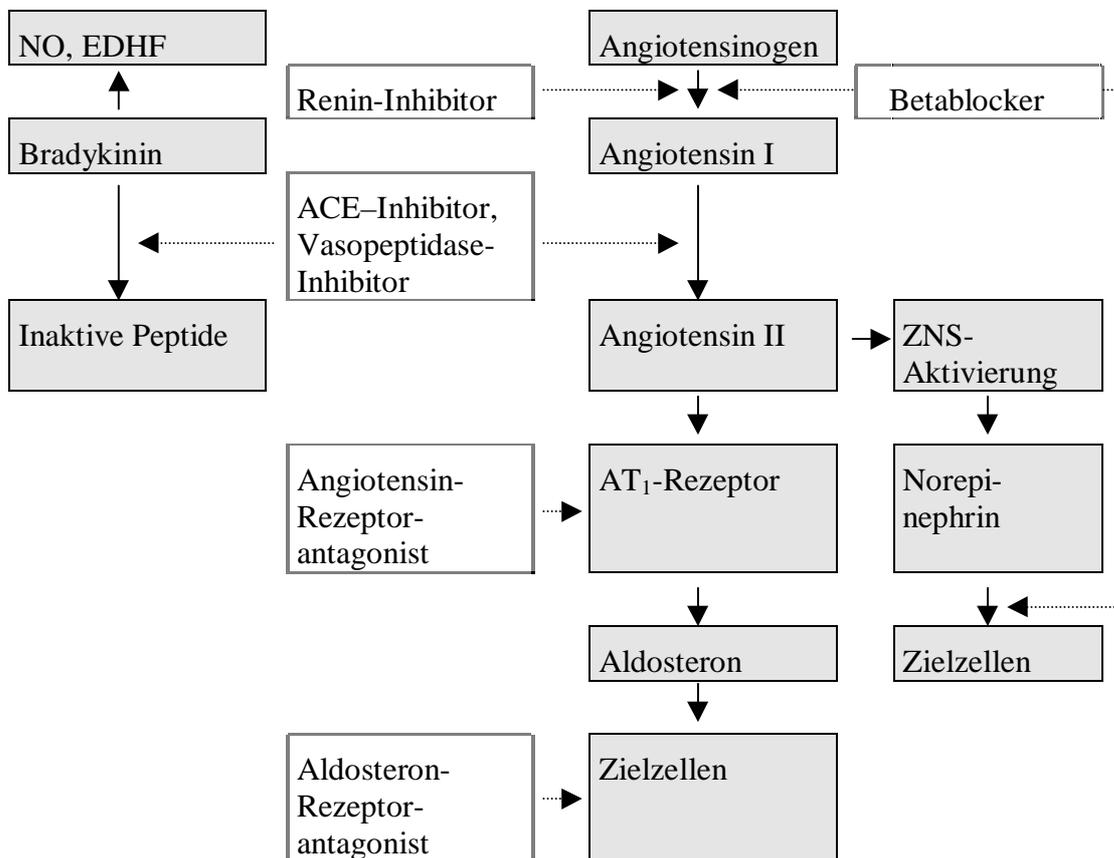


Abb.1.2.a: Pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten in das RAS nach *Givertz M., 2001*

Für Angiotensin II sind vielfältige Wirkungen bekannt:

Zelle, Gewebe, Organ	Rezeptortyp	Signaltransduktionsweg	Akute Wirkung	Chronische Wirkung
Glatte Gefäßmuskulatur, Arteriolen	AT ₁	PLC	Kontraktion**, Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes, Blutdrucksteigerung	Proliferation von VSMC***; Hypertrophie und Hyperplasie
Nieren	AT ₁	PLC	Verm. Durchblutung, aber erhöhte GFR durch überwiegende Konstriktion des Vas efferens**	
	AT ₁	AC	Erhöhung der Na ⁺ -Reabsorption und H ⁺ -Sekretion im proximalen Tubulus	Hypervolämie
Nebennierenrinde (Zona glomerulosa)	AT ₁ (und AT ₂)*	PLC	Erhöhung der Aldosteronsynthese und -freisetzung***	Hypervolämie, Blutdrucksteigerung
Nebennierenmark	AT ₁ (und AT ₂)*	PLC	Erhöhung der Adrenalinfreisetzung**	
Symph. Nervenendigungen	AT ₁	PLC	Erleichterung der Noradrenalinfreisetzung**	
Herz	AT ₁	PLC		Hypertrophie (***?)
Hypophysenhinterlappen	AT ₁	PLC	Vasopressin/ADH-Freisetzung**	
Hypothalamus	AT ₁ (und AT ₂)*	PLC	Durst	

Tab.1.2.a: Wichtige Angiotensin II vermittelte Wirkungen (nach Förstermann U, 2000)
 *Alle beschriebenen Wirkungen sind AT₁-Rezeptor vermittelt, die funktionelle Bedeutung der AT₂-Bindungsstellen ist unklar;
 ** vermittelt durch IP₃ (=Inositol-1,4,5-triphosphat)
 *** vermittelt durch DAG (=1,2-Diacylglycerol)
 PLC: Aktivierung der Phospholipase C
 AC: Hemmung der Adenylylcyclase
 GFR: Glomeruläre Filtrationsrate

1.2.2. Lokale RAS

Extrinsische, d.h. von zirkulierenden Komponenten wie Renin abhängige, sowie komplette intrinsische, lokal wirksame Renin-Angiotensin-Systeme lassen sich insbesondere im kardiovaskulären (Gefäße, Herz), wie auch im renalen System (Niere, Nebenniere) nachweisen.

Gewebe-ACE ist beteiligt an der regionalen Blutflußregulation, Modulation der lokalen sympathischen Aktivierung, sowie an komplexen Mechanismen der Stimulation von Hypertrophie und Hyperplasie (*Johnston CI et al, 1992*).

Während das renal/hepatische, endokrine RAS vorwiegend für die Vermittlung akuter Effekte verantwortlich ist, sind lokale parakrin/autokrin wirksame RAS in chronische, insbesondere in pathogenetische Prozesse einbezogen (*Lee A.E., 1992*). Eine Akkumulation von gewebeständigem ACE findet sich in Regionen atherosklerotischer Plaques, insbesondere in Makrophagen und auf mikrovaskulären Endothelzellen (*Diet F et al, 1996*).

Experimentell wurden lokal erhöhte ACE-Konzentrationen (ohne Erhöhung der Plasmakonzentration) bei Hypertonie, linksventrikulärer Hypertrophie und nach Endothelschädigung nachgewiesen (*Johnston CI et al, 1992*).

Hemmung des Gewebe-ACE kann somit von entscheidender Bedeutung für die spezifische Wirkung einzelner ACE-Inhibitoren sein.

Bindungsstudien (*Fabris B et al, 1989*) ergaben beispielsweise folgende Reihenfolge der Affinität (*Dzau VJ et al, 2001*):

Quinaprilat = Benazaprilat > Ramiprilat > Perindoprilat > Lisinopril > Enalaprilat > Fosinopril > Captopril

Hinweise für die klinische Relevanz dieser Unterschiede geben insbesondere die BANFF Studie (Brachial Artery Ultrasound Normalization of Forearm Flow, *Anderson TJ et al, 1999*) sowie die Vorstudie zu QUO VADIS (Effect of Quinapril On Vascular ACE and Determinants of Ischaemia, *Oosterga M et al, 2000*):

BANFF Studie : Bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit verbesserte nur die Therapie mit Quinapril, nicht aber Enalapril (8 Wochen, n = 80; Quinapril 20 mg/d, Enalapril 10 mg/d) die flußabhängige Vasodilatation signifikant.

QUO VADIS: Bei Patienten, die vor einer Bypass Operation mit Quinapril, Captopril oder Plazebo behandelt wurden (27 Tage, n = 187; Quinapril 40 mg/d, Captopril 50 mg/d), führte nur Quinapril zu einer signifikanten Hemmung der Angiotensin II-Bildung arterieller Segmente.

Auf die Bedeutung des Gewebe-ACE für Endothelfunktion, Inflammation und Atherogenese wird im folgenden Kapitel näher eingegangen. Für die Ermittlung solcher Effekte ist wesentlich, daß Zellkulturmodelle die Möglichkeit bieten, lokale RAS unabhängig von zirkulierenden Komponenten spezifisch zu untersuchen (*Lee MAE et al, 1992*).

1.3. ACE-Hemmung: Bedeutung für Endothelfunktion und Atherogenese

1.3.1. Das Endothel

Ein Monolayer von über 10^{12} Endothelzellen mit einer Gesamtoberfläche von über 1000 m^2 bildet als innere Schicht die strukturelle Basis des Blutgefäßsystems (*Augustin HG et al, 1994*). Das Gefäßendothel stellt nicht nur eine physikalische Permeabilitätsbarriere dar. Vielmehr sezerniert es eine Vielzahl parakriner und autokriner Mediatoren zur Regulation von Tonus und Permeabilität, aber auch von Wachstums- und Remodelingprozessen der Gefäßwand. Ebenso von Bedeutung sind antithrombogene und antiinflammatorische Eigenschaften, sowie die Funktion von Endothelzellen als antigenpräsentierende Zellen .

Intrinsische Determinierung (embryonaler Ursprung), überwiegend aber die Mikroumgebung (hämodynamische Faktoren, Zell-Zell Interaktionen) bedingen dabei eine Heterogenität (z.B. der Blutflußregulation) zwischen arteriellem und venösem Endothel, Leitungs- und Widerstandsgefäßen, aber auch segmentale Unterschiede innerhalb der Widerstandsgefäße eines Gefäßbettes (z.B. unterschiedliche Kapazität zur NO-Freisetzung) (*Boegehold MA, 1998*).

Grundsätzlich sind folgende endotheliale Funktionen mit den dafür verantwortlichen Mediatoren von Bedeutung:

Funktion	Mediatoren
vasodilatierend	NO, PGI ₂ , EDHF, BK, Adrenomedullin, CNP
vasokonstriktorisch	ET-1, AT II, TXA ₂ , PGH ₂ , ROS
antiproliferativ	NO, PGI ₂ , TGF-β, Heparinsulfat
proliferativ	ET-1, AT II, ROS, PDGF, bFGF, IGF, Interleukine
antithrombotisch	NO, PGI ₂ , t-PA, Protein C, TFPI, vWF
prothrombotisch	ET-1, ROS, PAI, TXA ₂ , Fibrinogen, TF
inflammatorisch	Adhäsionsmoleküle (P- und E-Selektin, ICAM, VCAM), Chemokine, NFκB
permeabilitätskontrollierend	RAGE
angiogenetisch	VEGF

Tab 1.3.1.a: Endothelfunktion (nach Verma S, 2002)

Insgesamt wird die Gefäßhomöostase wesentlich bestimmt von einem kritischen Gleichgewicht endothelialer „relaxing factors“ (EDRF) - d.h. insbesondere NO - und „contracting factors“ (wie Angiotensin II, Endothelin-1).

1.3.2. Endotheldysfunktion und Atherosklerose

Eine Schädigung des Endothels und eine daraus resultierende endotheliale Dysfunktion geht als initiiertes Ereignis nachweisbaren atherosklerotischen Veränderungen voraus. Die Endotheldysfunktion zeigt einen progredienten Verlauf und hat entscheidende Bedeutung für akute ischämische Manifestationen der Koronaren Herzkrankheit (Schächinger V et al, 2000).

Genetische, umwelt- und verhaltensbedingte Risikofaktoren für die Entstehung einer Endotheldysfunktion und einer atherosklerotischen Erkrankung sind Hypercholesterinämie, Hypertonie, Alter, Diabetes, Rauchen, Ischämie-Reperfusion u.a. Wesentliches, gemeinsames Merkmal ist das Auftreten von erhöhtem oxidativen Stress (vgl 1.4.1).

Der Begriff Endotheldysfunktion bezeichnet eine eingeschränkte, endothel-abhängige Vasodilatation, aber auch eine (durch Zytokine/ROS vermittelte) Endothelaktivierung, d.h. die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, sowie eine erhöhte Permeabilität. Daraus resultiert eine vermehrte

Adhäsion und Einwanderung von Leukocyten und Monocyten in den subendothelialen Raum, ebenso wie eine erhöhte Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen (VSMC). All diese Prozesse sind zugleich Bestandteile der Entstehung von Atherosklerose (*Enseleit F et al, 2001*).

Die Bedeutung der einzelnen an einer koronaren Endotheldysfunktion beteiligten Mechanismen ist zur Zeit noch nicht geklärt.

Schlüsselfaktor ist jedoch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO, der folgende Ursachen zugrunde liegen können (*Drexler H, 1999*):

- 1) Verminderte NO-Synthese durch
 - a) verminderte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS)
 - b) dysfunktionelle NOS (vgl 1.4.1)
- 2) Störungen der rezeptorvermittelten NO-Freisetzung/Signaltransduktion
- 3) Inaktivierung von NO durch ROS (vgl 1.4.1)

Im gesunden Zustand weisen sowohl epikardiale als auch mikrovaskuläre Koronargefäße eine basale NO-Freisetzung als entscheidende vasodilatierende Komponente des Ruhetonus sowie zum Erhalt antiadhäsiver, antiaggregatorischer und antiproliferatorischer Bedingungen auf.

Flußabhängig (durch erhöhten shear stress) oder rezeptorvermittelt (durch Acetylcholin, Bradykinin, Catecholamine oder Plättchenmediatoren wie Serotonin, Thrombin und ADP) bzw. durch chemische Veränderungen (Hypoxie, pH Wert- Abfall), kommt es durch Aktivierung der eNOS zu einer gesteigerten NO-Freisetzung und somit bedarfsgerechter Blutflußregulation (*Drexler H, 1999*).

Vasomotionsstudien zeigen eine progressive Verschlechterung dieser Funktionen, beginnend mit einer verminderten Acetylcholinantwort und anschließend auftretender Beeinträchtigung der flußabhängigen Dilatation (*Zeiger A M et al, 1991*).

Eine eingeschränkte Endothelfunktion bedeutet nicht nur eine Progression atherosklerotischer Gefäßveränderungen, sondern auch ein erhöhtes Risiko für akute, koronare Ereignisse: Vasokonstriktoren wirken direkt auf glatte

Muskelzellen und werden nicht durch EDRF kompensiert. Eine paradoxe Konstriktion kann dann bei bereits vorliegenden Stenosen (50-70%) eine Myokardischämie auslösen. Zusätzlich führt ein dysfunktionelles, aktiviertes Endothel zu erhöhter Plaqueinstabilität bis hin zur Plaqueruptur (*Verma S et al, 2002*).

Zur Ermittlung und Quantifizierung der koronaren Endothelfunktion wird die endothelabhängige Dilatation nach Infusion von Acetylcholin (oder anderer Testsubstanzen) untersucht. Die epikardiale Vasomotion kann mittels quantitativer Koronarangiographie, die Reaktion der Widerstandsgefäße durch Flußmessung mittels Dopplerdraht gemessen werden. Eine mikrovaskuläre Endotheldysfunktion kann so auch ohne erkennbare morphologische Veränderungen diagnostiziert werden (*Zeher AM et al, 1991*).

Die prognostische Relevanz dieser Untersuchungen konnte inzwischen durch klinische Studien (*Schächinger V et al, 2000*) belegt werden:

Eine koronare, vasomotorische Endotheldysfunktion ist ein unabhängiger Prädiktor für das Fortschreiten einer atherosklerotischen Erkrankung und korreliert mit dem Risiko für das Eintreten kardiovaskulärer Ereignisse.

Eine pharmakologische Möglichkeit zur Verbesserung der Endothelfunktion bietet die Hemmung des Gewebe-ACE (*Anderson TJ, 1999*).

In der TREND Studie (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction, *Mancini GBJ et al, 1996*) konnte gezeigt werden, daß die orale Gabe des ACE-Hemmers Quinapril (6 Monate, n = 129, 40 mg/d) bei Patienten mit koronarer Atherosklerose ohne Hypertonie, Hyperlipidämie und ohne Anzeichen einer Herzinsuffizienz die koronare Endothelfunktion signifikant verbessert.

1.3.3. Endotheliale Wirkmechanismen von ACE-Inhibitoren

ACE-Hemmer zeichnen sich wie bereits unter 1.1 einleitend erwähnt durch ein duales Wirkprinzip aus:

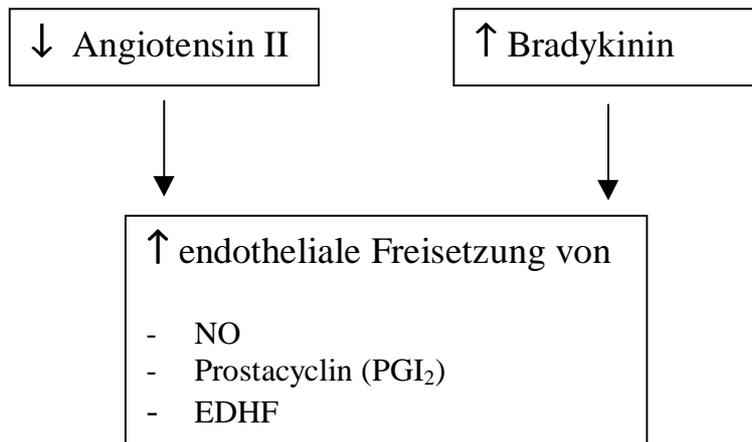


Abb.1.3.3.a: Duales Wirkprinzip der ACE-Hemmung

Gehemmt werden die Bildung von Angiotensin II (AT II) und der Abbau von Bradykinin (Curzen N, 1997). Zusätzlich besteht eine direkte Interaktion der ACE-Hemmer mit dem B₂-Kininrezeptor, wodurch dessen schnelle Desensitivierung und Internalisierung bei hohen Bradykininkonzentrationen verhindert wird (Benzig T et al, 1999). Die Bioverfügbarkeit, Wirkdauer und -intensität von Bradykinin werden somit erhöht.

Beide Komponenten sind für die Gesamtwirkung auf Endothelfunktion und kardiovaskuläres System von Bedeutung:

Angiotensin II:

AT II ist nicht nur ein starker Vasokonstriktor. AT II induziert die Expression einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren (PDGF, bFGF, TGF- β , IGF-I), Cytokinen (IL-6, IL-1, TNF α), Chemokinen (MCP-1, IL-8) und Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin) und vermittelt so Wachstum und Migration von glatten Muskelzellen und Fibroblasten, Differenzierung von Monocyten in Makrophagen und Adhäsion von Monocyten, Leukocyten und T-Lymphocyten. Darüber hinaus besitzt AT II apoptotische Effekte auf Endothelzellen, aktiviert

Matrixmetalloproteinasen und extrazelluläre Matrixproduktion und wirkt prokoagulatorisch (erhöhte Produktion von PAI-1) (Weiss D et al, 2001). Ein wesentlicher Aspekt des Wirkspektrums von Angiotensin ist schließlich die Aktivierung des Endothelinsystems (vgl.1.5).

Bradykinin:

Produktion und Abbau (vorwiegend durch ACE) bestimmen - angepaßt an den systemischen oder lokalen Bedarf - die plasmatische und vaskuläre Bradykininkonzentration. Über den B₂-Rezeptor führt Bradykinin zu endothelialer Freisetzung von vasodilatierenden Substanzen: NO, Prostacyclin und EDHF (Mombouli J-V et al, 1995).

Verschiedene bradykininvermittelte, vasodilatierende und antiatherogene Effekte von ACE-Hemmern können in Tierversuchen mit dem selektiven B₂-Rezeptorantagonisten HOE 140 (Icatibant) blockiert werden (Linz W, 1995).

NO:

Die zentrale Bedeutung von NO als endothelialer Mediator wurde unter 1.3.2. dargestellt.

Das RAS und NO stehen in einem komplex regulierten Gleichgewicht (Linz W et al, 1999): Expression und Aktivität von ACE werden durch NO/ cGMP vermindert, während Kinine und ACE-Inhibitoren die Expression und Aktivität der eNOS steigern können.

Interaktionen von RAS und NO können zudem über eine NO-Freisetzung durch AT (1-7) erfolgen, das als Metabolit von AT I bei einer Hemmung des ACE vermehrt gebildet wird (Chappel MC et al, 2000), sowie über die Wirkung von AT II am AT₂-Rezeptorsubtyp (v.a. bei AT₁-Rezeptor Blockade):

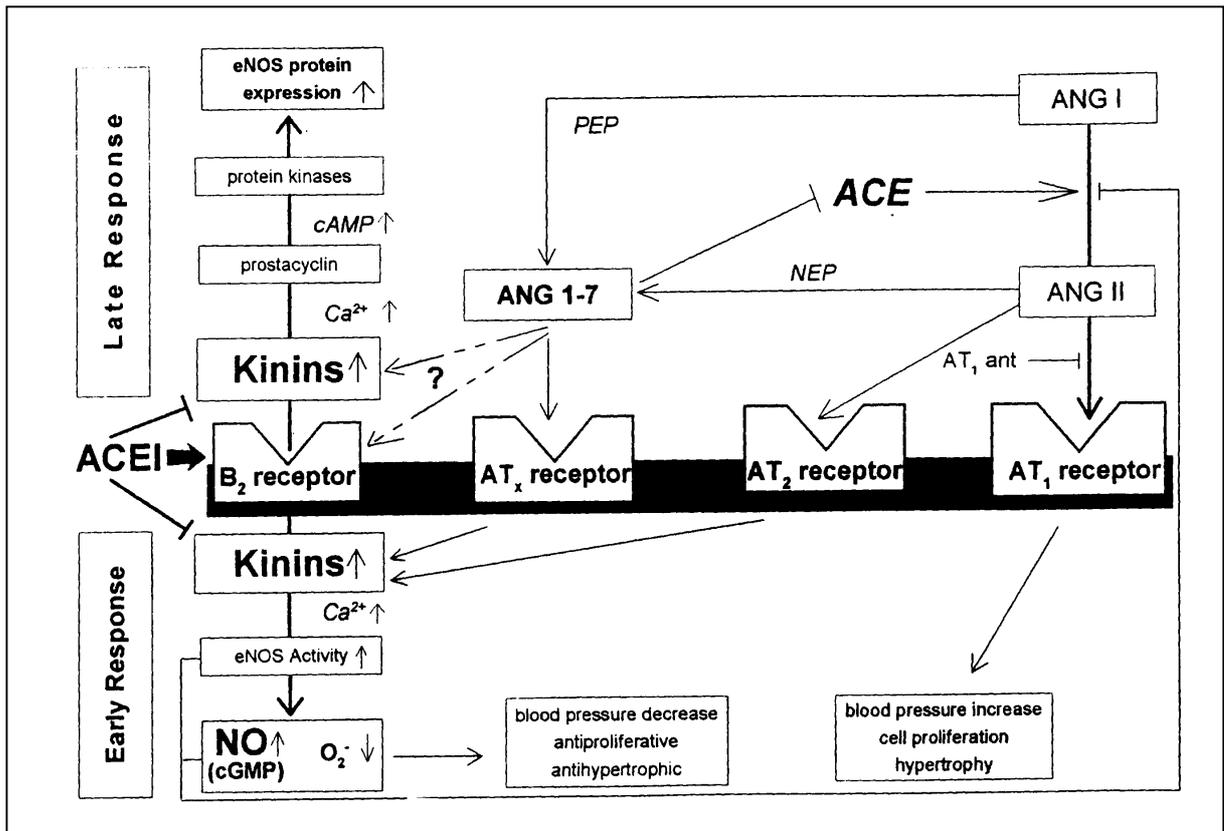


Abb.1.3.3.b: Interaktionen zwischen ACE, Kininen und NO (aus Linz W, 1999)

Ca_i²⁺: intrazelluläres Calcium

NEP: Neutrale Endopeptidase 3.4.24.11

PEP: Prolyl-Endopeptidase

AT₁ ant: Angiotensin 1-Rezeptorantagonist

ACEI: ACE-Inhibitor

Zusammengefaßt kann erwartet werden, daß ACE-Hemmer über hämodynamische Veränderungen einer Blutdrucksenkung hinaus komplexe vasoprotektive Effekte aufweisen. Die Bedeutung einer antioxidativen Wirksamkeit und Beeinflussung des Endothelinsystems soll im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.4. Antioxidative Wirksamkeit

1.4.1. Vaskulärer Oxidativer Stress

Eine übermäßige Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species - ROS), die durch endogene antioxidative Schutzmecha-

nismen nicht mehr kompensiert werden kann, wird als oxidativer Stress bezeichnet (*Cai H et al, 2000*).

Risikofaktoren (z.B.: Hypercholesterinämie, Diabetes) und kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B.: Atherosklerose) stehen in Zusammenhang mit erhöhtem oxidativen Stress.

ROS sind Radikale - wie Superoxidanionen (O_2^-) und Hydroxylradikale ($OH\cdot$) - oder andere Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peroxynitrit ($ONOO^-$). Während ROS in niedrigen Konzentrationen als Signalmoleküle fungieren, bewirken sie in hohen Konzentrationen Zellschädigung und Zelltod (*Lum H et al, 2001*).

Über radikalische und oxidative Kettenreaktionen entstehen weitere reaktive Zwischenprodukte (Bsp.: Lipidperoxidation in der Plasmamembran) und toxische Endprodukte (4-Hydroxynoneal, Malondialdehyd). Allgemein werden Schäden durch ROS durch die Oxidation biologischer Makromoleküle (Lipide, Proteine, Kohlenhydrate, DNA) hervorgerufen.

Besondere Bedeutung kommt den Oxidationsprodukten des LDL (OxLDL) zu (*Lusis AJ, 2000*):

- Aufnahme von OxLDL in Makrophagen über scavenger Rezeptoren und die Bildung von Schaumzellen ist ein initiales Ereignis der atherosklerotischen Plaqueentstehung.
- OxLDL (v.a. der Bestandteil Lysophosphatidylcholin) vermindert die rezeptorvermittelte NO-Freisetzung und aktiviert die Superoxidanionproduktion durch die endotheliale NAD(P)H-Oxidase.
- „Minimal oxidiertes“ LDL besitzt vielfache proinflammatorische Effekte.

Eine Hauptquelle für ROS sind aktivierte, am Endothel anhaftende Leukozyten (PMN), aber auch aktivierte Endothelzellen können eine gesteigerte ROS-Produktion aufweisen (*Lum H et al, 2001*).

Enzymatische Quellen für ROS in vaskulären Zellen (EC, VSMC) sind neben Enzymen der mitochondrialen Atmungskette vor allem Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsels (Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen, Cytochrom P450), die

Xanthinoxidase, NAD(P)H-Oxidasen und eine dysfunktionelle eNOS (*Cai H et al, 2000*).

Endotheliale NO- Synthase (eNOS):

Eine Produktion von O_2^- und $ONOO^-$ durch eNOS tritt bei Mangel an Tetrahydrobiopterin (BH_4) oder L-Arginin auf, jedoch sind die Ursachen *in vivo* noch nicht geklärt (*Cai H et al, 2000*).

Grundsätzlich erfolgt eine simultane Produktion von O_2^- und NO durch induzierbare NO-Synthasen (*Yong X et al, 1998*).

Endotheliale NAD(P)H-Oxidase:

Als wichtigste Quelle der Superoxidanionproduktion von Endothelzellen wird inzwischen eine NAD(P)H-Oxidase angesehen, deren Struktur in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt werden konnte, während die Aktivierungs- und Regulationswege bislang nur partiell bekannt sind. Eine weitere Isoform findet sich in glatten Muskelzellen (*Griendling KK et al, 2000*).

NAD(P)H-Oxidasen sind membrangebundene Enzyme, welche die Ein-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff mit NADH oder NADPH als Elektronendonator katalysieren:



Die entstehenden Superoxidanionen können (durch SOD) weiter zu H_2O_2 metabolisiert werden.

Die Kapazität vaskulärer NAD(P)H-Oxidasen beträgt ca. ein Drittel derjenigen von phagozytierenden Zellen. Endotheliale NAD(P)H-Oxidasen zeigen eine geringe konstitutive Aktivität und die Aktivierung erfolgt innerhalb von Minuten bis Stunden (bei Neutrophilen in Sekunden) (*Griendling KK et al, 2000*).

Ein Aktivator dieses Enzyms ist neben verschiedenen Cytokinen und anderen Faktoren v.a. Angiotensin II (*Warnholtz A et al, 1999*).

Viele atherogene Angiotensineffekte (vgl. 1.3.3.) werden über die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und redoxsensitiver Signalkaskaden (MAPK, SAPK AKT, NF κ B) ausgelöst (*Weiss D et al, 2001*).

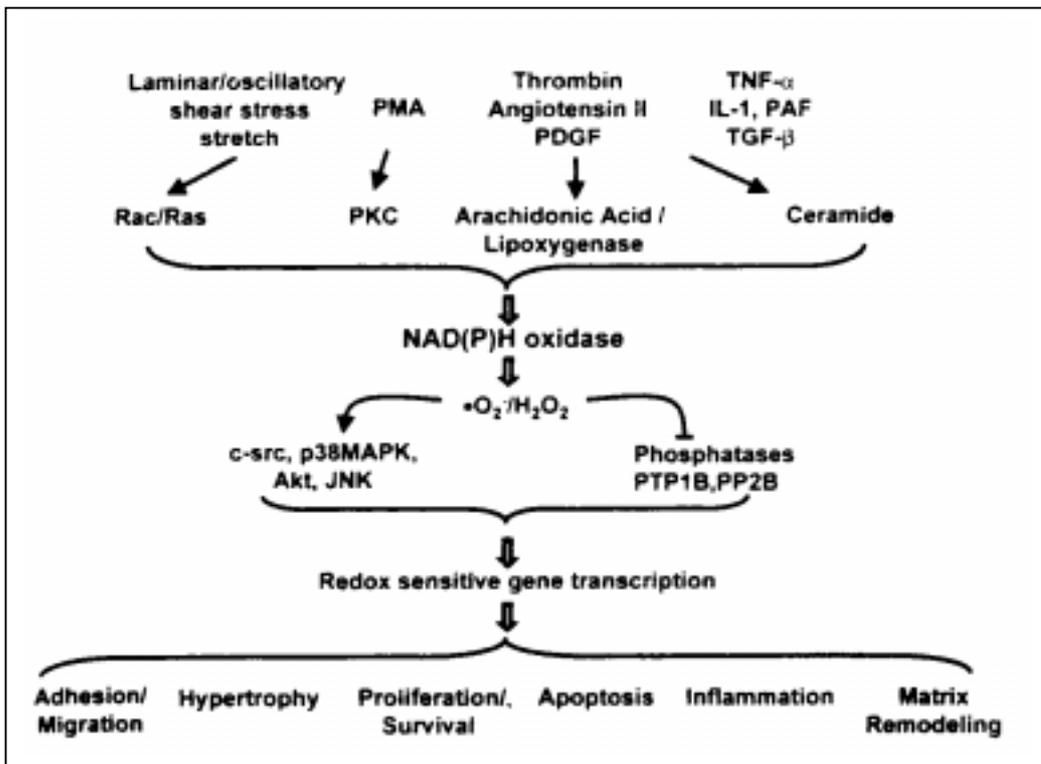


Abb.1.4.1.a: Modell der Aktivierung von NAD(P)H-Oxidase und der funktionellen Konsequenzen in kardiovaskulären Zellen (nach *Griendling KK et al, 2000*)

Eine erhöhte NAD(P)H-Oxidaseaktivität wurde im Tiermodell u.a. bei Hypertonie und Herzinsuffizienz (*Cai H et al, 2000*) gefunden.

Ebenso wurde eine Korrelation der vaskulären NAD(P)H-Oxidaseaktivität (gemessen in der Vena Saphena) mit dem Vorhandensein von Risikofaktoren für Koronare Herzkrankheit (Diabetes, Hypercholesterinämie) sowie einer bestehenden Endotheldysfunktion (*Guzik TJ et al, 2000*) gefunden.

Gravierende Folge der vermehrten ROS-Produktion für die Endothelfunktion ist eine deutliche Einschränkung der NO-Verfügbarkeit.

Die Reaktion von O_2^- mit NO erfolgt sehr schnell ($6,7 \times 10^9$ mol/lxs). Eine daraus resultierende, verminderte endothelabhängige Dilatation läßt sich experimentell durch Infusion antioxidativer Vitamine (*Cai H, 2000*) oder polyethylenglycolierter SOD (*Griendling KK et al, 2000*) aufheben.

Neben Peroxynitrit können durch Oxidation von NO weitere reaktive Stickstoffverbindungen (reactive nitrogen species-RNS) entstehen, die wiederum

als starke Oxidantien für Lipide und Proteine wirken (*Münzel T et al, 2001*).

Kontrollierte klinische Studien zum Einsatz von Antioxidantien bei atherosklerotischen Erkrankungen erbrachten bislang nur zum Teil positive Ergebnisse (*Irani K, Circulation Research 2000*).

1.4.2. Antioxidatives Potential von ACE-Inhibitoren

Experimentelle Modelle für Atherosklerose unterstützen die Annahme, daß ein aktiviertes (lokales) RAS mit einer gesteigerten Superoxidanionproduktion durch NAD(P)H-Oxidasen verbunden ist (*Münzel T et al, 2001*).

Wie unter 1.4.1. gezeigt, kann die Hemmung der Angiotensin II-Bildung zu einer verminderten NAD(P)H-Oxidaseaktivität und damit zu einer geringeren ROS Produktion führen. Die Bioverfügbarkeit von NO wird wiederhergestellt.

Gleichzeitig wirkt NO selber als Antioxidans. Folgende Mechanismen werden in der Literatur beschrieben:

- NO inhibiert effektiv die Lipidperoxidation (durch Kettenabbruchreaktion) in verschiedenen in vitro Systemen. Dies betrifft Membranlipide ebenso wie LDL (*O'Donnell VB, 2001*).

Studien zeigen eine signifikante Hemmung der LDL-Oxidation bei mehrwöchiger Einnahme eines ACE-Hemmers sowohl bei Patienten mit Hypertonie als auch bei Diabetes (*Rachmani R, 2000*).

- NO reagiert mit Superoxidanionen bei Überschuß von NO zum nicht-toxischen Endprodukt Nitrat und schützt Zellen vor toxischen Hydroperoxiden, indem NO hypervalente Metalloproteine abfängt.
- NO kann die Aktivierung der NADPH-Oxidase in Neutrophilen inhibieren (*Wink DA et al, 1999*).

Als ein Teilaspekt der antioxidativen Gesamtwirkung langfristiger ACE-Hemmer-Anwendung ist schließlich die zunächst im Tierversuch (*De Cavanagh E, 1997*) beobachtete Induktion antioxidativer Enzyme zu nennen.

Bei KHK-Patienten führte die Einnahme von Enalapril über 4 Wochen zu einer signifikanten Zunahme der endothelialen, extrazellulären SOD-Aktivität,

verbunden mit einer verbesserten flußabhängigen Vasodilatation (*Hornig B et al, 2001*).

Zusammengefaßt weisen ACE-Hemmer potentiell verschiedene effektive antioxidative Mechanismen auf, die wesentlicher Bestandteil für die bereits in klinischen Studien (HOPE, TREND) gefundenen protektiven Effekte sein können, aber auch weitere Einsatzmöglichkeiten (vgl. 2.6.) bieten.

1.4.3. Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein in biologischen Geweben ubiquitär vorkommendes Tripeptid aus γ -Glutamat, Cystein und Glycin mit einer intrazellulären Konzentration von bis zu 10 mM (*Meister A, 1988*). Oxidiertes Glutathion liegt als Disulfid vor (GSSG):

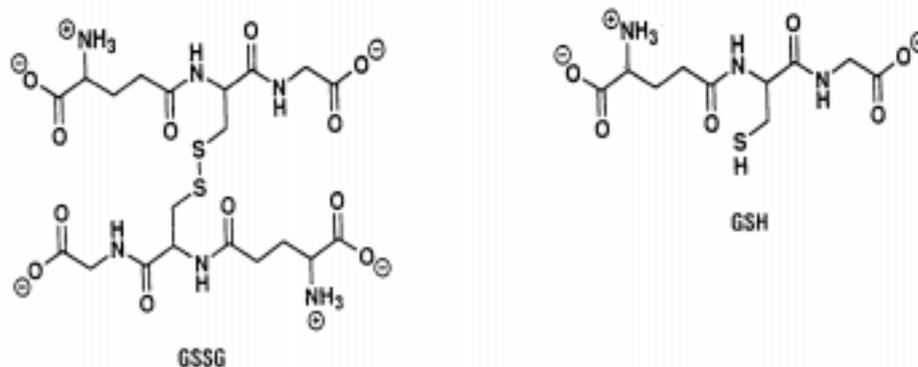


Abb. 1.4.3.a: Strukturformeln von GSH und GSSG (aus *Siems W et al, 1996*)

Die Glutathionsynthese verläuft intrazellulär in zwei Schritten (γ -Glutamylsynthetase, GSH-Synthetase). Der Abbau erfolgt extrazellulär, initial durch die γ -Glutamyl-Transpeptidase an der Außenseite der zellulären Plasmamembran.

Glutathion ist Cofaktor zahlreicher Enzyme.

Die Bildung von Glutathion S-Konjugaten (durch Glutathion S-Transferasen) ist wichtig für die Detoxifikation von Xenobiotika (Mercaptursäurebildung) und von verschiedenen Metaboliten, die bei oxidativem Stress gebildet werden (Bsp.: 4-Hydroxynoneal, Lipidhydroperoxide). Glutathion S-Transferase-Reaktionen

(Hayes JD et al, 1999) sind außerdem am Stoffwechsel und der Funktion von Arachidonsäurederivaten beteiligt.

Als reduziertes Thiol ist Glutathion ein wesentlicher Faktor für die Synthese ebenso wie für die Stabilität von NO (Wang W et al, 1998). Für Nitrosoglutathion (GSNO) wurde die Funktion als EDRF nachgewiesen (Ignarro LJ et al, 1981).

Wesentlich für die Bedeutung des Glutathionstatus als Parameter für oxidativen Stress sind jedoch die Redoxfunktionen von Glutathion. Eine Übersicht gibt Abb 1.4.3.b:

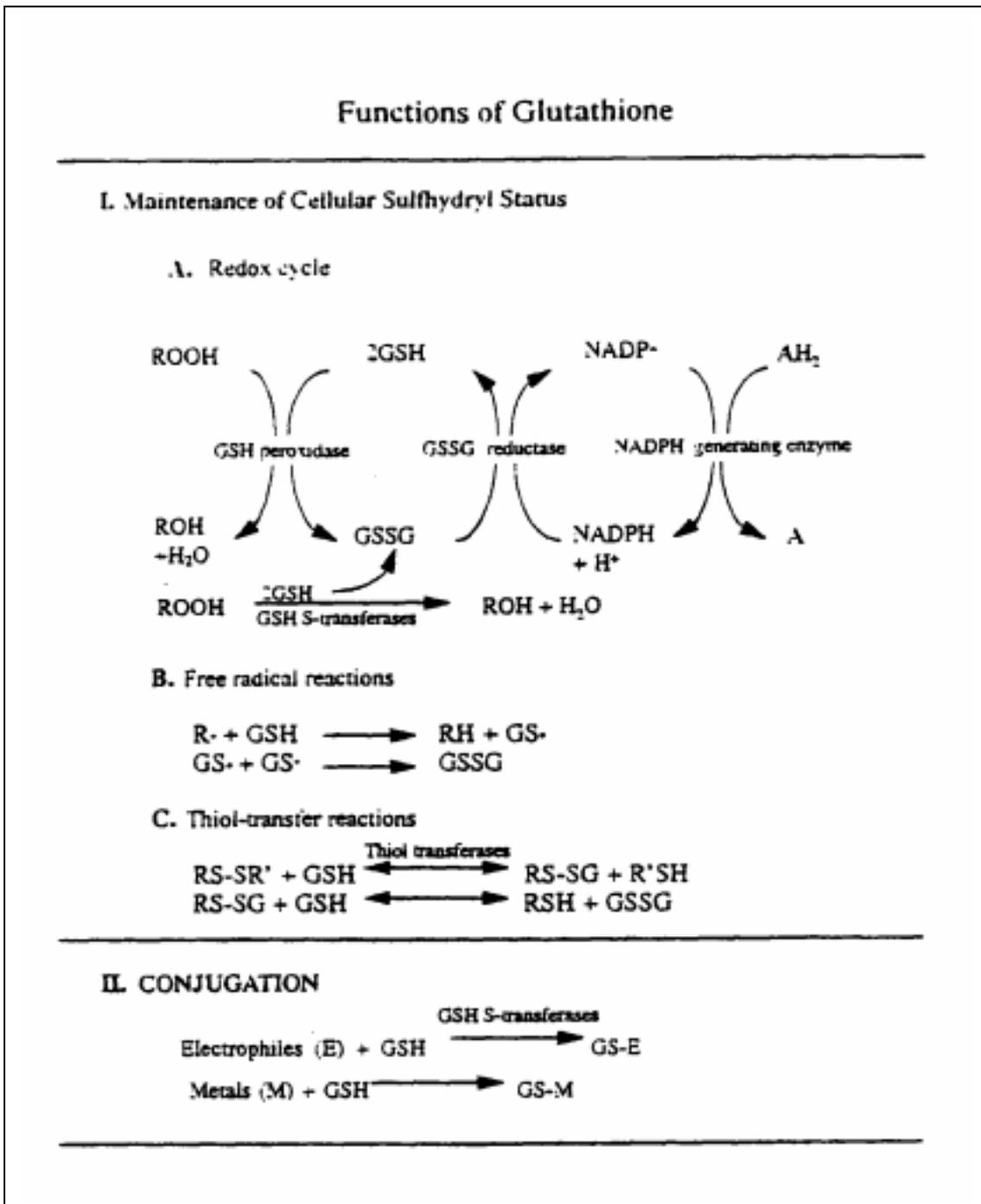


Abb.1.4.3.b: Redoxfunktionen von Glutathion (aus *Wang W et al, 1998*)
AH₂/ A: Reduzierte/ oxidierte Form von Verbindungen, die an der NADPH-Synthese beteiligt sind
RH/R: Reduzierte/ oxidierte Form verschiedener organischer Moleküle
ROOH: Hydroperoxid
ROH: Alkohol
RS-SG: Glutathionthioester
RS-SR': gemischtes Disulfid

GSH ist das wichtigste niedermolekulare, wasserlösliche Antioxidans der Zelle (*Schettler V et al, 2000*).

GSH kann Ascorbinsäure und Vitamin E regenerieren und wird für Disulfidreduktionen durch GSH-Transhydrogenasen verbraucht. Dabei treten neben dem Endprodukt GSSG auch gemischte Disulfide RSSG auf, deren Konzentration unter physiologischen Bedingungen jedoch als extrem niedrig gilt. Der Thiol-Disulfid-Austausch spielt bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine Rolle (z.B. Aktivierung und Inhibierung von Enzymen). Die meisten dieser Reaktionen laufen unter Beteiligung von Glutathion ab (*Hayes JD et al, 1999*). Glutathion kann direkt oder enzymatisch mit freien Radikalen reagieren. Die wichtigste Reaktion ist jedoch die Reduktion von Wasserstoff und organischen Hydroperoxiden durch Glutathionperoxidasen (GPX). Diese schützen Proteine und Membranen vor Oxidation (*Hayes JD et al, 1999*).

Die Glutathionperoxidaseaktivität ist am höchsten in Blut, Leber und Niere. Das gebildete GSSG kann durch Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert werden.

GPX bestehen aus vier Untereinheiten von denen jede ein Selenatom enthält, es kommen jedoch auch selenunabhängige Formen vor.

Besonders Erythrozyten weisen neben einer hohen Glutathionperoxidase- auch eine hohe Reduktaseaktivität auf, ein Hinweis für die besondere Notwendigkeit dieses antioxidativen Systems (*Siems W et al, 1996*).

Bei Einwirkung von oxidativem Stress kommt es zusätzlich zum aktiven Transport von GSSG in den extrazellulären Raum. Dieser Vorgang wurde u.a. an Erythrozyten und am isolierten perfundierten Herzen gezeigt (*Ishikawa T et al, 1986*).

Normalerweise liegen intrazellulär weniger als 0,5% des Gesamtglutathions als GSSG vor (*Meister A, 1988*), im Interstitium und Plasma wird ein etwas erhöhter oxidiertes Anteil gemessen (*Siems WG, 1996*). Ein Anstieg des oxidierten Glutathions innerhalb eines untersuchten Gewebes bzw. im Extrazellulärraum (Plasma) ist somit ein empfindlicher Parameter für die Bewertung von oxidativem Stress (*Ferrari R et al, 1990*).

1.4.4. Nitrotyrosin

In niedrigen Konzentrationsbereichen, wie sie durch die konstitutive NO-Synthase (eNOS) produziert werden, vermittelt NO durch eine direkte Interaktion mit dem Zielmolekül (Bsp.: Guanylatcyclase) physiologische Effekte.

Indirekte Effekte resultieren aus der Reaktion von NO mit Sauerstoff oder Superoxid unter Bildung reaktiver Stickstoffoxidverbindungen (RNS). Normalerweise sind dazu höhere Konzentrationen von NO erforderlich, wie sie durch Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) bei Entzündungsvorgängen entstehen.

Als wichtigstes Derivat wird Peroxynitrit angesehen. Dessen Halbwertszeit liegt unter 1s, so daß die Detektion schwierig ist. Spontan oder katalysiert durch SOD oder Übergangsmetalle reagiert Peroxynitrit mit freiem und proteingebundenem Tyrosin zum stabilen Endprodukt 3-Nitrotyrosin (3-NT) (*Herce-Pagliai C et al, 1998*). 3-Nitrotyrosin ist nicht spezifisch für Peroxynitrit, sondern ein Marker für RNS, die bei oxidativem Stress aus NO gebildet werden (*Halliwell B, 1997*).

1.5. Interaktion des RAS mit dem Endothelinsystem

Das Ungleichgewicht, das eine Endotheldysfunktion kennzeichnet, ist neben einer Verminderung vasodilatierender Mediatoren auch durch eine verstärkte Produktion konstriktorischer Faktoren bedingt.

Einer der stärksten bekannten Vasokonstriktoren von Venen und Arterien ist Endothelin-1₁₋₂₁, die vorherrschende Isoform mehrerer 21-Aminosäurepeptide (*Burnett JC, 1997*). Zwar ist Endothelin-1 auch am Ruhetonus (*Kinlay S et al, 2001*) und an der Homöostase gesunder Gefäße beteiligt, doch sind erst Risikofaktoren und kardiovaskuläre Krankheitsbilder (Hypertonie, Atherosklerose, Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz, Restenose) mit einer Aktivierung des Endothelinsystems verbunden (*Lüscher TF et al, 2000*).

Studien an Patienten mit koronarer Endotheldysfunktion ergaben erhöhte koronare und systemische Endothelin-Plasmaspiegel mit einem weiteren Anstieg bei intrakoronarer Acetylcholininfusion (*Lerman A et al, 1995*).

Plasmaspiegel und die Immunoreaktivität von Endothelin-1 in Intima und Media atherosklerotischer Gefäße korrelieren mit Plaqueentstehung und Entzündung (*d'Uscio LV et al, 2000*).

ET-1 kann von glatten Gefäßmuskelzellen, Kardiomyocyten, mesangialen Zellen, Macrophagen und Leukocyten produziert werden. Hauptquelle ist jedoch das Endothel (*Lüscher TF et al, 2000*).

Als autokrin und parakrin wirksamer Mediator wird es überwiegend abluminal sezerniert.

Die Synthese erfolgt wie in Abb.1.5.a gezeigt :

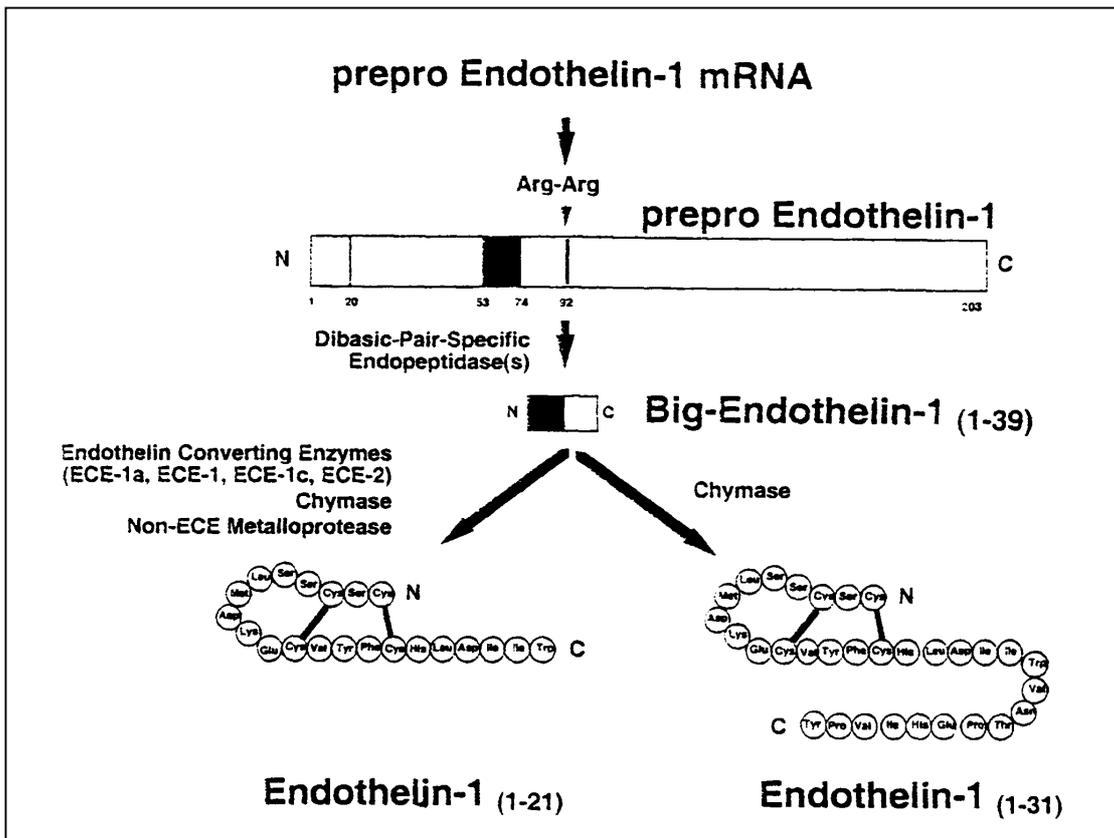


Abb.1.5.a: Biosynthese von Endothelin-1₁₋₂₁ (aus *Lüscher TF et al, 2000*)
 Translation von Prepro-ET-1 mRNA in das prepro-ET-1 Protein mit 203 Aminosäuren
 Spaltung durch Furin-Convertase zum 38 Aminosäure-Peptid Big-ET
 Prozessierung zu ET-1 durch Endothelin-Converting Enzyme (ECEs), Mastzell und glatte Muskelzell-Chymasen und Nicht-ECE-Metalloproteasen
 Ein neuer Mastzell-Chymase abhängiger Pathway führt zur Bildung von Endothelin-1₁₋₃₁

Reguliert wird die Endothelinproduktion vorwiegend über die Transkription von Prepro-ET-1 mRNA (*Miyauchi T et al, 1999*). Zusätzlich wurde die Möglichkeit einer (schnellen) regulierten Freisetzung aus Weibel Palade Bodies beschrieben (*Russel FD et al, 1998*). Die Endothelinsynthese wird bestimmt von physikochemischen Mechanismen (shear stress, pH) und dabei stark aktiviert durch Hypoxie. Folgende Faktoren der Aktivierung und Hemmung sind zudem mittlerweile bekannt:

Aktivierung	Hemmung
OxLDL, Glucose, Thrombin, Cytokine, Übergewicht, Alter (<i>Lüscher TF et al, 2000</i>)	NO, Prostacyclin , ANP, Östrogene (<i>Lüscher TF et al, 2000</i>)
Insulin, Angiotensin II , Vasopressin, Norepinephrin, Bradykinin (<i>Miyauchi T, 1999</i>)	

Tab 1.5.a: Aktivierung und Hemmung des Endothelinsystems

Die vaskuläre Wirkung von Endothelin erfolgt über verschiedene G-proteingekoppelte Rezeptoren. Unterschieden werden der ET_A-Rezeptorsubtyp (auf glatten Gefäßmuskelzellen, VSMC) und der ET_B-Rezeptorsubtyp (auf Endothelzellen, weniger auf VSMC). Der endotheliale ET_B-Rezeptor vermittelt u.a. die Freisetzung von Prostacyclin und NO, die Wiederaufnahme von Endothelin in Endothelzellen und die pulmonale Clearance zirkulierenden Endothelins (*Lüscher TF et al, 2000*).

Neben der starken Vasokonstriktion durch ET_A (>ET_B) -Rezeptoren auf glatten Muskelzellen wurde eine Vielzahl atherogener Wirkmechanismen von Endothelin-1 auf verschiedene Zelltypen gezeigt :

Zelltyp	Wirkung von ET-1
VSMC	Mitogen, Migration↑, Hypertrophie↑, Kollagenproduktion↑, Wachstumsfaktoren (PDGF,FGF)↑
EC	Mitogen, Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1)↑
Monocyten/Macrophagen	Einwanderung↑, Aktivierung (Cytokine, MCP-1, O ₂ ⁻ ↑)
Fibroblasten	Mitogen, Matrixsynthese↑

Tab 1.5.b: Vaskuläre Effekte von Endothelin (nach *Best P et al, 2000*)

Eine spezifische Hemmung der Endothelinwirkungen ist experimentell möglich durch neu entwickelte Endothelinrezeptorantagonisten. An apoE-defizienten Mäusen konnte damit eine Verminderung der Atherosklerose und eine

Wiederherstellung der NO-vermittelten Endothelfunktion gezeigt werden (*Lüscher TF et al, 2000*). Die klinische Anwendung ist jedoch bislang mit Problemen verbunden und kontrollierte Studien stehen noch aus.

Die Therapie mit ACE-Hemmern bietet über die beschriebene Verbesserung der NO- und Prostacyclinverfügbarkeit, sowie über die Verminderung von AT II (vgl.Tab.1.5.a) potentiell die Möglichkeit zur Hemmung des Endothelinsystems. Zugleich hat Endothelin wesentlichen Anteil an hypertensiven und hypertrophen Effekten von Angiotensin II (*D`Uscio LV et al, 2000*).

Die Interaktion eines ACE-Hemmers mit dem Endothelinsystem könnte somit einen entscheidenden Beitrag zur vasoprotektiven Gesamtwirkung leisten.

1.6. Herztransplantation und Transplantatvaskulopathie

Die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie (TVP) ist der limitierende Faktor für den langfristigen Erfolg einer Herztransplantation (HTX). Sie ist die Haupttodesursache jenseits des ersten Jahres nach der Transplantation. Die Inzidenz beträgt 5-10% pro Jahr (*von Scheidt W,2000*).

Immunologische Auslöser und nicht immunologische Faktoren beeinflussen Entstehung und Verlauf der TVP (*Weis M, von Scheidt W, 2000*).

Endothelzellen der Gefäße des Spenderorgans sind das primäre Ziel einer humoralen und zellvermittelten Immunantwort (v.a. durch Empfänger T-Zellen). Weitere Endothelschäden können bei der Preservierung des Spenderorgans, durch Ischämie/Reperfusion, durch die koronare Denervierung sowie durch immunsuppressive Therapie, durch Cytomegalie Virusinfektion und durch klassische Risikofaktoren eintreten (*Weis M et al, 2000*). Im Sinne von „response to injury“ Pathomechanismen, wie sie auch der nativen Atherosklerose zugrunde liegen, kommt es zu einer Endothelaktivierung (vgl 1.3.2) und chronischen Entzündung der Gefäßwand (*Deng MC et al, 2000*).

Die Manifestation der TVP beginnt mit einer früh detektierbaren (intravaskulärer Ultraschall) Intimaverdickung und zeigt im weiteren Verlauf sehr heterogene Erscheinungsformen (*Weis M, von Scheidt W, 2000*).

Die Prävalenz für eine koronare Endotheldysfunktion nach Herztransplantation

beträgt ca. 20 – 30 % im ersten Jahr und nachfolgend ca 30 – 40 %. Dabei können eine epikardiale und eine mikrovaskuläre vasomotorische Endotheldysfunktion (vgl 1.3.2) unabhängig voneinander auftreten (*Weis M et al, 2000*).

Segmentale Unterschiede mit Bereichen intakter Endothelfunktion deuten zudem darauf hin, daß hier keine diffuse, sondern eine lokale, möglicherweise reversible Endothelschädigung besteht (*Weis M et al, 1997*).

Langzeitstudien (1-8 Jahre) mit herztransplantierten Patienten konnten kürzlich zeigen, daß eine koronare Endotheldysfunktion, die unabhängig von morphologischen Veränderungen bereits in der Frühphase nach HTX auftreten kann, prädiktiv ist sowohl für die Entwicklung einer angiographisch nachweisbaren TVP (Stenosen > 50 %), als auch für das Eintreten kardiovaskulärer Ereignisse und kardiovaskulären Tod (*Hollenberg SM et al, 2001; Kuebrich M et al, 2002*).

Eine spezifische Therapie der Transplantatvaskulopathie steht derzeit noch nicht zur Verfügung (*Weis M, von Scheidt W, 2000*). Endotheliale Effekte von ACE-Hemmern könnten hier zu einer Verbesserung der Prognose beitragen, jedoch liegen bislang kaum Studien vor. Eine kleine Fall-Kontrollstudie (n=32) zeigte bei Patienten, die entweder mit Calciumkanalblocker oder ACE-Hemmer behandelt wurden eine geringere Intimaverdickung im ersten Jahr nach HTX (*Mehra MR et al, 1995*).

Eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit könnte eine Verbesserung der Endothelfunktion bewirken. Darauf weist eine Untersuchung zum Einsatz von L-Arginin bei herztransplantierten Patienten hin (*Drexler H et al, 1994*).

Die Ergebnisse einer Patientenstudie (n = 7) über drei Jahre nach HTX zeigen zudem eine signifikante Verminderung der eNOS-Expression in Myokardbiopsien über die Zeit (*Vejlstrup NG et al, 2002*).

Ebenso von Bedeutung ist aber auch nach Herztransplantation eine mögliche Hemmung des Endothelinsystems und die Verminderung von oxidativem Stress:

Endothelin nach Herztransplantation

Erhöhte Endothelinplasmaspiegel treten bereits bei Herzinsuffizienz auf. Mehrere

Studien zeigen einen noch deutlicheren Anstieg bei herztransplantierten Patienten (*Geny B et al, 1998*). Gleichzeitig wird eine verminderte renale, vor allem aber pulmonale Endothelin-Clearance beobachtet.

Erhöhte Endothelinplasmaspiegel nach Herztransplantation werden wesentlich zurückgeführt auf eine bereits vorbestehende systemische Endotheldysfunktion, insbesondere aber auf die vermehrte Produktion von Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Cytokinen (*Geny B et al, 1998*).

Weiterhin können immunsupprimierende Medikamente durch eine direkte Induktion der Genexpression (Cyclosporin A), durch eine generell endothel-schädigende Wirkung (Tacrolimus) oder als Auslöser einer Hypercholesterinämie (Corticoide, Cyclosporin A) zur Aktivierung des Endothelinsystems beitragen (*Tayara L et al, 2000*).

Komplikationen wie Nephropathie und Bluthochdruck nach der Transplantation stehen in Zusammenhang mit Endothelin und lassen sich experimentell durch Endothelinantagonisten vermindern (*Geny B et al, 1998*).

Seine inflammatorischen, proliferativen und konstriktorischen Wirkungen lassen Endothelin als einen potentiellen pathogenetischen Faktor der Transplantatvaskulopathie vermuten. Tatsächlich weisen humane Koronararterien mit TVP eine signifikant erhöhte ET-1 Immunreaktivität auf (*Ravalli S et al, 1996*). ET_A-Rezeptorblockade verhindert die Entwicklung einer TVP bei heterotoper Rattenherztransplantation mit Cyclosporinbehandlung (*Okada K et al, 1998*). Eine koronare mikrovaskuläre vasomotorische Endotheldysfunktion im ersten Jahr nach HTX korreliert signifikant mit einer vermehrten myokardialen Prepro ET-mRNA Expression (*Weis M et al, 1999*).

Ein aktiviertes Endothelinsystem nach HTX stellt somit einen Marker und Mediator für die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie dar.

Oxidativer Stress nach Herztransplantation

Mögliche Komplikationen nach HTX wie Hypertrophie, Herzinsuffizienz und TVP sind assoziiert mit oxidativem Stress. In Rechtsherzbiopsien, die in drei verschiedenen Zeiträumen bei herztransplantierten Patienten entnommen wurden, finden sich hohe Werte für Lipidperoxidationsprodukte (LPO) unmittelbar nach Transplantation. Nachfolgend zeigt sich zunächst eine Abnahme und mehr als

ein Jahr nach HTX ein massiver Anstieg an LPO. Damit verbunden ist die Induktion antioxidativer Enzyme (SOD, GPX), die jedoch die Zunahme an oxidativem Stress letztlich nicht mehr kompensieren kann (*Schimke I et al, 1999*). Es besteht dabei keine Korrelation mit akuten Abstoßungsreaktionen. Die Ursachen für oxidativen Stress nach HTX sind im Einzelnen nicht geklärt. Vermutet werden können jedoch Zusammenhänge wie unter 1.4.1. beschrieben. Bekannt ist zudem die Überexpression der 15-Lipoxygenase bei TVP (*Tayara L et al, 2000*). Kürzlich konnte eine protektive Wirkung der Kombination von Vitamin C und E hinsichtlich der Progression einer TVP gezeigt werden (*Fang JC et al, 2002*).

Antioxidative Effekte einer ACE-Hemmung können somit auch nach Herztransplantation klinisch relevant sein.

1.7. Hypothese und Studienziel

Herztransplantierte Patienten stellen ein Kollektiv mit hoher Prävalenz für funktionelle und morphologische Koronarveränderungen dar, die den langfristigen Erfolg der Transplantation limitieren können. Experimentelle Daten und klinische Studien mit nicht transplantierten Patienten lassen eine Verbesserung der Endothelfunktion durch ACE-Hemmer auch bei herztransplantierten Patienten erwarten. Eine entsprechende Langzeitmedikation könnte auf diese Weise zur Verbesserung der Prognose nach Herztransplantation entscheidend beitragen.

Die vorliegende prospektive Studie sollte zunächst Aufschluß geben über akute Effekte von Quinaprilat - einem ACE-Hemmer mit hoher Gewebeaffinität - auf die koronare Vasomotion sowie auf spezifische für die Endothelfunktion relevante Parameter (oxidativer Stress, Endothelinsystem):

Bei 32 herztransplantierten Patienten wurde die Akutwirkung einer intrakoronaren Quinaprilatgabe (Q) auf die koronare Vasomotion bei Patienten mit und ohne einer koronaren Endotheldysfunktion ermittelt. Dabei sollten zum einen direkte vasomotorische Effekte von Q zum anderen eine mögliche akute Reversibilität einer endothelialen Dysfunktion durch Q bestimmt werden.

Gleichzeitig sollten die akute antioxidative Wirksamkeit sowie die akute

Interaktion mit dem Endothelinsystem untersucht werden.

Dazu wurden vor und nach Q arterielle und koronarvenöse Blutproben entnommen und jeweils die Parameter Glutathionstatus, Nitrotyrosinspiegel und Endothelinplasmakonzentration bestimmt.

Der Mechanismus der dabei *in vivo* festgestellten akuten Interaktion der ACE-Hemmung mit dem Glutathionsystem wurde *in vitro* (durch Inkubation von Blutproben mit verschiedenen Testsubstanzen) charakterisiert. Postuliert wurde dabei eine Reaktion von Glutathion (GSH) mit durch Q stimuliertem NO unter Bildung des Intermediärproduktes Nitrosoglutathion (GSNO).

Eine Hemmung des auf der Endotheloberfläche exprimierten ACE läßt - unabhängig von systemischen Veränderungen, sowie von der Interaktion mit anderen Zelltypen - direkte Effekte auf endotheliale Funktionen erwarten. Endothelzellspezifische vaskuloprotektive Effekte von Quinaprilat wurden in Zellkulturmodellen untersucht. Bestimmt wurden entsprechend der Intention der Studie die antioxidative Wirksamkeit sowie die postulierte Hemmung der Endothelinproduktion.

2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	Kühlzentrifuge Mikro 22R; Zentrifuge Universal	Hettich, Tuttlingen
Sterilbank		BDK, Reutlingen
Brutschrank	Begasungsbrutschrank	Heraeus, München
Photometer	Spektrophotometer DU-70	Beckmann, Frankfurt
ELISA Reader	Titertek Multiscan [®] MCC/340	Eflab, Helsinki
Auswertungssoftware	PEAK Analysing Software, ELISA Computerkontrolle Windows Version 1.1	
Fluoreszenzspektrometer	Fluorolite 1000	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Gamma Counter	LKB Wallac1261 Multigamma Gamma Counter	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
HPLC Autosampler	717	Waters , Eschborn
HPLC Integrator	D 2500	Merck-Hitachi, Darmstadt
HPLC Fraktionssammler	LKB Wallac Helirac 2212	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
HPLC Pumpe	Merck-Hitachi L 6200	Scientific Instruments, Unterhaching
HPLC Trennsäule	Nucleosil 100-5 C 18, Länge 250 mm, ID 4mm	Machery-Nagel, Düren
HPLC UV-Vis Detektor	Merck-Hitachi L 4250	Scientific Instruments, Unterhaching

2.2 Patientenstudie

2.2.1. Patienten

Eingeschlossen wurden ausschließlich herztransplantierte Patienten (31±36 Monate nach HTX, n=32) ohne akute Infektion, ohne akute Abstoßungsepisode und mit guter Nierenfunktion (Serumkreatinin unter 1,5 mg/dl), bei denen eine routinemäßige Herzkatheteruntersuchung durchgeführt wurde. Alle vasoaktiven Medikamente sowie Acetylsalicylsäure wurden 24h, ACE-Hemmer 48h zuvor abgesetzt.

2.2.2. Blutproben: Gewinnung und Verarbeitung

Material

EDTA- und Heparin-Primavetten (Braun, Melsungen), Trasyolol 500.000 KIE (Bayer, Leverkusen)

Lösungen:

Phosphatpuffer pH 7,4: Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ (143 mM), EDTA (17,5 mM; Titriplex, Merck, Darmstadt), Wasser (Lichrosolv, Merck, Darmstadt)

Stopplösung: N-Ethylmaleimide (NEM: 60 mM, Sigma, München), EDTA (2 mM), Perchlorsäure 70% Suprapur (Merck, Darmstadt), Wasser

(Alle verwendeten Reagenzien hatten HPLC Reinheitsgrad)

Durchführung:

Zu den beiden Meßzeitpunkten (s.3.1.) wird jeweils arterielles und koronarvenöses Blut abgenommen und sofort in auf Eis stehende EDTA-Röhrchen (zur Endothelin- und 3-Nitrotyrosinbestimmung) und Heparinröhrchen (zur Glutathionbestimmung mit HPLC-Methode) überführt. Ein 5 ml EDTA-Röhrchen wird jeweils zur Hämatokritbestimmung in die Abteilung für Klinische Chemie des Klinikums gegeben.

Endothelin, 3-Nitrotyrosin:

Vor der Blutabnahme werden je 0,5 ml Trasyolol (als Peptidaseinhibitor) in ein 10 ml EDTA-Röhrchen gegeben.

Die Proben werden zur Homogenisierung geschwenkt, dann 10 min bei 2000g

zentrifugiert Das Plasma wird aliquotiert und bis zur Messung bei -80°C eingefroren.

Glutathion (HPLC):

Jeweils 1 ml Heparinblut wird sofort in ein vorbereitetes Probenröhrchen auf Eis mit 2 ml Phosphatpuffer und 1 ml Stoplösung pipettiert, die Mischung homogenisiert und 5 min bei 14000g zentrifugiert. Der klare Überstand wird aliquotiert und bei -80°C bis zur Messung eingefroren.

Diese Behandlung mit Stoplösung verhindert sowohl einen Glutathionabbau durch Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ -GT), indem die beigefügte Perchlorsäure eine Proteinfällung bewirkt, als auch eine Oxidation von GSH durch Blockade der freien SH-Gruppe mit N-Ethylmaleimid.

2.2.3. Enzymatischer Assay zur Bestimmung von Gesamtglutathion

Material:

GSH (Glutathionstandard, Sigma, Taufkirchen), GR (Glutathionreduktase aus Hefe, Sigma, Taufkirchen) NADPH (Roche, Mannheim), DTNB (5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoic acid, Sigma, Taufkirchen), 5-SSS (5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat pa, Merck, Darmstadt), Küvetten (Halb-Mikro-Küvette, Polystyrol, Sarstedt, Niebrecht)

Lösungen:

Puffer: Natriumphosphatpuffer pH 7,5 (143 mM; 17,5 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$)

NADPH: 4,8 mM / 0,5% NaHCO_3 -Lösung

DTNB: 3,8 mM/Puffer

GR: 3,5 U/ml/Puffer

GSH: 0,05 mM/Puffer

Durchführung:

Für die Bestimmung von Gesamtglutathion wird peripher entnommenes EDTA-Plasma sofort verarbeitet, nicht eingefroren. Die Proteinfällung erfolgt durch Zugabe von 100 μl 5-SSS (43 %) zu 900 μl Plasma und Zentrifugation bei

14000g über 5min bei 4°C. GSH wird aus dem klaren Überstand direkt bestimmt.

Testprinzip:

Grundlage des Assays ist die spektrophotometrische Bestimmung mit Ellmanns Reagenz (DTNB) (*Ellmann GL, 1959*).

Dabei reagiert DTNB mit Thiolen zum Disulfid und dem stark farbigen p-Nitrolatanion (TNB) mit einem Absorptionsmaximum bei 412nm.

Spezifisch für Glutathion ist das auf der beschriebenen Reaktion basierende enzymatische Verfahren nach Tietze (*Tietze F, 1969*). Die zugesetzte Glutathionreduktase (GR) katalysiert nur die Reduktion von GSSG durch NADPH. Die Zunahme der Absorption bei 412nm pro Minute (dA/min) ist dabei proportional zur GSH-Konzentration in der Probe:



Enzymatische Methoden bieten bis auf spezielle HPLC-Methoden die beste Selektivität und Sensitivität zur Glutathionbestimmung.

Testdurchführung:

Die Bestimmung erfolgt mittels internem GSH-Standard. Pro Probe werden jeweils 6 Ansätze - 3 Küvetten ohne, 3 Küvetten mit zugesetztem Standard - simultan vermessen.

Ansatz einer Küvette:	1000 µl Puffer bzw. 980 µl Puffer + 20 µl GSH
	100 µl Probe
	50 µl NADPH
	20 µl GR

mischen, 15 min bei 25°C equilibrieren,

starten mit	20 µl DTNB
-------------	------------

mischen, dann sofort vermessen (412 nm, 10 min, Meßintervall: 1 min)

Die dA/min wird jeweils aus den Einzelwerten als Steigung der Geraden berechnet.

2.2.4. HPLC-Methode zur Bestimmung von GSH und GSSG

Die HPLC- Messungen werden im Physiologischen Institut, München, im Labor von Prof Becker nach einer dort entwickelten Methode (*Massoudy P et al, 1994*) durchgeführt.

Material:

Lösungen

Fließmittel für die GSH-Bestimmung: 25 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 6 mit 1% Methanol (60% vol/vol in Wasser)

Fließmittel für die GSSG-Bestimmung: 0,01 mM HClO_4 mit 1% Methanol, pH 2

Durchführung:

GSH-Bestimmung:

Die zu bestimmende Probe wird aufgetaut und der pH-Wert mit 1M KH_2PO_4 auf pH 6 eingestellt. Nach Zentrifugation (14000g, 5 min, 4°C) werden 200 µl der Lösung injiziert Die Flußrate beträgt 1 ml/min. Das System ist auf 37°C equilibriert. Die Fraktion von 1,8 bis 3,4 min wird für die spätere Rechromatographie zur GSSG-Bestimmung gesammelt. Die Retentionszeit des GS-NEM Adduktes beträgt ca 16 min. Durch Vergleich der Peakfläche mit der Peakfläche einer GS-NEM Standardpräparation wird die GSH-Konzentration der Probe ermittelt. Die Detektionswellenlänge des UV-Vis Detektors für GS-NEM liegt bei 210 nm.

GSSG-Bestimmung:

Das gesammelte Eluat wird lyophilisiert, der Rückstand in 250 µl destilliertem Wasser gelöst und davon 200 µl injiziert. Detektionswellenlänge für GSSG ist 202 nm, die Retentionszeit beträgt ca 8 min bei einer Flußrate von 1 ml/min.

Die Detektionsgrenze für GSSG liegt bei dieser Methode bei 0,06 µM GSSG im Blut.

In alle Berechnungen von GSH- und GSSG-Konzentrationen wird folgende Volumenkorrektur mit einbezogen:

$$k(V) = 1 - (0,0035 \times HK)$$

k(V): Volumenkorrekturfaktor

HK: Hämatokritwert (%)

2.2.5. Bestimmung von Endothelin-1

Material:

Endothelin-ELISA (Biomedica, Wien, Österreich)

Durchführung:

Testprinzip:

Endothelin (1-21) in der Probe bindet zunächst an einen immunaffinitätschromatographisch gereinigten polyklonalen Erstantikörper, mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet ist. Ein für Endothelin hochspezifischer monoklonaler Detektionsantikörper wird gleichzeitig mit der Probe zugegeben und bildet mit dem in der Probe vorhandenen Endothelin und dem gebundenen Erstantikörper ein Sandwich. Nach einem Waschschrift, der alle nicht spezifisch gebundenen Substanzen entfernt, wird die Menge an gebundenem Detektionsantikörper bestimmt. Sie entspricht der Menge an Endothelin in der Probe. In diesem Schritt wird ein mit Peroxidase konjugierter anti-Mausantikörper eingesetzt. Nach abermaligem Waschen wird Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat zugegeben. Die im ELISA-Photometer meßbare Farbentwicklung ist direkt proportional der Konzentration an Endothelin in der Probe.

Testdurchführung:

Die Testdurchführung erfolgt exakt entsprechend dem vorgegebenen Protokoll. Die zu messenden Patientenplasmen werden auf Eis aufgetaut und jeweils durch Vortexen homogenisiert. Waschpuffer, Standardverdünnungen und Detektionsantikörper werden frisch angesetzt.

Die Auswertung erfolgt mit der zum ELISA-Reader gehörenden Software über eine Eichkurve mit 4PL Algorithmus. Die Absorption des Leerwertes wurde jeweils abgezogen.

Testmerkmale:

Mit dem verwendeten Sandwich ELISA kann Endothelin-1 direkt aus humanem EDTA-Plasma bestimmt werden.

Normalwerte: 0,2 - 0,7 fmol/ml

Standardkonzentrationen: 0; 0,61; 1,21; 3,961; 7,09; 10,19 (fmol/ml)

Nachweisgrenze: 0,05 fmol/ ml

Kreuzreaktionen: ET 1 (1-21): 100 %

ET 2 (1-21): 100 %

ET 3 (1-21): < 5 %

Big Endothelin (1-38): < 1 %

2.2.6. Bestimmung von 3-Nitrotyrosin

Material:

Protein Nitrotyrosine ELISA Kit (TCS Biologicals, Buckingham, U. K.)

Durchführung:

Testprinzip:

Proben und Standards werden in die Wells der Microtiterplatte pipettiert, die mit einer definierten Menge an nitriertem Protein beschichtet sind. Der anschließend zugegebene Primärantikörper (polyklonaler Kaninchen-anti-Nitrotyrosin-antikörper) bindet kompetitiv an die Beschichtung und nitrierte Proteine der Probe.

Je geringer also der Gehalt an nitriertem Protein in der Probe, umso mehr Antikörper bleibt nach dem Waschen an die Platte gebunden. Als Detektionsantikörper dient ein Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, der mit Peroxidase konjugiert ist. Der Substratumsatz kann photometrisch im ELISA-

Reader bestimmt werden.

Testdurchführung:

Die Testdurchführung folgt exakt dem vorgegebenen Protokoll.

Die Konzentration an Nitrotyrosin in den Proben wird aus dem linearen Teil der Nitro-BSA Standardkurve berechnet.

Testmerkmale:

Mit dem verwendeten ELISA können freies 3-Nitrotyrosin und proteingebundene 3-Nitrotyrosinreste in humanem EDTA-Plasma direkt semi-quantitativ, das heißt als Nitro-BSA-Äquivalente, bezogen auf einen nitrierten BSA Standard bestimmt werden.

Als Positivkontrollen wurden nitrierte Proteine (KLH, Fibrinogen, Pepsinogen, BSA, alpha 1-antitrypsin, HSA und Lysozym) getestet, die alle, wenn auch mit signifikanten Unterschieden in der Affinität, an den Primärantikörper binden.

Die entsprechenden nativen Proteine zeigen keinen Effekt.

Bindung an den Primärantikörper kann durch 10 mM Nitrotyrosin komplett blockiert werden. Keinen Effekt zeigen dagegen Tyrosin, Phenylalanin u.a.

Als Standard wird nitriertes BSA im Konzentrationsbereich 6,1 bis 1500 nM (0,35 bis 85 µg/ml) entsprechend 25 bis 6300 nM gebundenem Nitrotyrosin verwendet.

2.2.7. *In vitro* Test zum akuten Effekt von Quinaprilat auf GSH-Blutspiegel

Material:

Primavetten für EDTA-Blut, (Braun, Melsungen)

Accupro[®] i.v. (2,44 x 10⁻³ M Quinaprilat; Parke- Davis, Freiburg)

GSNO (Nitrosoglutathion; Sigma, München)

NO Gas (NO, Aga Gas GmbH, Höllriegelskreuth)

Reagenzien:

Perfusat: Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,0

Durchführung:

Inkubation mit Quinaprilat:

10 µl Quinaprilatlösung (in Perfusat) werden zu 990 µl EDTA-Blut gegeben, so daß die Endkonzentration von Quinaprilat 10^{-5} bzw 10^{-7} M beträgt. Dieser Ansatz wird nach kurzem Vortexen im Brutschrank bei 37°C 5 min inkubiert. Die untersuchten Kontrollen werden mit 10µl Perfusat versetzt.

Im Anschluß an die Inkubation wird kurz gemischt, 800 µl entnommen und mit Stopplösung sofort wie unter 2.2.2. beschrieben für die spätere HPLC Messung verarbeitet.

Inkubation mit GSNO:

950 µl Citratblut werden mit 50 µl GSNO-Lösung in Perfusat (Endkonzentration 400 µM) versetzt, für die Kontrollen werden 50 µl Perfusat verwendet. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur werden jeweils 500 µl wie unter 2.2.2 beschrieben weiterverarbeitet

Einleitung von NO-Gas:

NO Gas wird unter vorsichtiger Ventilöffnung der Gaspatrone mittels eines kleinen Plastikschauches durch einen Stopfen in 2 ml Citratblut über 2 min kontinuierlich eingeleitet. In anschließenden Bestimmungen mit einer pneumatischen Waage wird die dabei erreichte Konzentration an gelöstem NO auf ca. 100 µM bestimmt. Als Kontrolle dient ein nicht behandeltes Aliquot von 2 ml Citratblut. Jeweils 1 ml Blut wird nach dem Test sofort wie unter 2.2.2 beschrieben weiterverarbeitet.

HPLC-Messungen:

Die Bestimmung von GSH und GSSG erfolgt wie unter 2.2.4 beschrieben. Die GSNO-Bestimmung erfolgt im ersten Lauf mit einer Retentionszeit von 12 Minuten.

2.3. Zellkulturversuche

2.3.1. Endothelzellprimärkultur aus Schweineaorten (PAEC)

Material:

Kulturschalen: Flaschen (HDPE, Schräghals mit Filterkappe), 80 cm², 10 ml

6-well-Platten, 9,6 cm²/well, 2 ml

12-well-Platten, 3,5 cm²/well, 1 ml

96-well-Platten, 1,1 cm²/well, 200µl

(jeweils: Nunc, Wiesbaden)

PBS: instamed 9,55 g/l (PBS Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom/Seromed, Berlin)

DMEM: (Dulbecco`s modified Eagle Medium, Life Technologies, Karlsruhe)

FCS Gold, (PAA Laboratories, Cölbe)

Penicillin/Streptomycin (Biochrom/ Seromed, Berlin)

Heparin-Natrium (25.000 I.E./5 ml, Braun, Melsungen)

Trypsin (4-6U/mg, Serva, Heidelberg)

Collagenase II (319 U/mg, Biochrom/Seromed, Berlin)

BSA (Albumin Bovine Fraction V Pulver, Sigma-Aldrich GmbH, München)

Trypsin/EDTA Lösung (0,05 % bzw 0,02 % in PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom/Seromed, Berlin)

Enzymlösung: 0,1g/100 ml Collagenase II
 0,05 g/100 ml Trypsin
 0,1 % BSA
 in PBS, sterilfiltriert (0,2 µm)

Kulturmedium: 450 ml DMEM
 50 ml FCS
 5 ml Penicillin/Streptomycin

Durchführung:

Schweineaorten vom Schlachthof werden in PBS mit 1250 U/ml Heparin bei 4°C transportiert. Die Präparation erfolgt mit sterilisierten Materialien und Lösungen unter Laminar Flow.

Die von umliegendem Gewebe befreiten Aorten werden entlang der Linie austretender Gefäße geöffnet und mit der Lumenseite nach oben in einen Halterahmen eingespannt. Mit 5 ml Enzymlösung wird das Gefäß 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen wird mit 2 mal 5 ml 10 %-serumhaltigem Medium gespült und die resultierenden 10 ml Zellsuspension in einem Sarstedtröhrchen 10 min bei 300g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml 10 %-serumhaltigem Medium resuspendiert und die Endothelzellen in eine Zellkulturflasche ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 h, später alle 48 h.

Für Zellkulturversuche werden Zellen der 1. und 2. Passage verwendet. Dazu werden die Zellen 1 Woche nach Isolierung in die für die jeweilige Versuchsdurchführung geeigneten wells gesplittet:

Nach Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit 5 ml PBS wird die Zellschicht mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung 5 min im Brutschrank inkubiert.

Durch Zugabe von 5 ml DMEM (10 %) wird das Enzym inaktiviert und die Zellen 10 min bei 300g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 20 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl der Suspension in der Neubauer Kammer bestimmt. Nach Verdünnung auf eine angestrebte Konzentration von 10^5 Zellen/ml wird die Zellsuspension homogen in die entsprechenden wells verteilt.

2.3.2. Zellkultur zur Bestimmung des sezernierten Endothelins

Material:

Versuchsmedium:

1 % serumhaltiges DMEM

Testsubstanzen:

Accupro i.v. (5,22 mg/ml Quinaprilat·H₂O, Parke-Davis, Freiburg)

Xanef i.v. (1,379 mg/ml Enaprilat·2 H₂O, MSD Sharp&Dohme GmbH, Haar)

Phosphoramidon (Dinatrium Salz, Calbiochem, Schwalbach)

Angiotensin II (Acetat, Sigma, München)

Thrombin (EC 3.4.21.5 human, 1 vial 10NIH, Sigma, München)

LPS (Lipopolysaccharide; E.Coli 026:B6, Stimulation Index 71,4 at 125 µg/ml, Sigma, München)

Bradykinin (Acetat, Sigma, München)

Durchführung:

Für die Versuche werden konfluente Monolayer in 6-well-Platten 24 h in 1 % DMEM vorinkubiert. Die Inkubation mit den Testsubstanzen in den entsprechenden Konzentrationen erfolgt ebenfalls in Versuchsmedium.

Jeweils 1 ml Überstand wird anschließend entnommen und bei 4°C 5 min bei 14000g zentrifugiert. 800 µl werden zur späteren Bestimmung bei -80°C eingefroren.

2.3.3. Kultivierung einer Zelllinie humaner mikrovaskulärer Zellen (HMEC-1)

Material:

HMEC-1: mikrovaskuläre dermale Endothelzelllinie (*Ades EW et al, 1992*)

Kulturmedium: 200 ml Medium (MCDB 131, c.c.pro GmbH, Neustadt/W.)
37,5 ml FCS (FCS Gold, PAA Laboratories, Cölbe)
12,5 ml L-Glutamin (200 mM, Biochrom/Seromed, Berlin)
125 µl Gentamycin (40 mg/ml, Brahms Arzneimittel GmbH, Wiesbaden)

Testsubstanzen:

TNFα (rekombinanter Tumornekrosefaktor alpha, R&D Systems, Wiesbaden)

Durchführung:

Die Zellen werden im Wasserbad (37°C) aufgetaut, die Suspension mit Medium verdünnt und in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml in Kulturflaschen

ausgesäht. Für die Versuche wird wie unter 2.3.1. für PAEC beschrieben gesplittet.

2.3.4. Bestimmung der NO-Freisetzung von PAEC

Material:

Platten für Fluorolite

Hank`s Puffer (w/o Phenolrot, Biochrom/Seromed, Berlin)

DAF-2 (4,5-Diaminofluorescein, Alexis, Grünberg)

L-Arginin (L-Arginine·HCl, Sigma-Aldrich, München)

L-NA (N-Nitro-L-Arginin, Alexis, Grünberg)

Durchführung:

Versuche zur NO-Freisetzung werden an konfluenten PAEC in 12-well-Platten nach 24 h Vorinkubation in 1 % DMEM durchgeführt.

Zur Inkubation mit Testsubstanzen wird Hank`s Puffer verwendet. Der Fluoreszenzindikator DAF-2 (*Nakatsubo N et al, 1998, vgl. 3.2.1.*) wird in einer Konzentration von 10 µM unter Lichtschutz eingesetzt.

Die Fluoreszenzintensität wird in je 200 µl Überstand in einer schwarzen 96-well-Platte im Fluorolite Gerät gemessen (Extinktion: 495 nm, Emission: 515 nm).

2.3.5. Endotheliale Endothelinproduktion

2.3.5.1. ELISA

Material:

ELISA Immunoassay Kit , humanes Endothelin-1; Biotrend, Köln

Durchführung:

Testdurchführung:

Die zu messenden Zellkulturüberstände werden aufgetaut und mit 1 % DMEM im Verhältnis 1:12 verdünnt. Reagenzien und Proben werden auf Raumtemperatur erwärmt und der Test exakt entsprechend dem vorgegebenen Protokoll durchgeführt. Abschließend werden die Endothelinkonzentrationen

nach kolorimetrischer Messung der Testplatte im ELISA Reader bei 450 nm anhand der gleichzeitig gemessenen Standardkurve ermittelt. Zur Auswertung wird ein Cubic Spline Algorithmus herangezogen.

Testmerkmale:

Assay Range: 0,78 bis 100 pg/ml

Sensitivität: < 0,014 pg/ml

Wiederfindungsrate in Zellkulturmedium: 99,5 %

Kreuzreaktionen: Endothelin-1: 100 %

Endothelin-2: 3,32 %

Endothelin-3: < 0,1 %

Big-Endothelin-1: 0,10 %

Präzision: Intra Assay: 2,1 % CV

Inter Assay: 3,3 % CV

2.3.5.2. RIA

Material:

Antikörper (Rabbit Anti-ET-1-Serum, Peninsula, San Carlos, USA)

Standard (ET-1 Standard, Novabiochem, Schwalbach)

Radioaktives ET-1 (ET-1-(3(-125J)Tyr), 10 µCi/mM, Biotrend, Berlin)

Lösungen:

RIA-Puffer: 19 mM NaH₂PO₄, 81 mM Na₂HPO₄, 0,05 mM NaCl, 0,1 % BSA, 0,1% Triton X-100, 0,01 % NaN₃

Adsorptionslösung: 0,625 g Aktivkohle, 0,125 g BSA, 50 ml RIA-Puffer

Durchführung:

Zur Bestimmung der Endothelinkonzentration im Radioimmunoassay (RIA) werden die Zellkulturüberstände auf Eis aufgetaut und mit RIA-Puffer im

Verhältnis 1:14 verdünnt. Jede Probe wird als Doppelwert angesetzt. Eine Standardreihe von 1,57 bis 1600 fmol/ml wird ebenfalls in RIA-Puffer hergestellt.

Zur Immunkomplexbildung werden je 350 µl Probenlösung mit 100 µl Endothelin-Antikörper und 50 µl radioaktiv markiertem Endothelin über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Trennung von gebundenem und nicht gebundenem radioaktiven ET-1 erfolgt durch Inkubation mit 500 µl Adsorptionslösung (10 min) bei Raumtemperatur und Zentrifugieren bei 3000g während 10 min.

800 µl des Überstandes werden im γ -Counter gezählt. Die Meßwerte werden anhand der Standardkurve mittels der zugehörigen Auswertungssoftware berechnet.

2.3.6. Bestimmung des intrazellulären Glutathiongehaltes in PAEC

Material:

Triton X-100 (Merck, Darmstadt)

Assayreagenzien: siehe unter 2.2.3

Testsubstanzen:

L-Buthioninsulfoxim (Fluka, Buckingham, U.K.)

Spermine NONOate (Alexis, Grünberg)

Durchführung:

Die Methode zur Bestimmung des endothelialen Glutathiongehaltes wird in Analogie zur Bestimmung der Plasmaglutathionkonzentration (vgl. Kapitel 2.2.3.) entwickelt.

Alle Versuche werden in 12-well-Platten mit 1 ml DMEM (1 %-serumhaltig) durchgeführt, die Zellen 24 h in DMEM (1 %-serumhaltig) vorinkubiert.

Im Anschluß an die Inkubation mit den Testsubstanzen wird mit PBS gewaschen und die Monolayer während 5 min in 0,1 % Triton X-100 (in PBS) lysiert. 450 µl homogenisiertes Zelllysat werden zur Proteinfällung mit 50 µl 25 % Sulfosalicylsäure versetzt. Nach Zentrifugation bei 14000g bei 4°C über 5 min

kann der Überstand zur enzymatischen Glutathionbestimmung eingesetzt werden.

2.3.7. Endotheliale ROS-Bildung

2.3.7.1. Cytochrom C/SOD-Assay

Die Bestimmungen zur extrazellulären Superoxidanionproduktion endothelialer Zellen wurden im Institut für Physiologie (Labor Prof. Pohl) in Kooperation mit Dr. Sohn mittels einer dort etablierten Methode durchgeführt

Testprinzip ist die photometrische Bestimmung der Reduktion von Ferricytochrom C (*Tarpey M et al, 2001*). Der dabei durch Superoxiddismutase blockierbare Anteil entspricht der spezifischen Detektion von O_2^- (*Fridovich I et al, 1985*).

Material:

Cytochrom C (gewonnen aus Schweineherz, Sigma, München)

SOD (Superoxiddismutase, Roche, Penzberg)

DMEM ohne Phenolrot (Promocell, Heidelberg) serumfrei

Lösungen:

Cytochrom C: Stammlösung 800 μ M/ PBS, -20°C
Verdünnung 40 μ M/DMEM ohne Phenolrot

SOD: Stammlösung 5000 IE/ ml/ PBS, -20°C
Endkonzentration 200 IE/ml

Durchführung:

Konfluente Endothelzellen in 24-well-Schalen werden mit PBS gewaschen und mit 400 μ l Cytochrom C-Verdünnung sowie in den dafür bestimmten wells mit 13 μ l SOD-Lösung inkubiert. Quinaprilat wird in einem Volumen von 5 μ l in einer Endkonzentration von 10^{-5} M bzw. 10^{-7} M zugesetzt.

Pipettierschema:

<i>K</i>	<i>K</i>	<i>K</i>	<i>K+ SOD</i>	<i>K+ SOD</i>	<i>K+ SOD</i>
<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q+SOD</i>	<i>Q+ SOD</i>	<i>Q+ SOD</i>

Abb.2.3.7.1.a: Anordnung der wells zur Inkubation mit Cytochrom C:

K: Kontrolle

Q: Quinaprilat

Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 60 min werden die Überstände sofort im Photometer (*Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech*) bei einer Wellenlänge von 550 nm vermessen.

Die Superoxidanionfreisetzung wird aus den Absorptionsdifferenzen der Proben mit und ohne SOD ($dA = \text{Absorption ohne SOD} - \text{Absorption mit SOD}$) berechnet, indem der Wert durch den Extinktionskoeffizienten für die Reduktion von Ferricytochrom C zu Ferrocycytochrom C ($\epsilon_{550\text{nm}} = 21,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) dividiert wird.

2.3.7.2. DCF-Fluoreszenz

Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität der oxidierten Form (DCF) des membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoffs Dichlordihydrofluoresceindiacetat (H_2DCFDA) bietet die Möglichkeit, die intrazelluläre Bildung freier Radikale (ROS) zu untersuchen (*Wang H et al, 1999*).

Material:

DCF (Molecular Probes, Göttingen)

DCF-Stammlösung (10 mM in DMSO, Lagerung bei -80°C unter Argon)

Puffer (Hank`s balanced salt solution mit 1,2 mM CaCl_2 , ohne Phenolrot, 20 mM HEPES, Sigma, München)

Testsubstanzen:

Bradykininacetat (Sigma, München)

Diphenyliodoniumchlorid (Sigma, München)

Phorbol 12-Myristyl 13-acetat (Sigma, München)

Durchführung:

Für Versuche mit DCF werden PAEC in 96-well-Platten mit 200 μl 10 % serumhaltigem Medium pro well ausplatiert. Nach 24 h können die konfluenten Monolayer mit Testsubstanzen inkubiert werden. Zur Inkubation werden dabei 200 μl 1 % serumhaltiges Medium pro well verwendet.

Vor dem Beladen mit 5 μM DCF in 200 μl Puffer werden die Zellen vorsichtig mit Puffer gewaschen. Die Pufferlösung wird zuvor auf 37°C temperiert.

Je nach Versuchsanordnung werden der DCF/Pufferlösung Testsubstanzen zugegeben.

Mit DCF muß unter Lichtschutz gearbeitet werden. Zum Beladen werden die Zellen 30 min bei 37°C in den Brutschrank gestellt, anschließend wird die Platte sofort im Fluorometer mit einer Extinktionswellenlänge von 485 nm und Emissionswellenlänge von 520 nm vermessen und in der auf 37°C temperierten Meßkammer belassen. In Abständen von 5 bzw. 10 Minuten können so weitere Meßwerte aufgezeichnet werden.

2.3.8. Proteinbestimmung

Zur Normierung des freigesetzten Endothelins auf die Zellzahl wird die Gesamtproteinmenge der einzelnen wells bestimmt. Dazu werden die Monolayer nach Versuchsabschluß mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C in 0,2 M NaOH lysiert. Pro well werden zweimal 50 μl für die Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry (*Lowry et al, 1951*) eingesetzt. Als Standard wird ein BSA-Standard von Pierce verwendet.

2.4. Statistische Auswertung

Statistische Analysen der Ergebnisse werden mit Hilfe des Microsoft Excel Statistikprogramms Version 7.0 durchgeführt. Zellkulturversuche (Kontrollen vs stimulierte Zellen) bzw Patientendaten (pre vs post Accupro i.v.) werden mit dem zweiseitigen Student's T-Test verglichen. In den graphischen Darstellungen ist das Signifikanzniveau folgendermaßen dargestellt:

* für $p \leq 0,05$; ** für $p \leq 0,01$

Alle in der Arbeit enthaltenen Meßwerte sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (sd) angegeben.

Graphiken und Tabellen im Ergebnisteil zur Patientenstudie (3.1.) beziehen sich auf das Gesamtkollektiv ($n = 32$), soweit keine spezifizierenden Angaben zur Grösse eines Teilkollektives gemacht werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Patientenstudie

Koronare Vasomotion nach i.c.Gabe von Quinaprilat (Accupro i.v.) bei Patienten nach Herztransplantation.

Durchführung: Nach einer Ruhemessung erfolgt zunächst zur Prüfung der endothelabhängigen Vasomotion die i.c. Gabe von Acetylcholin in steigender Dosierung (1 $\mu\text{g}/\text{min}$ über 5 min, dann 30 $\mu\text{g}/\text{min}$ über 5 min). Nach Rückkehr auf einen basalen Ruhefluß erfolgt die i.c. Gabe von Quinaprilat (1,5 mg über 3 min, dann 5 mg über 5 min), gefolgt von Acetylcholin (30 $\mu\text{g}/\text{min}$ über 5 min). Bei einer Untergruppe erfolgte zusätzlich zu Acetylcholin die Gabe von L-Arginin (200 $\mu\text{mol}/\text{min}$).

Um die Änderung der mittleren, koronaren Blutflußgeschwindigkeit (Reaktion der kardialen Mikrozirkulation) zu bestimmen, wird eine kontinuierliche, intrakoronare Dopplerflußmessung mit einem Dopplerdraht durchgeführt. Zur Ermittlung der Weitenänderung der epikardialen Koronararterien (Reaktion der kardialen Makrozirkulation) erfolgt jeweils nach Substanzinfundierung eine Koronarangiographie und spätere Auswertung mittels quantitativer Koronarangiographie.

Vor und nach Quinaprilat (Q) werden koronarvenöse und arterielle Blutproben entnommen (vgl. Kapitel 2.2.).

Die i.c. Gabe von Q bewirkte keine signifikante Änderung von Blutdruck oder Herzfrequenz.

Ruhemessung		
Testsubstanz:	Acetylcholin	1 µg/min, 5 min
	Acetylcholin	30µg/min, 5 min
	(+ L-Arginin	200 µmol/min)
Entnahme von Blutproben		
Ruhemessung		
Testsubstanz:	Quinaprilat	0,5 mg/min, 3 min
	Quinaprilat	1mg/min, 5 min
Ruhemessung		
Testsubstanz:	Acetylcholin	30 µg/min, 5 min
	(+ L-Arginin	200 µmol/min)
Entnahme von Blutproben		

Abb.3.1.a : Schema der Substanzinfundierung und Blutproben

3.1.1. Koronare Vasomotion

Die i.c. Quinaprilat-Gabe führt zu einer signifikanten Änderung des koronaren Gefäßtonus:

Epikardiale Durchmesser nehmen um 10 ± 10 % zu (proximale Segmente: $6 \pm 0,3$ %, $p < 0,05$; distale Segmente: $14 \pm 0,6$ %, $p < 0,01$).

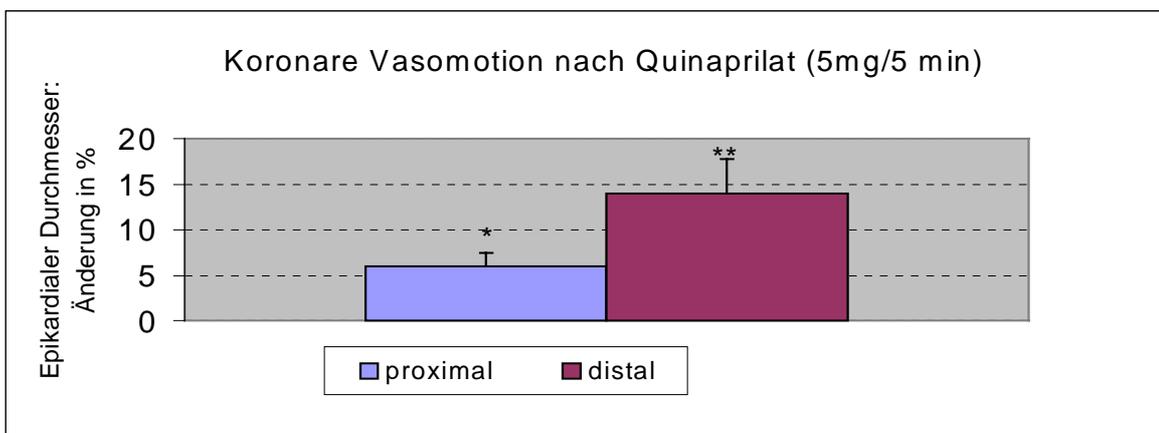


Abb.3.1.1.a: Einfluß von Q auf epikardiale Koronargefäße

Die koronare Blutflußsteigerung nach i.c. Quinaprilatgabe beträgt $51 \pm 4 \%$ (1,5 mg/ 3 min, $p < 0,01$) bzw $110 \pm 5\%$ (5 mg/ 5min, $p < 0,001$).

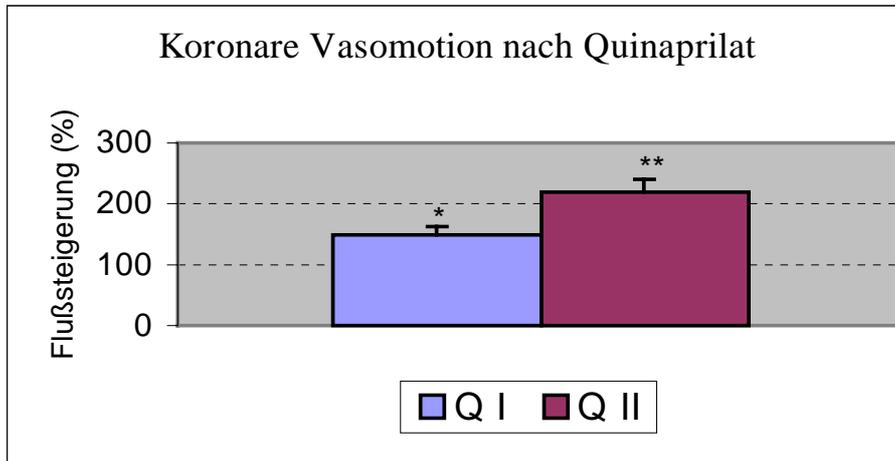


Abb.3.1.1.b: Einfluß von Q auf die koronare Mikrozirkulation
Q I: 1,5 mg/ 3 min
Q II: 5 mg/ 5 min

Die akute Beeinflussung der Endothelfunktion im Acetylcholintest variiert innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs (vgl. Abb.3.1.1.c und Abb.3.1.1.d). Eine koronare Endotheldysfunktion ist durch die akute Q-Gabe sowohl epikardial als auch mikrovaskulär bei 25 % der Patienten reversibel (3/12 epikardial; 4/16 mikrovaskulär, n.s.).

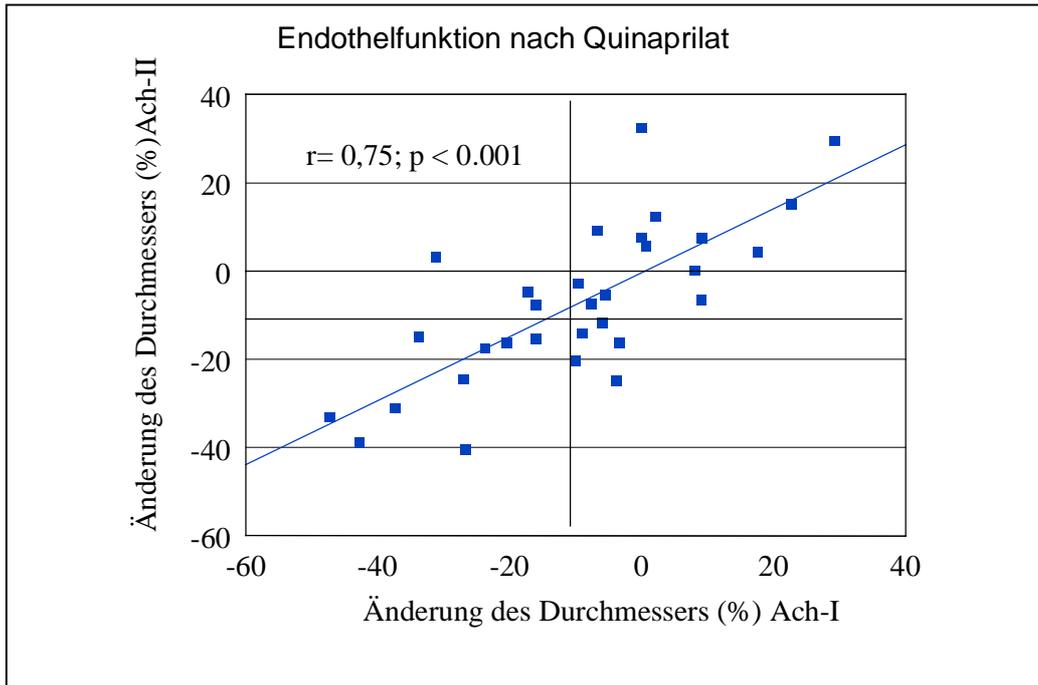


Abb.3.1.1.c: Einfluß von Q auf die epikardiale Endothelfunktion
 Ach-I: Acetylcholin 150 µg/5min vor Quinaprilatinfusion
 Ach-II: Acetylcholin 150 µg/5min nach Quinaprilatinfusion

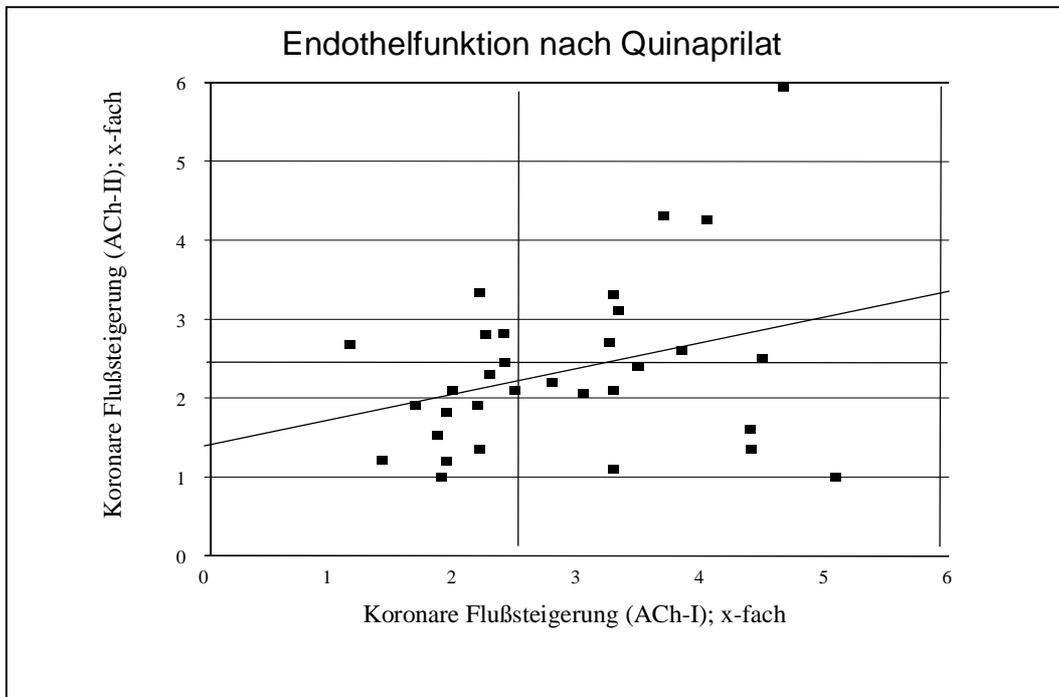


Abb.3.1.1.d: Einfluß von Q auf die mikrovaskuläre Endothelfunktion
 Ach-I: Acetylcholin 150 µg/5 min vor Quinaprilatinfusion
 Ach-II: Acetylcholin 150 µg/5 min nach Quinaprilatinfusion

Nach Quinaprilat ist zunächst eine tendenziell verminderte, endothelabhängige Flußsteigerung zu beobachten. Eine Erklärung dafür ist möglicherweise eine Erschöpfung der NO-Produktion. Für das nachfolgend untersuchte Patientenkollektiv wird deshalb das Protokoll um eine zusätzliche L-Argininfusion zu den Acetylcholininfusionen vor und nach Q erweitert. Tatsächlich kann damit die mikrovaskuläre Acetylcholinantwort wiederhergestellt werden:

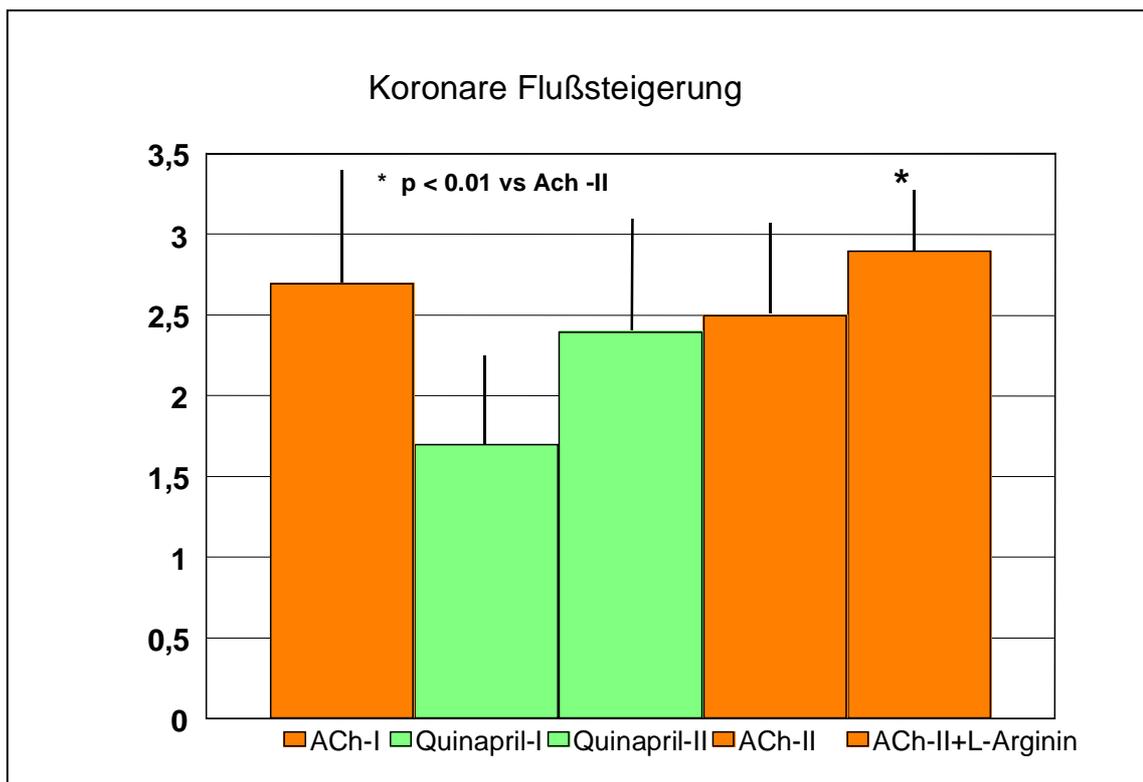


Abb.3.1.1.e: Einfluß einer zusätzlichen L-Argininfusion auf die mikrovaskuläre Endothelfunktion nach Q

Ach-I: Acetylcholin 150 µg/5 min vor Quinaprilatinfusion

Ach-II: Acetylcholin 150 µg/5 min nach Quinaprilatinfusion

Quinapril-I: 1,5 mg/3 min

Quinapril-II: 5 mg/5 min

Ach-II + L-Arginin: Acetylcholin 150 µg/5 min, L-Arginin 1 mmol/5 min

Die vorliegende Studie ergibt für den ACE-Hemmer Quinaprilat (Q) somit folgende akut wirksame Effekte bei herztransplantierten Patienten:

Q bewirkt eine signifikante, konzentrationsabhängige Änderung des Ruhetonus ohne Beeinflussung von Herzfrequenz und Blutdruck.

Epikardiale Gefäßdurchmesser nehmen unter der höchsten Q-Dosierung um $10 \pm 10\%$ (distal > proximal) zu. Dabei besteht keine Korrelation zu bereits im intrakoronaren Ultraschall diagnostizierbaren morphologischen Veränderungen.

Die koronare Blutflußreserve (CFR) steigt nach Q II um den $2,2 \pm 0,5$ fachen Wert an.

Q bewirkt bei Patienten mit einer epikardialen Endotheldysfunktion (Def.: >10 % Vasokonstriktion nach Acetylcholin) eine Verbesserung der Acetylcholin vermittelten Vasomotorik um 26 % ($p < 0,05$).

Die mikrovaskuläre Endotheldysfunktion (Def.: < 2,5 fache Flußsteigerung nach Acetylcholin) ist nach Q akut bei 25 % der Patienten reversibel, wird jedoch bezogen auf das Gesamtkollektiv nicht signifikant verbessert.

3.1.2. Interaktion von Quinaprilat mit vaskulärem Glutathion

Wesentlicher Bestandteil der protektiven Mechanismen von ACE-Hemmern sind antioxidative Effekte. Ein etablierter Marker für oxidativen Stress ist der Glutathionstatus im Gewebe bzw. im Blut (*Ferrari R et al, 1990*). Dieser bezeichnet den Gehalt an Gesamtglutathion sowie das Verhältnis von reduziertem Glutathion zu seiner oxidierten Disulfidform (vgl 1.4.3.).

3.1.2.1. Ergebnisse der Patientenstudie

Zunächst wurden zirkulierende Plasmaspiegel von Gesamtglutathion vor und nach Q im enzymatischen Assay bestimmt. Gesamtglutathion bedeutet dabei GSH-Spiegel plus den doppelten Wert der GSSG-Spiegel.

Literaturangaben für Plasmaglutathionspiegel variieren zwischen $2,22 \mu\text{M}$ und $11,36 \mu\text{M}$ (*Michelet F et al, 1995*) bei gesunden Probanden. Die Mittelwerte für die herztransplantierten Patienten betragen $2,87 \pm 1,16 \mu\text{M}$ vor vs $2,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$ nach Quinaprilat. Bei der Bestimmung von Gesamtglutathion in peripher entnommenen Plasmaproben ist somit eine deutliche Abnahme an Gesamtglutathion ($26 \pm 0,22\%$; $p < 0,01$) nach Quinaprilat feststellbar:

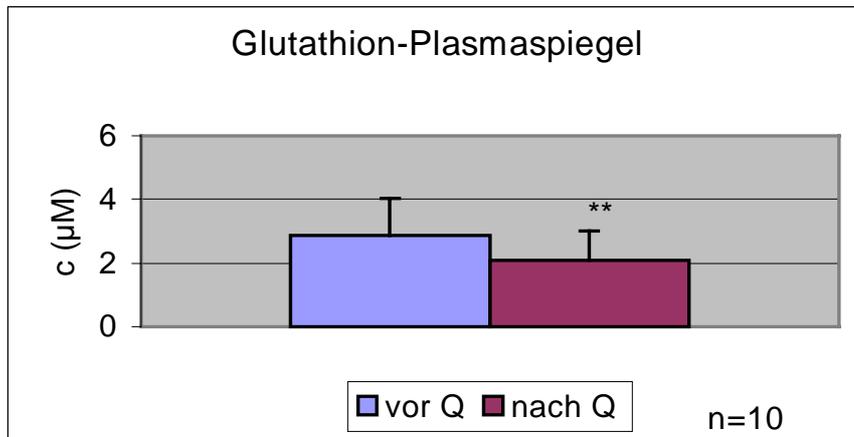


Abb.3.1.2.1.a: Akuter Effekt von Q auf Gesamtglutathion
Q: Quinaprilat ic

Für ein Kollektiv von 10 Patienten können GSH und GSSG direkt aus arteriellen (art) und koronarvenösen (cv) Blutproben mit der beschriebenen HPLC-Methode bestimmt (vgl. 2.2.4.) werden. Da Glutathion intrazellulär - auch in Erythrozyten - ca. 100fach höher konzentriert vorkommt als extrazellulär (*Michelet F et al, 1995*), wobei mehr als 99% des intrazellulären Glutathions in reduzierter Form vorliegen (*Siems W et al, 1996*), führen bereits geringe Hämolyseanteile zu verfälschten Plasmawerten. Deshalb erscheint es sinnvoll, Glutathion grundsätzlich nach vollständiger Hämolyse im Vollblut zu bestimmen. Ebenso werden eventuelle Änderungen des Hämatokrits während der Infusionen in die Berechnungen einbezogen (vgl. 2.2.4.).

Die gemessenen GSH-Werte sind in Tabelle 3.1.2.1.a aufgeführt:

n=10	cGSH (mM) pre	cGSH (mM) post
art	0,34±0,17	0,13±0,06
cv	0,41±0,22	0,15±0,06

Tab.3.1.2.1.a: Konzentration von GSH vor und nach Q im Vollblut

Durch die Quinaprilatinfusion wird GSH arteriell um 47 ± 44 % ($p = 0,007$), koronarvenös um 58 ± 21 % ($p = 0,002$) reduziert.

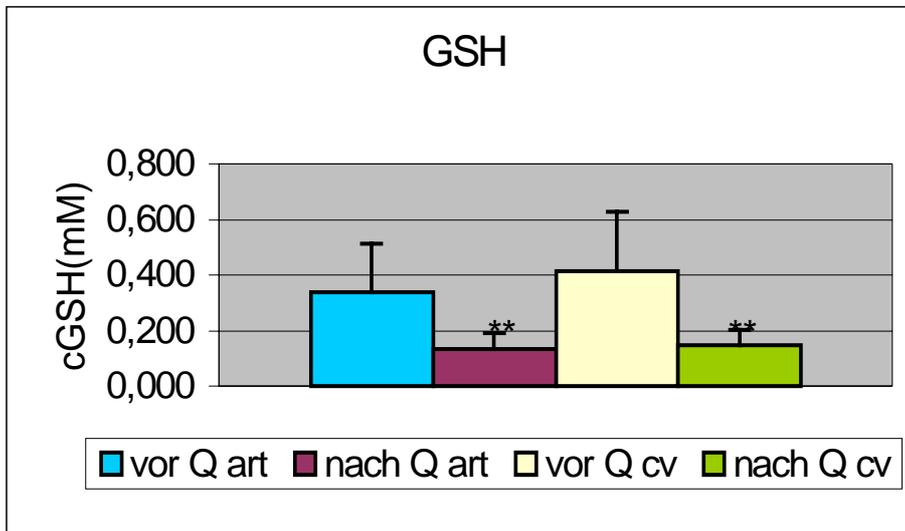


Abb.3.1.2.1.b: Akuter Effekt von Q auf GSH
Q: Quinaprilat i.c.

7 von 10 Patienten weisen meßbare GSSG-Spiegel ($> 0,006 \mu\text{M}$) auf: $0,246 \pm 0,153 \mu\text{M}$ art; $0,189 \pm 0,093$ cv. Dies kann ein Hinweis auf systemischen oxidativen Streß sein. Eine zusätzliche transkardiale GSSG-Freisetzung erfolgt nicht. Die Quinaprilatinfusion führt zu keiner signifikanten Änderung der GSSG-Spiegel, wobei jedoch tendenziell eine Verminderung erkennbar ist.

Die Verminderung der GSH-Spiegel ist im Patientenkollektiv, das zusätzlich L-Arginin erhielt, noch stärker ausgeprägt als bei den Patienten ohne L-Arginininfusion :

ohne L-Arg: -31 ± 23 % art; -46 ± 14 % cv; $n = 4$, n.s.

mit L-Arg: -58 ± 18 % art; -67 ± 4 % cv; $n = 6$, $p < 0,05$.

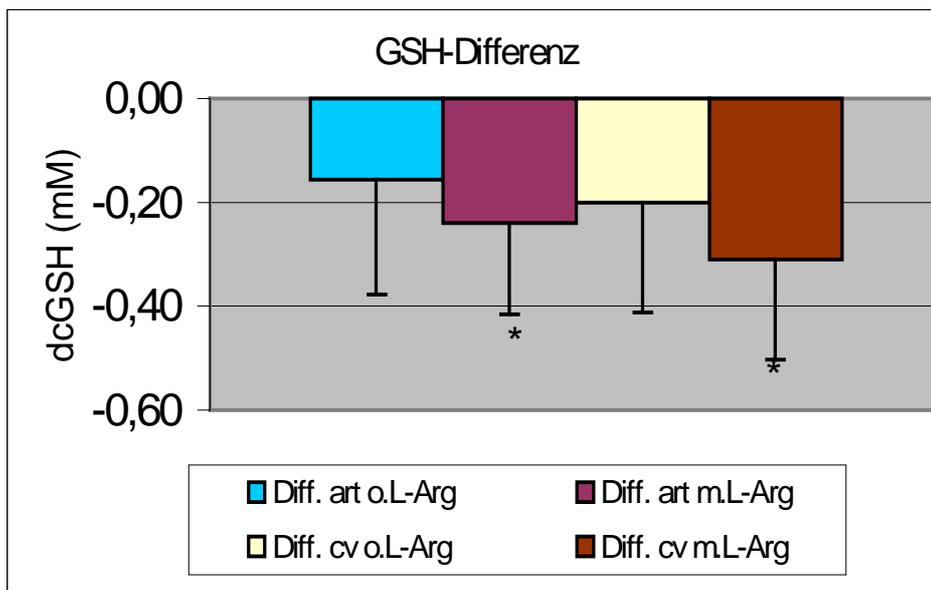


Abb.3.1.2.1.c: Vergleich der Glutathiondifferenzen (dcGSH) in den Patientenkollektiven ohne und mit L-Arginingabe

3.1.2.2. *In vitro* Tests in Vollblut zum akuten Effekt von Quinaprilat auf GSH

Zur genaueren Charakterisierung des in der Studie beobachteten akuten Effektes der Quinaprilatinfusion auf GSH-Blutspiegel werden ergänzende *in vitro* Tests im Vollblutproben angeschlossen.

In Vorversuchen wird zunächst geprüft, ob auch eine direkte Interaktion des Quinaprilatmoleküls mit in Betracht zu ziehen ist. Glutathion kann spontan oder katalysiert durch Glutathiontransferasen zahlreiche Konjugate bilden (Wang *W et al.*, 1998). Allerdings sprechen allein die Verhältnisse von Quinaprilatplasmakonzentration und der gemessenen Differenz der Glutathionkonzentration (dcGSH) gegen einen solchen direkten Effekt als entscheidenden Mechanismus:

Errechnete Q-Konz: ca $1,5 \times 10^{-5}$ M

dc (GSH)art: 0,21mM.

In zwei unabhängigen Tests wird EDTA-Blut über 5 min bei 37°C mit PBS (Kontrolle) bzw. 10^{-5} M (Q1) und 10^{-7} M (Q2) Quinaprilat inkubiert. Es ergeben sich keine Unterschiede in den GSH- und GSSG-Konzentrationen. Eine direkte Reaktion von GSH mit den Quinaprilatmolekül ist somit nicht erfolgt.

Analog wird in EDTA-Blut NO-Gas in zwei verschiedenen Konzentrationen über 2 min eingeleitet, um den postulierten (endothelabhängigen) NO-Effekt einer Abnahme von Glutathion durch Bildung von Nitrosoglutathion zu prüfen. Die Blutproben werden sofort entsprechend den Patientenblutproben verarbeitet. Bestimmt werden die Konzentrationen von GSH, GSSG und GSNO. Für GSH ergibt sich in Abhängigkeit von der eingeleiteten NO-Menge eine Abnahme von GSH. Bei einer NO-Konzentration unterhalb 100 μM wird ein größerer Anteil an GSNO und GSSG (11 % bzw. 25 % des ursprünglichen GSH, $p < 0,05$) gebildet, während bei sehr hoher NO-Konzentration eine stärkere Oxidation erfolgt. In unbehandeltem Kontrollblut ist weder GSNO noch GSSG nachweisbar.

Parallel dazu wird Blut direkt mit dem NO-Donor GSNO (400 μM) über 5 min inkubiert. In den mit GSNO inkubierten Proben erfolgt eine deutliche Abnahme von GSH verbunden mit einem Anstieg von GSSG.

Die Ergebnisse sind in Abb.3.1.2.2.a zusammengefaßt:

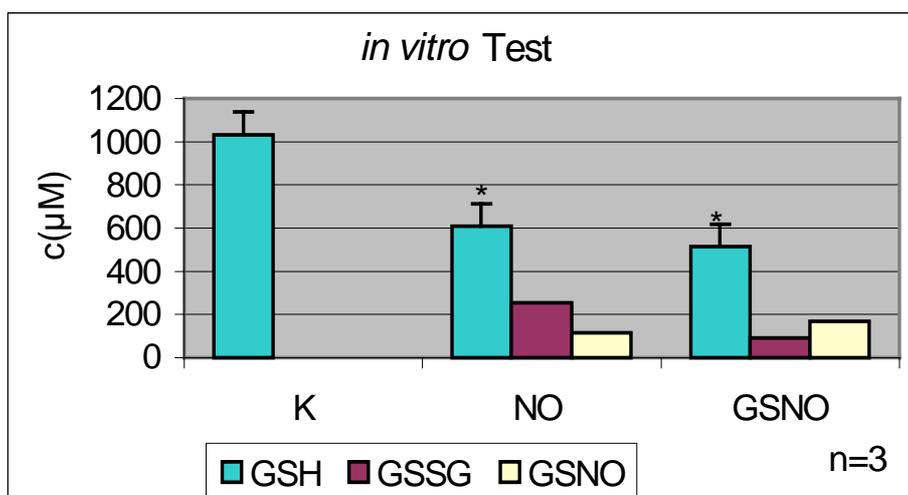


Abb.3.1.2.2.a: Effekte von NO und GSNO auf Vollblutspiegel von GSH, GSSG, GSNO

K: Kontrollblut nach 5 min

NO: NOs < 100 μM , 2 min

GSNO: GSNO 400 μM , 5 min

Diese Resultate korrelieren sehr gut mit den Daten der Patientenstudie und unterstützen den Erklärungsansatz, daß durch die Infusion von Quinaprilat eine starke NO-Freisetzung erfolgt, die auch in einer vorübergehenden Abnahme der

GSH-Spiegel zum Ausdruck kommt. Da in vivo komplexere Bedingungen vorliegen und aus dem Intermediärprodukt GSNO - vermittelt v.a. durch verschiedene Enzyme und reduzierende Verbindungen - eine Vielzahl von Folgeprodukten in unterschiedlichen Geweben entstehen können (vgl.4.1.), erfolgt kein Anstieg von GSSG im Blut.

3.1.3. Akute Effekte von Quinaprilat auf koronare Endothelinspiegel

Als stark vasokonstriktorisches, proliferationsförderndes Peptid ist Endothelin- 1 (ET-1) ein Mediator koronarer Endotheldysfunktion und Atherosklerose (*Lerman A et al, 1995*). Die endothelprotektiven Effekte von ACE-Hemmern beinhalten insbesondere komplexe Interaktionen mit dem Endothelinsystem (vgl. Kap.1.5.), die im Wesentlichen eine daraus resultierende Hemmung der ET-Produktion erwarten lassen.

Im Rahmen der vorliegenden Patientenstudie wurde der akute Effekt der i.c. Quinaprilatinfusion auf arterielle und koronarvenöse Endothelin-Plasmaspiegel, bzw. auf die transkardiale Freisetzung oder Aufnahme untersucht. Dazu wurden mit Trasylol stabilisierte EDTA-Plasmaproben verwendet .

Die Normwerte des ELISA für humanes EDTA-Plasma gesunder Kontrollpersonen liegen zwischen 0,2 und 0,7 fmol Endothelin/ml. Bei den Patienten nach Herztransplantation liegen die Werte bei $0,67 \pm 0,57$ im arteriellen Blut und $0,85 \pm 0,73$ fmol/ml im Koronarsinusblut. 3 Patienten weisen Konzentrationen über 1fmol/ml auf. Die akute Quinaprilatinfusion bewirkte keine signifikanten Änderungen der Endothelinspiegel:

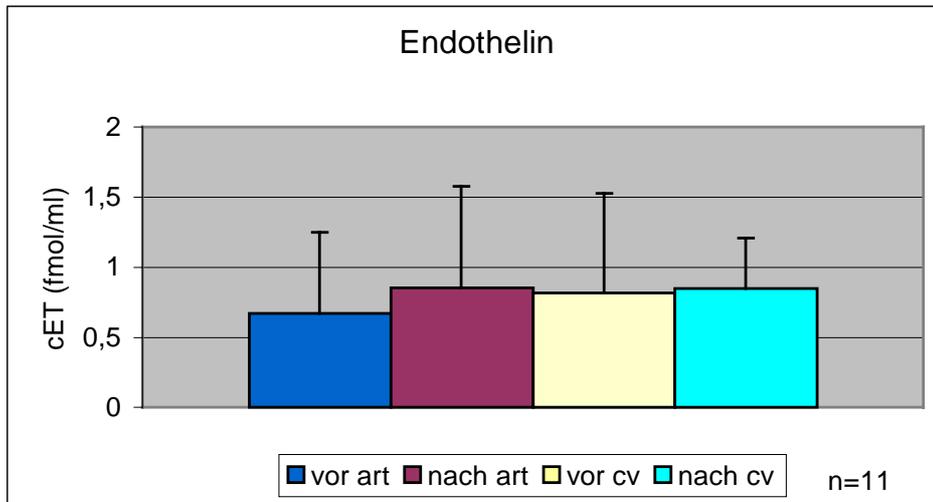


Abb.3.1.3.a: Endothelinplasmaspiegel vor und nach Quinaprilat i.c.
 art: arterielle Konzentration
 cv: koronarvenöse Konzentration

Der transkardiale Gradient (arteriovenöse Differenz, $AVD = c(ET)_{cv} - c(ET)_{art}$) wird durch Quinaprilat in Richtung eines uptakes verändert (AVD vor Q: $0,14 \pm 0,36$ fmol/ml; AVD nach Q: $-0,09 \pm 0,25$, n.s.). Vor Quinaprilat zeigen 7 der 11 Patienten eine transkardiale Endothelinfreisetzung, nach Quinaprilat noch 4.

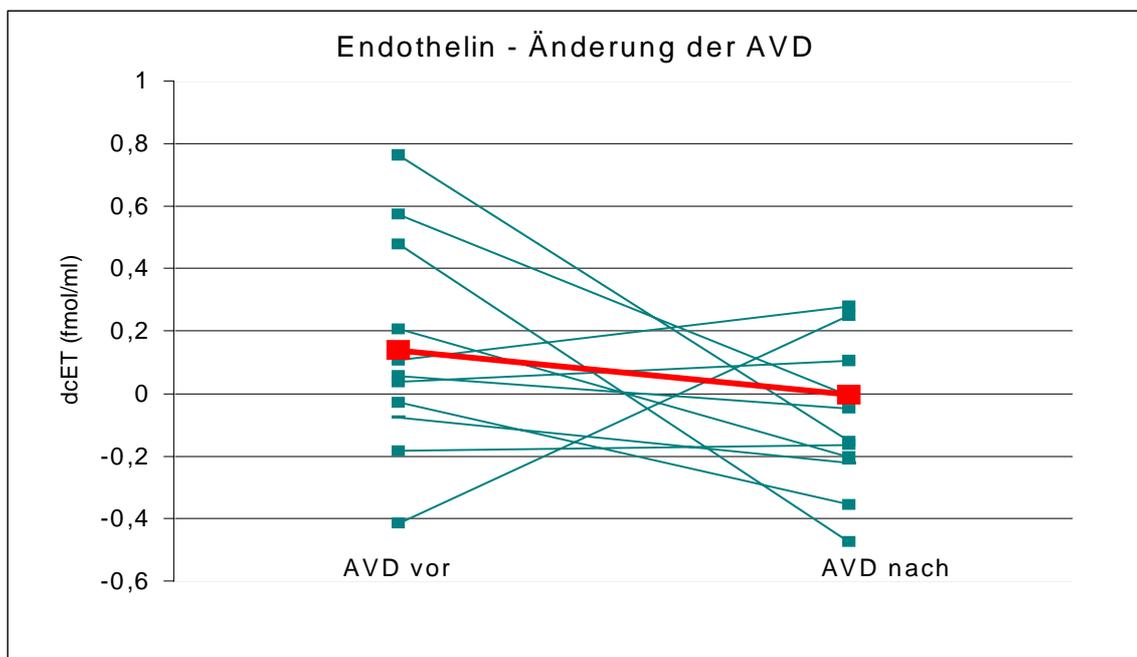


Abb.3.1.3.b: Akuter Effekt von Quinaprilat i.c. auf den transkardialen Endothelingradienten
 AVD: transkardialer Gradient ($AVD = c(ET)_{cv} - c(ET)_{art}$)

Während die akute Quinaprilatgabe im untersuchten Patientenkollektiv somit noch keine signifikante Verminderung der Endothelinplasmaspiegel bewirken kann, stellt eine Beeinflussung des transkardialen Gradienten möglicherweise einen interessanten Aspekt dar.

3.1.4. Akute Effekte von Quinaprilat i.c. auf koronare 3-Nitrotyrosinspiegel

Während NO in niedrigen Konzentrationsbereichen direkte physiologische und gefäßprotektive Effekte vermittelt, kommt es bei hohen lokalen NO-Konzentrationen unter Beteiligung von Sauerstoff und Superoxidanionen zur Bildung reaktiver Stickstoffverbindungen (RNS). Stabiler Marker für RNS ist freies und proteingebundenes 3-Nitrotyrosin (3-NT) (vgl. Kap 1.4.4.). Mit neuen ELISA-Verfahren kann 3-NT direkt in humanem Plasma bestimmt werden.

Für 8 Patienten werden die 3-NT-Konzentrationen, ausgedrückt als Nitro-BSA-Äquivalente in arteriellen und koronarvenösen Plasmaproben vor und nach Quinaprilat bestimmt.

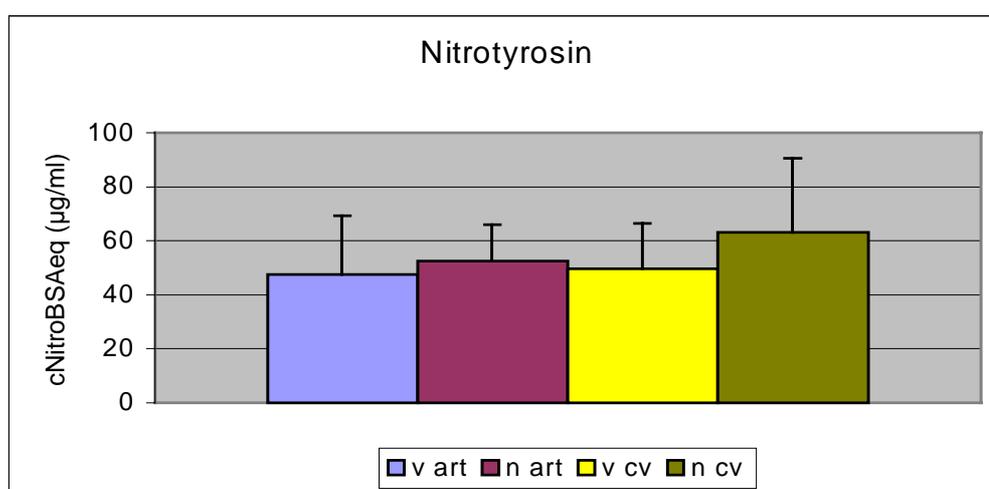


Abb.3.1.4.a: Akuter Effekt von Quinaprilat i.c. auf 3-NT-Plasmaspiegel
NitroBSAeq: Nitro-BSA-Äquivalente

Die Veränderungen unter Quinaprilat sind nicht signifikant. Die tendenziell erkennbare Zunahme an 3-NT, vor allem im Koronarsinusblut, kann jedoch mit einer starken Zunahme an lokal gebildetem NO (vgl. 5.1.) in Zusammenhang stehen.

3.2. Zellkultur

3.2.1 Direkte Messung der NO-Freisetzung von PAEC mit DAF-2

Die gefäßprotektiven Effekte von ACE-Hemmern werden überwiegend vermittelt durch eine verbesserte endotheliale NO-Freisetzung (vgl.1.3.3.). Deshalb wird die NO-Produktion im verwendeten Modell aortaler Endothelzellen vom Schwein (PAEC) untersucht. Neue Fluoreszenzindikatoren ermöglichen eine direkte sensitive Bestimmung von NO in Endothelzellkulturen mit einer Detektionsgrenze von 2-5 nM (*Nakatsubo N et al, 1998*). Freigesetztes NO reagiert sofort mit dem nicht zellmembranpermeablen Fluoreszenzindikator DAF-2 zum grünfluoreszierenden Triazolfluorescein (DAF-2 T).

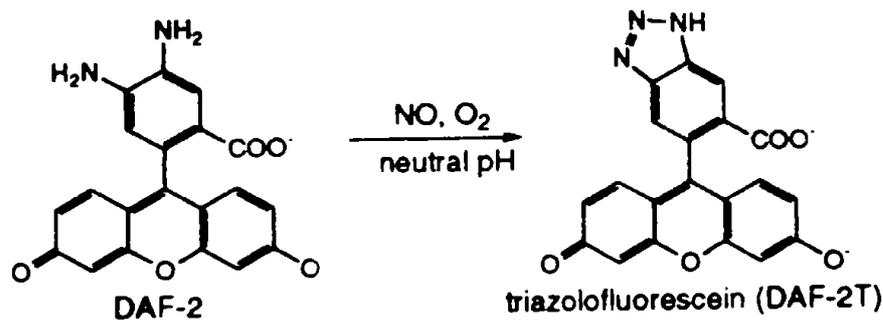


Abb.3.2.1.a: Strukturen von DAF-2 und DAF-2 T

Um die Funktionsfähigkeit des Verfahrens zu testen, wird die NO-Produktion der Zellen mit L-Nitroarginin (L-NA), einem Inhibitor der eNOS, gehemmt.

Die im PAEC-Überstand erzielte Fluoreszenzintensität wird dabei signifikant vermindert: 39 % ($p = 0,02$) bei Vorinkubation mit 100 μ M L-NA über 30 min und anschließender Inkubation mit DAF-2 über 70 min.

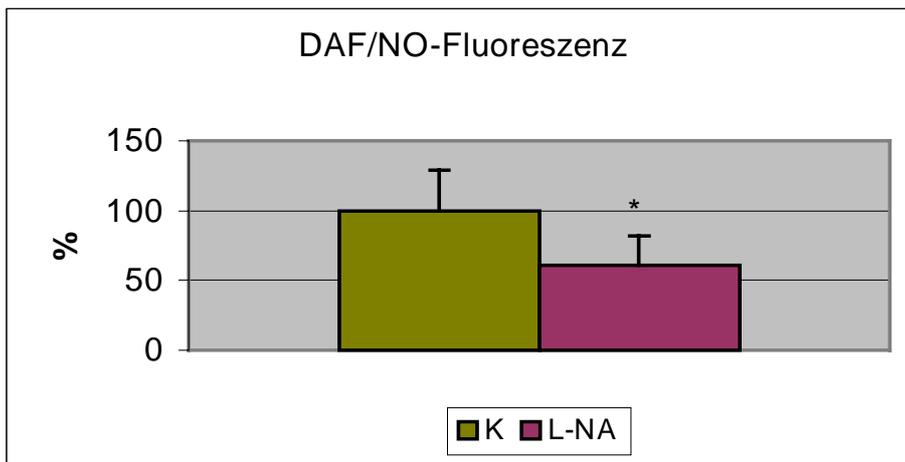


Abb.3.2.1.b: Detektion der basalen NO-Produktion von PAEC mit DAF-2
 K: Kontrolle
 L-NA: L-Nitroarginin 100 µM

Die NO-Produktion von PAEC lässt sich somit im Überstand mit DAF-2 bestimmen und durch L-NA blockieren.

Wird dem Inkubationspuffer zur Verhinderung eines möglicherweise limitierenden Substratmangels L-Arginin zugegeben, ist zusätzlich eine deutliche Steigerung der NO-Freisetzung erkennbar.

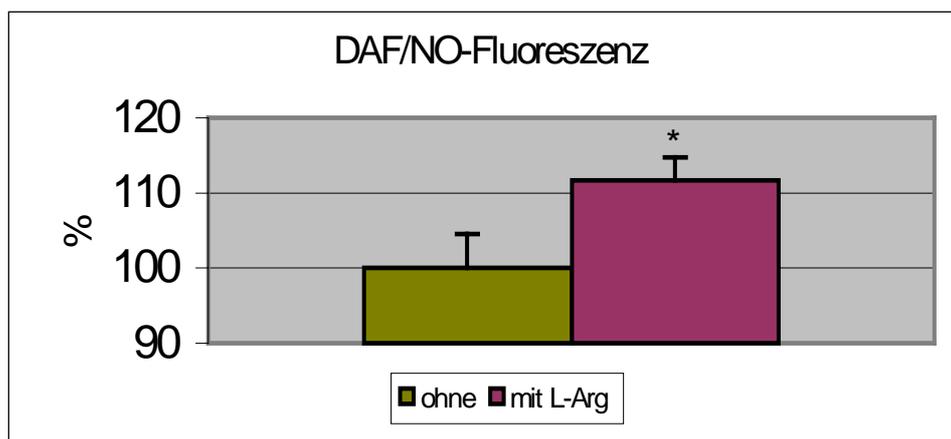


Abb.3.2.1.c: Basale NO-Produktion von PAEC mit und ohne L-Arginin 100 µM
 Inkubationszeit 0,5 h, n = 3

Die beschriebenen Effekte bestätigen damit die Zuverlässigkeit der Methode.

Unter Quinaprilat bzw. Quinaprilat mit Zusatz von exogenem Bradykinin ist in allen Versuchen eine gesteigerte NO-Produktion erkennbar. Die Unterschiede sind hier unter den durch das Detektionssystem vorgegebenen Bedingungen jedoch nicht signifikant.

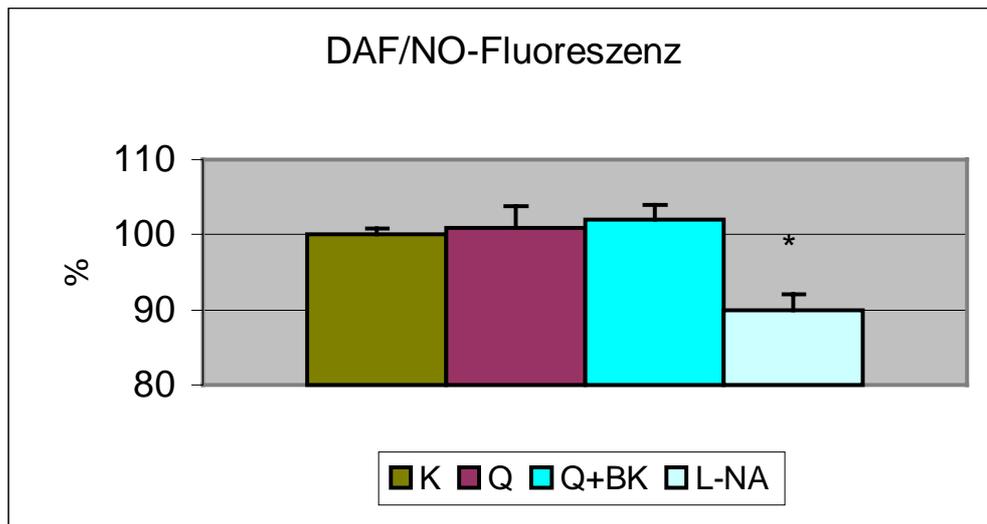


Abb.3.2.1.d: NO-Produktion von PAEC mit Quinaprilat
Fluoreszenz nach 0,5 h, n = 3
K: Kontrolle
Q: Quinaprilat 10^{-6} M
BK: Bradykinin 10^{-6} M
L-NA: L-Nitroarginin $100 \mu\text{M}$

Als Grundlage für die *in vitro* Versuche mit Quinaprilat kann mit der optimierten Fluoreszenzindikatormethode nachgewiesen werden, dass die verwendeten PAEC sowohl eine basale als auch eine stimulierbare NO-Produktion aufweisen.

3.2.2 Effekte von Quinaprilat auf die endotheliale Endothelinfreisetzung

Die verwendeten aortalen Endothelzellen vom Schwein (PAEC) weisen eine basal hohe ET-Produktion auf. Diese kann mit der Teilungsaktivität der Zellkultur variieren (*Ranta V et al, 1997*). Deshalb werden konfluente Monolayer 24 h bei minimaler Serumkonzentration (DMEM 1 %) vorinkubiert und somit stets in ruhenden, wenig teilungsaktiven Zellen gemessen.

Die basale Endothelinkonzentration im Überstand nimmt über 24 h linear zu. Folglich wird für weitere Versuche zur Beeinflussung der Endothelinfreisetzung jeweils Medium nach 6 bzw. 24 h Inkubationszeit abgenommen.

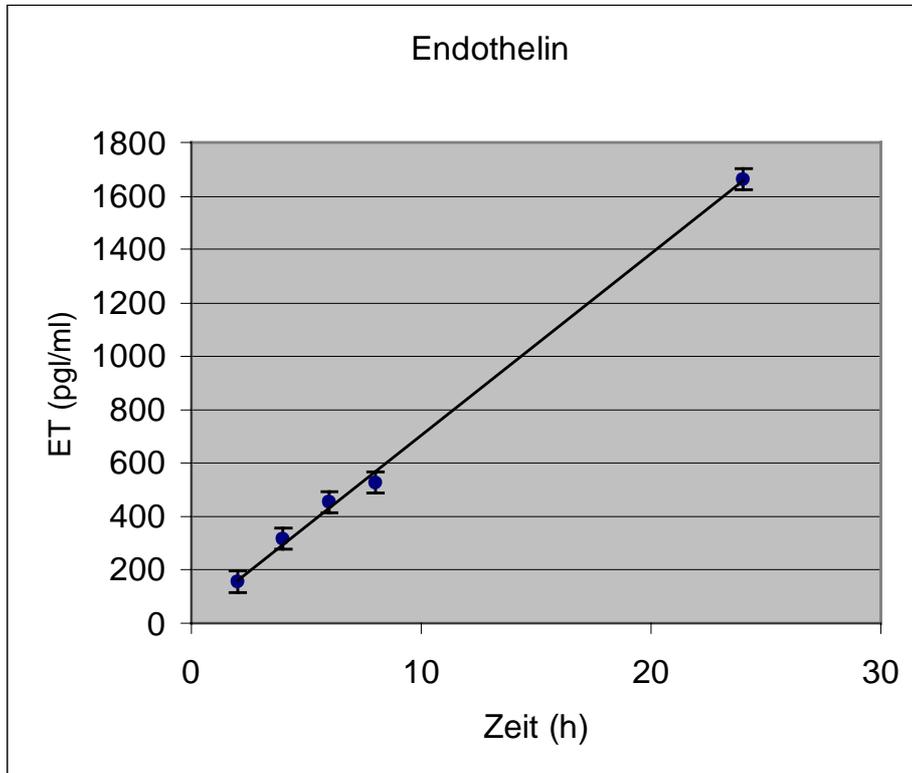


Abb 3.2.2.a: Kinetik der ET-Freisetzung von PAEC (1.Passage)
Inkubation in DMEM 1% nach 24 h Vorinkubation in DMEM 1%
Bestimmung der Konzentration im Medium (ELISA)

In Tab.3.2.2.a sind die Mittelwerte der ET-Konzentration (6-well, 2ml Überstand) zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten angegeben. 1 pg ET entspricht dabei 0,4 fmol ET.

(n=3)	2h	4h	6h	8h	24h
Mittelwert ET (pg/ml)	156 ± 19	317 ± 35	454 ± 10	527 ± 44	1663 ± 261

Tab 3.2.2.a: Daten zu Abb 3.2.2.a

Entscheidend für die Verwendbarkeit dieses Zellkulturmodells ist neben der vorhandenen ET-Produktion auch deren Regulationsfähigkeit, erkennbar als Aktivierung bzw. Hemmung.

Die endotheliale ET-Freisetzung kann durch unterschiedliche Faktoren aktiviert werden (vgl.1.5., *Schiffrin EL et al, 1998*). Dazu zählen Thrombin, Lipopolysaccharide und insbesondere Angiotensin II. Eine Hemmung der Freisetzung kann durch Phosphoramidon, einem Inhibitor des Endothelin Converting Enzyme (ECE), erfolgen.

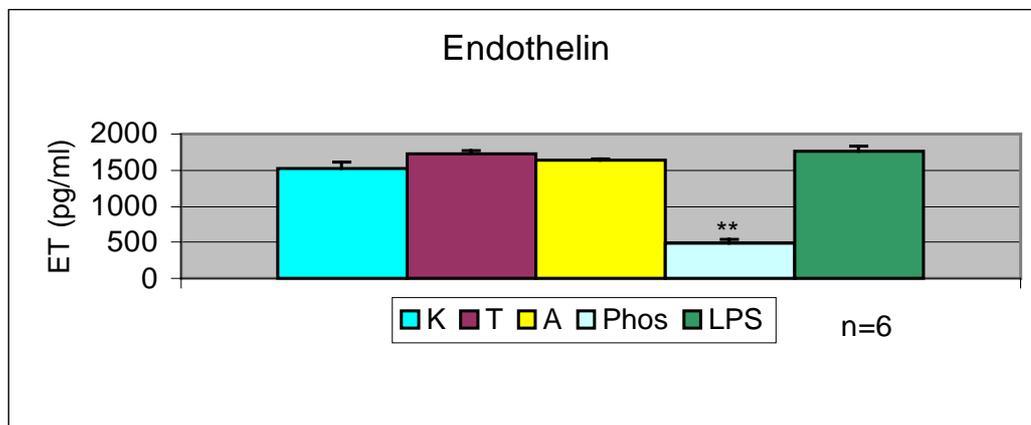


Abb 3.2.2.b: Stimulation und Hemmung der ET-Freisetzung von PAEC
 ET im Überstand nach 24 h Inkubationszeit
 K: Kontrolle
 T: Thrombin 1U/ml
 A: Angiotensin II 10⁻⁷ M
 Phos: Phosphoramidon 10⁻⁴ M
 LPS: Lipopolysaccharide 1 µg/ml.

Die ET-Freisetzung der PAEC läßt sich in allen Versuchsreihen durch unterschiedliche Aktivierung geringfügig (n.s.) steigern und mit Phosphoramidon über 60 % (p = 0,02) hemmen.

Um den Einfluss unterschiedlicher Zellzahlen in den einzelnen wells auszuschliessen, werden zusätzlich die gemessenen Werte auf die jeweilige Gesamtproteinmenge der einzelnen wells bezogen und das Ergebnis in pg ET/µg Protein ausgedrückt. Die Proteinmenge wird nach der Methode von Lowry bestimmt.

	Mittelwerte (pg/ml)	Mittelwerte(pg/ μ g)
K	1522 \pm 92	7,02 \pm 0,09
T	1733 \pm 40	7,61 \pm 0,38
A	1636 \pm 19	7,56 \pm 0,27
Phos	497 \pm 50	2,61 \pm 0,49
LPS	1762 \pm 67	7,86 \pm 0,62

Tab.3.2.2.b: Daten zu den Abbildungen 3.2.2.b und 3.2.2.d

Die im Überstand bestimmten Endothelinkonzentrationen korrelieren sehr gut mit den auf die Proteine bezogenen Werten:

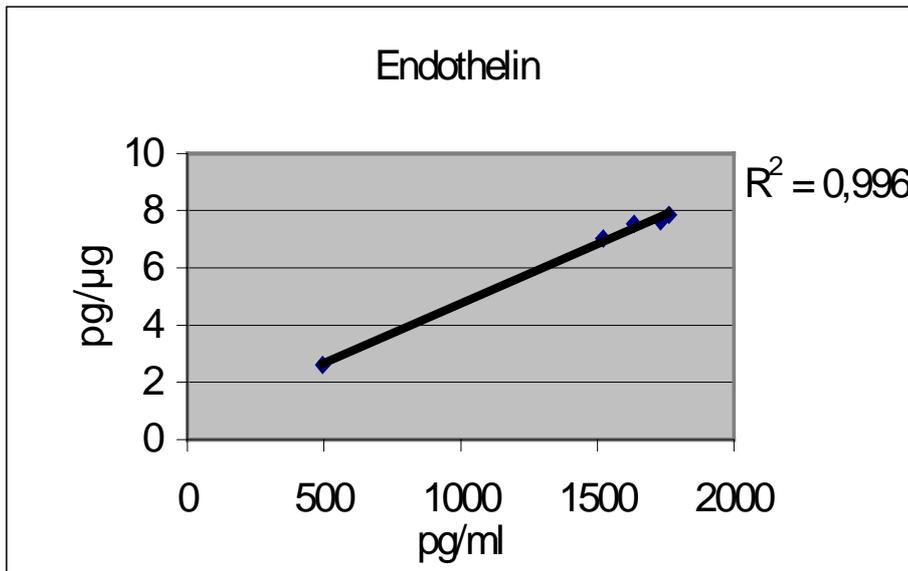


Abb.3.2.2.c: Korrelation der ET-Konzentration im Überstand (pg/ml Medium) zur freigesetzten ET-Menge bezogen auf Gesamtprotein (pg/ μ g Protein)

Bei konfluenten Monolayern mit vergleichbarer Proteinmenge bzw. Zellzahl pro well und ausreichender Versuchsgröße ($n \geq 6$) liefert somit die Bestimmung der ET-Konzentration im Medium zuverlässige Daten zur ET-Freisetzung. So wird auch das in Abb.3.2.2.b dargestellte Ergebnis zur Beeinflussbarkeit der Endothelinproduktion in PAEC durch Ermittlung der normierten Werte bestätigt:

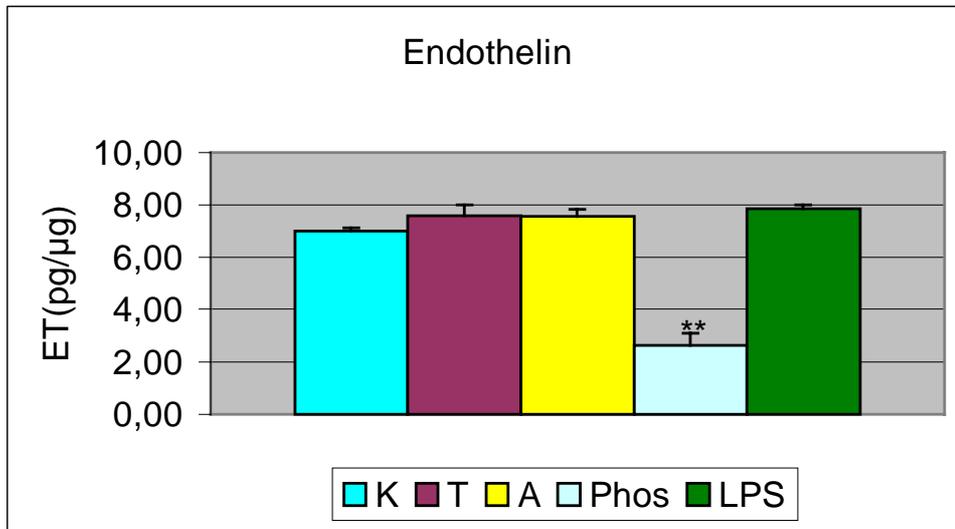


Abb.3.2.2.d: Normierung der sezernierten Menge an ET auf die Proteinmengen der Zellkultur

In den weiteren Versuchen kann folglich die Endothelinkonzentration im Überstand der wells direkt zur Ergebnisermittlung eingesetzt werden.

Sämtliche grundlegenden Versuche zum PAEC-Modell erfolgen zunächst mit der ELISA-Testmethode, die ohne radioaktive Komponenten durchgeführt werden kann. Nachteilig sind jedoch die verhältnismäßig hohen Kosten. Größere Versuchsreihen werden deshalb anschließend mit einer bereits gut etablierten RIA-Methode bearbeitet.

Die Vergleichbarkeit beider Methoden kann im Kontrollversuch mit Phosphoramidon gezeigt werden, das auch hier eine Hemmung über 60 % ($p < 0,01$) bewirkt (vgl. Abb.3.2.2.b).

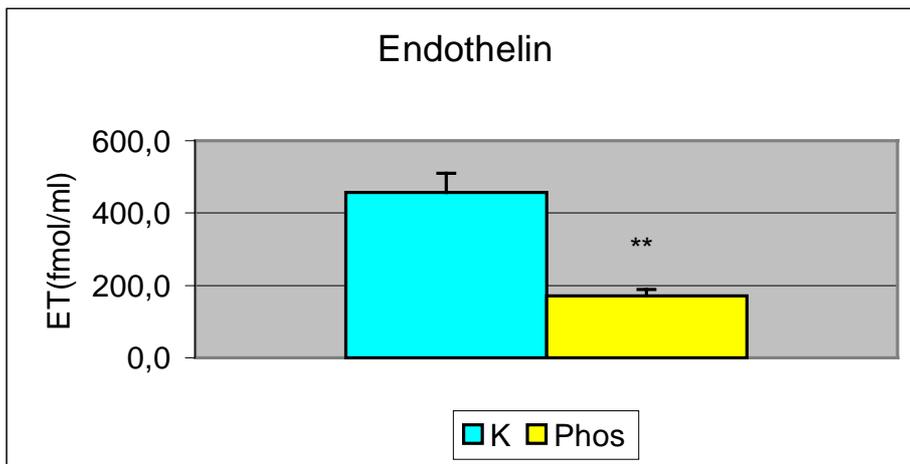


Abb.3.2.2.e: Kontrollversuch (RIA) zur Hemmung der ET-Sekretion durch Phosphoramidon
 Inkubationszeit 4 h, n = 6
 K: Kontrolle
 Phos: Phosphoramidon 10^{-4} M

Ziel der folgenden Versuche ist es - parallel zu den *in vivo* Bestimmungen im Rahmen der Patientenstudie (s. 3.1.) - den Einfluss von Quinaprilat *in vitro* am PAEC-Modell auf die endotheliale ET-Freisetzung zu prüfen.

Dazu werden PAEC nach einer Optimierung der Inkubationszeit (6 h) mit unterschiedlichen Quinaprilat-Konzentrationen auf den Einfluss des ACE-Hemmers auf die Endothelinproduktion untersucht. Quinaprilat (Q) bewirkt dabei in allen Versuchen eine Verminderung der basalen ET-Freisetzung:

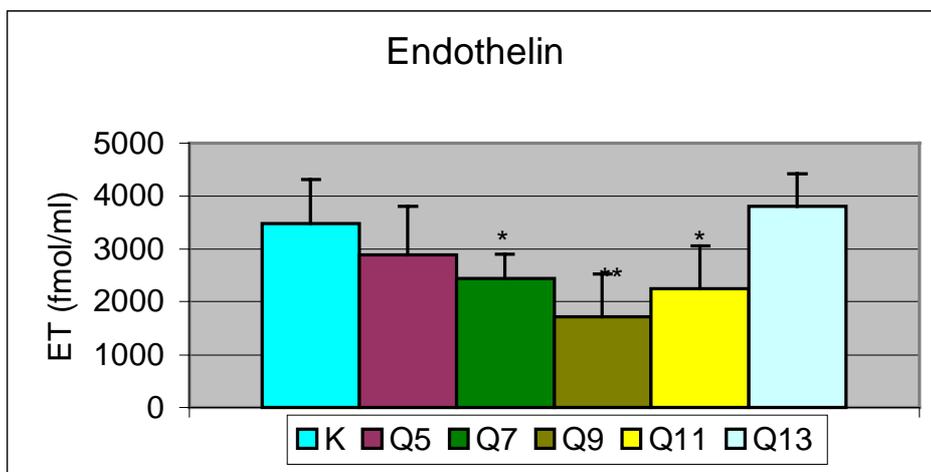


Abb.3.2.2.f: Hemmung der ET-Sekretion durch unterschiedliche Quinaprilatkonzentrationen:
 Inkubationszeit 6 h, n = 6
 K: Kontrolle
 Q5-Q13: Quinaprilat 10^{-5} M bis 10^{-13} M

Der inhibitorische Effekt von Q ist konzentrationsabhängig mit einem Maximum bei einer Konzentration $c(Q) = 10^{-9}$ M (51 % Hemmung, $p = 0,002$). Oberhalb einer Konzentration von $c(Q) = 10^{-7}$ M ist diese Wirkung geringer ausgeprägt.

Verschiedene ACE-Hemmer können sich in Ihrem Wirkprofil unterscheiden. Von zentraler Bedeutung ist dabei ihre Affinität zum Gewebe-ACE. Deshalb wurden entsprechende Versuche (3.2.2.f) mit Enalaprilat, einem ACE-Hemmer mit geringerer Affinität (vgl. 1.2.2.) durchgeführt:

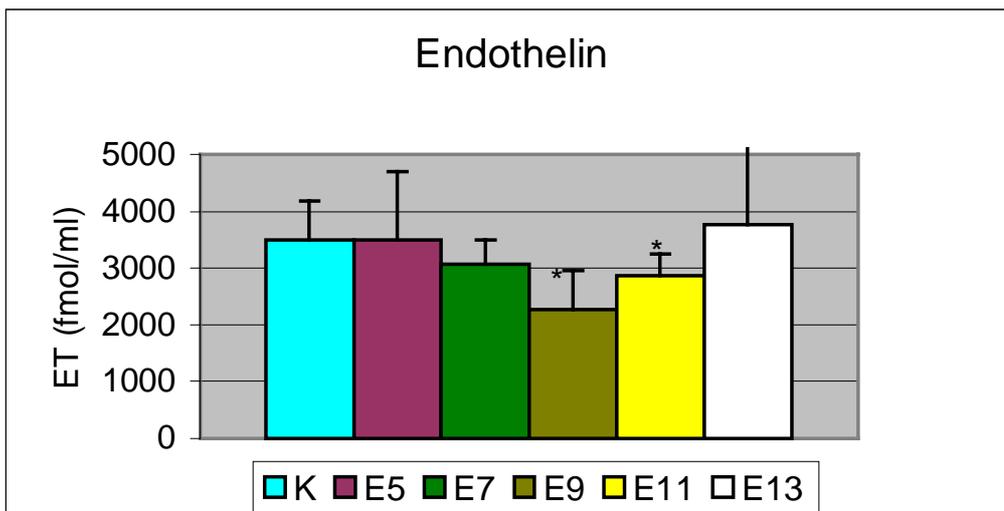


Abb.3.2.2.g: Vergleichender Versuch mit Enalaprilat
 K: Kontrolle
 E5 bis E13: Enalaprilat 10^{-5} M bis 10^{-13} M

Dabei ergibt sich eine mit Quinaprilat vergleichbare Konzentrationsabhängigkeit. Die maximale Hemmung mit $c(E) = 10^{-9}$ M ist jedoch geringer (35 %, $p = 0,01$).

Diese Differenz wird auch im direkten Vergleich bestätigt:

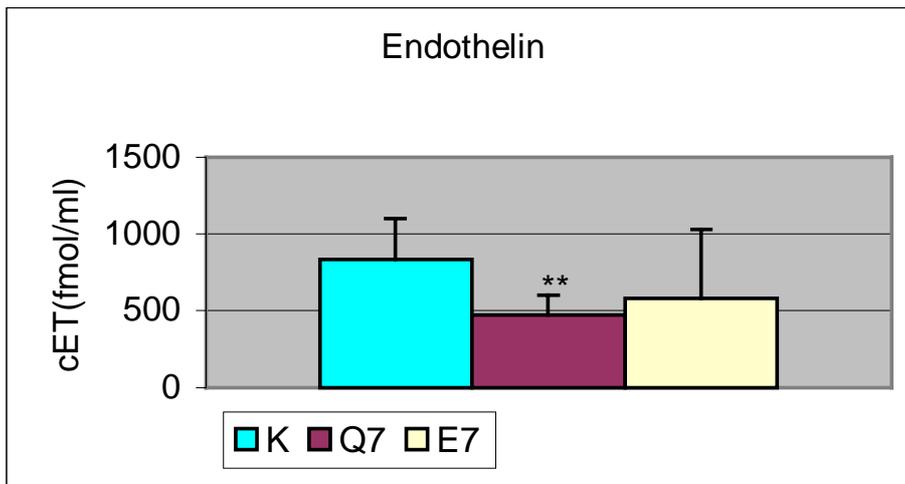


Abb.3.2.2.h: Parallelversuch mit Quinaprilat und Enalaprilat
 Inkubationszeit 6 h, n = 6
 Q7: Quinaprilat 10^{-7} M
 E7: Enalaprilat 10^{-7} M
 **: $p < 0,01$ vs Kontrolle

Dies korreliert klar mit der deutlich ausgeprägteren Gewebsaffinität von Quinaprilat im Vergleich zu Enalaprilat.

Mechanistische Studien zur Wirkung von Quinaprilat in dem von uns verwendeten PAEC-Modell werden durchgeführt. Für die Hemmung der Endothelinproduktion sind beide Wege (via Angiotensin oder via Bradykinin, s. Einleitung) von Bedeutung. ACE-Hemmer können den Abbau von Bradykinin vermindern und dessen Konzentration damit erhöhen. Deshalb wird der direkte Effekt unterschiedlicher Bradykininkonzentrationen geprüft:

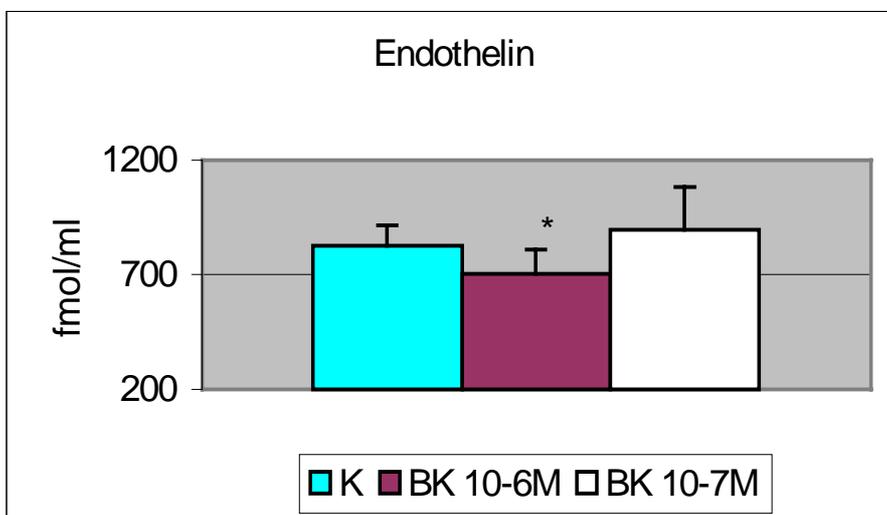


Abb.3.2.2.i: Effekt von Bradykinin auf die ET-Sekretion
 Inkubationszeit 6 h, n = 6
 K: Kontrolle
 BK: Bradykinin

Bradykinin 10^{-6} M vermindert die freigesetzte ET-Menge um 14 % ($p = 0,05$). Unterhalb dieser Konzentration tritt keine Hemmung mehr auf. Somit ist belegt, daß eine Erhöhung der Bradykininkonzentration einen wesentlichen Bestandteil der Hemmwirkung von Quinaprilat ausmacht.

Im Hinblick auf die Bedeutung der mikrovaskulären Endothelfunktion wird Quinaprilat auch in einem Modell mikrovaskulärer Zellen (HMEC-1) getestet. Zur Stimulation der ET-Produktion wird dabei $\text{TNF}\alpha$ verwendet.

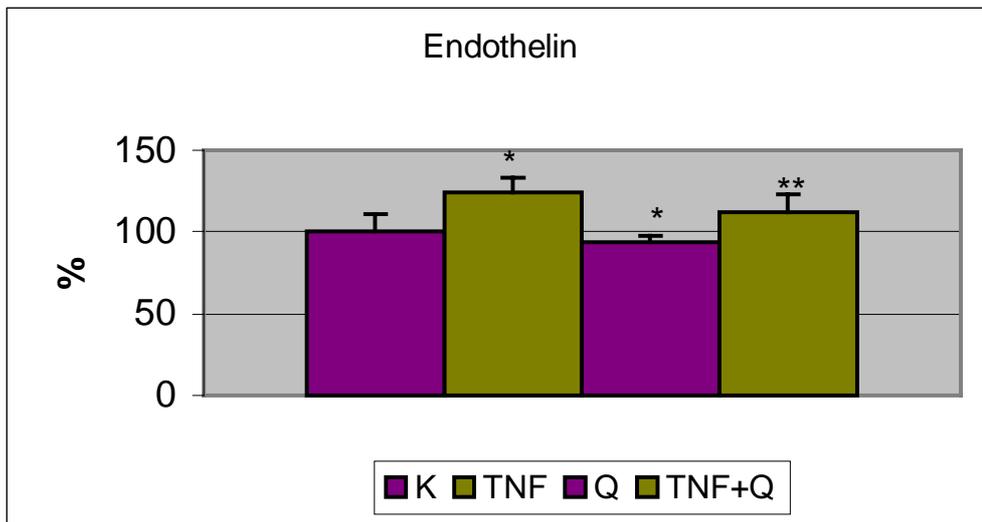


Abb.3.2.2.j: Effekte von Quinaprilat auf die ET-Sekretion mikrovaskulärer Zellen
 Inkubationszeit 6 h, n = 3
 K: Kontrolle
 Q: Quinaprilat 10^{-7} M
 TNF: 1 ng/ml
 * $p < 0,05$ vs Kontrolle
 ** $p < 0,05$ vs TNF

Die basale ET-Sekretion der HMEC-1 ist mit ca 90 pg/ml deutlich geringer als im PAEC-Modell mit ca 450 pg/ml nach 6 h Inkubation (bei vergleichbaren Proteinmengen).

Deutlich ist eine Aktivierung durch $\text{TNF}\alpha$ (+24 %, $p = 0,05$) erkennbar. Während die basale Freisetzung von Endothelin durch Quinaprilat nur geringfügig vermindert (-6 %, $p < 0,05$) wird, kann die stimulierte Freisetzung durch gleichzeitige Quinaprilatinkubation um 50 % ($p < 0,05$) gehemmt werden.

Zusammenfassend läßt sich sowohl in aortalen, als auch in mikrovaskulären Endothelzellen ein eindeutiger hemmender Einfluß des ACE-Hemmers Quinaprilat auf die basale bzw stimulierte endotheliale ET-Freisetzung zeigen.

3.2.3. Effekte von Quinaprilat auf endotheliale Glutathionspiegel

In Analogie zu der in der Patientenstudie beobachteten starken Abnahme der Glutathionspiegel im Vollblut, wird der Einfluß von Quinaprilat bzw. NO auf intrazelluläres Glutathion (GSH) im PAEC-Modell untersucht.

Basierend auf der Methode nach Tietze (*Tietze F, 1969*) wird dazu ein enzymatischer Assay neu entwickelt: Nach der Lyse der Endothelzellen in Triton X 100 (0,1 %) und Ausfällung der Proteine mit 2,5 %iger 5-Sulfosalicylsäure, kann Gesamtglutathion nach dem Abzentrifugieren im klaren Überstand photometrisch mit Ellmanns Reagenz (Dithionitrobenzol, DTNB) bestimmt werden.

Die Zunahme der Absorption des p-Nitrolatanions bei 412 nm pro Minute (dA/min) ist proportional zur Gesamtglutathionkonzentration in der Probe. Der lineare Zusammenhang ist in Abb.3.2.3.a mit einer GSH-Standardreihe dargestellt.

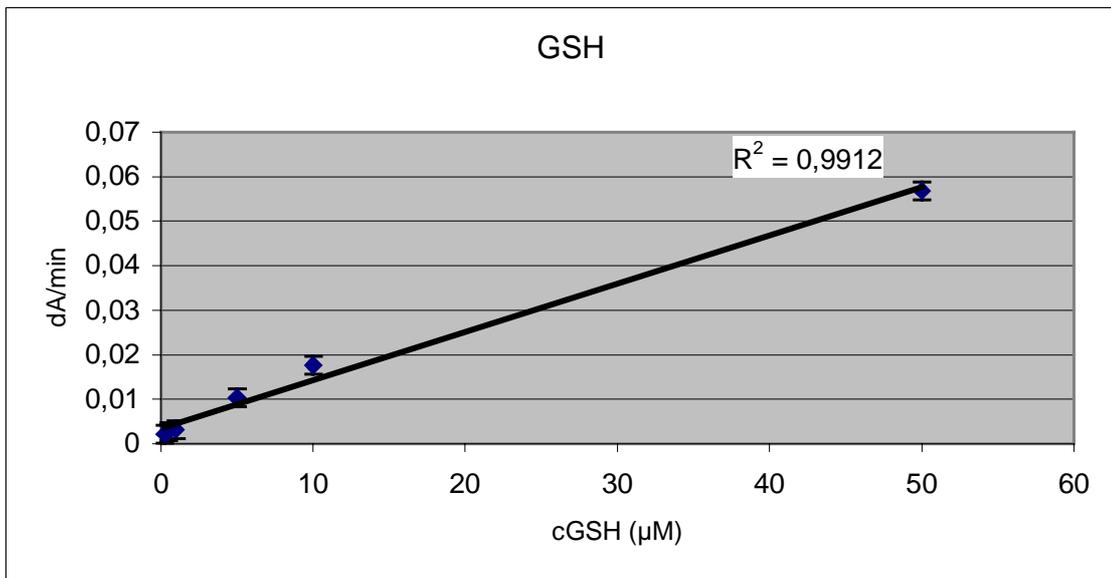


Abb.3.2.3.a: GSH-Standardreihe in 0,1 % Triton X 100, 2,5 % 5-Sulfosalicylsäure

Alle Versuche werden in 12-well-Platten durchgeführt. Die angegebenen GSH-Konzentrationen beziehen sich auf ein Lösungsvolumen von 1 ml Triton (0,1 %) pro well.

Um die Funktionsfähigkeit der Methode und die Spezifität des Glutathionnachweises zu bestätigen, werden die PAEC mit einem Inhibitor der Glutathionsynthese, Buthioninsulfoxim (BSO), inkubiert:

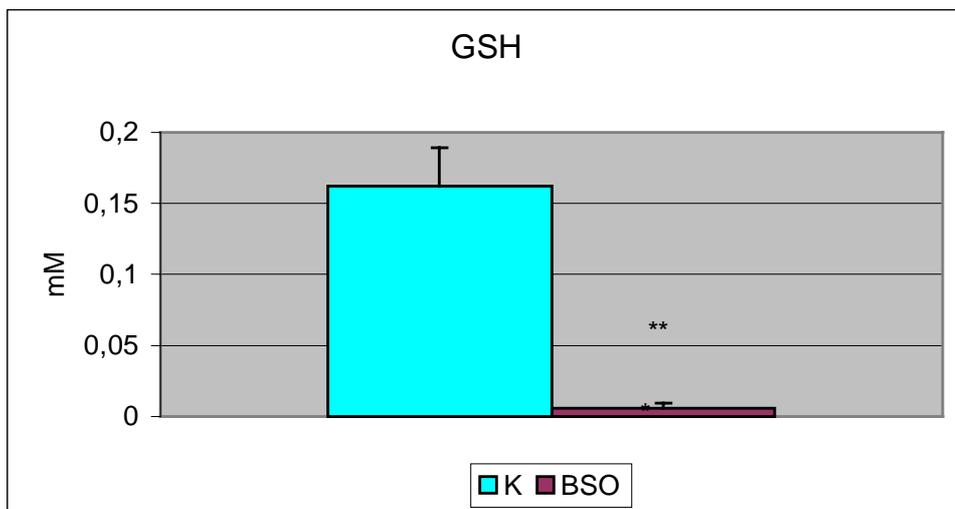


Abb.3.2.3.b: Hemmung der GSH-Synthese in PAEC mit BSO, 18 h Inkubation in 12 well mit DMEM 1 %
 K: Kontrolle
 BSO: Buthioninsulfoxim 125 μ M

Dies führt praktisch zum kompletten Verlust des gemessenen Glutathions.

Mit Quinaprilat ist im PAEC-Modell mit dem enzymatischen Verfahren eine tendenzielle, doch nicht signifikante Verminderung der GSH-Konzentration erkennbar. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß die unter diesen Versuchsbedingungen freigesetzte NO-Menge begrenzt ist. Deshalb wird der direkte Einfluß eines NO-Donors getestet. Ausgewählt wird SpermineNONOate (Sper/NO), welches 2 Mol NO pro Mol Sper/NO bei 37°C mit einer Halbwertszeit von 39 min freisetzt. Inkubationszeit ist 40 min in DMEM 1 %.

Damit wird eine konzentrationsabhängige Abnahme des intrazellulären GSH erzielt (79 % mit 1mM Sper/NO; $p < 0,01$), da das NO mit dem vorhandenen GSH reagiert, wodurch die GSH-Konzentration gesenkt wird (vgl. 1.4.3.).

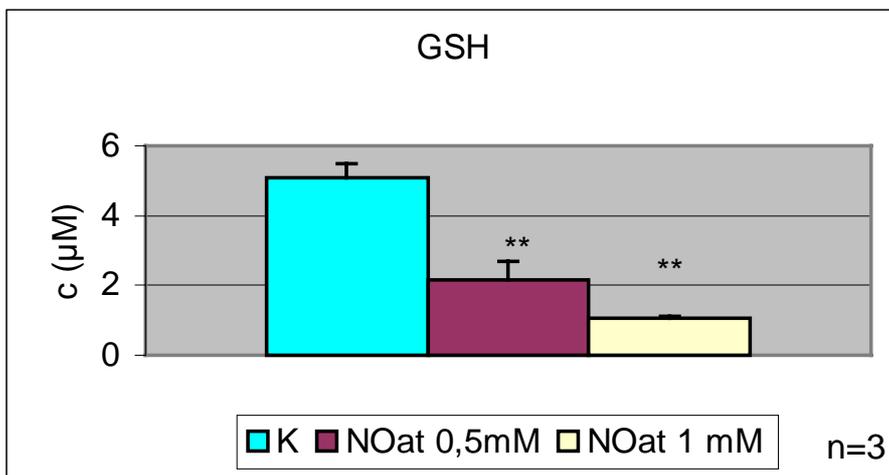


Abb.3.2.3.c: Verminderung des intrazellulären GSH durch NO
 K: Kontrolle
 NOat: SpermineNONOate

Dieser auch im PAEC-Modell meßbare Effekt liefert somit einen weiteren starken Hinweis (vgl. *in vitro* Tests mit Vollblut unter 3.1.) darauf, daß der

nach i.c. Gabe von Quinaprilat beobachtete Abfall der GSH-Spiegel in Zusammenhang mit einer deutlich gesteigerten endothelialen NO-Freisetzung gesehen werden kann.

3.2.4. Antioxidative Effekte von Quinaprilat

3.2.4.1. Bestimmung der Superoxidanionproduktion im Cytochrom C/ SOD-Assay

Untersucht wird zunächst der Einfluß von Quinaprilat auf die Superoxidanionproduktion von HUVEC und PAEC. Dabei zeigt sich zwar im Vorversuch eine Hemmung der basalen Freisetzungsrates (vgl. Abb 3.2.4.1.a). Diese ist jedoch in umfassenden Versuchsreihen nicht reproduzierbar.

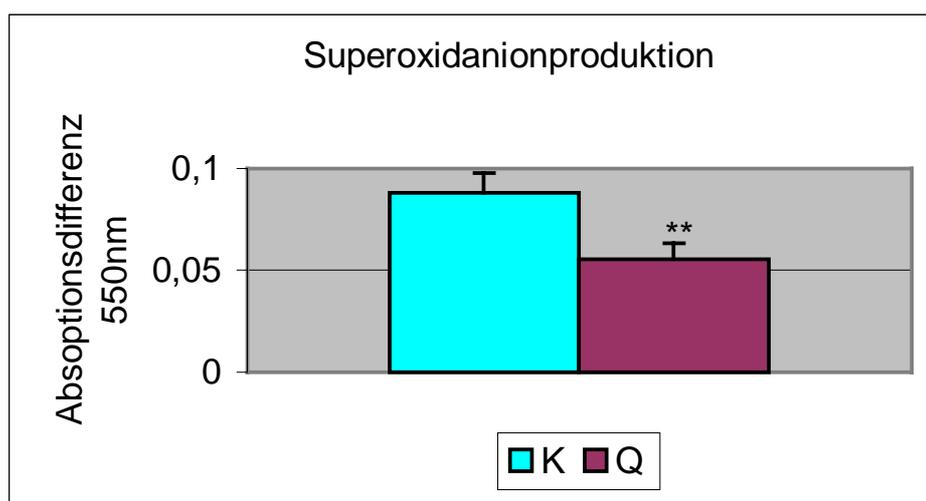


Abb.3.2.4.1.a: Hemmung der basalen Superoxidanionfreisetzung durch Quinaprilat HUVEC, 50 min Inkubationszeit, n = 5
K: Kontrolle
Q: Quinaprilat 10⁻⁵ M

Die Ursachen für diese differierenden Ergebnisse konnten nicht geklärt werden.

3.2.4.2. Bestimmung der ROS-Produktion mit DCF-Fluoreszenz

Aufgrund der variierenden Ergebnisse zum Einfluß von Quinaprilat auf die Superoxidanionproduktion in Endothelzellkulturen im Cytochrom C assay,

das die extrazelluläre Superoxidanionenfreisetzung bestimmt, wird eine Versuchsreihe mit dem membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Dichlor-dihydrofluoresceindiacetat (H_2DCFDA) angeschlossen. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität von dessen oxidierte Form (DCF) bietet die Möglichkeit, die intrazelluläre Bildung freier Radikale (ROS) zu untersuchen. Die Endothelzellen (PAEC) können direkt in 96-well-Platten ausplattiert und nach Konfluenz im Versuch eingesetzt und vermessen werden.

Positivkontrollen zur Funktionsfähigkeit des Indikators werden jeweils mit $1\text{mM H}_2\text{O}_2$ durchgeführt. Die DCF-Fluoreszenz erreicht dabei ca. die dreifache Intensität der DCF-Fluoreszenz von PAEC und bleibt über die gesamte Meßdauer konstant.

Die Negativkontrollen mit DCF ohne Zellen zeigen eine Fluoreszenzintensität von ca. $2/3$ der endothelialen Werte, wiederum ohne Veränderung. Die Zuverlässigkeit der DCF-Fluoreszenzmessung ist somit bestätigt.

In PAEC ist eine basale ROS-Produktion feststellbar:

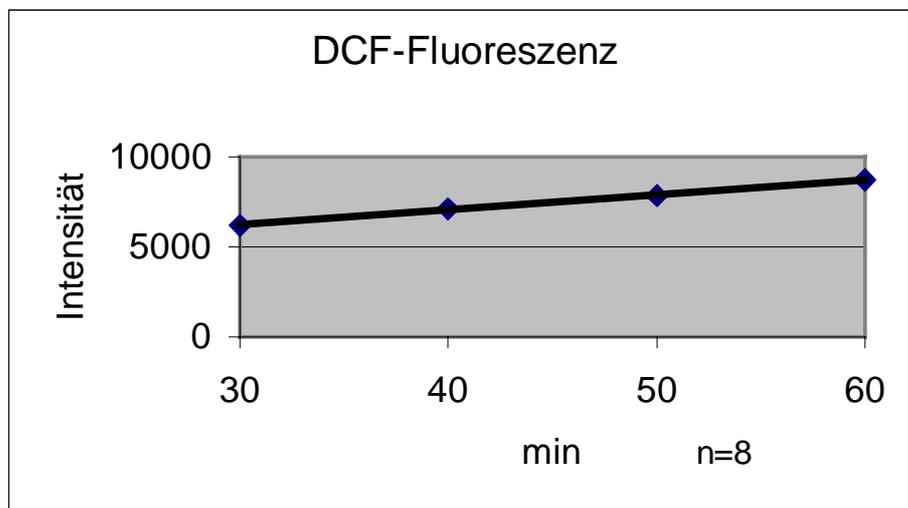


Abb.3.2.4.2.a: Kinetik der basalen DCF-Fluoreszenz in PAEC
Inkubation mit H_2DCFDA 30 bis 60 min

Diese zellvermittelte DCF-Fluoreszenz steigt im Gegensatz zu den Kontrollen über die gesamte Meßdauer linear an.

Darauf basierend können die Effekte von Quinaprilat auf den oxidativen Stress in PAEC untersucht werden.

Bradykinin kann unter entsprechenden Bedingungen einen Anstieg endothelialer ROS-Produktion über den Arachidonsäureweg bewirken (Holland JA et al, 1990). Dieser eigenständige, einer antioxidativen Gesamtwirkung des ACE-Hemmers (s.1.4.2.) möglicherweise entgegenlaufende Effekt, wird deshalb im Vorfeld untersucht:

Mit H₂DCFDA beladene PAEC wurden mit Bradykinin versetzt und im Zeitraum von 5 bis 15 min nach Zugabe vermessen.

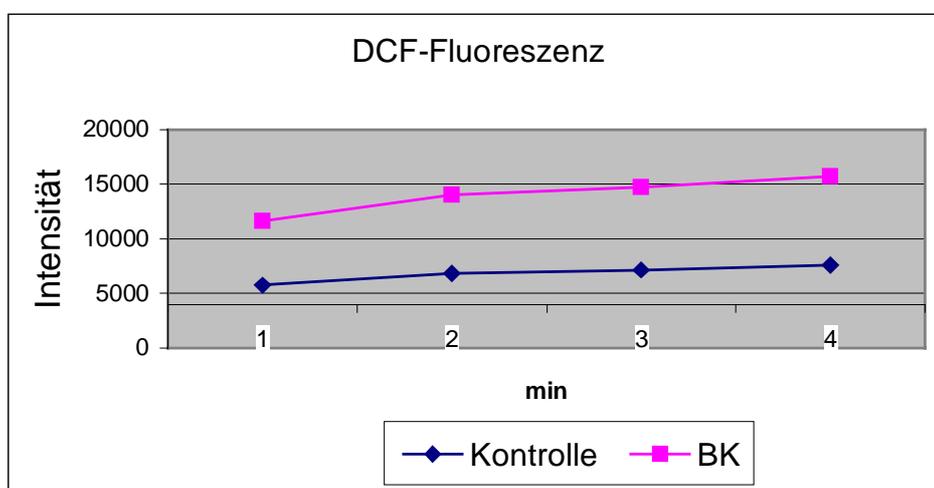


Abb.3.2.4.2.b: Effekt von Bradykinin auf die DCF-Fluoreszenz in PAEC
 K: Kontrolle
 BK: Bradykinin 10⁻⁵ M

Unter Bradykinin erfolgt ein geringfügig aber signifikant stärkerer Anstieg der DCF-Fluoreszenz ($p < 0,01$). Die ROS-Produktion in PAEC ist somit durch Bradykinin tendenziell stimulierbar. Dieser gegenläufige Teileffekt erweist sich in den Versuchen mit Quinaprilat (s. u.) jedoch als nicht ausschlaggebend.

Wesentlichen Anteil an der antioxidativen Gesamtwirkung von ACE-Hemmern hat vermutlich eine verminderte NAD(P)H-Oxidaseaktivität (vgl. 1.4.2.). Deshalb wird die NAD(P)H-Oxidase abhängige ROS-Bildung im PAEC-Modell untersucht:

Der Flavoenzyminhibitor Diphenyleniodonium (DPI; Cross AR et al, 1986) hemmt die basale ROS-Produktion in PAEC signifikant (10 %, $p < 0,01$).

Stimulation der Zellen mit dem Proteinkinase C-Aktivator Phorbolmyristylacetat (PMA, *Inanami O et al, 1998*) bewirkt eine massive ROS-Bildung (196 % Fluoreszenzsteigerung vs. Kontrolle; $p < 0,01$). Unter diesen aktivierten Bedingungen hemmte DPI zu 41 % ($p < 0,01$).

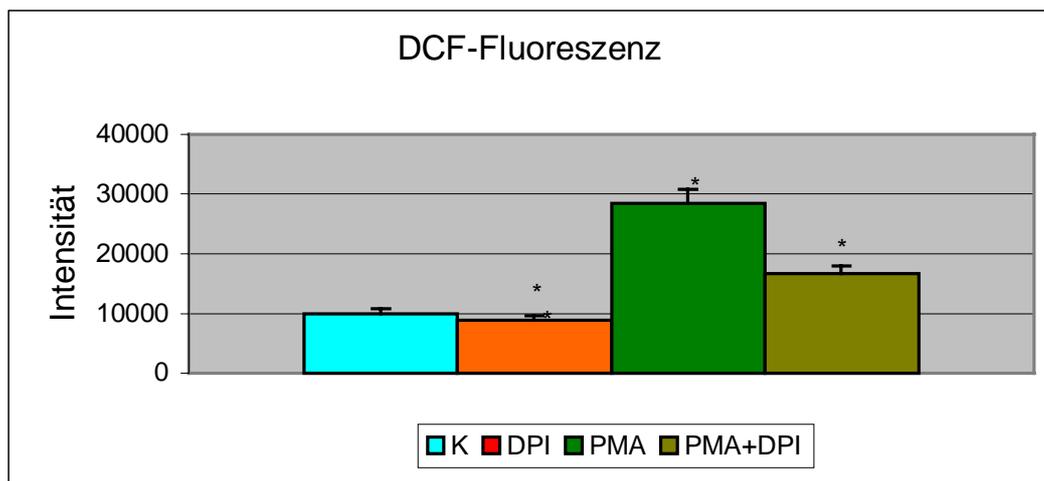


Abb. 3.2.4.2.c: Stimulation und Hemmung der NAD(P)H-Oxidase in PAEC

Inkubationszeit: 3 h PMA, 2 h DPI

dann 60 min DCF bzw. DCF + DPI, $n = 8$

K: Kontrolle

DPI: 10^{-5} M

PMA: 5×10^{-5} M

PAEC weisen somit eine basale NAD(P)H-Oxidaseaktivität auf, die durch PKC-Aktivierung stark erhöht wird. Eine Hemmung der NAD(P)H-Oxidase kann somit den oxidativen Stress in PAEC vermindern.

Auch NO-Synthasen können zur Superoxidanionproduktion beitragen (vgl. 1.4.1.). H_2DCF kann auch durch Peroxynitrit oxidiert werden (*Possel H et al, 1997*). Ebenso können DPI und PMA nicht nur spezifisch die NAD(P)H-Oxidasen beeinflussen, sondern auch die NO-Synthasen (*Stuehr DJ et al, 1991; Li H et al, 1998*). Um einen Einfluss dieser Effekte auf die oben beschriebene Charakterisierung der NAD(P)H-Oxidaseaktivität in PAEC ausschließen zu können, werden die NO-Synthasen (NOS) unter basalen bzw. mit PMA stimulierten Bedingungen mit L-NA inhibiert. Dabei ergibt sich, daß die NOS keinen Anteil an der gemessenen ROS-Produktion haben, sondern im Gegenteil

eine verminderte NO-Synthese tendenziell zum Anstieg der DCF-Fluoreszenz führt.

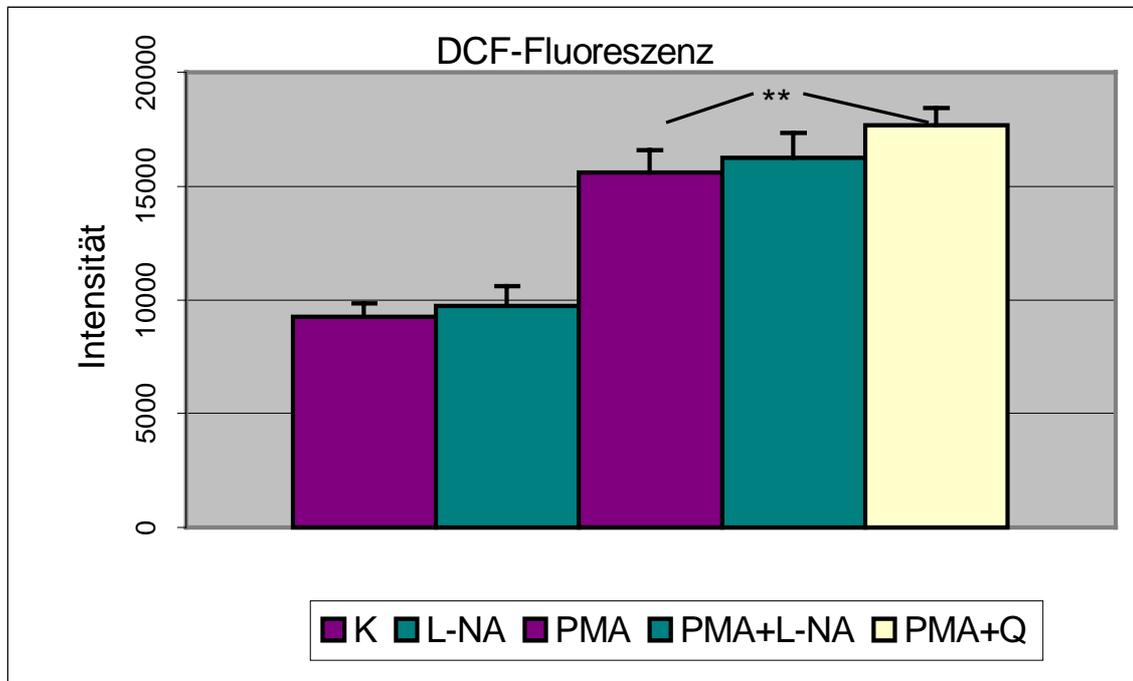


Abb.3.2.4.d.: Einfluß von L-NA auf die basale und aktivierte DCF-Fluoreszenz in PAEC
 3 h Inkubation, 60 min DCF, n = 8
 K: Kontrolle
 L-NA: L-Nitroarginin 100 µM
 PMA: Phorbolmyristylacetat 5×10^{-7} M
 Q: Quinaprilat 10^{-5} M
 **p < 0,02 vs Kontrolle

Aus dieser Abbildung ist auch ersichtlich, daß Quinaprilat die starke ROS-Produktion durch PMA nicht kompensieren kann.

Der Einfluß von Quinaprilat auf die basale ROS-Freisetzung in PAEC wird in zwei verschiedenen Ansätzen getestet: 3 h Inkubation mit verschiedenen Q-Konzentrationen vor DCF-Beladung und Inkubation mit Q gleichzeitig mit DCF. Dabei erweist sich die längere Quinaprilateinwirkung als deutlich effektiver mit einem Maximum für $c(Q) = 10^{-5}$ M (45 % Hemmung, p < 0,01):

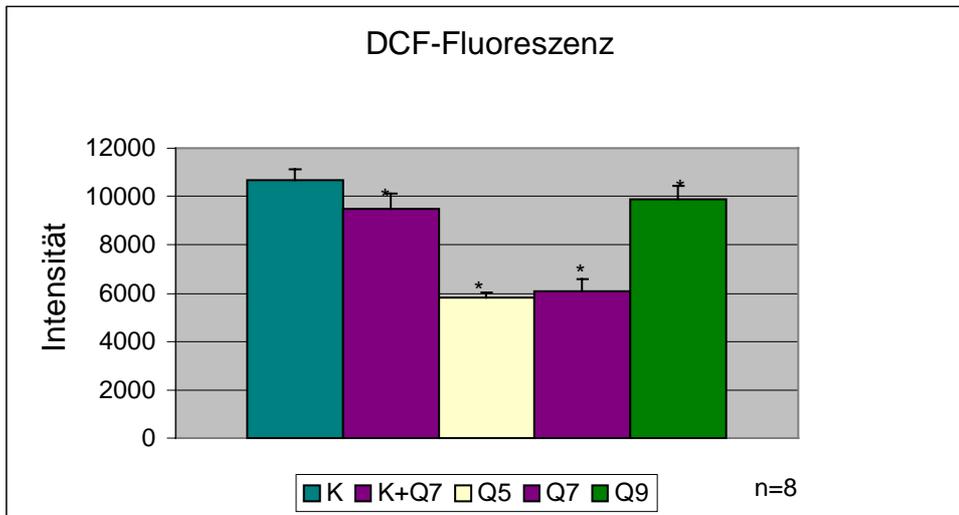


Abb.3.2.4.2.e: Einfluß von Quinaprilat auf die basale DCF-Fluoreszenz in PAEC
 Werte nach 60 min
 K: Kontrolle
 K+Q7: anschließende Zugabe von Quinaprilat 10^{-7} M
 Q5 bis Q9: 3 h Inkubation mit Q 10^{-5} M bis 10^{-9} M

Als Aktivator der NAD(P)H-Oxidase wird nun Angiotensin II getestet. Der Anstieg der DCF-Fluoreszenz ist gering aber signifikant und wird durch anschließende Quinaprilatzugabe ebenso signifikant vermindert.

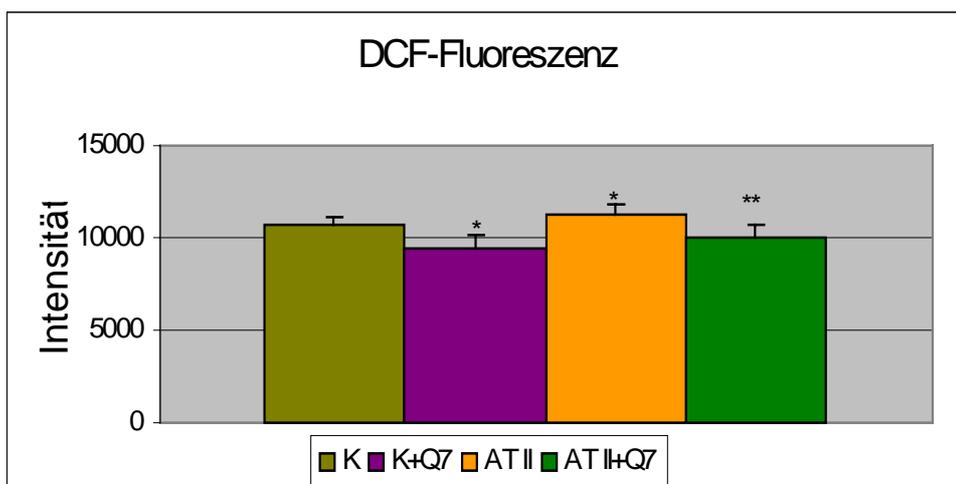


Abb.3.2.4.2.f: Einfluß von Angiotensin und Quinaprilat auf die DCF-Fluoreszenz

Werte nach 60 min

K: Kontrolle

K+Q7: Zugabe von Quinaprilat 10^{-7} M zur Kontrolle gleichzeitig mit der H_2DCF -Beladung

AT II: 3 h Inkubation mit Angiotensin II 10^{-6} M

AT II + Q7: Zugabe von Quinaprilat 10^{-7} M zu AT II aktivierten Zellen gleichzeitig mit H_2DCF -Beladung

*: $p < 0,05$ vs Kontrolle

** : $p < 0,02$ vs Angiotensin II

Zusammenfassend kann gezeigt werden, daß NAD(P)H-Oxidasen - insbesondere unter aktivierten Bedingungen - im PAEC-Modell entscheidenden Anteil an der als DCF-Fluoreszenz ermittelten ROS-Produktion haben.

Der oxidative Stress kann dabei durch Quinaprilat konzentrationsabhängig vermindert werden. Dieser wesentliche, endothelprotektive Effekt wird damit im PAEC-Modell belegt.

4. DISKUSSION

4.1. Akutwirkung von Quinaprilat *in vivo*

Der Einfluß einer ACE-Hemmung auf die koronare Endothelfunktion herztransplantierten Patienten konnte in der vorliegenden Studie erstmalig untersucht werden. Ausgewählt wurde ein ACE-Hemmer mit hoher Gewebearffinität (*Dzau VJ et al, 2001*): Quinaprilat.

Die Vasomotionsstudie zeigt für die intrakoronare Quinaprilatgabe akut eine signifikante koronare Vasodilatation (1) sowie eine partielle Verbesserung der Endothelfunktion (2).

Die durch Q vermittelte Vasodilatation ist verbunden mit einer akuten, signifikanten Verminderung der Glutathionblutspiegel (GSH) (3). Zusätzliche Infusion von L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthase, verstärkt diesen Effekt.

Entsprechende *in vitro* Tests zum Einfluß von NO auf Blutspiegel von Glutathion ergeben eine signifikante Abnahme von GSH, verbunden mit der Bildung von GSNO.

Nitrotyrosinplasmaspiegel (4) und die Plasmaspiegel von Endothelin-1(5) werden durch Q akut nicht signifikant beeinflusst. Der transkardiale Endothelingradient wird jedoch tendenziell in Richtung einer Aufnahme verändert.

Die Mechanismen und die Bedeutung der beobachteten Akutwirkungen von Quinaprilat sollen nachfolgend diskutiert werden:

(1) Akute Vasodilatation durch Quinaprilat:

Q bewirkt eine signifikante, konzentrationsabhängige Änderung des Ruhtonus ohne Beeinflussung von Herzfrequenz und Blutdruck.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß Quinaprilat bereits akut die vasomotorische Funktion herztransplantierten Patienten positiv im Sinne eines ausgeprägten substanzeigenen, vasodilatierenden Effektes beeinflussen kann. Mikrovaskulär scheint die Wirksamkeit gerade dann zu bestehen, wenn die basale NO-Freisetzung bereits eingeschränkt ist.

Verschiedene Mechanismen können an einem direkten, vasodilatierenden Effekt von ACE-Inhibitoren beteiligt sein (vgl. 1.3.3):

- (a) Verminderung der lokalen Angiotensin II-Produktion und dessen direkter vasokonstriktorischer Wirkung.
- (b) Verminderung der durch Angiotensin II erleichterten Norepinephrin-freisetzung aus sympathischen Nervenendigungen (*Taddei S et al, 1991*).
- (c) Verminderung der durch Angiotensin II aktivierten NAD(P)H-Oxidase-aktivität, d.h. einer erhöhten ROS-Produktion und NO-Inaktivierung (vgl. 1.4.2.).
- (d) NO-Freisetzung durch Akkumulation des Metaboliten von Angiotensin I, Angiotensin (1-7) (*Porsti I et al, 1995*).
- (e) Erhöhung lokaler Konzentrationen von Bradykinin und/oder direkte Wirkung auf den B₂-Rezeptor. Bradykininvermittelte Freisetzung von NO, Prostacyclin und/oder EDHF (vgl. 1.3.3.).

An gesunden Probanden bewirkte eine intraarterielle Quinaprilatinfusion (3,9 nmol/min, 20 Minuten) einen signifikanten Anstieg des Unterarmblutflusses. Enaprilat (13 nmol/min, 20 Minuten) zeigte diesen Effekt nicht. Beide ACE-Hemmer steigerten dagegen die Wirkung zusätzlich infundierten Bradykinins. Die Vasodilatation unter Quinaprilat wurde durch L-NA vollständig blockiert, während Aspirin keinen Einfluß hatte (*Haefeli WE et al, 1997*).

In diesem Modell liegt der Vasodilatation also eine substanzspezifisch (Quinaprilat vs Enaprilat) gesteigerte NO-Synthese zugrunde.

Eine Studie mit herzinsuffizienten Patienten (NYHA III) Patienten ergab nach Quinaprilat-, nicht aber nach Enaprilatinfusion (Q: 1,6µg/min; E: 5µg/min) eine verbesserte (epikardiale) koronare flußabhängige Dilatation, d.h. einen substanzspezifischen Effekt. Diese Wirkung war wiederum durch L-NA blockierbar, also ebenfalls NO vermittelt.

Allerdings bewirkte auch Quinaprilat hier keine Vasodilatation unter Rubedingungen (*Hornig B et al, 1998*). Für eine Beeinflußung des Ruhetonus scheinen somit auch das untersuchte Gefäßsystem, sowie das Patientenkollektiv eine Rolle zu spielen.

An gesunden Probanden wurde gezeigt, daß endogenes Bradykinin sowohl in koronaren Leitungs- als auch Widerstandsgefäßen an der Regulation des Ruhetonus und der flußabhängigen Dilatation beteiligt ist (*Groves P et al, 1995*).

Isolierte Rattenherzen weisen bei intaktem Endothel eine kontinuierliche Bradykininfreisetzung auf, die durch Ramiprilat erhöht wird (*Baumgarten CR et al, 1993*).

Eine vergleichende Untersuchung von herztransplantierten Patienten ($3,6 \pm 1,7$ Monate nach HTX) und gesunden Kontrollpersonen hat gezeigt, daß die Dilatation nach Bradykinininfusion (epikardial und mikrovaskulär) bei einer gleichzeitig bereits vorhandenen epikardialen Vasokonstriktion nach Acetylcholin noch vollständig erhalten ist (*Apectar E et a, 2000*).

Andererseits zeigt eine Studie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, daß die Endothelfunktion nicht nur im Acetylcholintest, sondern auch hinsichtlich der Wirkung von Bradykinin beeinträchtigt sein kann. Die Vasodilatation durch exogenes Bradykinin kann dabei durch eine Quinaprilatinfusion ($50\mu\text{g}/\text{min}$, 5 Minuten) wiederhergestellt werden (*Benacerraf S et al, 1999*).

Ein vergleichbarer Effekt kann auch für endogenes Bradykinin angenommen werden. Dessen Verfügbarkeit könnte zudem insbesondere bei verstärkter ACE-Aktivität vermindert sein. Dies könnte zugleich zu einer Erhöhung des Ruhetonus beitragen.

Eine verbesserte Wirksamkeit endogenen Bradykinins bildet somit einen möglichen Erklärungsansatz für den vasodilatierenden Effekt von Quinaprilat bei Patienten nach HTX. Neben NO können weitere EDRF, insbesondere EDHF daran beteiligt sein (*Benacerraf S et al, 1999*). In welchem Ausmaß zusätzliche Mechanismen in einzelnen Gefäßabschnitten von Bedeutung sind, kann hier nicht festgelegt werden.

(2) Akuter Einfluß von Quinaprilat auf die Endothelfunktion

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Studien zur Endothelfunktion nach Herztransplantation (vgl. Kap 1.6, *Hartmann A et al, 1994*) weist ein großer Anteil der Patienten des hier untersuchten Kollektivs eine epikardiale (38 %) bzw mikrovaskuläre (50 %) Endotheldysfunktion im

Acetylcholintest auf. Nach Infusion von Quinaprilat ist eine partielle (epikardial > mikrovaskulär) Verbesserung zu beobachten.

Die akute Reduzierung der Vasokonstriktion unter Acetylcholin entspricht qualitativ den Ergebnissen der TREND-Studie, d.h. dem Effekt einer langfristigen Anwendung von Quinapril bei nicht transplantierten Patienten (vgl 1.3.2., *Mancini GBJ et al, 1996*).

In einer parallel zur TREND-Studie durchgeführten Pilotstudie mit 13 Patienten wurde eine deutliche Verbesserung auch der mikrovaskulären Acetylcholinantwort bei den mit Quinapril behandelten Patienten gefunden, während bei den mit Plazebo behandelten Patienten eine weitere Verschlechterung eintrat. Aufgrund des kleinen Kollektivs wurde jedoch ebenfalls keine Signifikanz erreicht (*Schlaifer JD et al, 1997*).

Von Prasad und Mitarbeitern wurde der akute Einfluß von Enalaprilat (20µg/min i.c., 10 Minuten) auf die epikardiale und mikrovaskuläre Acetylcholinantwort von 56 Patienten mit koronarer Atherosklerose oder Risikofaktoren (Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes, Rauchen) untersucht (*Prasad A et al, 2000*): Enalaprilat beeinflusste den Ruhetonus nicht.

Die epikardiale Vasomotion nach Acetylcholin wurde durch Enalaprilat selektiv in den Segmenten verbessert, die vorher eine Konstriktion zeigten. Auch die mikrovaskuläre Flußsteigerung wurde in umgekehrter Korrelation zum Ausgangswert signifikant verbessert.

Zusätzlich wurde hier der Zusammenhang zwischen der Wirkung des ACE-Hemmers und dem ACE-I/D Genotyp untersucht. Vorhandensein des D-Allels wird mit einer erhöhten Aktivität des Gewebe-ACE in Verbindung gebracht (*Danser AH et al, 1995*). Zusätzlich können jedoch weitere Faktoren zur Hochregulation dieses Enzymes beitragen (vgl.1.2.2). Innerhalb der Studie wurde kein Zusammenhang zwischen I/D Polymorphismus und Endothelfunktion im Acetylcholintest festgestellt.

Die Verbesserung der Acetylcholinantwort durch Enalaprilat war jedoch abhängig vom Vorhandensein des D-Allels.

Diese Ergebnisse zeigen, daß akut wirksame Mechanismen von ACE-Hemmern zu einer Verbesserung der koronaren Endothelfunktion beitragen.

Dabei sind individuelle Unterschiede, wie etwa der ACE-Genotyp von Bedeutung. Unsere Daten belegen, daß auch nach Herztransplantation eine positive Beeinflussung der Endothelfunktion durch ACE-Hemmung möglich ist.

Eine IVUS-Studie mit 121 herztransplantierten Patienten zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen ACE-D Genotyp des Empfängers und Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie (*Pethig K et al, 2000*).

Weitere Daten belegen den ACE-D Genotyp des Donors als potentiellen Risikofaktor (*Cunningham D et al, 1998*).

Langfristige Studien können zeigen, ob sich der akut festgestellte Effekt von Quinaprilat auf die Endothelfunktion herztransplantierten Patienten entsprechend der TREND-Studie verstärkt und sich damit protektiv gegen morphologische Veränderungen der Transplantatvaskulopathie bzw. das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen auswirken kann. Dabei ist auch zu klären, ob bestimmte prädiktive Faktoren (z.B. der ACE D-Genotyp) den erfolgreichen Einsatz des ACE-Hemmers entscheiden können.

(3) Akute Interaktion mit dem Glutathionsystem

In der vorliegenden Patientenstudie erfolgt parallel zur Aufzeichnung der koronaren Vasomotion die Bestimmung des Glutathionstatus im Blut vor und nach Quinaprilatapplikation.

Die i.c. Quinaprilatgabe resultiert unmittelbar nach der Infusion in einer starken Abnahme an reduziertem GSH im Blut, während die GSSG-Spiegel (nachweisbar bei 7 von 10 Patienten) unbeeinflusst bleiben. Für diesen unerwarteten Effekt muß ein anderer Mechanismus als ein einfacher Redoxvorgang verantwortlich sein, der mit einer Veränderung der GSSG-Spiegel verbunden wäre.

Die Ergebnisse der *in vitro* Studien (vgl. 3.1.1.2.) zum direkten Einfluß von NO-Gas auf GSH in Blutproben sind mit der Hypothese vereinbar, daß der beobachteten (akuten) Verminderung der GSH-Konzentration im Blut die schnelle Reaktion von GSH mit NO unter intermediärer Bildung von Nitrosoglutathion zugrundeliegt. Diese Reaktion erfolgt nur unter aeroben Bedingungen mit NO/O₂. Die freie Sulfhydrylgruppe des Glutathionmoleküls

besitzt eine sehr hohe Affinität zu reaktiven NO_x Verbindungen - ca 150 mal höher als Tyrosinreste (*Wink DA et al, 1994*).

Literaturangaben zufolge ist GSH zugleich ein notwendiger Cofaktor für die endotheliale NO-Synthese (*Ghigo D et al, 1993*), GSH wird demnach bei Aktivierung der eNOS vermehrt benötigt.

Die signifikante Abnahme der GSH-Spiegel kann somit als direkter Indikator für eine durch Q akut deutlich verbesserte NO-Bioverfügbarkeit gesehen werden.

Eine unter Quinaprilat verbesserte endotheliale NO-Freisetzung wird möglicherweise bei L-Arginingabe noch verstärkt und führt dann vermehrt zur Reaktion mit Glutathion.

GSNO besitzt in Plasma bei 37°C eine Halbwertszeit von 50 min (*Kashiba M et al, 1999*). Unsere Ergebnisse zeigen einen schnellen Abbau von zugesetztem GSNO bereits *in vitro*. *In vivo* besteht eine Vielzahl an möglichen intra- und extrazellulären enzymatischen und nicht enzymatischen Reaktionen:

Untersuchter Mechanismus	Endprodukte	Literaturangabe
Enzymatische Spaltung durch Thioredoxin-Reduktase/ Thioredoxin	NO, GSH	<i>Nikitovich D et al, 1996</i>
Reaktion mit GSH	In Abhängigkeit von der GSH-Konzentration: GSSG, NO ₂ ⁻ , N ₂ O, NH ₃	<i>Singh SP et al, 1996</i>
Zerfall bei Raumtemperatur/ Modifikation von Proteinen	GSSG, GSO ₃ H/ S-Glutathiolate, S-NO-Verbindungen	<i>Ji Y et al, 1999</i>
Metabolismus von infundiertem GSNO in Ratten	Abbau durch γ -GT, NO-Freisetzung (i.z.) aus Cys-NO	<i>Kashiba M et al, 1999</i>
Aktivierung der sGC durch NOS/GSH	Nachweis von GSNO/ reduktive NO-Freisetzung (vgl. Abb.4.1.a)	<i>Mayer B et al, 1997</i>
Transnitrosierung/ Reaktion mit Hämproteinen (sehr schnell), d.h. Vasodilatation durch Reaktion mit sGC	GSNO+RSNO \rightarrow GSH+RSNO/ Hämprotein + GSNO NO-Hämprotein +1/2 GSSG	<i>Park JW et al, 1993</i>

Tab.4.1.a.: Reaktionen und Metabolismus von GSNO

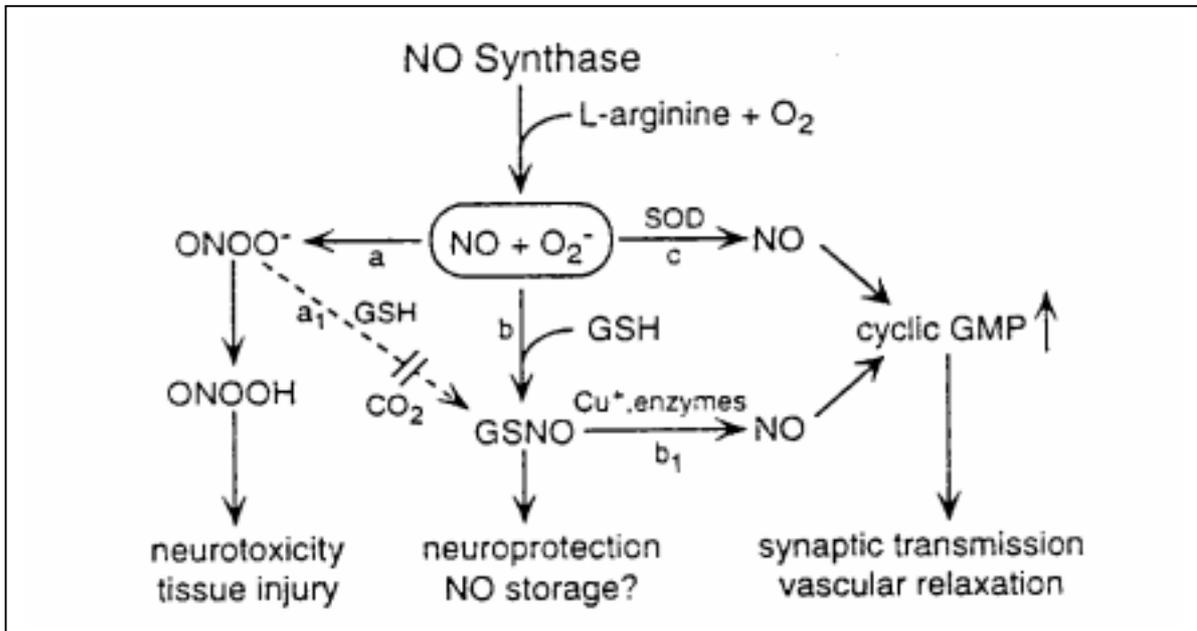


Abb.4.1.a: Signalübertragungswege von NO/O₂⁻ (nach Mayer B et al, 1997)

Simultan gebildetes NO und O₂⁻ reagieren mit GSH (b) zu GSNO

Enzymatisch/ nicht enzymatisch wird daraus NO freigesetzt (b₁), welches die Guanylatcyclase aktivieren kann.

Die Reaktion von GSH mit Peroxynitrit erfolgt dagegen nur langsam und wird durch CO₂ blockiert (a₁). In Abwesenheit von GSH ist SOD zur cGMP Bildung erforderlich (c).

Bei der HPLC-Analyse der Blutproben eines Patienten auf GSNO im Anschluß an die *in vitro* Tests kann kein GSNO-Peak nachgewiesen werden. Dieses Einzelergebnis steht jedoch angesichts der beschriebenen Instabilität des Intermediärproduktes GSNO nicht im Widerspruch zu der von uns postulierten Interaktion zwischen ACE-Hemmung, NO-Freisetzung und dem Glutathionsystem.

Damit vereinbar sind auch die Ergebnisse von Versuchen zur Ischämie-Reperfusion an isolierten Meerschweinchenherzen:

Innerhalb der ersten 5 Minuten der Reperfusion (nach 15 min Ischämie), also dem Zeitraum des Anstiegs der Produktion von ROS, wurde ein deutlicher Anstieg von GSH im Koronarsinusblut gefunden. Dieser wurde signifikant vermindert durch den Zusatz von Ramiprilat oder Bradykinin zum Perfusat. Die verminderte GSH-Freisetzung korrelierte dabei mit der postischämischen Erholung der Herzfunktion. Die Wirkung des ACE-Hemmers (Kardio-

protektion und Verminderung der myokardialen GSH-Freisetzung) wurde vollständig blockiert durch Coapplikation des Bradykininrezeptorantagonisten HOE 140 (*Massoudy P et al, 1994*).

Weiterführende Versuche ergaben für den NO-Donor SNP (Natriumnitroprussid) entsprechende Effekte wie für Ramiprilat, sowie die Aufhebung der Ramiprilatwirkung durch den NO-Antagonisten N-Nitro-L-Arginin (*Massoudy P et al, 1995*).

Experimentell konnte somit der Zusammenhang von ACE-Hemmung, bradykininvermittelter NO-Freisetzung und Abnahme der GSH-Konzentration in Verbindung mit kardioprotektiven Effekten eindeutig belegt werden. Diese Versuche zeigen darüber hinaus, daß auch die Freisetzung von GSH (nicht GSSG) einen Indikator für oxidativen Stress darstellen kann. Von dieser Arbeitsgruppe wurde ebenfalls der antioxidative Effekt von SNP in Chemilumineszenzassays gezeigt.

Somit sind auch bei den Ergebnissen der Patientenstudie - neben der direkten Reaktion von GSH und NO - antioxidative Wirkungen der ACE-Hemmung (vermittelt durch NO) in Betracht zu ziehen.

In kultivierten Endothelzellen führt die Inkubation mit dem NO-Donor SNAP bei Freisetzung physiologischer NO-Raten (1-3 nM/s) nach einem vorübergehenden Abfall der intrazellulären GSH-Konzentration langfristig zur Induktion der GSH-Synthese und damit zu einer Erhöhung dieses antioxidativen Schutzsystems. Im Rahmen einer weiterführenden Studie mit längerer Applikation von Quinaprilat, sollte dieser interessante Aspekt Beachtung finden.

(4) Nitrotyrosinplasmaspiegel

Als stabiler Marker für reaktive Stickstoffverbindungen, wie sie bei Reaktion von NO mit ROS, insbesondere mit Superoxidanionen (*Kissner R et al, 1997*) auftreten, wird bei 8 Patienten 3-Nitrotyrosin im Plasma bestimmt. Die Quinaprilatinfusion bewirkt keine signifikante Veränderung der Werte, wobei eine tendenzielle Erhöhung der koronarvenösen Spiegel zu beobachten ist. Basal liegt kein transkardialer Gradient vor. Da es sich um einen semiquantitativen Test zum Vergleich der Konzentrationen vor und nach Q

handelt (vgl. 2.2.6.) und da aufgrund der geringen Probenkapazität des ELISA keine Plasmen von Kontrollpersonen gemessen werden, ermöglicht der Test keine absoluten Aussagen zu den Nitrotyrosinplasmaspiegeln der herztransplantierten Patienten. Der Vergleich mit Literaturdaten für zwei Studien unter Verwendung des gleichen Tests läßt jedoch erhöhte Werte vermuten:

Plasmaspiegel für gesunde Personen werden mit $0,12 \pm 0,01 \mu\text{M}$ nitro-BSA Äquivalenten angegeben (*Khan J et al, 1998*), Zöliakiepatienten weisen dagegen $1,27 \pm 1,03 \mu\text{M}$ auf (*Ter Steege JCA et al 1998*). Die Werte der Patienten nach HTX betragen im Koronarsinusblut $0,88 \pm 0,3 \mu\text{M}$.

Experimentell wurde gezeigt, daß eine Angiotensininfusion bei Ratten über 3 Tage (in einer Konzentration, die keine Blutdrucksteigerung bewirkt) in einer intimaspezifischen Erhöhung der 3-Nitrotyrosinimmunreaktivität (in der Aorta) resultiert, verbunden mit der Entstehung einer Endotheldysfunktion (*Wattanapitayakul S et al, 2000*). Dies entspricht einer angiotensinvermittelt gesteigerten Superoxidanionproduktion mit gleichzeitiger Inaktivierung von NO (vgl.1.4.2.). Langfristig wäre also eine Verminderung der 3-Nitrotyrosinbildung durch eine ACE-Hemmer-Therapie zu erwarten. Da sowohl die Reaktion von NO mit O_2^- als auch die 3-Nitrotyrosinbildung sehr schnell und damit vorwiegend lokal am Entstehungsort (Endothel?) erfolgen, ist zusätzlich die Aussagekraft der Plasmaspiegel zu klären.

Die tendenzielle Erhöhung der Nitrotyrosinwerte im Koronarsinusblut läßt sich mechanistisch möglicherweise anhand umfassender Untersuchungen von Amirmansour und Mitarbeitern (*Amirmansour C et al, 1999*) erklären, die zeigen, daß bei konstanter basaler Superoxidanionproduktion von Aortenringen (Kaninchen) die Nitrotyrosinbildung bei Zugabe von NO-Donoren (SNP, GSNO) konzentrationsabhängig zunimmt.

Entsprechend könnte auch eine durch Quinaprilat gesteigerte lokale, endogene NO-Bildung zu einer Nitrotyrosinbildung führen. Literaturangaben weisen allerdings darauf hin, daß die durch eNOS-Aktivierung erreichten NO-Konzentrationen für diese Reaktionen zu gering sind (vgl. 1.4.4., *Amirmansour C et al, 1999*).

(5) Akute Interaktion mit dem Endothelinsystem

Vergleichbar mit den Ergebnissen einer früheren Studie zur Bestimmung von Endothelfunktion und Endothelin bei Patienten innerhalb des ersten Jahres nach Herztransplantation (*Weis M et al, 1997*), weisen auch die herztransplantierten Patienten der vorliegenden Studie überwiegend erhöhte Endothelinplasmaspiegel auf. Im Gegensatz zum obengenannten früh postoperativem Kollektiv ist in der jetzt vorliegenden Studie mit Patienten 31 ± 36 Monate nach HTX im Durchschnitt eine transkardiale Endothelinfreisetzung feststellbar.

Quinaprilat führt hier akut zu keiner signifikanten Veränderung der Plasmaspiegel. Dabei fällt jedoch auf, daß *nach* der Quinaprilatinfusion die Mehrzahl der Patienten eine transkardiale Endothelinaufnahme aufweist.

Hinsichtlich der Beeinflussung der Plasmaspiegel ist zunächst die kurze Applikationszeit zu beachten. Für die Endothelinfreisetzung ist überwiegend eine Regulation auf der Transkriptionsebene bekannt (vgl. 1.5). Hier reicht das Meßintervall möglicherweise nicht aus, um eine Veränderung sichtbar zu machen. Für die Bestimmung von Endothelinplasmaspiegeln gilt außerdem, daß diese nicht immer die lokale, vorwiegend abluminale Sekretion reflektieren (*Grenier O et al, 1996*).

Eine Ischämie/Reperfusionstudie an perfundierten Rattenherzen (*Brunner F et al, 1996*) ergab allerdings eine überwiegend luminale Endothelinsekretion mit einem signifikanten Anstieg zu Beginn der Reperfusion. Wurden dem Perfusat während der gesamten Versuchsdauer - d.h. 60 min Kontrollphase, 60 min Ischämie, 30 min Reperfusion - ACE-Hemmer (Ramiprilat 100 nMol, Captopril 5 µMol) zugesetzt, erfolgte eine signifikante Verminderung des Endothelinanstiegs. Innerhalb dieser Zeitspanne ist also bereits ein Wirkungseintritt möglich. Eine Hemmung erfolgte auch durch einen Angiotensinrezeptorantagonisten (EXP 3174, aktiver Metabolit von Losartan), während die Endothelinpiegel bei Kombination von ACE-Hemmer und Bradykininrezeptorantagonisten (Icatibant) über die Kontrollwerte (ohne Medikation) hinaus anstiegen. In diesem Modell sind also sowohl Angiotensin- als auch Bradykinineffekte bestimmend für die Endothelinsekretion.

Zwei finnische Studien zu Akuteffekten einer intravenösen Enaprilatinfusion bei Intensivpatienten nach Herzinfarkt (*Tohmo H et al, 1994*) bzw. Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion nach herzchirurgischen Eingriffen (*Tohmo H et al, 1997*) ergaben jeweils eine Verminderung der erhöhten Endothelinplasmaspiegel innerhalb von zwei Stunden.

Zum langfristigen Effekt von ACE-Hemmern auf Endothelin nach Herztransplantation liegen bisher keine Daten vor. Eine vergleichende Untersuchung für Patienten nach Nierentransplantation zeigt signifikant niedrigere Endothelinplasmaspiegel für die mit Lisinopril behandelten Patienten gegenüber den mit Nifedipin behandelten Patienten. Dies korreliert zugleich mit einer besseren mikrovaskulären Endothelfunktion (*Asberg A et al, 2001*).

Insgesamt zeigen klinische Studien zum langfristigen Einsatz von ACE-Hemmern und der Beeinflussung der Endothelinspiegel bei verschiedenen Patientenkollektiven unterschiedliche Ergebnisse (*Boldt J et al, 1998; Schalkwijk CG et al, 2000*).

Eine Therapie mit Captopril oder Quinapril bei herzinsuffizienten Patienten über 4 Monate beeinflusste die erhöhten Endothelinplasmaspiegel nicht (*Townend J et al, 1994*), während eine dreimonatige Anwendung von Fosinopril bei Patienten mit Herzinsuffizienz die Endothelinplasmaspiegel auf Normalwerte reduzierte (*Galatius-Jensen S et al, 1996*).

Der Langzeiteffekt von Quinapril auf Endothelin nach Herztransplantation müßte somit in einer eigenen Studie geklärt werden.

Offen bleibt auch die Frage, ob sich dann tatsächlich eine signifikante Veränderung des transkardialen Endothelingradienten ergibt und wenn ja, welche Mechanismen (verminderte kardiale Freisetzung oder kardialer uptake?) dafür verantwortlich sind. In der oben genannten Studie von *Weis et al* wurde eine Korrelation zwischen Endothelin-uptake und erhaltener mikrovaskulärer, sowie distaler epikardialer Endothelfunktion festgestellt. Möglicherweise spielen hier Expression und Funktion (Freisetzung von NO, PGI₂, Endothelin-clearance, vgl. 1.5.) des Endothelin_B-Rezeptors eine Rolle.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Aufnahme von Endothelin in Endothelzellen über ET_B Rezeptoren erfolgt, Endothelin dabei partiell

gespeichert wird und daß dieser Vorgang verbunden ist mit einer Inhibierung der Transkription von Prepro-ET mRNA. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus kann für die physiologische Regulation des Endothelinsystems entscheidend sein (*Sanchez R et al, 2002*).

Interaktionen von ACE-Hemmung und Endothelinrezeptorexpression sind bislang in der Literatur nicht bekannt.

4.2. Endothelspezifische Effekte von Quinaprilat *in vitro*

Endothelspezifische Wirkungen von Quinaprilat - insbesondere die Interaktion mit der Freisetzung von Endothelin sowie antioxidative Effekte - werden anhand von Zellkulturmodellen untersucht. Dies ermöglicht zudem in Ergänzung zur Studie längere Inkubationszeiten und die Verwendung anderer Detektionsmethoden für oxidativen Stress als *in vivo*.

Fluoreszenzmessungen im Überstand von PAEC mit DAF-2 bestätigen zunächst die endotheliale NO-Produktion (1) als eine wesentliche Voraussetzung der postulierten Wirkmechanismen (vgl. 1.3.3.)

Quinaprilat bewirkt eine signifikante Hemmung der basalen Endothelinproduktion von PAEC. Der Effekt entsprechender Konzentrationen von Enalaprilat ist schwächer (2). Humane mikrovaskuläre Endothelzellkulturen (HMEC-1) weisen eine deutlich geringere Endothelinproduktion auf als PAEC. TNF α bewirkt eine signifikante Steigerung der Endothelinproduktion, die durch Coinkubation mit Quinaprilat signifikant gehemmt werden kann.

Die in der Patientenstudie beobachtete Interaktion von ACE-Hemmung und Glutathionsystem und der vermutete Zusammenhang mit der Freisetzung von NO können wiederum in einerer konzentrationsabhängigen signifikanten Abnahme intrazellulären Glutathions bei Inkubation von PAEC mit dem NO-Donor Spermine-NONOate (3) bestätigt werden. Quinaprilat hat tendenziell den gleichen Effekt.

Die Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von Quinaprilat (4) zeigen eine signifikante konzentrations- und zeitabhängige Hemmung der basalen und durch Angiotensin II aktivierten DCF-Fluoreszenz von PAEC.

(1) Detektion der NO-Freisetzung im PAEC-Modell

Eine intakte Funktion der eNOS im verwendeten Zellkulturmodell ist die entscheidende, mechanistische Voraussetzung für die postulierte Wirkung des untersuchten ACE-Hemmers auf die endotheliale Produktion von Endothelin und ROS (vgl. 1.5. und 1.4.2.).

In ergänzenden Versuchen kann diese mit Hilfe eines Fluoreszenzindikators zur direkten Bestimmung von freigesetztem NO im Zellüberstand (vgl. 2.3.4.; *Nakatsubo N et al, 1998*) nachgewiesen werden.

Die bradykininvermittelte eNOS-Aktivierung durch Inkubation von Endothelzellen (HUVEC, BAEC) mit einem ACE-Hemmer (Ramiprilat) wurde zuvor anhand der Messung von intrazellulär gebildetem cGMP gezeigt und erfolgt bereits innerhalb von 10 min (*Wiemer G et al, 1991*).

Mit der von uns verwendeten Methode ist entsprechend eine durch Quinaprilat gesteigerte NO-Freisetzung feststellbar.

(2) Einfluß von Quinaprilat und Enalaprilat auf die Endothelinproduktion

Im PAEC Modell kann eindeutig belegt werden, daß die endotheliale Endothelinfreisetzung durch Quinaprilat signifikant vermindert wird. Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen an HUVEC, die diesen Effekt für Captopril und Enaprilat zeigen (*Yoshida H et al, 1992*). Die in unseren Versuchsreihen feststellbare, stärkere maximale Hemmung durch Quinaprilat im Vergleich zu Enaprilat könnte auf Unterschiede in der substanzspezifischen Affinität zum endothelialen ACE (*Dzau VJ et al, 2001*) und der Wirkdauer (*Kinoshita A et al, 1993*) zurückzuführen sein.

Die Hemmung kann sowohl durch Verminderung von Angiotensin II, als auch durch Potenzierung von Bradykinineffekten vermittelt sein (vgl. 1.5.). An bovinen Endothelzellen wurde die Steigerung der Endothelinfreisetzung durch Angiotensin II gezeigt (*Emori T et al, 1991*). Dieser Effekt ist vermittelt durch Induktion der Preproendothelin-1 mRNA (*Imai T et al, 1992*).

Die o.g. Versuche von *Yoshida et al* bestätigen eine Verminderung der Endothelinfreisetzung durch Inkubation mit Bradykinin bzw. mit dem NO-Donor SNP. In diesem Modell hat Angiotensin II dagegen keinen Effekt.

Eine Erklärung für diese Differenzen bietet vermutlich die unterschiedliche Aktivierung einzelner Signaltransduktionswege im jeweiligen Zellkulturmodell.

Die von uns verwendeten PAEC weisen bereits basal eine hohe Endothelinproduktion auf. Der Anstieg unter Angiotensin II war im Gegensatz zur Verminderung unter Bradykinin nicht signifikant.

Die in einer kleineren Versuchsreihe eingesetzten humanen mikrovaskulären Zellen (HMEC-1) zeigen eine - verglichen mit PAEC - basal geringe Endothelinproduktion, die durch das Cytokinin TNF α signifikant gesteigert wird. Die dabei gezeigte Hemmbarkeit der TNF α stimulierten Endothelinfreisetzung könnte auch klinisch von Bedeutung sein.

Eine Zytokinaktivierung, wie sie gerade auch bei herztransplantierten Patienten gefunden wird (*Weis M et al, 1999*), kann durch Induktion der Preproendothelin-1 mRNA (*Marsden PA et al, 1992*) zusätzlich eine Aktivierung des Endothelinsystems verursachen. Die Therapie mit einem ACE-Hemmer könnte diese Konsequenz abmildern.

Abschließend ist die Frage zu klären, weshalb die Hemmwirkung von Quinaprilat bei höheren Konzentrationen wieder abnimmt.

Ein möglicher Erklärungsansatz dazu ist das Vorkommen von zwei Bradykininrezeptorsubtypen auf Endothelzellen (*Sung C et al, 1988*): B₁ Rezeptoren mit geringer und B₂ Rezeptoren mit hoher Affinität.

Durch Aktivierung des B₂ Rezeptors wird NO freigesetzt und die Endothelinproduktion inhibiert. Aktivierung des B₁ Rezeptors stimuliert dagegen die Endothelinsekretion. Bei vorrangiger Aktivierung des B₁ Weges bzw. bei hohen Bradykininkonzentrationen steigt somit die gemessene Endothelinkonzentration an. Ein entsprechendes Konzentrationsprofil wurde auch für Captopril gefunden (*Momose N et al, 1993*).

Eine eingeschränkte Wirksamkeit könnte zudem bedingt sein durch die konzentrations- und zeitabhängige Induktion der ACE-mRNA, wie sie für die Inkubation von Endothelzellen mit Lisinipril und Captopril gezeigt wurde (*King SJ et al, 1992*).

(3) Einfluß exogener NO-Donoren auf intrazelluläres Glutathion

Extrazellulär ist die Bildung von S-Nitroso Verbindungen mit den Eigenschaften von EDRF bekannt (*Stamler JS et al, 1992*). Versuche mit Neutrophilen haben gezeigt, daß extrazelluläres NO (nach Diffusion) auch mit intrazellulärem Glutathion reagiert. Dabei wird GSNO gebildet, das zugleich als Mediator antioxidativer Effekte fungiert (*Clancy RM et al, 1993*).

Vergleichbar damit und in Ergänzung zu den Ergebnissen der Studie und der *in vitro* Tests (vgl.4.1.), zeigen die Versuche mit Endothelzellen eine konzentrationsabhängige Verminderung von intrazellulärem GSH durch NO-Donoren.

(4) Einfluß von Quinaprilat auf die endotheliale ROS-Produktion

Unsere Ergebnisse zeigen eine direkte antioxidative Wirksamkeit des ACE-Hemmers Quinaprilat auf Endothelzellen. Die Zuverlässigkeit der dazu verwendeten Methode einer direkten Bestimmung der intrazellulären DCF-Fluoreszenz in Microtiterplatten wird in einer Arbeit von Wang und Mitarbeitern bestätigt (*Wang H et al, 1999*). Mit diesem Verfahren werden jedoch verschiedene ROS (u.a. H₂O₂, organische Hydroperoxide, Peroxynitrit) erfasst. Die DCF-Fluoreszenz als Index für oxidativen Stress kann sowohl durch eine Abnahme der ROS-Produktion, als auch durch eine gesteigerte Aktivität von Antioxidantien vermindert werden (*Jakubowski W et al, 2000*).

Auch bei der Bestimmung der extrazelluläre Freisetzung von Superoxid-anionen im Cytochrom C/SOD-Assay wurde ein inhibierender Effekt von Quinaprilat gefunden. Untersuchungen mit dieser Methode und dem dabei verwendeten HUVEC-Modell wurden jedoch aufgrund einer nicht ausreichenden Reproduzierbarkeit nicht fortgesetzt. Die zugrundeliegenden Ursachen konnten nicht geklärt werden. Sie können unterschiedliche Kulturbedingungen (*Jones SA et al, 1996*) Sensitivitäts-/Spezifitätsunterschiede der Detektionsmethoden (*Tarpey MM et al, 2001*) oder die unterschiedlichen Meßkompartimente (intra-/extrazellulär) beinhalten. Die Orientierung der endothelialen Oxidasen (*Griendling KK et al, 2000*) sowie die Frage der extra- oder intrazellulären Freisetzung von Superoxidanionen

und Wasserstoffperoxid (*Bayraktutan UB et al, 1998*) sind bislang nicht eindeutig geklärt.

Potentielle Mechanismen für die antioxidative Wirkung wurden unter 1.4.1. und 1.4.2. dargestellt.

Die Bedeutung einer Aktivierung vaskulärer NAD(P)H-Oxidasen durch Angiotensin II, insbesondere für die Entstehung von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose, wird durch umfangreiche Literaturdaten (*Rajaopalan S et al 1996; Warnholtz A et al, 1999, Meyer JW et al, 2000*) belegt. Daran können sowohl die verstärkte Expression von Untereinheiten des Multienzymkomplexes als auch die Aktivierung durch Translokation der cytosolischen Komponenten beteiligt sein (*Touyz RM et al, 2002*).

Quinaprilat hemmt zunächst die basale DCF-Fluoreszenz von Endothelzellen. NADH- und in geringerem Ausmaß NADPH-abhängige Oxidasen wurden als wichtigste Quelle der basalen ROS-Produktion in bovinen Endothelzellen identifiziert. Beide werden durch DPI (vgl. 3.2.4.2.) gehemmt (*Mohazzab-H KM et al, 1994*).

Wesentliche Signaltransduktionswege zur Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen verlaufen über die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC; *Görlach A et al, 2000*). Ein starker Aktivator von PKC ist PMA (vgl. 3.2.4.2.). Auch für Angiotensin II konnte inzwischen eine PKC Beteiligung nachgewiesen werden (*Mollnau H et al, 2002*).

Die entsprechende Charakterisierung der ROS-Produktion der von uns verwendeten Endothelzellen durch DPI- und PMA-Inkubation zeigt eine Beteiligung von NAD(P)H-Oxidasen unter basalen Bedingungen. Eine mögliche Komponente der Quinaprilatwirkung ist somit eine verminderte Aktivierung dieses Enzyms.

Nach PMA-Aktivierung ist keine signifikante Hemmwirkung von Quinaprilat mehr erkennbar. *In vivo* könnte der ACE-Hemmer jedoch zu einem früheren Zeitpunkt eingreifen, d.h. bereits die Bildung von Angiotensin II und die daraus folgende Aktivierung von PKC bzw NAD(P)H-Oxidasen verhindern.

Entsprechend den Ergebnissen der Arbeit von Zhang und Mitarbeitern (*Zhang H et al, 1999*) an HUVEC bewirkt Angiotensin II eine signifikante Steigerung

der ROS-Produktion in PAEC. Von derselben Arbeitsgruppe wurde auch gezeigt, daß dieser Anstieg verbunden ist mit der Aktivierung membranständiger NAD(P)H-Oxidasen, nicht aber der Xanthinoxidase.

Vergleichbar mit Quinapril bewirkte Lisinopril in dieser Studie eine Verminderung der basalen Superoxidanionfreisetzung. Der Anstieg durch anschließende Angiotensin II Zugabe wurde jedoch nicht verhindert.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß Quinapril auch bei Coinkubation mit Angiotensin II die DCF-Fluoreszenz signifikant verringert.

Dies ist ein Hinweis für die Beteiligung weiterer Mechanismen, wie einer gesteigerten NO-Freisetzung. Eine Möglichkeit ist dabei die inhibierende Wirkung von NO auf NAD(P)H-Oxidasen, ein Mechanismus, der bisher nur an Neutrophilen gezeigt wurde (*Clancy RM et al, 1992*). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Abschwächung der H₂DCF-Oxidation durch Reaktion von NO mit ROS (radical scavenger Effekte, vgl. 1.4.2).

Schließlich zeigen unsere Daten, daß die antioxidative Effektivität des ACE-Hemmers mit der Applikationsdauer deutlich zunimmt. Dieser Aspekt ist von Interesse für die Langzeituntersuchung der antioxidativen Wirksamkeit *in vivo*.

4.3. Schlußfolgerung

Insgesamt lassen die Ergebnisse der vorliegenden Patiententudie (koronare Vasodilatation, partielle Reversibilität einer Endotheldysfunktion, verbesserte Bioverfügbarkeit von NO), sowie die an Endothelzellen gezeigten Quinaprilateffekte (Verminderung von Endothelin und oxidativem Stress) somit erwarten, daß die langfristige Behandlung mit Quinaprilat oder vergleichbaren ACE-Hemmern sich protektiv auf funktionelle und morphologische Veränderungen der Transplantatvaskulopathie auswirken kann.

Weitere Studien zur Anwendung von Quinaprilat nach Herztransplantation könnten zusätzliche Mechanismen aufzeigen und deren klinische Relevanz belegen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Eine Schädigung des Endothels und eine daraus resultierende endotheliale Dysfunktion geht als initiiierendes Ereignis nachweisbaren atherosklerotischen Veränderungen voraus. Eine koronare, vasomotorische Endotheldysfunktion ist ein unabhängiger Prädiktor für das Fortschreiten einer atherosklerotischen Erkrankung und korreliert mit dem Risiko für das Eintreten kardiovaskulärer Ereignisse.

Eine pharmakologische Möglichkeit zur Verbesserung der Endothelfunktion bieten ACE-Hemmer.

ACE ist identisch mit Kininase II. ACE-Hemmung vermindert somit nicht nur die Bildung des Vasokonstriktors Angiotensin II und der damit verbundenen atherogenen Effekte, sondern auch den Abbau von Bradykinin. Bradykininvermittelt kommt es zum Anstieg von vasoprotektiven Mediatoren: NO, Prostacyclin und EDHF. ACE ist zu 90 % im Gewebe und dabei überwiegend auf Endothelzellen lokalisiert. Eine Endotheldysfunktion ist assoziiert mit der Aktivierung lokaler Renin-Angiotensinsysteme (RAS) und verstärkter Expression von Gewebe-ACE. Möglicherweise bestehen klinisch relevante substanzspezifische Unterschiede zwischen einzelnen ACE-Hemmern, die auf einer unterschiedlichen Affinität zum Gewebe-ACE basieren.

Potentielle endotheliale Wirkmechanismen von ACE-Hemmern beinhalten

- (1) eine erhöhte NO-Synthese
- (2) antioxidative Effekte - insbesondere eine verminderte angiotensinvermittelte Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen - und damit verbunden eine verbesserte NO-Verfügbarkeit
- (3) die Hemmung der Produktion des vasokonstriktorischen und proliferationsfördernden Peptids Endothelin-1.

Herztransplantierte Patienten weisen eine hohe Prävalenz für eine eingeschränkte endothelabhängige epikardiale und mikrovaskuläre NO-vermittelte Dilatation auf. Diese vasomotorische Endotheldysfunktion ist prädiktiv sowohl für die Entwicklung einer angiographisch nachweisbare TVP (Stenosen > 50 %), als auch für das Eintreten kardiovaskulärer Ereignisse und kardiovaskulären Tod.

Ein aktiviertes Endothelinsystem nach HTX stellt einen Marker und Mediator für die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie dar. Die Bestimmung von

Lipidoxidationsprodukten in Biopsien von herztransplantierten Patienten zeigen eine zeitabhängige deutliche Zunahme von oxidativem Stress nach HTX.

Beide Faktoren - Aktivierung von Endothelin und erhöhter oxidativer Stress - können ebenso wie eine verminderte eNOS-Aktivität zur Manifestierung einer Endotheldysfunktion und damit zur Verschlechterung der Prognose beitragen.

Studienziel war deshalb die Ermittlung der Akutwirkung einer intrakoronaren Applikation von Quinaprilat (Q, aktiver Metabolit von Quinapril, ACE-Hemmer mit hoher Gewebeaffinität) auf die koronare Vasomotion, die Bestimmung der akuten antioxidativen Potenz, sowie des transkardialen Endothelgradienten vor und nach Q. Parallel dazu wurden endothelzellspezifische Effekte in Zellkulturmodellen detailliert untersucht.

Methoden:

Patientenstudie: Koronare Vasomotion nach i.c. Gabe von Q (Accupro iv) bei Patienten nach HTX:

Die epikardiale (QCA) und mikrovaskuläre (i.c. Doppler) Vasodilatation nach Q (1,5 mg/ 3 min und 5 mg/ 5 min) wurde bei 32 herztransplantierten Patienten (31 ± 36 Monate nach HTX) untersucht. Die Endothelfunktion wurde vor und nach Q-Gabe im Acetylcholin-Test ermittelt. In Kooperation mit Prof. Becker (Physiologisches Institut, LMU) wurden jeweils arterielle und koronarvenöse Konzentrationen für GSH und GSSG (Glutathionstatus, Marker für oxidativen Stress) im Vollblut vor und nach Q mittels HPLC gemessen. Trankardiale ET-Spiegel wurden aus den entsprechenden EDTA-Plasmaproben im ELISA (*Biomedica*) ermittelt. Zusätzlich wurde eine semiquantitative Bestimmung von 3-Nitrotyrosinresten in Plasmaproteinen mittels ELISA (*TCS Biologicals*) durchgeführt.

Der Mechanismus der *in vivo* beobachteten akuten Interaktion von Quinaprilat mit dem Glutathionsystem wurde *in vitro* (Blutproben) genauer charakterisiert.

Zellkulturversuche:

Als Basis für die Versuche mit Endothelzellen wurde ein Modell für aortale Endothelzellen vom Schwein (PAEC) etabliert, sowie ergänzend eine Zelllinie humaner mikrovaskulärer Zellen (HMEC-1) verwendet.

Endothelin-1 Konzentrationen im Zellüberstand wurden mittels Radioimmunoassay (RIA) bzw. im ELISA (*Biotrend*) bestimmt.

Die NO-Freisetzung der Zellen wurde durch Fluoreszenzmessungen (DAF-2) verifiziert, die Interaktion von NO-Donoren mit intrazellulärem Glutathion mit einer modifizierten enzymatischen Bestimmungsmethode nach Tietze untersucht.

Zur Bestimmung antioxidativer Effekte von Q wurde zunächst die Superoxid-anionenfreisetzung von HUVEC in Kooperation mit Dr. Sohn (Lehrstuhl Prof Pohl, Physiologisches Institut, LMU) in einem Cytochrom C/SOD-Assay gemessen.

Weiterführende Untersuchungen wurden mit einer DCF-Fluoreszenzmethode bei Herrn Prof. Krombach (Institut für Chirurgische Forschung, LMU) durchgeführt.

Ergebnisse: Der ACE-Hemmer Quinaprilat (Q) bewirkt bei herztransplantierten Patienten akut eine signifikante, konzentrationsabhängige koronare Vasodilatation ohne Beeinflussung von Herzfrequenz und Blutdruck, sowie eine partielle Verbesserung der epikardialen und mikrovaskulären Endothelfunktion.

Die durch Q vermittelte Vasodilatation ist verbunden mit einer akuten, signifikanten Verminderung der Glutathionblutspiegel (GSH) ohne Beeinflussung von GSSG. Zusätzliche L-Arginingabe verstärkt diesen Effekt.

In vitro Tests zum Einfluß von NO auf die Blutspiegel von Glutathion ergeben eine signifikante Abnahme von GSH, verbunden mit der Bildung von GSNO. Sie zeigen einen schnellen Abbau von GSNO und schließen eine direkte Interaktion von Q mit GSH aus. Entsprechend bewirken NO-Donoren eine Verminderung von GSH in Endothelzellen.

Ein Einfluß einer Kurzinfusion von Q auf Plasmaspiegel von Endothelin-1 konnte nicht nachgewiesen werden. Der transkardiale Gradient wird tendenziell in Richtung einer Aufnahme verändert.

In Endothelzellmodellen bewirkt eine Inkubation mit Q über 6h dagegen eine konzentrationsabhängige Hemmung der basalen und stimulierten Freisetzung von Endothelin, die im Vergleich zu Enalaprilat stärker ausgeprägt ist.

Während akut *in vivo* keine Abnahme von Nitrotyrosin oder GSSG als Marker für oxidativen Stress nachweisbar ist, bewirkt die Inkubation von

Endothelzellen mit Q eine konzentrations- und zeitabhängige Verminderung der basalen und stimulierten DCF-Fluoreszenz.

Schlußfolgerung: Die prospektive Studie zeigt, daß Quinaprilat stark koronarvasodilatierend wirkt und teilweise die Endothelfunktion bereits akut auch bei herztransplantierten Patienten verbessern kann. In Verbindung mit den Ergebnissen der Zellkultur sprechen unsere Daten somit für weiterführende Studien zum langfristigen Einsatz des ACE-Hemmers Quinaprilat nach HTX. Akute antioxidative Effekte sind mit Hilfe des Glutathionstatus noch nicht nachweisbar. Die beobachtete intrakoronare GSH-Verminderung nach akuter ACE-Hemmung, verstärkt durch L-Arginin, ist jedoch auch nicht mit der vermehrten Bildung von oxidiertem Glutathion verbunden. Vielmehr unterstützen die durchgeführten *in vitro* Untersuchungen in Verbindung mit Literaturdaten die Hypothese, daß der festgestellte, akute koronarvasodilatatorische Effekt einer ACE-Inhibition mit Quinaprilat assoziiert ist mit einer stark verbesserten Bioverfügbarkeit von NO unter intermediärer Bildung von in Vollblut instabilem Nitrosoglutathion.

Der bereits akut ausgeprägte positive Effekt auf die koronare NO-Produktion könnte sich langfristig (auch durch Induktion der eNOS-Expression) verstärken. Insbesondere können auch die *in vitro* gezeigte, antioxidative Wirksamkeit und inhibierende Effekte auf das Endothelinsystem zum Erhalt oder einer Wiederherstellung der koronaren Endothelfunktion beitragen. Möglicherweise lassen sich damit auch morphologische Veränderungen einer Transplantatvaskulopathie verhindern und eine Verbesserung der Prognose für herztransplantierte Patienten erreichen.

6. VERZEICHNISSE

6.1. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1.1.a:** Strukturformel von Quinapril
- Abb.1.3.3.a:** Duales Wirkprinzip der ACE-Hemmung
- Abb.1.3.3.b:** Interaktionen zwischen ACE, Kininen und NO
- Abb.1.4.1.a:** Modell der Aktivierung von NAD(P)H-Oxidase und der funktionellen Konsequenzen in kardiovaskulären Zellen
- Abb. 1.4.3.a:** Strukturformeln von GSH und GSSG
- Abb.1.4.3.b:** Redoxfunktionen von Glutathion
- Abb.1.5.a:** Biosynthese von Endothelin-1₁₋₂₁
- Abb.2.3.7.1.a:** Anordnung der Wells zur Inkubation mit Cytochrom C
- Abb.3.1.a :** Schema der Substanzinfundierung und Blutproben
- Abb.3.1.1.a:** Einfluß von Q auf epikardiale Koronargefäße
- Abb.3.1.1.b:** Einfluß von Q auf die koronare Mikrozirkulation
- Abb.3.1.1.c:** Einfluß von Q auf die epikardiale Endothelfunktion
- Abb.3.1.1.d:** Einfluß von Q auf die mikrovaskuläre Endothelfunktion
- Abb. 3.1.1.e:** Einfluß einer zusätzlichen L-Arginininfusion auf die mikrovaskuläre Endothelfunktion nach Q
- Abb.3.1.2.1.a:** Akuter Effekt von Q auf Gesamtglutathion
- Abb.3.1.2.1.b:** Akuter Effekt von Q auf GSH
- Abb.3.1.2.1.c:** Vergleich der Glutathiondifferenzen in den Patientenkollektiven ohne und mit L-Argininfusion
- Abb.3.1.2.2.a:** Effekte von NO und GSNO auf Vollblutspiegel von GSH, GSSG, GSNO
- Abb.3.1.3.a:** Endothelinplasmaspiegel vor und nach Quinaprilat i.c.
- Abb.3.1.3.b:** Akuter Effekt von Quinaprilat i.c. auf den transkardialen Endothelingradienten
- Abb.3.1.4.a:** Akuter Effekt von Quinaprilat i.c. auf 3-NT-Plasmaspiegel
- Abb.3.2.1.a:** Strukturen von DAF-2 und DAF-2 T
- Abb.3.2.1.b:** Detektion der basalen NO-Produktion von PAEC mit DAF-2
- Abb.3.2.1.c:** Basale NO-Produktion von PAEC mit und ohne L-Arginin 100µM
- Abb.3.2.1.d:** NO-Produktion von PAEC mit Quinaprilat
- Abb 3.2.2.a:** Kinetik der ET-Freisetzung von PAEC (1.Passage)
- Abb 3.2.2.b:** Stimulation und Hemmung der ET-Freisetzung von PAEC

- Abb.3.2.2.c:** Korrelation der ET-Konzentration im Überstand (pg/ml Medium) zur freigesetzten ET-Menge bezogen auf Gesamtprotein (pg/ μ g Protein)
- Abb.3.2.2.d:** Normierung der sezernierten Menge an ET auf die Proteinmengen der Zellkultur
- Abb.3.2.2.e:** Kontrollversuch zur Hemmung der ET-Sekretion durch Phosphoramidon
- Abb.3.2.2.f:** Hemmung der ET-Sekretion durch unterschiedliche Quinaprilatkonzentrationen
- Abb.3.2.2.g:** Vergleichender Versuch mit Enalaprilat
- Abb.3.2.2.h:** Parallelversuch mit Quinaprilat und Enalaprilat
- Abb.3.2.2.i:** Effekt von Bradykinin auf die ET-Sekretion
- Abb.3.2.2.j:** Effekte von Quinaprilat auf die ET-Sekretion mikrovaskulärer Zellen
- Abb.3.2.3.a:** GSH-Standardreihe in 0,1% Triton X 100; 2,5% 5-Sulfosalicylsäure
- Abb.3.2.3.b:** Hemmung der GSH-Synthese in PAEC mit BSO
- Abb.3.2.3.c:** Verminderung des intrazellulären GSH durch NO
- Abb.3.2.4.1.a:** Hemmung der basalen Superoxidanionfreisetzung durch Quinaprilat
- Abb.3.2.4.2.a:** Kinetik der basalen DCF-Fluoreszenz in PAEC
- Abb.3.2.4.2.b:** Effekt von Bradykinin auf die DCF-Fluoreszenz in PAEC
- Abb. 3.2.4.2.c:** Stimulation und Hemmung der NAD(P)H-Oxidase in PAEC
- Abb.3.2.4.2.d.:** Einfluß von L-NA auf die basale und aktivierte DCF-Fluoreszenz in PAEC
- Abb.3.2.4.2.e:** Einfluß von Quinaprilat auf die basale DCF-Fluoreszenz in PAEC
- Abb.3.2.4.2.f:** Einfluß von Angiotensin und Quinaprilat auf die DCF-Fluoreszenz
- Abb.4.1.a:** Signalübertragungswege von NO/O₂⁻

6.2. Tabellenverzeichnis

- Tab.1.2.a:** Wichtige Angiotensin II vermittelte Wirkungen
- Tab 1.3.1.a:** Endothelfunktion
- Tab 1.5.a:** Aktivierung und Hemmung des Endothelinsystems
- Tab 1.5.b:** Vaskuläre Effekte von Endothelin
- Tab.3.1.2.1.a:** Konzentration von GSH vor und nach Q im Vollblut
- Tab 3.2.2.a:** Daten zu Abb 3.2.2.a
- Tab.3.2.2.b:** Daten zu den Abbildungen 3.2.2.b und 3.2.2.d
- Tab.4.1.a:** Reaktionen und Metabolismus von GSNO

6.3. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
art	arteriell
AT II	Angiotensin II
AVD	Arteriovenöse Differenz
BK	Bradykinin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
cv	koronarvenös
DPI	Diphenyliodonium
E	Enalaprilat
EC	Endothelzellen
ECE	Endothelin-Converting-Enzyme
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor(s)
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HTX	Herztransplantation
i.c.	intrakoronar
iNOS	induzierbare NO-Synthase
3-NT	3-Nitrotyrosin
PGI ₂	Prostacyclin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat, 13-Acetat
Q	Quinaprilat
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxiddismutase
TVP	Transplantatvaskulopathie
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen

- Ades EW, Candal, FJ, Lawley TJ et al** (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line
J Invest Dermatol 99(6): 683-90
- Anderson TJ, Elstein E, Haber H, Charbonneau F.,** (1999) Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF study).
J Am Coll Cardiol 34:60-6
- Amirmansour C, Vallance P, Bogle RG** (1999) Tyrosine nitration in blood vessels occurs with increasing nitric oxide concentration
British Journal of Pharmacology 127: 788-794
- Apectar E, Teiger E, Dubois-Rande JL et al** (2000) Effects of bradykinin on coronary blood flow and vasomotion in transplant recipients
J Am Coll Cardiol 35(6): 1607-15
- Asberg A, Midtvedt K, Hartmann A et al** (2001) Better microvascular function on long-term treatment with lisinopril than with nifedipine in renal transplant recipients
Nephrol Dial Transplant 16(7): 1465-70
- Augustin HG, Koziar DH, Johnson RC,** (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes
BioEssays 16 (12) :901-905
- Baumgarten CR, Linz W, Wiemer G et al** (1993) Ramiprilat increases bradykinin outflow from isolated hearts of rats
Br J Pharmacol 108: 293-295
- Bayraktutan U, Draper N, Shah AM et al** (1998) Expression of a functional neutrophil-type NADPH-oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells
Cardiovascular Research 38: 256-262
- Benacerraf S, Carville C, Dubois-RandeJ-L et al** (1999) Improvement of bradykinin endothelium-mediated vasodilation of forearm resistance circulation by quinaprilat in patients with coronary artery disease with or without left ventricular dysfunction
J of Cardiovasc Pharmacol 34: 368-373
- Benzig T, Fleming I, Blaukat A, Müller-Esterl W, Busse R** (1999) Angiotensin-converting enzyme inhibitor Ramiprilat interferes with sequestration of the B2 kinin receptor within plasma membrane of native endothelial cells
Circulation 99:2034-2040
- Best P, Lerman A** (2000) Endothelin in cardiovascular disease: from atherosclerosis to heart failure
Journal of Cardiovascular Pharmacology 35 (Suppl. 2): S61-S63
- Boegehold MA** (1998) Heterogeneity of endothelial function within the circulation
Current Opinion in Nephrology & Hypertension 7:71-78
- Boldt J, Papsdorf M, Hempelmann G et al** (1998) Influence of angiotensin-converting

- enzyme inhibitor enaprilat on endothelial derived substances in the critically ill
Crit Care Med 26: 1663-1670
- Brown N., Vaughan DE** (1998) Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors.
Circulation 97: 1411-1420.
- Brunner F, Kukovetz WR** (1996) Poatiscemic antiarrhythmic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors-Role of suppression of endogenous endothelin secretion
Circulation 94: 1752-1761
- Burnett JC** (1997) Coronary endothelial function in health and disease
Drugs 53 Suppl.1: 20-39
- Cai H, Harrison DG** (2000) Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of **Oxidant** Stress
Circulation Research 87:840-852
- Chappel MC, Gomez MN, Ferrario CM et al** (2000) Release of angiotensin-(1-7) from the rat hindlimb: influence of angiotensin-converting enzyme inhibition
Hypertension 35: 348-52
- Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abrahamson SB** (1992) Nitric Oxide, an endothelial cell relaxing factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase
J Clin Invest 90: 1116-1121
- Clancy RM, Levartovsky D, Abramson SB et al** (1994) Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary
Proc Natl Acad Sci USA 91: 3680-3684
- Cross AR, Jones OTG** (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide generating system of neutrophils
Biochem J 237: 111-116
- Cunningham D, Crisp S, Yacoub M et al** (1998) Donor ACE gene polymorphism: a genetic risk factor for accelerated coronary sclerosis following cardiac implantation
Eur Heart J 19: 319-25
- Curzen N** (1997) Do ACE inhibitors modulate atherosclerosis?
European Heart Journal 18: 1530-1534
- Cushman DW, Cheung HS, Ondetti MA et al** (1977) Design of potent inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids
Biochemistry 16: 5484-5491
- Cushman DW, Cheung HS.** (1971) Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat
Biochim. Biophys. Acta 250:261-265
- Cushman DW, Ondetti MA.** (1991) History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme.
Hypertension 17(4): 589-92

- D'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Lüscher TF** (2000) Endothelin in atherosclerosis: Importance of risk factors and therapeutic implications
Journal of Cardiovascular Pharmacology 35 (Suppl 2): S55-S59
- Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA et al** (1995) Angiotensin-converting enzyme in the human heart: effect of the deletion/insertion polymorphism
Circulation 92: 1387-1388
- De Cavanagh E, Inserra F** (1997) Enalapril and Captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues
Am J Physiol 272:R514-R518
- Deng MC, Plenz G, Baba HA et al** (2000) Transplant Vasculopathy : a model for coronary artery disease?
Herz 25: 95-99
- Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ** (1996) Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease
Circulation 94:2756-2767
- Drexler H** (1999) Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans
Cardiovascular Research 43: 572-579
- Drexler H, Fischell TA, Pinto FJ et al** (1994) Effect of L-arginin on coronary endothelial function in cardiac transplant patients
Circulation 89: 1615-1623
- Dzau VJ, Bernstein K, Weber M et al** (2001) The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data
Am J Cardiol 88 (suppl): 1L-20L
- Ellmann GL** (1959) Tissue sulfhydryl groups
Arch Biochem Biophys 82: 70-77
- Emori T, Hirata Y, Marumo F et al** (1991) Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin
Hypertension 18: 165-170
- Enseleit F, Hürlimann D, Lüscher TF** (2001) Vascular protective effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and their relation of clinical events
Journal of Cardiovascular Pharmacology 37 (Suppl.1): S21-S30
- Erdös EG, Sloane EM** (1962) An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidin
Biochemistry and Pharmacology 11: 585-592
- Fabris B, Jackson B, Cubela R., Mendelsohn F.A.O., Johnston Cl.** (1989) Angiotensin-converting enzyme in the rat heart: studies of its inhibition in vitro and ex vivo.
Clin. Exp.Pharmacol. Physiol. 16: 309-313
- Fang JC, Kinlay S, Ganz P et al** (2002) Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial
Lancet 359: 1108-13

- Ferrari R, Alfieri O, Visioli O et al** (1990) Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human heart.
Circulation 81: 201-211
- Ferreira SH** (1985) History of the development of inhibitors of angiotensin I conversion
Drugs 30 Suppl 1: 1-5
- Förstermann U** (2001) Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: die Blutgefäße
In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Aufl: 479-486, Urban&Fischer Verlag, München
- Fridovic I** (1985) Cytochrom C
In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, Boca Raton, Fla: CRC Press; 121-122
- Galatius-Jensen S, Wroblewski H, Kastrup J et al** (1996) Plasma endothelin in congestive heart failure: effect of the ACE inhibitor, fosinopril
Cardiovasc Res 32(6): 1148-54
- Geny B, Piquard F, Habery P et al** (1998) Endothelin and heart transplantation
Cardiovascular Research 39: 556-562
- Ghigo D, Alessio P, Bosia A et al** (1993) Nitric oxide synthesis is impaired in glutathione-depleted human umbilical vein endothelial cells
Am J Physiol 265: C728-C732
- Givertz M.** (2001) Manipulation of the Renin-Angiotensin System.
Circulation 104:e14
- Görlach A, Brandes BP, Busse R** (2000) A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall
Circulation Research 87(1): 26-32
- Grenier O, Pousset F, Komajada M et al** (1996) Captopril does not acutely modulate plasma endothelin-1 concentration in human congestive heart failure
Cardiovasc Drugs Ther 10: 561-565
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M** (2000) NAD(P)H oxidase-Role in cardiovascular biology and disease
Circulation Research 86:494-501
- Groves P, Kurz S, Drexler H et al** (1995) Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control
Circulation 92: 3424-3430
- Guzik TJ, West NE, Channon KM** (2000) Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors
Circulation Research 86(9): E85-90
- Haefeli WE, Lindner L, Lüscher TF** (1997) Quinaprilat induces arterial vasodilation mediated by nitric oxide in humans
Hypertension 30: 912-917

- Halliwell B** (1997) What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as biomarker of peroxynitrite formation in vivo?
FEBS Letters 1997: 157-160
- Hartmann A, Weis M, Schröder R et al** (1994) Endothelium-dependent and endothelium-independent vasomotion in large coronary arteries and in the microcirculation after cardiac transplantation
European Heart Journal 15: 1486-1493
- Hayes JD, McLellan L** (1999) Glutathion and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defense against oxidative stress
Free Rad Res 31: 273-300
- Herce-Pagliai C, Shuker DEG** (1998) Analytical methods for 3-nitrotyrosin as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review
NitricOxide 5: 324-336
- Holland JA, Pritchard KA, Stemerman MB et al** (1990) Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells
Journal of Cellular Physiology 143: 21-25
- Hollenberg SM, Klein LW, Costanzo MR et al** (2001) Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death
Circulation 104: 3091-3096
- Hornig B, Arakawa N, Drexler H et al** (1998) Differential effects of quinaprilat and enaprilat on endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure
Circulation 98: 2842- 2848
- Hornig B, Landmesser U, Kohler C, Ahlersmann D, Drexler H** (2001) Comparative effect of ace inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailabiloty of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase
Circulation 103(6):799-805
- Ignarro LJ, Lippton H, Gruetter CA et al** (1981) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for involvement of S-nitrosothiols as active intermediates.
J Pharmacol Exp Ther 218: 739-749
- Imai T, Hirata Y, Marumo F et al** (1992) Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells
Hypertension 19: 753-757
- Inanami O, Johnson JL, Babior BM et al** (1998) Activation of the leucocyte NAD(P)H oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47-phox on serine 303 or 304
J Biol Chem 273:9539-9543
- Irani K** (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth , death and survival
Circulation Research 87:179-183
- Ishikawa T, Zimmer M, Sies H** (1986) Energy-linked transport system for glutathiondisulfid

FEBS Lett 200: 182-132

Jakubowski W, Bartosz G (2000) 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: What does it measure?

Cell Biology International 24(10): 757-760

Ji Y, Akerboom TPM, Thomas JA et al (1999) S-Nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitrosoglutathione

Archives of Biochemistry and Biophysics 362: 67-78

Johnston C.I., Burell L.M., Perich R., Jandeleit K., Jackson B. (1992) The tissue renin-angiotensin system and its functional role

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 19 (Suppl.): 1-5

Jones SA, O'Donnell VB. Jones OTG et al (1996) Expression of phagocyte NADPH oxidase in human endothelial cells

Am J Physiol 40: H 1626- H1634

Kashiba M, Kasahara E, Inoue M et al (1999) Fates and vascular action of S-Nitrosoglutathione and related compounds in the circulation

Archives of Biochemistry and Biophysics 363(2): 213-218

Keilani T, Schlueter W, Butte D et al (1995) Selected aspects of ACE inhibitor therapy for patients with renal disease: impact on proteinuria, lipids and potassium.

J Clin Pharmacol 35: 87-97

Khan J, Brennan DA, Jacobs M et al (1998) 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method

Biochem J 330: 795-801

King SJ, Oparil S (1992) Converting-enzyme inhibitors increase converting-enzyme mRNA and activity in endothelial cells

Am J Physiol 32: C743-C749

Kinlay S, Behrendt D, Ganz P (2001) Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries

Circulation 104:1114-1118

Kinoshita A, Urata H, Husain A (1993) Measurement of Angiotensin I Converting Enzyme inhibition in the heart

Circulation Research 73: 51-60

Kissner R, Nauser T, Koppenol WH et al (1997) Formation and properties of peroxynitrite studied by laser flash photolysis, high pressure stopped flow and pulse radiolysis

Chem Res Toxicol 10: 1285-1292

Kuebrich M, Weis M, von Scheidt W et al (2002) Prognostische Bedeutung der koronaren Endotheldysfunktion nach Herztransplantation

Zeitschrift für Kardiologie 91Suppl 1: P872

Lee Min A.E., Paul M., Böhm M., Ganten D. (1992) Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors on Tissue Renin-Angiotensin Systems

Am. J. Cardiol. 70: 12c-19c

Lerman A, Holmes D, Bell M et al (1995) Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans
Circulation 92: 2426-2431

Li H, Oehrlein SA, Kleinert H et al (1998) Activation of protein kinase C α and/or ϵ enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene
Molecular Pharmacology 53: 630-637

Li H, Oehrlein SA, Kleinert H et al (1998) Activation of Protein Kinase C α /or ϵ enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene
Mol Pharm 53(4): 630-637

Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA (1995) Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors
Pharmacological Reviews 47: 25-49

Linz W, Wohlfahrt P, Schölkens BA, Malinski T, Wiemer G (1999) Interaction among ACE, kinins and NO
Cardiovascular Research 43: 549-561

Lum H, Roebuck KA (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction
Am J Physiol Cell Physiol 280: C719-C741

Lüscher TF, Barton M (2000) Endothelins and endothelin receptor antagonists
Circulation 102:2434-2457

Lusis AJ (2000): Atherosclerosis
Nature 407: 233-242

Mancini GBJ, Henry GC, Macaya C et al (1996) Angiotensin converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease; The TREND study
Circulation 94:258-65

Marsden PA, Brenner BM (1992) Transcriptional regulation of the endothelin gene by TNF α
Am J Physiol 262: C854-C861

Massoudy P, Becker BF, Gerlach E et al (1994) Bradykinin accounts for improved postischemic function and decreased glutathione release of guinea pig heart treated with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat
Journal of Cardiovascular Pharmacology 23: 632-639

Massoudy P, Becker BF, Gerlach E et al (1995) Nitric oxide accounts for postischemic cardioprotection resulting from angiotensin-converting enzyme inhibition: indirect evidence for a radical scavenger effect in isolated guinea pig heart
Journal of Cardiovascular Pharmacology 25: 440-447

Mayer B, Pfeiffert S, Brunner F et al (1998) A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione
The Journal of Biological Chemistry 273(6): 3264-3270

- Mehra MR, Ventura HO, Smart FW et al** (1995) An intravascular ultrasound study of the influence of angiotensin-converting enzyme inhibitor and calcium entry blockers on development of cardiac allograft vasculopathy
Am J Cardiol 853-4
- Meister A** (1988) Glutathion metabolism and its selective modification
The Journal of Biological Chemistry 263: 17205-17208
- Meyer JW, Schmitt ME** (2000) A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis
FEBS Letters 472 (1): 1-4
- Michelet F, Guegen R, Siest G et al** (1995) Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: Relation to sex, aging, biological variables, and life habits
Clin Chem 41/10: 1509-1517
- Miyauchi T** (1999) Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system
Annu Rev Physiol 61: 391-415
- Mohazzab-H KM, Kaminski PM, Wolin MS** (1994) NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium
Am J Physiol 266: H2568- H2572
- Mollnau H, Wendt M, Münzel T et al** (2002) Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling
Circ Res 90(4): E58-65
- Mombouli J-v, Vanhoutte PM** (1995) Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle
Annual Review of Pharmacology and Toxicology 35: 679-705
- Momose N, Fukuo K, Ogihara T et al** (1993) Captopril inhibits endothelin-1 secretion through bradykinin
Hypertension 21: 921-924
- Münzel T, Keaney JF, Jr** (2001) Are ACE inhibitors a magic bullet against oxidative stress?
Circulation 104:1571-1574
- Murphy HS, Yu C, Quddus J** (2000) Functional expression of NAD(P)H oxidase p47 in lung microvascular endothelial cells
Biochemical and Biophysical Research Communications 278: 584-589
- Nakatsubo N, Kojima H, Nagano T et al** (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins
FEBS Letters 427:263-266
- Nikitovic D, Holmgren A** (1996) S-Nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide
The Journal of Biological Chemistry 32: 19180-19185

O'Donnell VB, Freeman BA (2001) Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways

Circulation Research 88:12-21

Okada K, Nishida Y, Okada M et al (1998) Role of endogenous endothelin in the development of graft arteriosclerosis in rat cardiac allografts

Circulation 97: 2346-2351

Oosterga M, Voors AA, Buikema H, Pinto YM, van Gilst WH (2000) Angiotensin II formation in human vasculature after chronic ACE inhibition: a prospective, randomized placebo-controlled study. QUO VADIS Investigators.

Cardiovascular Drugs Ther 14(1):55-60

Park J-W, Billman GE, Means GE (1993) Transnitrosation as a predominant mechanism in the hypotensive effect of S-nitrosoglutathione

Biochemistry and Molecular Biology International 30: 885-891

Pethig K, Heublein B, Haverich A et al (2000) ACE-gene polymorphism is associated with the development of allograft vascular disease in heart transplant recipients

J Heart Lung Transplant 19: 1175-1182

Porsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M (1994) Release of nitric oxide by angiotensin (1-7) from porcine coronary endothelium: implications for novel angiotensin receptor

Br J Pharmacol 11: 652-654

Possel H, Noack H, Wolf G et al (1997) 2,7-Dichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation

FEBS Lett 416:175-178

Prasad A, Narayanan S, Quyyumi A et al (2000) Insertion-deletion polymorphism of the ACE gene modulates reversibility of endothelial dysfunction with ace inhibition

Circulation 102: 35-29

Rachmani R, Lidar M, Ravid M (2000) Oxidation of low-density lipoprotein in normotensive type 2 diabetic patients. Comparative effects of enalapril versus nifedipin: a randomized cross over study

Diabetes Res Cli Pract 48(2):139-145

Ranta V, Orpana A, Viinikka L et al (1996) Culturing of human vascular endothelial cells strongly effects their endothelin-1 and prostacyclin production

Molecular and Cellular Biochemistry 177: 251-255

Rajagopalan S, Kurz S, Harrison DG et al (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone

J Clin Invest 97(8): 1916-23

Ravalli S, Szabolcs M, Cannon PJ et al (1996) Increased immunoreactive endothelin-1 in human transplant coronary artery disease.

Circulation 94 (9): 2096-102

Roth HJ, Fenner H et al (1988) Angiotensin Converting Enzym-Hemmstoffe.

In *Pharmazeutische Chemie III, Arzneistoffe*, 2. Aufl. ; Thieme Verlag, Stuttgart

Rubanyi GM, Polokoff MA (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology.

Pharmacol Rev 46: 325-415

Russel FD, Skepper JN, Davenport AP (1998) Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin

Journal of Cardiovascular Pharmacology 31: 424-430

Sanchez R, Maceknie A, Thorin E et al (2002) Endothelin B receptor-mediated regulation of endothelin-1 content and release in cultured porcine endothelial cells

Journal of Cardiovascular Pharmacology 39: 654-659

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease

Circulation 101: 1899-1913

Schächinger V, Zeiher AM (2000) Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction

Z Kardiol 89 Suppl 9: IX/70-4

Schalkwijk CG, Smulders RA, Stehouwer CD et al (2000) ACE-inhibition modulates some endothelial functions in healthy subjects and in normotensive type 1 diabetic patients

Eur J Clin Invest 30(10): 853-60

Schettler V, Methe H, Müller GA, Wieland E (2000) Acute effect of H.E.L.P. treatment on radical scavenging enzyme activities, total glutathione concentrations in granulocytes and selenium in plasma

European Journal of Clinical Investigation 30: 26-32

Schiffrin EL, Touyz RM (1998) Vascular Biology of Endothelin

Journal of Cardiovascular Pharmacology 32:S2-S13

Schimke I, Schikora M, Baumann G et al (1999) Oxidative stress in human heart is associated with changes in the antioxidative defense as shown after heart transplantation

Molecular and cellular biochemistry 204: 89-96

Schlaifer JD, Wargovich TJ, Pepine CJ et al (1997) Effects of Quinapril on coronary blood flow in coronary artery disease in coronary artery disease patients with endothelial dysfunction

The American Journal of Cardiology 80: 1594-1597

Schölkens BA, Landgraf W (2001) ACE-Hemmung und Atherogenese

Der Internist 42: 1219-1225

Siems W, Krämer K, Grune T (1996) Zur Chemie und Biologie des Glutathionsystems: ein Überblick

Pharmazeutische Zeitung 45:4239-4250

Singh SP, Wishnok JS, Tannenbaum SR et al (1996) The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system

Proc Natl Acad Sci USA 93: 14428-14433

- Stamler JS, Simon DI, Loscalzo J et al** (1992) S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties of the enzyme
Natl Acad Sci USA 89: 8087-8091
- Stuehr DJ, Fasehun OA, Nathan CF** (1991) Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs
FASEB J 5: 98-103
- Stuehr DJ, Olufumilayo A, Nathan CF** (1991) Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs
FASEB J 5: 98-103
- Sung C, Shikano K, Berkowitz BA** (1988) Characterization and function of bradykinin receptors in vascular endothelial cells
J Pharmacol Exp Ther 247: 8-13
- Taddei S, Favilla S, Salvetti A et al** (1991) Vascular renin angiotensin system and neurotransmission in hypertensive persons.
Hypertension 18: 266-277
- Tarpey MM, Fridovich I** (2001) Methods of detection of vascular reactive species-nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite
Circulation Research 89: 224-236
- Tayara L, Giaid A** (2000) Endothelin in cardiac transplantation
Z Kardiol 89: Suppl 9, IX/28-IX/31
- Ter Steege JCA, Koster-Kamphius L, Buurman WA et al** (1998) Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA
Free Radical Biology & Medicine 25(8): 953-963
- Tietze F** (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and tissue
Anal Biochem 27: 502-522
- Tohmo H, Karanko M, Neuvonen P et al** (1994) Enalaprilat in acute intractable heart failure after myocardial infarction: a prospective, consecutive sample, before-after trial
Crit Care Med 22(6): 965-73
- Tohmo H, Karanko M, Ruskoaho H et al** (1997) Enalaprilat decreases plasma endothelin and atrial natriuretic peptide levels and preload in patients with left ventricular dysfunction after cardiac surgery
J Cardiothorac Vasc Anesth 11(5): 585-90
- Townend J, Doran J, Davies M et al** (1994) Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on plasma endothelin in congestive heart failure
Int J Cardiol 43(3): 299-304
- Touyz RM, Chen X, Chiffirin EL et al** (2002) 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
Circulation Research 90(11): 1205-1213

- Treasure CB, Vita JA, Selwyn AP et al** (1992) Loss of the coronary microvascular response to acetylcholine in cardiac transplant patients
Circulation 86: 1156-1164
- Vejlstrup NG, Andersen CB, Aldersvhile J et al** (2002) Temporal changes in myocardial nitric oxide synthase expression following human heart transplantation
J Heart Lung Transplant 21: 211-6
- Verma S, Anderson TJ** (2002) Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist
Circulation 105:546
- Von Scheidt W** (2000) Herztransplantation
In *Klinische Kardiologie*, 4. Auflage; Springer Verlag , Heidelberg
- Wang H, Joseph JA** (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader
Free Radic Biol Med 27(5-6): 612-616
- Wang W, Ballatori N** (1998) Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions
Pharmacological Reviews 50: 335-355
- Warnholtz A, Nickenig G et al** (1999) Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system.
Circulation 99:2027-2033
- Wattanapitayakul S,, Weinstein D, Bauer JA et al** (2000) Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders
FASEB J 14: 271-278
- Weis M, Pehlivanli S, von Scheidt W** (2000) Heart allograft endothelial cell dysfunction. Cause, course, and consequences
Z Kardiol 89: Suppl 9, IX/58-IX/62
- Weis M, von Scheidt W** (2000) Coronary artery disease in the transplanted heart
Annu Rev Med 51: 81-100
- Weis M, Wildhirt SM, Schulze C et al** (1999) Endothelin in coronary endothelial dysfunction early after heart transplantation
J Heart Lung Transplant 18: 1071-1080
- Weis M, Wildhirt SM, von Scheidt W et al** (1999) Modulation of coronary vasomotor tone by cytokines in cardiac transplant recipients
Transplantation 68(9): 1263-1267
- Weis M, Wolf WP, Hartmann A et al** (1997) Variations of segmental endothelium-dependent and endothelium-independent vasomotor tone after cardiac transplantation (qualitative changes in endothelial function)
Am Heart J 134 (2 Pt 1): 306-15
- Weiss D, Sorescu D, Taylor WR** (2001) Angiotensin and Atherosclerosis

Am J Cardiol 87 (suppl):25C-32C

Wiemer G, Schölkens BA, Busse R (1991) Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin
Hypertension 18: 558-563

Wink DA, Mitchell JB (1999) Antioxidant effects of nitric oxide
Methods in Enzymology 301:413-424

Wink DA, Nims RW, Mitchell JB et al (1994) Reaction kinetics of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ Reaction
Chem Res Toxicol 7: 519-525

Yong X, Roman LJ, Zweier JL (1998) Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain
Journal of Biological Chemistry 273: 22635-22639

Yoshida H, Nakamura M (1992) Inhibition by angiotensin converting enzyme inhibitors of endothelin secretion from cultured human endothelial cells
Life Sciences 50: PL-195-PL-200

Yusuf S, Sleight P, Dagenais G et al (2000) Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high risk Patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study investigators
N Engl J Med 342: 145-53

Zhang H, Schmeißer A, Daniel WG et al (1999) Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: Role of membrane-bound NADH/NADPH-oxidases
Cardiovascular Research 44: 215-222

Zeiber AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H (1991) Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with early stages of coronary atherosclerosis
Circulation 83:391-401

Zeiber AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H (1991) Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with impaired coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis
Circulation 84:1984-92

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. W. von Scheidt und Herrn Dr. M. Weis für die Überlassung des interessanten Themas, das mir als Pharmazeutin - neben der Tätigkeit im Labor - auch wertvolle Einblicke in die kardiologische und klinische Anwendung ermöglichte. Ihr stetes Interesse und beständige Unterstützung hatten wesentlichen Anteil am Gelingen meiner Arbeit.

Die Durchführung dieser Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der DFG bot unter der Leitung von Herrn Prof. W. Siess, über die finanzielle Unterstützung hinaus, zahlreiche Möglichkeiten zur Teilnahme an Seminaren und Symposien, Praktika und hochinteressanten Vorträgen sowie hervorragende Kooperationsmöglichkeiten. Bei Herrn Prof. W. Siess möchte ich mich auch bedanken für die Verlängerung meines Stipendiums nach der Geburt meiner Tochter.

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit sind der HPLC-Messung von Glutathion und der sehr guten Kooperation mit Herrn Prof. B.F. Becker, sowie der perfekten technischen Durchführung durch Frau Kiesel zu verdanken.

Sehr konstruktive und engagierte Diskussionen zu den antioxidativen Fragestellungen meiner Arbeit und die Durchführung der Cytochrom C-Messungen verdanke ich Herrn Dr. H.Y. Sohn.

Im Institut von Herrn Prof. F. Krombach konnte ich, unter technischer Anleitung durch Herrn Dr. F. Ringel die DCF-Fluoreszenzmessungen durchführen. Auch diesen gilt mein spezieller Dank.

Ganz besonders hervorheben möchte ich die sehr angenehme Zusammenarbeit und technische Unterstützung durch die Technischen Assistentinnen Frau C. Grimm, A. Plasse und D. Wiegand, sowie die fachliche Beratung durch Herrn Dr. J. Koglin, Herrn Dr. H. Methe und Frau Dr. U. Wilbert-Lampen.

Daß ich meine Arbeit auch nach der Geburt unserer Tochter fertigstellen konnte, dafür bin ich meinem Mann sehr dankbar, der mich dabei immer mit großem Einsatz und viel Geduld unterstützt hat.

Lebenslauf

Name: Silke Unterlinner, geb. Steinhauff

Geburtsdatum : 05. August 1971

Geburtsort : Wilhelmshaven

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Adresse: Sulzbacherstraße 12
80803 München
Tel: 089-1675680
steinhauff.unterlinner @ t-online.de

Schulausbildung: 1977-1981 Grundschule, Schöckingen und
Freudenstadt

1981-1990 Gymnasium Freudenstadt und
Gundelfingen bei Freiburg i. Brsg.

Berufsausbildung: 1990-1995 Studium der Pharmazie an der Julius
Maximilian-Universität, Würzburg

1995-1996 Pharmaziepraktika in der Apotheke
Dr.Hartel, München und der Apotheke
des Klinikum Landshut

16.08.1996 Approbation als Apothekerin

Berufstätigkeit: 1996- 1998 Apothekerin in der Bahnhofapotheke
Garmisch-Partenkirchen

seit 1998 Promotion an der Medizinischen Klinik
und Poliklinik I der Ludwig-
Maximilians-Universität München