

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Effekte der Blockade des Angiotensin II Rezeptors Typ 1
auf die endotheliale und erektile Funktion**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2011

vorgelegt von: Nils Andreas Schlimmer
geboren am 16.03.1982
in Zweibrücken

Inhalt

Seite

1. Zusammenfassung

2. Einleitung

2.1. Einführung	3
2.2. Bedeutung der Endothelfunktion für die Erektion	4
2.3. Ätiologie der erektilen Dysfunktion	7
2.4. Assoziation der erektilen Dysfunktion mit dem kardiovaskulären Risiko	7
2.5. Rolle des Angiotensin II Rezeptors Typ 1 in der Pathogenese der endothelialen und erektilen Dysfunktion	9
2.6. Lokales Angiotensin II als Modulator der erektilen Funktion	13
2.7. Endothelfunktion unter AT ₁ -Rezeptorblockade durch Irbesartan	14
2.8. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	15
Effekte der AT ₁ -Rezeptorblockade durch Irbesartan im Modell der ApoE-Knockout Maus	

3. Material und Methodik

3.1. Materialien	16
3.1.1. Verwendete Substanzen	16
3.1.2. Puffer, Gele und Färbelösungen	17
3.1.3. Biochemische Kits	19
3.1.4. Geräte und Zubehör	19
3.1.4.1. Versuchsübergreifend	19
3.1.4.2. Isometrische Spannungsmessung an isolierten Geweben im Organbad	20
3.1.4.3. Histologie	20
3.1.4.4. Untersuchungen an Gewebehomogenisat	20
3.1.5. Software	21
3.2. Methodik	21
3.2.1. Versuchstiere	21
3.2.2. Tierhaltung	22
3.2.3. Tierfütterung	22
3.2.4. Studienprotokoll	23
3.2.5. Erhebung der Kreislaufdaten	23
3.2.6. Isometrische Spannungsmessung an isolierten Geweben im Organbad	24
3.2.6.1. Anästhesie und Organentnahme	24
3.2.6.2. Versuchsablauf	25
3.2.7. Histologische Untersuchungen	29
3.2.7.1. Kryotomie	29

3.2.7.2. Mikroskopie	29
3.2.7.3. Ölrot-O-Färbung	29
3.2.7.4. Sirius Red-Färbung	30
3.2.7.5. Dihydroethidium-Färbung	31
3.2.7.6. Immunfluoreszenzfärbung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)	32
3.2.7.7. Quantifizierung von Stickstoffmonoxid (Diaminofluoreszeinfärbung)	34
3.2.8. Untersuchungen an Gewebehomogenisat	34
3.2.8.1. Bestimmung der NADPH-Oxidase Aktivität durch Chemiluminiszenz	34
3.2.8.2. Photometrische Quantifizierung der Lipidperoxidation	36
3.2.8.3. Quantifizierung der lokalen Expression des AT ₁ -Rezeptorproteins im Corpus Cavernosum (Immunblot)	38
3.3. Statistische Auswertung	40

4. Ergebnisse

4.1. Effekte der AT ₁ -Rezeptorblockade durch Irbesartan im Modell der ApoE-Knockout Maus	41
4.1.1. Serumlipide	41
4.1.2. Vitalparameter	41
4.1.3. Verbesserung der Endothelfunktion durch AT ₁ R-Blockade	42
4.1.4. Histologische Untersuchungen an Aorten und Corpora Cavernosa unter AT ₁ R-Blockade	48
4.1.4.1. Reduktion atherosklerotischer Läsionen	48
4.1.4.2. Reduktion des fibrotischen Remodelling	49
4.1.4.3. Geringere Last an radikalen Sauerstoffspezies	51
4.1.4.4. Gesteigerte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)	52
4.1.4.5. Gesteigerte endotheliale Stickstoffmonoxidfreisetzung	54
4.1.5. Untersuchungen an Gewebehomogenisat	54
4.1.5.1. Reduktion der NADPH-Oxidase Aktivität	54
4.1.5.2. Reduktion der Lipidperoxidation	55
4.1.5.3. Reduktion der lokalen Expression des AT ₁ -Rezeptorproteins im Corpus Cavernosum unter AT ₁ R-Blockade (Immunblot)	56

5. Diskussion

5.1. Effekte der AT ₁ R-Blockade auf die vaskuläre und kavernöse endotheliale Dysfunktion im Modell der ApoE-Knockout Maus	57
5.1.1. Dyslipidämie und Atherogenese in der ApoE-Knockout Maus	57
5.1.2. Effekte AT ₁ R-abhängiger und AT ₁ R-unabhängiger antihypertensiver Medikation auf die Atheroskleroseentstehung in ApoE-Knockout Mäusen	58

5.1.3. Effekte AT ₁ R-abhängiger und AT ₁ R-unabhängiger antihypertensiver Medikation auf die endotheliale Dysfunktion in der ApoE-Knockout Maus	59
5.1.4. Einfluss der AT ₁ R-Blockade auf die Pathomechanismen der vaskulären und kavernösen endothelialen Dysfunktion	60
5.1.4.1. Peniles und vaskuläres Remodelling	60
5.1.4.2. Oxidativer Status des kavernösen und vaskulären Endothels unter AT ₁ R- Blockade	61
5.1.4.3. Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid im kavernösen und vaskulären Endothel	63
5.1.4.4. Downregulation der AT ₁ -Rezeptorproteinexpression unter Irbesartan	65
5.1.5. Zusammenfassung	67

6. Literaturverzeichnis

7. Publikationen und Danksagung

7.1. Publikationen

7.2. Danksagung

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A, mA	Ampere, Milliampere (10^{-3} Ampere)	x g	Gravitationskonstante ($9,81 \text{ kg x s}^2/\text{m}$)
Abb.	Abbildung		
ACE	angiotensin converting enzyme	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase
ACh	Acetylcholin		
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin	GTN	Glyzeroltrinitrat
Akt	Proteinkinase Akt	h	Stunde
Ang II	Angiotensin II	HDL	high density lipoprotein
ApoE	Apolipoprotein E	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E Knockout		
aqua dest.	destilliertes Wasser	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
α_1 R	alpha 1 Adrenozeptor	HPLC	high pressure liquid chromatography
Atg	Angiotensinogen	Hz, kHz	Hertz, Kilohertz (10^3 Hertz)
AT ₁ R	Angiotensin II Rezeptor Typ 1	ICAM	intercellular adhesion molecule
BH ₄	Tetrahydrobiopterin	IgG	Immunglobulin G
BP	blood pressure	IL	Interleukin
°C	Grad Celsius	IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration	ISLAND	Irbesartan and Lipoic Acid in Endothelial Dysfunction
Ca ²⁺ _v	spannungsabhängiger Kalziumkanal		
CC	Corpus Cavernosum	i.z.	intrazellulär
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	KHK	koronare Herzkrankheit
C.I.	colour index	l, dl, ml, μ l	Liter, Deziliter (10^{-1} Liter), Milliliter (10^{-3} Liter), Mikroliter (10^{-6} Liter)
cm	Zentimeter		
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	λ	Wellenlänge
CRP	C-reaktives Protein	L-Arg	L-Arginin
d	Tag	LDL	low density lipoprotein
DAF (DA)	Diaminofluoreszein (Diazetat)	L-NAME	N _ω -Nitro-L-Arginin Methylester
DAG	Diazylglyzerol	L-NMMA	L-NG-Monomethyl Argininziträt
DHE	Dihydroethidium	log	dekadischer Logarithmus
DMSO	Dimethylsulfoxid	LOX	lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
ECL	Elektrochemiluminiszenz	LPO	Lipidperoxidation
ED	erektile Dysfunktion	M, mM, μ M,	Molar (mol pro Liter),
ED ₅₀	50%-Effektivdosis	nM	Millimolar (10^{-3} mol/l), Mikromolar (10^{-6} mol/l), Nanomolar (10^{-9} mol/l)
EDHF	endothelium derived hyperpolarizing factor	m, mm, μ m,	Meter, Millimeter (10^{-3} Meter), Mikrometer (10^{-6} Meter), Nanometer (10^{-9} Meter)
EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure	nm	
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid- synthase	M ₃	muskarinerner Acetylcholinrezeptor Typ 3
ET	Endothelin		
FGF	fibroblast growth factor	MCP	monocyte chemoattractant protein
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat	min	Minute
g, kg, mg, μ g	Gramm, Kilogramm (10^3 Gramm), Milligramm (10^{-3} Gramm), Mikrogramm (10^{-6} Gramm)	MLC	Myosinleichtkette
		MLCK	Myosinleichtkettenkinase
		MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule	PLC	Phospholipase C
MMAS	Massachusetts Male Aging Study	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
MMP	Matrixmetalloproteinase		
mol, mmol, µmol, nmol	Stoffmenge (6,02 • 10 ²³ Teilchen), Millimol (10 ⁻³ mol), Mikromol (10 ⁻⁶ mol), Nanomol (10 ⁻⁹ mol)	RLU	relative light unit
mRNA	messenger Ribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert	ROC	receptor operated calcium channel
N, mN	Newton, Millinewton (10 ⁻³ Newton)	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
n	Anzahl der Experimente	s, ms	Sekunde, Millisekunde (10 ⁻³ Sekunden)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat	SCN ⁻	Thiozyanat-Anion
NANC	non-adrenerg non-cholinerg	SD	Standardabweichung
NIH	National Institutes of Health	SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumlaurylsulfat
NO	Stickstoffmonoxid	SEM	Standardfehler des Mittelwertes
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase	SOD	Superoxiddismutase
n.s.	nicht signifikant	SR	sarkoplasmatisches Retikulum
O ₂	Sauerstoff	TEMED	Tetramethylethylendiamin
O ₂ ⁻	Hydroperoxidanion	TGF	transforming growth factor
ONOO ⁻	Peroxynitrit	TNF	Tumornekrosefaktor
ONTARGET	Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial	TOMHS	Treatment of Mild Hypertension Study
oxLDL	oxidiertes LDL	t-PA	tissue plasminogen activator
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit	TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiozyanat
PAI	plasminogen activator inhibitor	V	Volt
PBS	phosphate buffered saline	VCAM	vascular cell adhesion molecule
PDGF	platelet derived growth factor	VEGF	vascular endothelial growth factor
PG	Prostaglandin	VLDL	very low density lipoprotein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration	Vol%	Volumenprozent
PKC	Proteinkinase C	v/v	Volumen pro Volumen
PKG	Proteinkinase G	W	Watt
		WT	Wildtyp
		w/v	Gewicht pro Volumen

1. Zusammenfassung

Die endotheliale Dysfunktion ist sowohl der initiale Schritt der Atherogenese, als auch eine mögliche Ursache der erektilen Dysfunktion. Daher besteht eine signifikante Assoziation der kardiovaskulären Morbidität mit dem Vorliegen einer erektilen Dysfunktion als frühzeitigem Endorganschaden der endothelialen Dysfunktion in kardiovaskulären Risikopatienten.

Die penile Erektion hängt in entscheidendem Maße von der Synthese von Stickstoffmonoxid durch das Schwellkörperendothel ab. Stickstoffmonoxid stellt den hauptsächlichen Mediator der Relaxation der glatten Muskulatur der Schwellkörper und der penilen Gefäße dar, während lokales Angiotensin II im Schwellkörpergewebe die Detumeszenz einleitet.

Eine endotheliale Dysfunktion wird bei Vorhandensein kardiovaskulärer Risikofaktoren durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems verstärkt. Dabei werden multiple Mechanismen der Entstehung der endothelialen Dysfunktion durch Angiotensin II- Wirkung am Angiotensin II Rezeptor Typ 1 vermittelt.

Für Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Systems sind positive Effekte auf die endotheliale Funktion beschrieben. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich in transgenen, hyperlipidämischen, Apolipoprotein E- defizienten Mäusen eine kompromittierte Endothelfunktion von Aorta und Corpus Cavernosum mit konsekutiv gesteigerter Atherogenese, interstitieller Fibrose der Schwellkörper und gesteigertem oxidativen Stress, sowie reduzierter Stickstoffmonoxidbioverfügbarkeit in beiden Geweben bei gesteigerter Expression des Angiotensin II Rezeptors Typ 1. Die Blockade des Angiotensin II Rezeptors Typ 1 durch Irbesartan führt, unabhängig vom Effekt der Blutdrucksenkung, zur Normalisierung der Endothelfunktion und zur signifikanten Reduktion von oxidativem Stress und Atherogenese, wobei die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid steigt.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Assoziation von kardiovaskulären Risikofaktoren mit dem Vorliegen einer erektilen Dysfunktion, die eine Endorganmanifestation einer kompromittierten Endothelfunktion darstellt. Diese wird in entscheidendem Maße durch die Wirkung des aktivierten Renin-Angiotensin-Systems am Angiotensin II Rezeptor Typ 1 beeinflusst und kann durch dessen Blockade mit Irbesartan, über die Effekte einer reinen Blutdruckreduktion hinaus, positiv beeinflusst werden.

1. Abstract

Endothelial dysfunction is the initial step in atherogenesis, as well as a putative cause of erectile dysfunction. Therefore, erectile dysfunction, as an early end organ manifestation of endothelial dysfunction in cardiovascular high risk patients, is significantly associated with cardiovascular morbidity.

Penile erection is crucially dependent on the production of nitric oxide by the cavernous endothelial monolayer. Nitric oxide is the main mediator of smooth muscle relaxation of the corpus cavernosum and the penile arteries, while local angiotensin II in cavernous tissue initiates detumescence.

Endothelial dysfunction is aggravated by cardiovascular risk factors via activation of the renin-angiotensin-system. Multiple mechanisms in the development of endothelial dysfunction are thereby mediated by angiotensin II effects at the angiotensin II receptor type 1.

Inhibition of the renin-angiotensin-system exerts positive effects on endothelial function. In the present study, transgenic, hyperlipidemic, apolipoprotein- E deficient mice show reduced endothelial function of aortic and cavernous tissue and reduced bioavailability of nitric oxide, accompanied by a subsequent increase in atherogenesis, cavernous interstitial fibrosis, oxidative stress in both tissues and overexpression of the angiotensin II receptor type 1. Blockade of the angiotensin II receptor type 1 by Irbesartan normalizes endothelial function, reduces oxidative stress and atherogenesis and increases bioavailability of nitric oxide, independent of blood pressure reduction.

The present study shows the association of cardiovascular risk with the prevalence of erectile dysfunction as an end organ manifestation of endothelial dysfunction, which is decisively influenced by the effects of an activated renin-angiotensin-system at the angiotensin II receptor type 1. Blockade of the angiotensin II receptor type 1 via irbesartan improves endothelial function to an extent beyond the effects of mere blood pressure reduction.

2. Einleitung

2.1. Einführung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die koronare Herzerkrankung, stellen die vorherrschenden Ursachen für vorzeitigen Tod und Verminderung der Lebensqualität in den westlichen Industrieländern dar (SIMOONS, 2002). Die koronare Herzerkrankung beruht auf atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen, wobei die endotheliale Dysfunktion den initialen Schritt in der Atherogenese darstellt (ROSS, 1993). Das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion ist per se bereits mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert (PERTICONE et al., 2001) und ist durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) charakterisiert, die zum einen auf eine reduzierte Synthese durch das Endothel, zum anderen auf eine vermehrte Inaktivierung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen ist (FÖRSTERMANN et al., 2006). ROS werden durch multiple oxidative Enzyme katalysiert, wobei der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) eine bedeutende Rolle zukommt. Die ROS-Synthese der NADPH-Oxidase wird u.a. über den Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT₁R) stimuliert. Die Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und das Expressionsniveau des AT₁R werden ihrerseits durch kardiovaskuläre Risikofaktoren gesteigert (HIGASHI et al., 2009; WARNHOLTZ et al., 1999). Diese Mechanismen spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion mit nachfolgender vaskulärer Inflammation und Atherosklerose in kardiovaskulären Risikopatienten.

Die endotheliale Dysfunktion, das Frühstadium der Atherosklerose, stellt eine Systemerkrankung dar. Als solche betrifft sie alle endothelialisierten Gewebe. Die Kavernen des Penis besitzen eine größere Endothelfläche pro Volumeneinheit als jedes andere Gewebe des Körpers (BOOKSTEIN et al., 1990). Die Fähigkeit des Endothels zur Synthese vasorelaxierender Mediatoren, insbesondere NO, stellt die Voraussetzung für den Ablauf der Erektion dar. Daher kann die endotheliale Dysfunktion im Schwellkörpergewebe die Entstehung einer erektilen Dysfunktion (ED) bedingen (VLACHOPOULOS et al., 2008). In kardiovaskulären Risikopatienten zeigt sich eine signifikante Korrelation der erektilen und endothelialen Funktion (YAVUZGIL et al., 2005). Patienten mit kardiovaskulären

Risikofaktoren und kardiovaskulären Erkrankungen weisen eine signifikant gesteigerte Prävalenz der ED auf (Kap. 2.4.).

Die pharmakologische Inhibition des RAAS verbessert die endotheliale Dysfunktion in vitro (DE GENNARO COLONNA et al., 2005; KANSUI et al., 2002) und in kardiovaskulären Risikopatienten (VON ZUR MUHLEN et al., 2001). Aufgrund der pathophysiologischen Assoziation der endothelialen und erektilen Dysfunktion sind positive Effekte einer Blockade des RAAS auf die erektile Funktion in kardiovaskulären Risikopatienten möglich. Die RAAS-Blockade senkt die Inzidenz der ED in kardiovaskulären Risikopatienten signifikant (BÖHM et al., 2007; DOUMAS et al., 2006; BISWAS et al., 2002) und verbessert Surrogatparameter der erektilen Funktion (FOGARI et al., 1998; FOGARI et al., 2001; DÜSING, 2003; LLISTERRI et al., 2001). Es ist jedoch bislang ungeklärt, ob der endothelialen Dysfunktion in vaskulärem und erektilen Gewebe dieselben Pathomechanismen zu Grunde liegen und inwieweit diese durch eine AT₁R-Blockade modifiziert werden können. Darüber hinaus sind die Effekte einer Risikoreduktion infolge einer durch RAAS-Blockade vermittelten Blutdrucksenkung von blutdruckunabhängigen Auswirkungen einer Blockade des AT₁R abzugrenzen.

2.2. Bedeutung der Endothelfunktion für die Erektion

Die Penisschwellkörper (Corpora Cavernosa, CC) weisen ein Netzwerk von bindegewebigen Trabekeln auf, die einen hohen Anteil an glatter Muskulatur besitzen und die kavernenösen Helixarterien enthalten. Die Trabekel der Schwellkörper begrenzen ein Labyrinth von Bluträumen (Kavernen, Sinusoide), die mit einer einlagigen Schicht von Endothelzellen ausgekleidet sind.

Im flakziden Zustand des Penis (Detumeszenz), dominiert der sympathische Anteil des autonomen Nervensystems. Die α -adrenerge Basalstimulation verhindert eine Relaxation der trabekulären und vaskulären glatten Muskelzellen und damit eine Vasodilatation der zuführenden Gefäße, sowie eine Zunahme des Füllungszustandes der Sinusoide der Schwellkörper, wodurch keine Erektion entstehen kann (Billups et al., 2008).

Der Vorgang der Erektion unterliegt zentralnervös oder senso-reflektorisch initiierten parasympathischen Stimuli. NO stellt den für die Erektion entscheidenden vasorelaxierenden Faktor dar (IGNARRO et al., 1987; PALMER et al., 1987). NO wird einerseits aus den Nervenendigungen non-adrenerger, non-cholinerg (NANC) Nerven (ANDERSSON et al., 1995), andererseits aus vaskulären und sinusoidalen Endothelzellen (FURCHGOTT et al., 1980) freigesetzt und führt zur Vasodilatation, sowie zur Relaxation der trabekulären glatten Muskelzellen.

Aus diesem Grund stellt die Funktionsfähigkeit des Endothels, sowohl der penilen Gefäße, als auch der Schwellkörper, eine entscheidende Voraussetzung für den Ablauf der Erektion dar.

Die endotheliale Freisetzung von NO erfolgt über cholinerge Stimulation der Endothelzelle. Diese führt zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), die die Substrate Sauerstoff und L-Arginin (L-Arg) zu NO und L-Citrullin umsetzt (KIRKEBY et al., 1993; SIMONSEN et al., 1997, BUSSE et al., 2003). NO diffundiert in die angrenzenden glatten Muskelzellen und führt dort zur Relaxation. Der konsekutive Bluteinstrom in den Schwellkörper bedingt die Erektion. Abb. 2.2. gibt einen Überblick über die zellulären Mechanismen der Erektion.

Die Steigerung des arteriellen Blutzustroms bedingt zusätzlich eine Kompression der efferenten Venen, wodurch ein erhöhter intrakavernöser Druck bis zur Phase der Detumeszenz aufrecht erhalten wird (Abb. 2.1.).

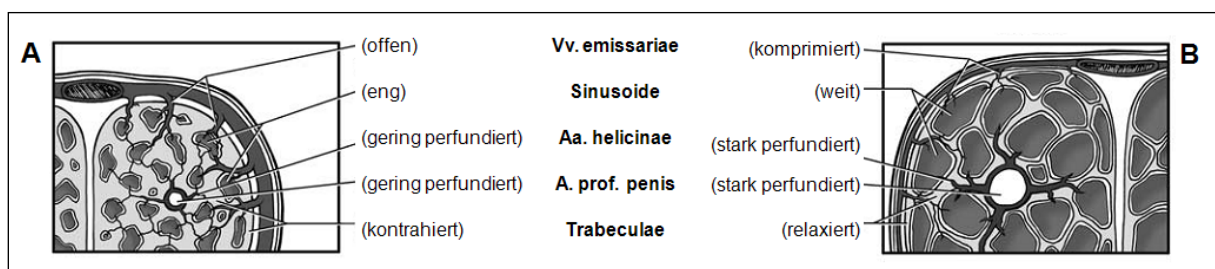


Abb. 2.1. Perfusionen des penilen Gewebes im flakziden (A) und eregierten (B) Stadium. Modifiziert nach Billups et al., 2008

Im flakziden Stadium sind trabekuläre und vaskuläre glatte Muskelzellen durch die sympathikotone Basalstimulation kontrahiert. Die somit gering perfundierten Sinusoide werden über die efferenten Venen drainiert. Durch parasympathisch eingeleitete, NO-vermittelte Dilatation der zuführenden Arterien und der Sinusoide füllen sich die Schwellkörper bei der Erektion mit Blut und verhindern den venösen Abfluss durch Kompression der efferenten Venen gegen die rigide Tunica Albuginea.

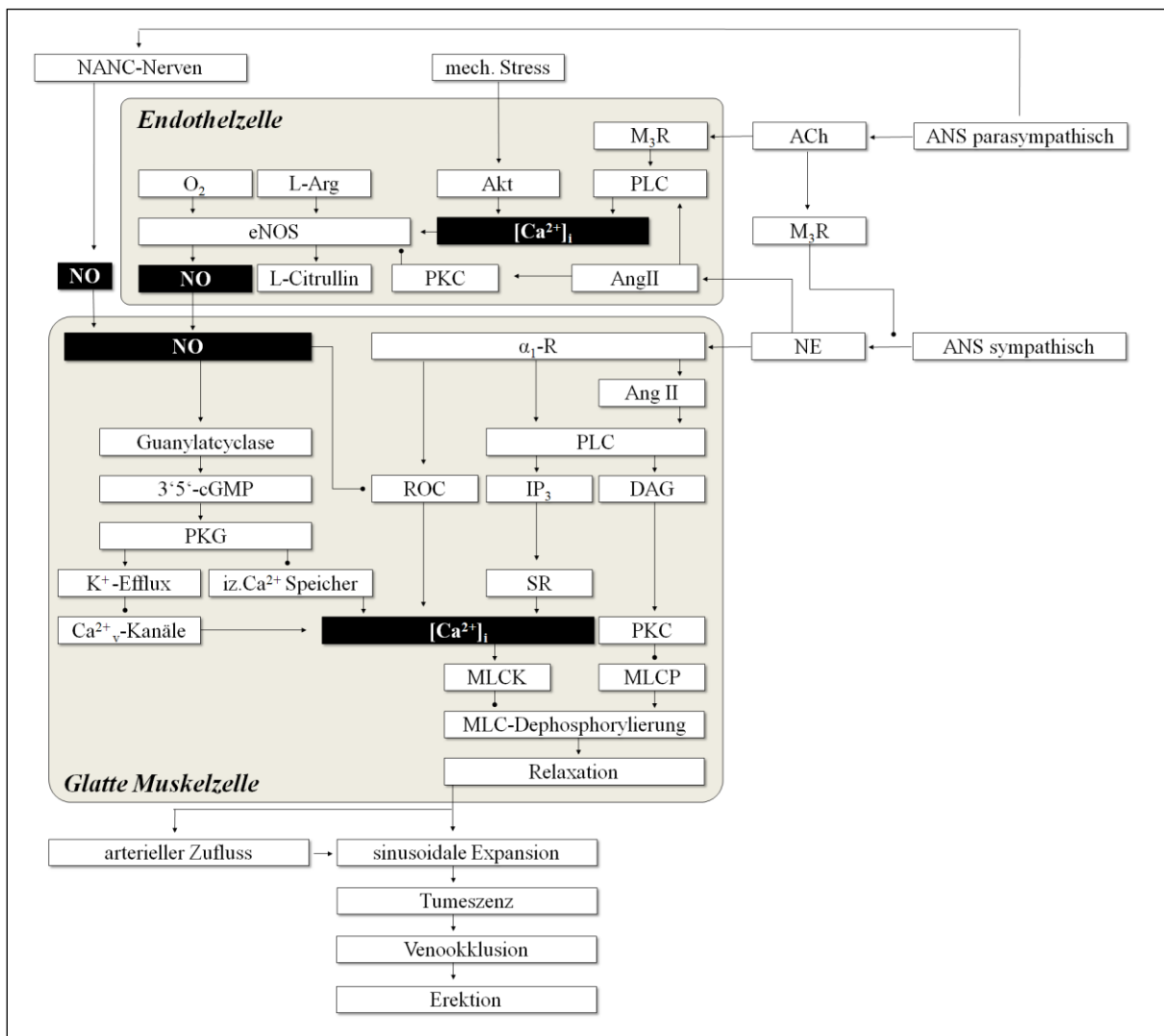


Abb. 2.2. Physiologie der Erektion: Nervale Regulation und lokale Prozesse an sinusoidalen und vaskulären Endothelzellen, sowie trabekulären und vaskulären glatten Muskelzellen

Acetylcholin (ACh) führt am muskarinergen Acetylcholinrezeptor Typ3 (M_3R) zu einer über Phospholipase C (PLC) vermittelten Steigerung des intrazellulären Kalziums $[Ca^{2+}]_i$. Vergleichbare Effekte vermittelt mechanischer Stress über die Proteinkinase Akt (Akt). Dies stimuliert die eNOS zur Synthese von NO. NO diffundiert in die angrenzenden glatten Muskelzellen und stimuliert dort die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat ($3'5'$ -cGMP) durch Aktivierung der Guanylatzyklase, was über die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) durch die Regulation intrazellulärer (i.z.) Kalziumspeicher und spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Ca^{2+}_v -Kanäle) zum Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ führt. Dies hemmt die Myosinleichtenkettenkinase (MLCK) und stimuliert die Myosinleichtenkettenphosphatase (MLCP). Die resultierende Dephosphorylierung der Myosinleichtenketten (MLC) führt zur Relaxation der vaskulären und trabekulären glatten Muskelzellen und zur Erektion. Gegenspieler der Erektion ist die unmittelbar an der glatten Muskelzelle adrenerg (α_1 -R: Alpha1 Adrenozeptor) vermittelte Öffnung rezeptorgesteuerter Kalziumkanäle (ROC) und Stimulation der PLC, die über Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freisetzt, sowie über Diazylglyzerol (DAG) die Proteinkinase C (PKC) stimuliert. Beides hemmt die MLC-Dephosphorylierung und verhindert die Relaxation. Ang II verhindert die glattmuskuläre Relaxation unmittelbar über Stimulation der glattmuskulären PLC, sowie indirekt durch PKC-abhängige Hemmung der eNOS in der Endothelzelle.

2.3. Ätiologie der erektilen Dysfunktion

ED ist definiert als die dauerhafte (>6 Monate) Unfähigkeit, eine, für den Geschlechtsverkehr ausreichende, penile Erektion zu erzielen und/oder aufrecht zu erhalten (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1992).

Die Daten der Massachusetts Male Aging Study (MMAS) (FELDMAN et al., 1994) und des Cologne Male Survey (BRAUN et al., 2000) zeigten eine Prävalenz der vollständigen ED in der männlichen Gesamtbevölkerung von 10%-19%, wobei Prävalenz und Schweregrad der ED dabei eine deutliche Assoziation mit dem Lebensalter der Patienten aufwiesen. Im Alter nimmt der trabekuläre Muskeltonus zu, gleichzeitig nimmt der intrakavernöse Druck während der Erektion ab (LUE, 2000). Im Hinblick auf diese, sich im Laufe des Alterungsprozesses entwickelnde, sekundäre ED, hat sich ein Verständnis der ED als Symptom einer somatischen Grunderkrankung etabliert (ARAUJO et al., 2005; ASSMANN et al., 2002). Bereits 1985, als der ED überwiegend psychogene Ursachen zugeschrieben wurden, zeigten VIRAG et al. in einem Kollektiv von Männern mit Erektionsstörungen (mittleres Alter 46,8 Jahre), dass die vorliegende ED zu 80% organisch bedingt war (VIRAG et al., 1985). Innerhalb dieser inhomogenen ätiologischen Gruppe (neurogene, vaskulogene, diabetisch- mikro- und makroangiopathische, postoperative, medikamentöse, hormonell und durch Substanzmissbrauch bedingte ED) stellen die vaskulogen-angiopathischen Ursachen mit über 50% die größte Fraktion dar (SOLOMON et al., 2003). Neben der ausgeprägten sozioökonomischen Bedeutung (FELDMAN et al., 2000) und dem hohen Leidensdruck der Patienten, gewinnt die ED daher zunehmend als Indikator der endothelialen Dysfunktion und eines erhöhten kardiovaskulären Risikos an Bedeutung (BILLUPS et al., 2008; BÖHM et al., 2008; BAUMHÄKEL et al., 2009).

2.4. Assoziation der erektilen Dysfunktion mit dem kardiovaskulären Risiko

Die MMAS zeigte, dass Probanden, die an kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes oder arterieller Hypertonie litten, mit 50-75% eine deutlich höhere Prävalenz der ED

aufwiesen, als die Gesamtpopulation (FELDMAN et al., 1994; FELDMAN et al., 2000), was durch den Cologne Male Survey (BRAUN et al., 2000) bestätigt wurde.

Arterielle Hypertonie:

Die Resultate der ONTARGET (Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial) ED Substudie (BÖHM et al., 2007), sowie der Treatment Of Mild Hypertension Study (TOMHS) (GRIMM et al., 1997) zeigten eine signifikante Korrelation des systolischen Blutdrucks mit einer defizitären erektilen Funktion. Zwei Drittel der Patienten mit arteriellem Hypertonus weisen eine ED auf, wobei die ED in hypertensiven Individuen höhergradig ist als in normotensiven Kontrollen (GIULIANO et al., 2004; BURCHARDT et al., 2000). Die Hypertoniedauer und der Schweregrad der Hypertonie korrelieren negativ mit der erektilen Funktion (DOUMAS et al., 2006). Patienten mit essentieller Hypertonie zeigen ein reduziertes Ansprechen auf Stimulation der endothelabhängigen Vasodilatation und einen erhöhten Basaltonus der vaskulären glatten Muskelzellen, was auf eine strukturell defiziente endotheliale NO-Synthese zurückgeführt wird (YOSHIDA et al., 1991; ²PANZA et al., 1993). Eine pharmakologisch herbeigeführte reine Korrektur des Blutdrucks geht nicht automatisch mit einer Wiederherstellung der endothelialen Funktion einher (¹Panza et al., 1993). Demgegenüber beeinflussen insbesondere solche Antihypertensiva, die zur Inhibition des aktivierten RAAS führen, die Endothelfunktion positiv (GRANDI et al., 2006).

Hyperlipidämie:

Das Vorliegen einer Hyperlipidämie stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die ED dar (PONHOLZER et al., 2005). In hyperlipidämischen Tiermodellen konnte die Assoziation erhöhter Lipidspiegel und reduzierter erektiler Funktionsfähigkeit gezeigt werden. Cholesterininduzierte Hyperlipidämie ist somit ein häufig verwendeter experimenteller Induktor einer generalisierten Atherosklerose und ED (BEHR-ROUSSEL et al., 2006; KOLOVOU et al., 2008; XIE et al., 2007; YANG et al., 2004).

Adipositas:

Adipositas ist ein unabhängiger Risikofaktor der ED (FONSECA, 2004), wobei eine Abnahme des Körpergewichtes eine signifikant gesteigerte Reversibilität der ED bedingt (ESPOSITO et al., 2004). BACON et al. fanden eine 30%ige Risikosteigerung für ED in Patienten mit einem BMI >28,7 (BACON et al., 2003). Der BMI korreliert signifikant invers mit der erektilen Funktionsfähigkeit (BAUMHÄKEL et al., 2007).

Diabetes mellitus:

Die ED betrifft 30-40% der an Diabetes mellitus leidenden männlichen Bevölkerung (PRICE et al., 2008) und Diabetes mellitus verdreifacht das Risiko, an ED zu erkranken (KIRBY et al., 2005). Das Vorliegen eines Diabetes mellitus ist signifikant mit einer gesteigerten Prävalenz der ED assoziiert (BÖHM et al., 2007, BAUMHÄKEL et al., 2007). Die glykämische Kontrolle der Patienten korreliert mit der Dauer und dem Schweregrad der ED (RHODEN et al., 2005; FONSECA et al., 2005). Des Weiteren korrelierte sie im Tierversuch mit der Relaxationsfähigkeit der Corpora Cavernosa (CARTLEDGE et al., 2000).

Kardiale Morbidität (koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz):

Die Prävalenz der ED ist bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK) deutlich erhöht (KLONER et al., 2003) und korreliert mit dem angiographisch ermittelten Ausmaß atherosklerotischer Plaques in den Koronargefäßen (SOLOMON et al., 2003), sowie mit der Anzahl betroffener Koronargefäße (GREENSTEIN et al., 1997, BAUMHÄKEL et al., 2007). Die COBRA-Studie (MONTORSI et al., 2006) zeigte eine signifikante Korrelation des Schweregrades der ED mit der Ausprägung der KHK. Ebenso korreliert die Zahl stattgehabter Koronarintervention bzw. aortokoronarer Bypassoperationen mit einer Zunahme der ED (BAUMHÄKEL et al., 2006).

60% bis 89% der männlichen Patienten mit Herzinsuffizienz leiden an ED (JAARSMA et al., 1996, HERBERT et al., 2008, SCHWARZ et al., 2008). Die Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion stellt hierbei einen unabhängigen Prädiktor für ED dar (BAUMHÄKEL et al., 2007). Auch klinische Parameter der Herzinsuffizienz (6 min-Gehtest, Duke treadmill score) korrelieren mit der erektilen Funktion der Patienten (JAARSMA et al., 1996; MIN et al., 2006).

2.5. Rolle des Angiotensin II Rezeptors Typ 1 in der Pathogenese der endothelialen und erektilen Dysfunktion

Die Dysfunktion des vaskulären und kavernösen Endothels stellt sowohl den initialen Schritt der Atherogenese als chronische vaskuläre Entzündungskrankheit (HANSSON, 2005, VANHOUTTE, 2009), als auch die Ursache mangelnder NO-Synthese und somit

mangelnder erektiler Funktionsfähigkeit dar. Sie bedingt die pathogenetische Assoziation von kardiovaskulären Risikofaktoren mit der ED.

Das intakte Endothel reguliert den Tonus vaskulärer und trabekulärer glatter Muskelzellen durch die balancierte Synthese relaxierender (NO, Prostazyklin, EDHF) und konstriktorischer (Endothelin, Ang II, Thromboxan A₂) Mediatoren. Während NO den für die Vasorelaxation und die Erektion bedeutsamsten Faktor darstellt, vermittelt das Gewebshormon Ang II über den AT₁R die Kontraktion vaskulärer und trabekulärer glatter Muskelzellen und ist somit ein hämodynamischer Antagonist der Erektion (KIFOR et al., 1997).

Dem Endothel kommen, über die Regulation des Gefäßtonus hinaus, antiinflammatorische und antithrombotische Aufgaben zu. Eine Dysfunktion des Endothels fördert vaskuläre inflammatorische Prozesse. Gleichzeitig bedingt eine chronische Inflammation vice versa eine endotheliale Dysfunktion (FICHTLSCHERER et al., 2004; TONETTI et al., 2007).

In der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion spielt die Verschiebung in der Homöostase zwischen ROS und NO eine entscheidende Rolle.

Geringe Mengen an ROS werden unter physiologischen Bedingungen permanent gebildet und sind im Körper als second messenger multipler Signalwege von funktioneller Bedeutung (GRIENGLING et al., 1994; RAJAGOPALAN et al., 1996; LYLE et al., 2006). Durch redoxsensitive Transkription, bzw. Aktivierung von Proteinkinasen, sind ROS an der Vermittlung von Wachstums- und Proliferationsstimuli, Zellmigration und zytoskelettaler Reorganisation beteiligt (CHENG et al., 2005; YAN et al., 2003, MOLDOVAN et al., 2000; WU et al., 2005; COLAVITTI et al., 2002).

Unter dem Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren wird durch eine Überstimulation des RAAS und eine gesteigerte Expression des AT₁R mit konsekutiver übermäßiger Produktion von ROS (insbesondere durch die NADPH-Oxidase) die oxidative Homöostase der Gewebe gestört (MAKRIS et al., 2000). Eine gesteigerte Radikallast führt einerseits zu einem proinflammatorischen Status mit konsekutiver endothelialer Dysfunktion und somit verminderter NO-Synthese. Gleichzeitig kommt es zur unmittelbaren Inaktivierung von NO durch die Reaktion mit ROS zu Peroxynitrit (ONOO⁻), das seinerseits zur gesteigerten Radikallast beiträgt (Abb. 2.3.)

Übersteigt die Radikallast das antioxidative Potenzial der Zelle, fungieren ROS als Vermittler pathologischer Vorgänge in Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Nicht nur Wachstum, Proliferation und Migration nehmen überhand, ROS stimulieren auch inflammatorische Zytokine, sowie leukozytäre Adhäsionsmoleküle und fördern die Thrombozytenaggregation (LANDMESSER et al., 2001; CHENG et al., 2005). Außerdem führt eine gesteigerte zelluläre Last an Sauerstoffradikalen zur Oxidation von LDL zu oxLDL (STEINBERG et al., 2002), das entscheidend zur Atherogenese beiträgt. ROS nehmen daher bedeutenden Einfluss auf die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und Atherosklerose, wobei eine bestehende endotheliale Dysfunktion wiederum die Bildung von ROS fördert.

Gleichzeitig nimmt die Bioverfügbarkeit von NO, das gegenläufige Effekte vermittelt, ab. NO hemmt die Proliferation glatter Muskelzellen (GARG et al., 1989), die Thrombozytenaggregation (ALHEID et al., 1987), die Synthese des plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) (LOSCALZO et al., 2001), die Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen (KUBES et al., 1991), die oxLDL-Bildung und, in physiologischen Konzentrationen, den apoptotischen Zelltod (CHUNG et al., 2001).

Sowohl über die gestörte oxidative Homöostase des Endothels, als auch unmittelbar, führt eine übermäßige Stimulation des AT₁R somit zu langfristigen Effekten, die die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion fixieren und zur Atherogenese beitragen. Sie umfassen das gesamte Spektrum der Atherogenese, von der Lipoproteinakkumulation über die Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration von Leukozyten bis zur vaskulären Permeabilitätssteigerung und fibrinösen Plaquebildung. Auch nimmt die Aktivierung des AT₁R Einfluss auf die Generierung von Wachstumsfaktoren, die zum Remodelling der Gefäßwand führen.

Abbildung 2.3. gibt einen Überblick über AT₁R-medierte Effekte in der Pathogenese der endothelialen und erektilen Dysfunktion.

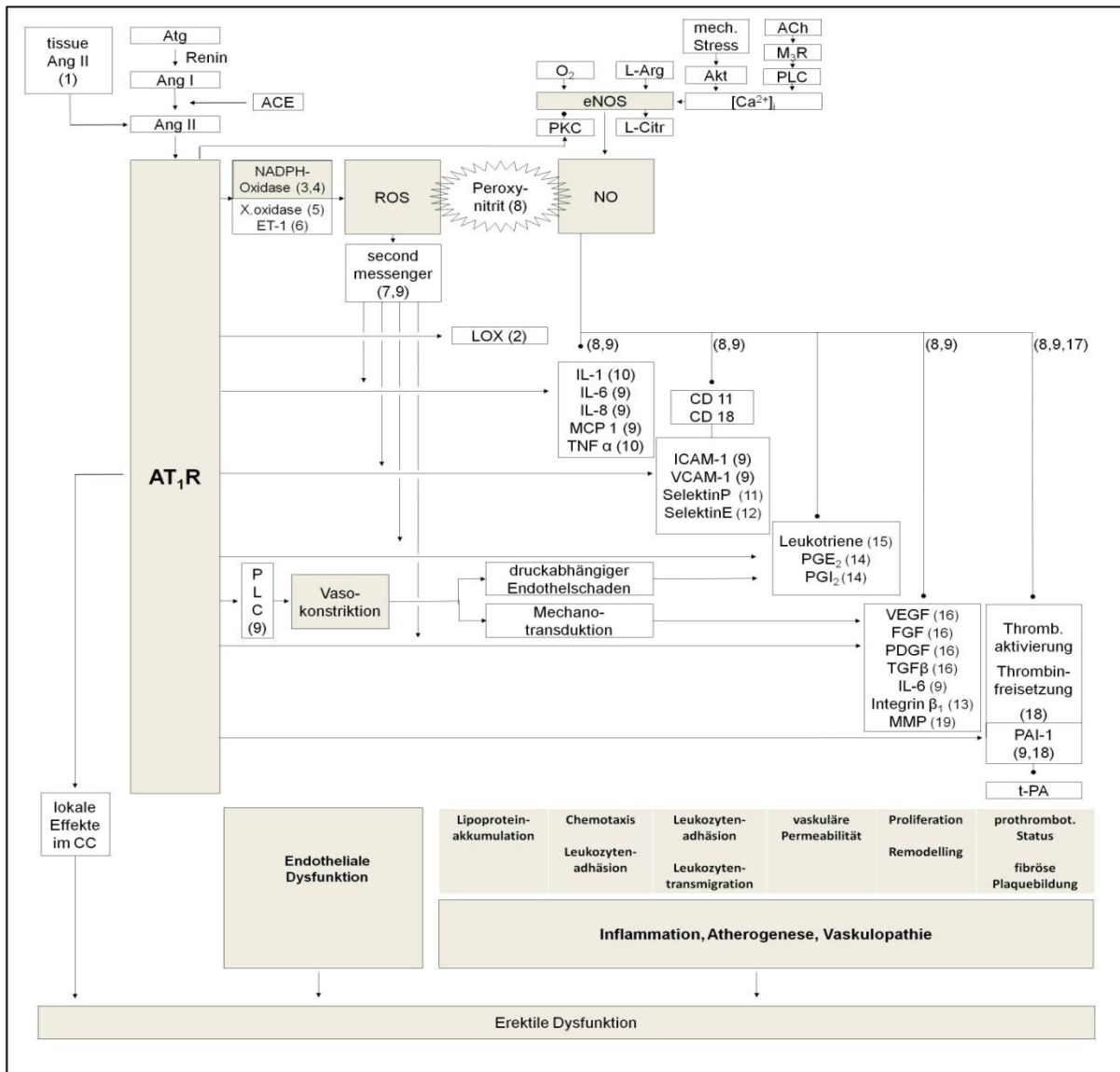


Abb. 2.3.: Rolle des AT₁R in der Genese der endothelialen und erektilen Dysfunktion

Ang II wird sowohl im zirkulierenden RAAS (Atg: Angiotensinogen; ACE: angiotensin converting enzyme) als auch gewebständig gebildet ((1) BELOVA, 2000) und bindet an den AT₁R. Dieser stimuliert die NADPH-Oxidase in glatten Muskelzellen ((3) GRIENGLING et al., 1994; (4) RAJAGOPALAN et al., 1996), sowie die Aktivität der Xanthinoxidase ((5) LANDMESSER et al., 2007) und die endogene Endothelin-1 (ET-1) Produktion ((6) CINGOLANI et al., 2006). Diese Mechanismen erhöhen die Last an ROS, die einerseits NO unter Bildung des Radikals Peroxynitrit inaktivieren ((8) FÖRSTERMANN et al., 2006), andererseits als second messenger Signalwege aktivieren, die zu Chemotaxis, Adhäsion, und Transmigration von Leukozyten an der Gefäßwand, sowie zu vaskulärer Permeabilitätssteigerung, sowie Proliferations- und Remodellingprozessen beitragen ((7) CHENG et al., 2005; (9) YAN et al., 2003). Die Reduktion an NO verringert dessen hemmenden Einfluss auf viele dieser Signalwege ((8); (9); (17) NEGRO, 2008). Daneben vermittelt der AT₁R auch unmittelbar die o.g. Prozesse, die in Atherogenese und Inflammation münden. Dazu zählt die Induktion des endothelialen Rezeptors für lectinlike oxLDL (LOX) ((2) MORAWIETZ et al., 1999), der zur Lipoproteinakkumulation in der frühen Atherogenese beiträgt. Ferner vermittelt der AT₁R über Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8), Tumornekrosefaktor α (TNFα), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP 1), intercellular adhesion molecule (ICAM), sowie Selektine P und E die Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration von Entzündungszellen im Prozess der Atherogenese ((9); (10) DAS, 2005; (11) PIQUERAS et al., 2000; (12) GRÄFE et al., 1997). Sowohl unmittelbar, als auch über Vasokonstriktion unterhält der AT₁R vaskuläre Permeabilität (Leukotriene, Prostaglandine (PGE₂, PGI₂): (14) SUZUKI et al., 2003; (15) DAHLÉN et al., 1981) und vaskuläre Proliferations- und Remodellingprozesse (VEGF: vascular endothelial growth factor; FGF: fibroblast growth factor; PDGF: platelet derived growth factor; TGFβ: transforming growth factor beta; MMP: Matrix Metalloproteinasen: (9); (13) KAPPERT et al., 2000; (16) WILLIAMS, 1998; (19) JIN et al., 2008). Darüber hinaus wirkt die Stimulation des AT₁R verstärkend auf den PAI-1, wodurch der prothrombotische Status im Verlauf der Atherogenese verstärkt wird ((18) VAUGHAN et al., 1995). Der AT₁R spielt somit eine zentrale Rolle in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und im gesamten Progress der Atherogenese. Zusammen mit den lokalen Wirkungen des Ang II im Schwellkörper (Kap. 2.6.) stellen diese Vorgänge mögliche Ursachen der ED bei unter kardiovaskulären Risikofaktoren stimuliertem RAAS dar.

2.6. Lokales Angiotensin II als Modulator der erektilen Funktion

Ang II wird, abgesehen von seiner Bildung durch das zirkulierende RAAS, auf adrenerge Stimulation hin, ACE-unabhängig, durch gewebständige Enzyme einer Vielzahl parakriner Zellen sezerniert, zu denen auch vaskuläre Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen zählen (KIFOR et al., 1987; BELOVA, 2000). Auch in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen des Schwellkörpers, wurde die lokale Produktion von Ang II nachgewiesen. Der Gehalt an Ang II im menschlichen Schwellkörper liegt dabei ca. 200fach über den Ang II Konzentrationen, die im aortalen und mesenterialen Stromgebiet bestimmt wurden (KIFOR et al., 1997). Dieses lokal synthetisierte Ang II führt als direkter Effektor am AT₁R der glatten Muskelzellen des Schwellkörpergewebes zur Kontraktion (PARK et al., 1997). Obgleich eine Steigerung der [Ca²⁺]_i in den Endothelzellen des Schwellkörpers die eNOS stimuliert, wird die NO-Produktion durch die Aktivierung von Proteinkinasen (insbesondere PKC) durch Ang II supprimiert (KIFOR et al., 1997; Abb. 2.2.). NO wiederum inhibiert den Ca²⁺-Influx in die glatten Muskelzellen (BLATTER et al., 1994). Diese nicht nur gegenläufigen, sondern partiell unmittelbar antagonistischen lokalen Effekte von Ang II und NO zeigen einen direkten Effekt von Ang II bei der Einleitung der Detumeszenz. Der Gehalt an Ang II in kavernösem Blut ist im Detumeszenzstadium signifikant gesteigert, während die Ang II- Konzentrationen im peripheren Blut keine signifikanten Schwankungen im Verlauf der Erektion aufweisen (BECKER et al, 2001). Die intrakavernöse Injektion von Ang II löste bei anästhesierten Hunden im Stadium spontaner Erektion den Abfall des intrakavernösen Druckes und den Übergang in die Detumeszenz aus, wobei die sukzessive Injektion des AT₁R-Antagonisten Losartan eine dosisabhängige Steigerung des intrakavernösen Druckes zur Folge hatte (KIFOR et al., 1997). Diese Befunde sprechen für die Existenz einer lokalen Ang II- Synthese, nicht nur in den penilen Gefäßen, sondern auch in hohem Maße im Schwellkörpergewebe, die weitgehend unabhängig vom zirkulierenden RAAS über spezifische Rezeptorwirkung an der Einleitung der Detumeszenz und damit an der Beendigung der Erektion beteiligt ist.

Eine Überstimulation des AT₁R kann neben einer Steigerung des kardiovaskulären Risikos nicht nur eine endotheliale Dysfunktion des erektilen Gewebes bedingen und

zur Atherosklerose, auch in der penilen Strombahn, beitragen, sie wirkt der erektilen Funktion auch hämodynamisch und parakrin entgegen.

2.7. Endothelfunktion unter AT₁-Rezeptorblockade durch Irbesartan

Irbesartan stellt einen potenten Inhibitor des AT₁R dar. Der Wirkstoff unterliegt keiner Biotransformation und weist keine Variationen bei Leber- oder Niereninsuffizienz, bzw. bei Individuen unterschiedlichen Geschlechts oder Alters auf (BRUNNER, 1997).

Irbesartan zeigte in klinischen Studien positive Effekte auf die Endothelfunktion: In hypertensiven Patienten verbesserte sich die endothelabhängige Vasodilatation unter AT₁R-Blockade mit Irbesartan signifikant (WARNHOLTZ et al., 2007). Darüber hinaus zeigten solche Patienten signifikant reduzierte Endothelinspiegel und eine Wiederherstellung der vasokonstriktorischen Wirkung des NOS-Inhibitors L-NMMA (BRAGULAT et al., 2003). Im Tiermodell reduzierte Irbesartan den endothelialen oxidativen Stress und verbesserte die Bioverfügbarkeit von NO (WASSMANN et al., 2001; RIVIERO et al., 2002; SCHÄFER et al., 2004). Die Ergebnisse der ISLAND-Studie (Irbesartan and Lipoic Acid in Endothelial Dysfunction) verweisen auf eine signifikant gesteigerte endothelabhängige Vasodilatation durch Irbesartan in Patienten mit dem metabolischen Syndrom, die mit einer Reduktion von IL-6, PAI-1 und 8-Isoprostran, einem Marker oxidativen Stresses, einherging (SOLA et al., 2005). In diabetischen Patienten verbesserte Irbesartan die endothelabhängige Vasodilatation und senkte die Spiegel an inflammatorischen Parametern (CRP, ICAM-1, IL-6) signifikant (CERIELLO et al., 2005).

In transgenen Apolipoprotein E Knockout (ApoE^{-/-}) Mäusen mit Streptozotocin-induziertem Diabetes zeigte, bei vergleichbarer Blutdrucksenkung durch Irbesartan und Amlodipin, nur Irbesartan eine signifikante Reduktion von atheromatösen Plaques, des Kollagengehaltes, der Zellproliferation und der Makrophageninfiltration im Aortengewebe (CANDIDO et al., 2004). Dies verweist auf Effekte der AT₁R-Blockade durch Irbesartan, die rezeptorspezifisch, über die erzielte Blutdruckreduktion hinaus, zum Tragen kommen.

2.8. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Effekte der AT₁-Rezeptorblockade durch Irbesartan im Modell der ApoE-Knockout Maus

Transgene Apolipoprotein E Knockout (ApoE^{-/-}) Mäuse, die mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert wurden, dienten als Modell zur experimentellen Induktion einer generalisierten Atherosklerose (NAKASHIMA et al., 1994). Eine Gruppe transgener Mäuse erhielt den AT₁R-Antagonisten Irbesartan, eine Kontrollgruppe den Vasodilatator Hydralazin. Die Endothelfunktion des Aorten- und Schwellkörpergewebes der Tiere wurde in vitro untersucht, um zu klären, ob beide Gewebe einen Verlust endothelialer Funktionsfähigkeit aufwiesen und ob dieser Verlust durch die Intervention mit Irbesartan bzw. Hydralazin reduziert werden konnte.

Im Falle des Vorliegens einer endothelialen Dysfunktion war zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß diese in beiden Geweben durch identische molekulare Pathomechanismen bedingt war (oxidativer Stress, reduzierte NO-Bioverfügbarkeit, Remodellingprozesse) und inwieweit diese Pathomechanismen durch die Intervention mit Irbesartan, respektive Hydralazin moduliert wurden. Der Vergleich AT₁R-abhängiger (Irbesartan) und AT₁R-unabhängiger (Hydralazin) Blutdrucksenkung sollte dabei klären, ob und inwieweit blutdruckunabhängige Effekte der AT₁R-Blockade in beiden Geweben zum Tragen kamen.

3. Material und Methodik

3.1. Materialien

3.1.1. Verwendete Substanzen

Acrylamid-Monomer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
aqua dest., HPLC-gereinigt	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aquatex, wässriges Eindeckmittel für Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
AT ₁ R Antikörper, rabbit-anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Carbachol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carbogen (5 Vol% CO ₂ in O ₂)	Praxair, Düsseldorf, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chlorwasserstoffsäure	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Complete, EDTA-frei, protease inhibitor cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Diaminofluoreszein (DAF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Dihydroethidium (DHE)	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMSO (reinst)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamidtetraessigsäure (EDTA)	BDH Laboratory Supplies, Poole, Großbritannien
Einbettmedium für Gefrierschnitte (Jung)	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
eNOS Antikörper, rabbit-anti-mouse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Entellan, Eindeckmittel für Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GAPDH-Antikörper, mouse-anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Glucose D(+)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Glyzerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Glyzin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Glyzeroltrinitrat (Aquo-Trinitrosan)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hydralazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Igepal (tert-Octylphenoxypoly(oxyethylen)ethanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Irbesartan (Karvea [®] 150mg bzw. 300mg)	Bristol-Myers-Squibb Deutschland, München, Deutschland
Irbesartan + Hydrochlorothiazid (Karvezide [®] 150/12,5mg bzw. 300/12,5mg)	Bristol-Myers-Squibb Deutschland, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ketamin (Ketavet 100 mg/ml)	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Lucigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'-Biacridiniumdinitrat)	Fluka via Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Meerrettichperoxidase-konjugierter Antikörper, mouse-anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mounting Medium für Fluoreszenzmikroskopie	Dako Deutschland GmbH, Hamburg Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS) 10%	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland
NADPH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
L-NAME	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ölrot-O (C.I. 26125)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Phenylephrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Pikrinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sirius Red (C.I. 35780)	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
Stickstoff, verdichtet	Praxair, Düsseldorf, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Triethylphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris Base (Tris-[hydroxy-methyl]-aminomethan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
TRITC-konjugierter Antikörper, goat-anti-rabbit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Trockenmilch (Sucofin)	TSI GmbH, Zeven, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

3.1.2. Puffer, Gele und Färbelösungen

<u>Tyrode</u>	(mM)	<u>Krebs-Hepes-Puffer</u>	(mM)	<u>PBS</u>	(mM)
CaCl ₂	2,50	CaCl ₂	1,87	KCl	2,68
EDTA Dinatriumsalz	0,03	Glucose D(+)	11,10	KH ₂ PO ₄	1,76
Glucose D(+)	5,50	HEPES	21,84	NaCl	136,89
KCl	4,73	KCl	4,70	Na ₂ HPO ₄	10,14
KH ₂ PO ₄	1,20	KH ₂ PO ₄	1,32		
MgCl ₂	1,20	MgSO ₄	1,20		
NaCl	118,00	NaCl 100,00	100,00		
NaHCO ₃	25,00	NaHCO ₃	25,00		
in aqua dest.		in aqua dest.		in aqua dest.	
pH	7,4	pH	7,4	pH	7,4

<u>Kalium-Phosphat-Puffer</u>	(mM)
Saccharose	150,00
K ₂ HPO ₄	19,25
KH ₂ PO ₄	35,00
Complete (62 mg/50 ml)	
in aqua dest.	
pH	7,0

<u>Probenpuffer</u>	
<u>(Western Blot)</u>	
Stacking Gel Puffer	12,5% (v/v)
SDS	1% (v/v)
Glycerin	10% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)
β-Mercaptoethanol	2,5% (v/v)
in aqua dest.	

<u>Stacking Gel Puffer</u>	
<u>(Western Blot)</u>	
Tris Base	0,50 M
SDS	0,4% (v/v)
in aqua dest.	
pH	6,8

<u>Transferpuffer</u>	
<u>(Western Blot)</u>	
Tris Base	20,00 mM
Glycin	67,30 mM
Methanol	40%
in aqua dest.	

<u>Trenngelpuffer</u>	(M)
<u>(Western Blot)</u>	
Tris Base	1,50
in aqua dest.	
pH	8,8

<u>Sammelgelpuffer</u>	(M)
<u>(Western Blot)</u>	
Tris Base	0,50
in aqua dest.	
pH	6,8

<u>Ammoniumpersulfat-Lösung</u>	(M)
Ammoniumperoxodisulfat	0,44
in aqua dest.	

<u>Elektrophoresepuffer</u>	(mM)
<u>(Western Blot)</u>	
Tris Base	25,00
Glycin	86,15
SDS	3,50
in aqua dest.	

<u>Lysepuffer Proteine</u>	
<u>(Western Blot)</u>	
Tris Base	10,00 mM
Glycerin	20% (v/v)
SDS	4% (v/v)
in aqua dest.	

<u>Trenngel 10%</u>	
<u>(Western Blot)</u>	
Acrylamid-Monomer	2,6 ml
Trenngelpuffer	2 ml
10% SDS	75 µl
Ammoniumpersulfatlösung	75 µl
TEMED	10 µl
aqua dest.	3 ml

<u>Sammelgel</u>	
<u>(Western Blot)</u>	
Acrylamid-Monomer	330 µl
Sammelgelpuffer	250 µl
10% SDS	20 µl
Ammoniumpersulfatlösung	20 µl
TEMED	5 µl
aqua dest.	1,4 ml

<u>Ölrot-O</u>	
<u>Stammlösung</u>	(100 ml)
Ölrot-O	500 mg
Triethylphosphat (60%)	100 ml

<u>Sirius Red-Lösung</u>	
0,1%ig	(100 ml)
Sirius Red	0,1 g
Pikrinsäure (pH 2,0) (1,2%)	1,2 g
aqua dest.	100 ml

<u>Dihydroethidium-</u>	
<u>Lösung 2µM</u>	(100 ml)
DHE	63,08 mg
in	
DMSO	100 ml
stabilisiert	
100 µl dieses Ansatzes in 100 ml Krebs-Hepes Puffer	

3.1.3. Biochemische Kits

Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay Kit: Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland

Detergent Compatible Protein Assay Kit I: Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Electrochemiluminescence (ECL)-Kit : GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Großbritannien

3.1.4. Geräte und Zubehör

3.1.4.1. Versuchsübergreifend

Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml bzw. 2 ml

Feinwaage (Acculab ALC-110.4)

Konusröhrchen, 50 ml bzw. 15 ml (Falcon)

Kühlschrank -80°C (Profiline ECU)

Laborwaage (Vicon VIC-212)

Magnetrührer (IKA Combimac RCH)

Pasteurpipetten, Polypropylen, 3,5ml

Petrischalen (64 x 19 mm)

pH-Meter

Pinzette (INOX, Gewebepräparation)

Pipetten (Research 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)

Scheren (Gewebepräparation)

Thermomixer (Eppendorf Thermomixer Comfort)

Vortexer (Vortex Genie 2)

Zentrifuge (Sigma 1K15)

Zentrifuge (Heraeus Fresco 21)

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

M.u.T. Labor GmbH, Berlin, Deutschland

Acculab, Edgewood, New York, USA

IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

pH 526, WTW GmbH, Weilheim, Deutschland

Outils-Dumont, Montignez, Schweiz

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf Deutschland

FST Medizintechnik, Bad Oeynhausen, Deutschland

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

Sigma Laborzentrifugen, Osterode, Deutschland

Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland

3.1.4.2. Isometrische Spannungsmessung an isolierten Geweben im Organbad

Aorten

Edelstahlhaken mit Titanspitze	Föhr Med. Instruments, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland
Messverstärker (BioAmp-04/8)	Föhr Med. Instruments, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland
Organbäder 50 ml	Föhr Med. Instruments, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland
Spannungsabnehmer, isometrisch (TF-6V50)	W.Fleck, Mainz, Deutschland
Umlaufthermostat C10	Gebr. Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Corpora Cavernosa

Messverstärker (TF-KWS 504.D)	Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland
Organbäder 75 ml, Schuler Tissue Bath System	Pyrex, London, Großbritannien
Spannungsabnehmer (Wägezelle Typ Q11)	Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland

3.1.4.3. Histologie

Brutschrank 37°C (Kelvitron t)	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
Deckgläser (Stärke 130 µm)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Digitalkamera für Mikroskopie DXM 1200 F	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Typ E600	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Kryomikrotom, Kryostat Leica CM 1900-V5.0	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Lichtmikroskop (Nikon Alphaphot-2 YS2)	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Objektträger, polysinebeschichtet	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland

3.1.4.4. Untersuchungen an Gewebehomogenisat

Blotkammer (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Filterpapier (Blotting Paper)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Homogenisator	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Luminometer (Lumat LB 9507)	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Messküvette für Photometrie, Acryl (10x4x45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Messküvette für Photometrie, Quarzglas (10 mm)	Hellma Optik GmbH, Jena, Deutschland
Nitrozellulosemembranen (Protran)	Whatman, Dassel, Deutschland
Reagenz- und Zentrifugenröhre, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röntgen-Entwicklungsautomat (Agfa Curix 60)	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Röntgenfilm (Agfa Curix HT1.000G)	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Spektrophotometer (DU 730 UV/Vis)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 31)	Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Wasserbad (WB 5)	PD-IgmbH Prüfgerätewerk Dresden, Deutschland

3.1.5. Software

Bestimmung der Vitalparameter

BP 2000 Analysis Software

Visitech Systems Inc., Apex, North Carolina, USA

Isometrische Spannungsmessung im Organbad

FMI VitroDat

Föhr Med. Instruments, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland

Histologie

ACT-1, Version 2.62

Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Confocal Assistant Application 40, Version 4.02

Todd Clark Brelje, University of Minnesota, USA

ImageJ for microscopy, Version 1.37v

Wayne Rashband, NIH, USA

Lucia G/F, Version 4.60

Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Untersuchungen an Gewebehomogenisat

Labworks Analysis Software, Version 4.6

UVP Inc., Upland, Kanada

Statistische Auswertung

Microsoft Excel 2003

Microsoft, Redmond, USA

Graph Pad Prism, Version 4.03

GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA

SAS 9.1.

Statistical Analysis Software Inc, Cary, USA

3.2. Methodik

3.2.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 80 männliche Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet, darunter 20 Wildtyp-Mäuse (WT) und 60 homozygote Apolipoprotein E Knockout (ApoE^{-/-}) Mäuse der Linie B6.129P2-ApoE^{tm 1 Unc}. Die Mäuse wurden von Charles River Laboratories, Research Models and Services GmbH, Sulzfeld, Deutschland, im Alter von 10 Wochen bezogen.

Alle Prozeduren wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch die Kreispolizeibehörde des Saarpfalzkreises (über das Veterinäramt des Saarpfalzkreises und die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes) durchgeführt.

3.2.2. Tierhaltung

Die Tiere wurden einzeln, oder in Gruppen bis zu maximal 5 Tieren, in Milieukäfigen gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 22°C, die relative Luftfeuchtigkeit 70-80%. Durch Kunstlicht wurde ein jeweils zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus aufrecht erhalten.

3.2.3. Tierfütterung

Transgene (ApoE^{-/-}) Mäuse gelten als derzeit geeignetes Modell zur experimentellen Induktion einer generalisierten Atherosklerose. ApoE fungiert als Ligand, der die Aufnahme von Chylomikronen, VLDL und deren Bruchteilen, insb. an hepatischen Rezeptoren, vermittelt. Den transgenen Knockout-Tieren fehlt diese Fähigkeit zur Bereinigung des Serums von Triglycerid- und Lipoproteinbestandteilen. Daher entwickeln sie eine ausgeprägte Hypertriglycerid- und Hypercholesterinämie und eine akzelerierte Atherosklerose (VAN REE et al., 1994; NAKASHIMA et al., 1994; NAPOLI et al., 2000).

Alle Mäuse erhielten eine fett- und cholesterinreiche Diät (21% Rohfett, 19,5% Casein, sowie 1,25% Cholesterin) in Form von Futterpellets (hergestellt von Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

20 ApoE^{-/-}-Mäuse erhielten zusätzlich eine Irbesartan-Dosis von 50 mg pro kg Körpergewicht und Tag. Hierzu wurde Irbesartan den Futterpellets in einer Konzentration von 300 mg/kg (bei einer geschätzten Futteraufnahme von 5 g pro Tier und Tag) zugefügt.

20 ApoE^{-/-}-Mäuse erhielten 25 mg Hydralazin pro kg Körpergewicht und Tag, das dem Trinkwasser in einer Konzentration von 250 mg/l zugemischt wurde (bei einer geschätzten Trinkwasseraufnahme von 3 ml pro Tier und Tag).

Die Behandlung dieser Kontrollgruppe mit dem Vasodilatator Hydralazin zielte auf eine Blutdrucksenkung, unabhängig von der Blockade des AT₁R ab, um blutdruckunabhängige Effekte der Behandlung mit dem AT₁R-Blocker Irbesartan abgrenzen zu können.

Es fanden regelmäßige Kontrollen der Futter- und Wasseraufnahme statt.

3.2.4. Studienprotokoll

Ab einem Alter von 10 Wochen wurden alle Tiere für 7 Wochen mit der o.g. fett- und cholesterinreichen Diät gefüttert. Entsprechend der Interventionen ergab sich folgende Gruppeneinteilung:

Gruppe	Typ	Anzahl	fett- und cholesterinreiche Diät	Intervention
1	WT	20	ja	keine
2	ApoE ^{-/-}	20	ja	keine
3	ApoE ^{-/-}	20	ja	Irbesartan 50 mg/kg/d
4	ApoE ^{-/-}	20	ja	Hydralazin 25 mg/kg/d

Tab. 3.1.: Studienprotokoll

Jeweils 20 transgene ApoE^{-/-}-Tiere wurden unter cholesterinreicher Diät für 7 Wochen mit Irbesartan, respektive Hydralazin behandelt. Als Kontrollen dienten 20 WT- und 20 unbehandelte ApoE^{-/-}-Tiere.

Die Erhebung der Kreislaufdaten wurde in der 7. Fütterungswoche durchgeführt. Nach Abschluss der 7. Fütterungswoche fand die Entnahme von Aorten und CC nach Tötung der Tiere statt.

3.2.5. Erhebung der Kreislaufdaten

Der systolische Blutdruck, sowie die Herzfrequenz der Versuchstiere wurden mittels tail-cuff-Methode nichtinvasiv bestimmt. Hierzu diente das BP-2000 Blood Pressure Analysis System for mice. Das System bestimmt photoelektrisch die Pulswelle, die durch den Blutfluss in der Kaudalarterie der Maus erzeugt wird und gibt diese auf einem angeschlossenen Computer in Echtzeit wieder. Über eine Blutdruckmanschette, die über den Schwanz der Tiere gestreift wird, erfolgt die Bestimmung des systolischen Blutdruckes (KREGE et al., 1995).

Die Versuchstiere wurden, von störenden Geräuscheinflüssen abgeschottet, in einem abgedunkelten Raum auf die, auf 37°C vorgeheizte, Bodenplatte der Messeinheit platziert. Jeder Messdurchgang wurde an 4 Tieren gleichzeitig durchgeführt, wobei jede Maus in einer individuellen, abgeschotteten Messkammer saß. Um den Einfluss der Messsituation auf den Blutdruck und die Herzfrequenz der Tiere gering zu halten, wurden an jedem Tier pro Durchgang 10 vorläufige Blutdruckmessungen (Dauer ca. 8 min) vorgenommen, um eine Gewöhnung herbeizuführen. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden verworfen. Erst danach wurden die eigentlichen 15 Messungen

(Dauer ca. 12 min) durchgeführt, deren Resultate für jedes Tier gemittelt wurden. Die Bestimmung von Herzfrequenz und Blutdruck wurde insgesamt an 5 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Messungen der ersten 3 Tage wurden als Gewöhnungsphase definiert und verworfen. Die Ergebnisse der Tage 4 und 5 wurden in die Auswertung einbezogen. Um einen Einfluss der Tageszeit auf die Messdaten auszuschließen wurde die Reihenfolge, in der die Tiere gemessen wurden, täglich variiert.

3.2.6. Isometrische Spannungsmessung an isoliertem Gewebe im Organbad

3.2.6.1. Anästhesie und Organentnahme

Die Tiere wurden nach Abschluss der 7. Fütterungswoche, jeweils unmittelbar vor der funktionellen Messung der Endothelfunktion, in Narkose getötet. Die Narkose erfolgte durch eine Überdosis Ketamin (20 mg) und Xylazin-HCl (Rompun, 2 mg) intraperitoneal.

Aus der Aorta Abdominalis wurde mit einer Spritze 1 ml Blut aspiriert und in Eppendorfgefäße mit EDTA überführt. Anschließend wurde das Blut bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert und bei -80°C bis zur Bestimmung der Serumlipidwerte gelagert.

Das Herz wurde, ohne die Aorta abzusetzen, mobilisiert und in der Folge die Pars Thoracica Aortae unter Vermeidung von Zugkräften aus ihrer prävertebralen Lage gelöst. Die Aorta wurde am Durchtritt durch das Diaphragma abgesetzt. Das Herz inklusive Aorta wurde sofort in eine Petrischale mit 4°C kalter Tyrode überführt. Anhaftendes Binde- und Fettgewebe wurde vorsichtig entfernt. Von der Pars Thoracica Aortae wurden jeweils 4 Segmente von 3 mm Länge für die funktionelle Messung der Endothelfunktion im Organbad abgetrennt.

Die präpubische Bauchdecke und Faszie wurden eröffnet, das Ligamentum Fundiforme Penis durchtrennt und der Penis des Tieres an der Membrana Perinei abgesetzt. In eine Petrischale mit 4°C kalter Tyrode wurden Glans Penis und Corpus Spongiosum inklusive Urethra entfernt, wobei die Tunica Albuginea der CC erhalten blieb. Die CC wurden voneinander getrennt.

3.2.6.2. Versuchsablauf

Aortensegmente

Die Aortensegmente wurden, unmittelbar nach Präparation, in Organbäder überführt (Abb. 3.1. und 3.2.).

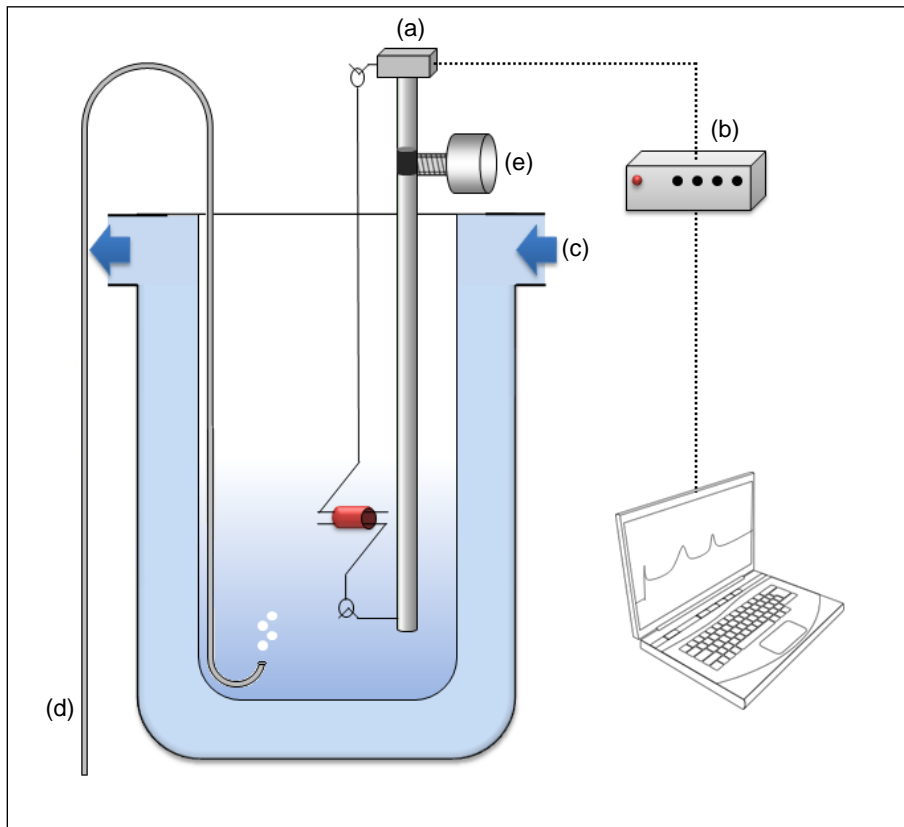


Abb. 3.1.: Schematische Darstellung der verwendeten Organbadapparatur

Zwei triangulär geformte Haken wurden in das Lumen des jeweiligen Aortensegments eingeführt. Einer der Haken wurde fixiert, der andere mit einem isometrischen Spannungsaufnehmer (a) verbunden. Der Spannungsaufnehmer stand über einen Messverstärker (b) mit einem Computer in Verbindung, der die Messung aufzeichnete (FMI, VitroDat). Das Aortensegment inklusive Haken wurde in ein mit Tyrode gefülltes Organbad (50 ml) eingebracht. Die Organbäder wurden fortwährend mit 37°C warmem destilliertem Wasser (c) umspült (Umlaufthermostat) und mit Carbogen (5 Vol% CO₂ in O₂) begast (d). Nach einer Äquilibrationsphase im Organbad wurde die Position der Haken zueinander mittels einer Mikrometerschraube (e) so eingestellt, dass das jeweilige Aortensegment schrittweise auf eine Vorspannung von 10 mN gebracht wurde. Die Vorspannung wurde bis zum Beginn der Kontraktilitätsmessung über mindestens zehn Minuten auf konstantem Niveau belassen.



Abb. 3.2.: Versuchsaufbau

Organbadapparatur mit Spannungsabnehmern, Verstärker, Umlaufthermostat und digitaler Aufzeichnung.

Kontraktion durch Phenylephrin:

Phenylephrin gehört als Agonist des α_1R zur Gruppe der direkt wirkenden Sympathomimetika.

Phenylephrin wurde den Organbädern in 5 Schritten in kumulierender Konzentration (jeweils um eine Zehnerpotenz gesteigert) zugesetzt. Die Endkonzentrationen im Organbad nach den jeweiligen Zugaben betragen 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M. Die Zugabe der Folgekonzentration fand statt, sobald die Kontraktion auf die vorherige Konzentration in ein Plateau überging. Die Amplitude der Kontraktion wurde der jeweiligen Konzentration an Phenylephrin zugeordnet. Aortensegmente, die keine Reaktion auf die Zugabe von Phenylephrin zeigten (Kontraktion <10% der Ausgangsspannung), wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Endothelabhängige Relaxation mittels Carbachol:

Carbachol ist ein unselektiver Agonist an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und als solcher ein direkt wirkendes Parasympathomimetikum, v.a. am M_3R , dessen Aktivierung die Synthese und Freisetzung von NO aus Endothelzellen bedingt. Damit relaxiert Carbachol glatte Muskulatur unter der Voraussetzung des Vorhandenseins eines funktionierenden Endothels. Somit lässt das Maß der Relaxation des jeweiligen

Gefäßsegments auf Carbachol Rückschlüsse auf dessen endotheliale Funktionsfähigkeit zu.

Vom höchsten Niveau der Kontraktion mit Phenylephrin ausgehend, wurde eine endothelabhängige Relaxation der Aortensegmente durch die kumulative Zugabe von Carbachol in 6 Einzeldosen (jeweils um eine Zehnerpotenz gesteigert) herbeigeführt. Dabei betrug die jeweiligen Endkonzentrationen im Organbad 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM und 100 µM. Nachdem die Relaxation auf eine bestimmte Konzentration in ein Plateau überging, wurde die nächsthöhere Konzentration zugegeben. Die Relaxation durch die jeweilige Carbachol-Dosis wurde in Relation zur maximal erfolgten Kontraktion auf Phenylephrin berechnet.

Reversibilität der endothelabhängigen Relaxation durch die Blockade der eNOS mittels N_ω-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME) :

L-NAME stellt als Struktur analogon des L-Arginin, des Substrates eNOS, einen potenten Inhibitor dieses Enzyms dar. Durch Inhibition der eNOS reduziert L-NAME die Freisetzung von NO durch die Endothelzelle. Dies bedingt in Summa ein Überwiegen konstriktorischer Mediatoren und somit eine Kontraktion der glatten Muskelzelle.

Nachdem die maximale Relaxation des jeweiligen Aortensegments auf Carbachol erreicht war, wurde L-NAME (Endkonzentration im Organbad 1 µM) zugegeben.

Eine Aufhebung der Carbachol-induzierten Relaxation des jeweiligen Aortensegments durch die Blockade der eNOS mittels L-NAME zeigte, dass die zuvor beobachtete Relaxation auf Carbachol einen endothelialen Effekt (eNOS) darstellte. Folglich wurden solche Aortensegmente, die keine Reversibilität der Vasorelaxation nach Zugabe von L-NAME zeigten, nicht in die Auswertung mit einbezogen, da hier keine intakte Endothelzellschicht vorlag.

Daraufhin wurde die Tyrode in den Organbädern mehrfach ausgetauscht, um die zugegebenen Substanzen auszuwaschen, bevor die Vorspannung wieder auf 10 mN eingestellt, und für mindestens fünf Minuten auf konstantem Niveau belassen wurde.

Endothelunabhängige Relaxation durch Glyzeroltrinitrat:

Glyzeroltrinitrat stellt als organisches Nitrat ein Prodrug des NO dar. In der glatten Muskelzelle wird Glyzeroltrinitrat zu Nitrit-Ionen umgebaut, die in NO überführt

werden. NO vermittelt die Relaxation der glatten Muskelzelle. Die Konversion von exogen zugeführtem Glyceroltrinitrat zu NO findet in der glatten Muskelzelle selbst (ohne Beteiligung des Endothels) statt. Die entstehende Vasodilatation ist damit unabhängig von der Endothelfunktion.

Die Aortensegmente wurden erneut mit Phenylephrin kontrahiert (Einzeldosis, Endkonzentration im Organbad 10 μ M), wobei nach Erreichen eines Plateaus nun eine Relaxation durch kumulative Dosen von Glyceroltrinitrat herbeigeführt wurde (Endkonzentrationen im Organbad: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M). Die durch die jeweilige Glyceroltrinitrat-Dosis erfolgte Relaxation wurde prozentual im Verhältnis zur maximalen α -adrenergen Kontraktion berechnet.

Nach Beendigung des Experiments wurden die Aortensegmente bei -80°C gelagert.

Corpora Cavernosa

Unmittelbar nach Präparation wurden beide CC des jeweiligen Tieres an beiden Enden mit chirurgischem Faden versehen und in die Organbadapparatur eingebracht, die vom Aufbau her der zuvor beschriebenen entspricht. Der untere Faden wurde fixiert, der obere mit dem isometrischen Spannungsabnehmer verbunden. Entsprechend dem zuvor beschriebenen Versuch, wurden die mit Tyrode gefüllten Bäder mit 37°C warmem destilliertem Wasser umspült und mit Carbogen begast. Die CC wurden schrittweise auf eine Vorspannung von 3 mN gebracht, die über mindestens zehn Minuten konstant gehalten wurde.

Endothelabhängige und endothelunabhängige Relaxation:

Die verwendeten Reagenzien und deren Abfolge entsprachen dem zuvor beschriebenen Protokoll der Stimulation der Aortensegmente. Hierbei betragen die kumulativen Endkonzentrationen der Substanzen im Organbad:

- Phenylephrin (Einzeldosis): 5 μ M
- Carbachol (kumulativ): 1 nM -3 nM -10 nM -30 nM -100 nM -300 nM -1 μ M
- L-NAME: (Einzeldosis): 1 μ M
- Erneuerung der Tyrode, Spülen der Organbäder, Einstellen der Vorspannung
- Phenylephrin (Einzeldosis): 5 μ M
- Glyceroltrinitrat (k.): 100 nM -300 nM -1 μ M -3 μ M -10 μ M -30 μ M -100 μ M

Nach Beendigung des Experiments wurden die CC bei -80°C gelagert.

3.2.7. Histologische Untersuchungen

3.2.7.1. Kryotomie

Sämtliche Schnittpräparate zur histologischen Untersuchung wurden im Kryomikrotom-Schnittverfahren (Kryostat) bei einer Kühlkammertemperatur von -25°C und einer Objekttemperatur von -20°C hergestellt. Die Schnittdicke betrug $10\ \mu\text{m}$, als Einbettmedium wurde Jung-Einbettmedium für Gefrierschnitte verwendet. Die Schnitte wurden auf polysinebeschichtete Objektträger aufgebracht und, sofern nicht unmittelbar histologisch gefärbt, bei -80°C gelagert.

3.2.7.2. Mikroskopie

Die digitale Aufnahme der gefärbten Schnitte erfolgte mit einem Nikon-Mikroskop (incl. Digitalkamera) unter Verwendung der Software ACT-1.

3.2.7.3. Ölrot-O-Färbung

Ölrot-O (auch solvent red 27, Sudanrot 5B, $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$) ist ein Lysochrom (fettlöslicher Diazofarbstoff), das neutrale Lipide in Kryoschnitten anfärbt (MCVEAN et al., 1965). In diesem Fall wurde es zur Detektion des Lipidkerns subendothelialer atherosklerotischer Gefäßläsionen (Plaque) verwendet.

Gewebe:

Von 5 Tieren jeder Gruppe wurden jeweils 5 aufeinanderfolgende Transversalschnitte aus der Aorta Ascendens, und dem Aortensinus gefärbt. Der Aortensinus ist die am häufigsten verwendete Lokalisation zur Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen im Tiermodell, da das Ausmaß der Plaques in dieser Region geringeren Variationen unterworfen ist, als in anderen Gefäßbereichen und da die Aortenwurzel eine standardisierbare Lokalisation darstellt (DAUGHERTY et al., 2005).

Färbung:

Zur Herstellung der Färbelösung wurde die Stammlösung im Verhältnis 3:2 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Gefrierschnitte wurden luftgetrocknet und 1 h lang mit 4%igem Paraformaldehyd vorbehandelt. Anschließend wurden die Objektträger

dreimal mit destilliertem Wasser gespült und für 1 h in die Färbelösung eingetaucht. Nach erneutem dreimaligem Spülen in destilliertem Wasser erfolgte das Eindecken der Schnitte (mittels Aquatex).

Auswertung:

Die gefärbten Schnitte wurden in Hellfeldmikroskopie digital aufgenommen. Mit Hilfe der Lucia G/F Auswertungssoftware wurden die Umrisse, sowohl der atherosklerotischen Läsionen, als auch der Gefäßlumina umfahren, deren Fläche berechnet und die Fläche der Plaque prozentual im Verhältnis zur Fläche des gesamten Gefäßlumens errechnet.

3.2.7.4. Sirius Red-Färbung

Der Farbstoff Sirius Red bindet selektiv an fibrilläre Kollagene (Typ I und III) und färbt diese in der lichtmikroskopischen Betrachtung intensiv rot, während zytoplasmatische Strukturen schwach gelb erscheinen (SWEAT et al., 1964). Im Zuge der Atherogenese kommt es zu einer Zunahme von fibrillären Kollagenfasern in der Gefäßwand und im trabekulären Interstitium der Schwellkörper. Die Färbung mit Sirius Red diente daher der Quantifizierung des fibrotischen Remodelling beider Gewebe.

Gewebe:

Von 5 Tieren pro Gruppe erfolgte die Färbung jeweils 5 aufeinanderfolgender Transversalschnitte der Aorta Ascendens, sowie eines CC.

Färbung:

- Absteigende Ethanolreihe: jeweils 2 min in 100%igem, sowie 90%igem und 70%igem Ethanol in aqua dest.
- Zweimalige Spülung in aqua dest. für 5 und anschließend 10 min
- Färbung in Sirius Red Gebrauchslösung (CC 5 min, Aorta Ascendens 10 min)
- Erneutes Spülen in aqua dest.
- Jeweils 2 min in 90%igem und anschließend 100%igem Ethanol
- 2 min in Xylol
- Eindecken mit Entellan

Auswertung:

Die hellfeldmikroskopischen Aufnahmen der mit Sirius Red gefärbten Gewebe entstanden bei konstanter Belichtungszeit. Eine standardisierte Auswertungsmaske (Sirius Red Macro für Expositionszeiten ≤ 83 ms) der Lucia G/F-Software diene der Definition des Intensitätsbereiches der Rotfärbung der Kollagenfibrillen. Diejenige Fläche des Präparates, deren Farbton sich innerhalb dieses Intensitätsbereiches befand, wurde zur Gesamtfläche des Gewebes ins Verhältnis gesetzt.

3.2.7.5. Dihydroethidium-Färbung

Dihydroethidium (DHE) eignet sich zur Quantifizierung intrazellulärer Superoxidproduktion, da es durch ROS zu fluoreszierenden Ethidium-Kationen oxidiert wird (CHRISTENSEN et al., 2007; Abb. 3.3.). Ethidium-Kationen sind Bestandteil des Ethidumbromid, das einen aromatischen, roten Phenanthridinfarbstoff darstellt, der avid in Nukleinsäuren interkaliert und daher in der Molekularbiologie zum Nachweis von DNA und RNA verwendet wird.

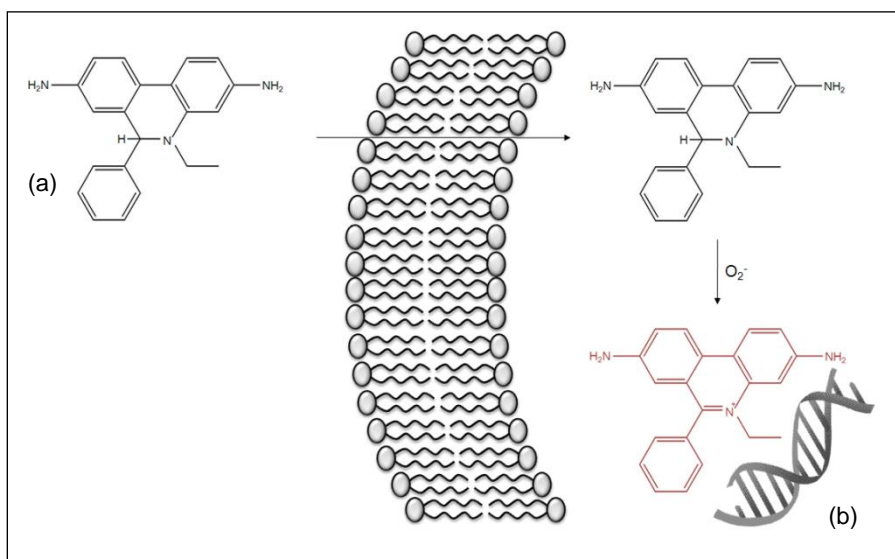


Abb. 3.3.: Prinzip der DHE-Superoxid-Färbung

DHE (a) permeiert Zellmembranen ungehindert. In der Anwesenheit von Superoxid-Anionen (O_2^-) wird DHE zu Ethidium-Kationen (b) und anderen fluoreszierenden Produkten wie Oxy-Ethidium oxidiert. Ethidium-Kationen können die Zelle aufgrund ihrer unmittelbaren Interkalation in die DNA nicht mehr verlassen. Im Gegensatz zu DHE weisen Ethidium-Kationen eine Fluoreszenz (Exzitationsspektrum $\lambda = 500-530$ nm, Emissionsspektrum $\lambda = 590-620$ nm) auf.

Gewebe:

Die Färbung mit DHE wurde an 5 aufeinanderfolgenden Transversalschnitten der Aorta Ascendens und eines CC von jeweils 5 Tieren pro Gruppe durchgeführt.

Färbung:

Um die Färbelösung auf dem Gewebe zu konzentrieren, erfolgte die Umrandung der luftgetrockneten Schnitte mit einem Fettstift. In abgedunkelter Umgebung wurden im Folgenden jeweils 100 µl Färbelösung auf jeden Schnitt pipettiert, woraufhin die Objektträger für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden. Die mikroskopische Aufnahme der Bilder fand unmittelbar im Anschluss statt, wobei ohne Verwendung eines Eindeckmediums lediglich ein Deckglas auf die Färbelösung aufgebracht wurde. Bei einer Belichtungszeit von 1 ms stellte sich das oxidierte Dihydroethidium im G-2A Fluoreszenzfilter (Exzitationsspektrum $\lambda = 510-560$ nm, Langpassfilter mit Absorptionskante bei $\lambda = 565$ nm) hellleuchtend rot dar.

Auswertung:

Um sowohl die Intensität, als auch die Quantität der Fluoreszenzsignale evaluieren zu können, erfolgte zunächst die Konversion der Farbaufnahmen in 8-bit Graustufenbilder (Confocal Assistant Application).

In die Auswertung einbezogen wurde der endotheliale Bereich der Aorta Ascendens (bis zur Intima), respektive der von Endothel ausgekleidete Anteil der Kavernen der Schwellkörper.

Mittels der Auswertungssoftware ImageJ wurde jedem Bildpunkt des markierten Bereiches, entsprechend seiner Helligkeit, ein Pixelwert zwischen 0 und 255 zugeordnet. Die so erhobene Helligkeitsverteilung des Auswahlbereiches wurde als Histogramm aufgetragen und ihr Mittelwert errechnet. Hohe Werte lassen somit den Rückschluss auf eine hohe Intensität von Fluoreszenzsignalen in den beschriebenen Regionen, gleichbedeutend mit einer hohen Last an Superoxid-Anionen im Bereich des Endothels zu.

3.2.7.6. Immunfluoreszenzfärbung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)

Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) katalysieren die Bildung von hochreaktivem NO aus molekularem Sauerstoff und der basischen Aminosäure L-Arginin unter Bildung von L-Citrullin. Die eNOS (auch NOS Typ III), wird im Gefäßendothel, sowie im Sinusoid-Endothel der CC exprimiert. Von dieser konstitutiven Expression abgesehen, unterliegt die eNOS sowohl einer physiologischen Regulation, als auch

der Beeinflussung durch pathologische Zustände, auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene (NISHIDA et al., 1992; SEARLES, 2006). In diesem Fall wurde das Expressionsniveau des eNOS-Proteins durch Immunfluoreszenz quantifiziert.

Gewebe:

5 aufeinanderfolgende Transversalschnitte der Aorta Ascendens, sowie eines Schwellkörpers von 5 Tieren pro Gruppe wurden der Färbeprozedur unterzogen.

Färbung:

Nach erfolgter Lufttrocknung und Umrandung der Schnitte mit Fettstift, erfolgte die immunhistochemische Färbung nach folgendem Protokoll:

- 2 min in 4%igem Paraformaldehyd
- 5 min waschen in PBS
- 2 mal 5 min in 0,5%iger Lösung von Igepal (tert-Octylphenoxy-poly(oxyethylen)ethanol) in PBS
- 30 min in 0,5%iger Lösung von Ziegen Serum in PBS
- 90 min Exposition jedes Schnittes gegenüber 100 µl 1%iger Lösung des Primärantikörpers (NOS Typ III Antikörper, rabbit-anti-mouse, Isotyp IgG) in 0,5% Ziegen Serum in PBS, bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 3 mal 5 min waschen in PBS
- 45 minütige Inkubation jedes Schnittes mit 100 µl 1%iger Lösung des Sekundärantikörpers (TRITC-konjugierter Antikörper, goat-anti-rabbit, affinitätsisoliert und mit humanem IgG adsorbiert) in 0,5% Ziegen Serum in PBS, in einer feuchten Kammer, im abgedunkelten Raum
- 3 mal 10 min waschen in PBS
- Eindecken mit Mounting Medium

Auswertung:

Die digitale Aufnahme, sowie die Auswertung der fluoreszenzgefärbten Schnitte (TRITC-Exzitationsmaximum: $\lambda = 550$ nm, Emissionsmaximum: $\lambda = 573$ nm) entsprachen dem im Rahmen der DHE-Färbung beschriebenen Ablauf, wobei in diesem Fall die Intensität des Fluoreszenzsignals mit dem Maß der Bindung des spezifischen Primärantikörpers an vorhandenes eNOS-Protein korrelierte.

3.2.7.7. Quantifizierung von Stickstoffmonoxid (Diaminofluoreszeinfärbung)

Diaminofluoreszein Diazetat (DAF DA) stellt ein nicht fluoreszierendes Agens dar, das in der Lage ist, Zellmembranen zu permeieren. Innerhalb der Zelle wird DAF DA durch Esterasen im Zytosol hydrolysiert, wobei DAF freigesetzt wird. DAF permeiert die Zellmembran in wesentlich geringerem Umfang und reagiert intrazellulär mit NO zu seinem fluoreszierenden Triazol-Derivat. Das Triazol zeigt bei einem Exzitationsmaximum von $\lambda = 488 \text{ nm}$ und einem Emissionsmaximum von $\lambda = 515 \text{ nm}$ eine grüne Fluoreszenz (KOJIMA et al., 1998). Das Fluoreszenzsignal korreliert somit mit dem Ausmaß intrazellulär vorhandenen Stickstoffmonoxids.

Gewebe:

5 aufeinanderfolgende Transversalschnitte eines Schwellkörpers von 5 Tieren pro Gruppe wurden mittels DAF gefärbt.

Färbung:

Nach Lufttrocknung der Kryoschnitte erfolgte deren Umrandung mit Fettstift. Anschließend wurde das Einbettmedium in aqua dest. (15 min) gelöst. 100 μl der Gebrauchslösung wurden auf jeden Schnitt aufgebracht, bevor die CC 4 h lang bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Die gefärbten Präparate wurden ohne Verwendung eines Eindeckmediums mit einem Deckglas versehen und unmittelbar im Anschluss mikroskopiert. Alle Prozeduren, an denen DAF DA beteiligt war, wurden unter Vermeidung direkter Lichteinwirkung durchgeführt.

Auswertung:

Die digitale Aufnahme und Auswertung der Schnitte entsprachen dem im Rahmen der DHE- und Immunfluoreszenzfärbung beschriebenen Vorgehen unter Verwendung eines Fluoreszenzfilters mit FITC-Spektrum (Exzitationsspektrum $\lambda = 465\text{-}495 \text{ nm}$, Langpassfilter mit Absorptionskante bei $\lambda = 505 \text{ nm}$).

3.2.8. Untersuchungen an Gewebehomogenisat

3.2.8.1. Bestimmung der NADPH-Oxidase Aktivität durch Chemiluminiszenz

Der Enzymkomplex der NADPH-Oxidase gewährleistet durch Elektronentransfer von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat auf molekularen Sauerstoff die Bildung von Superoxidanionen ($\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+$).

In Endothelzellen, sowie glatten Gefäßmuskelzellen, stellt das Enzym eine der hauptsächlichen Quellen vaskulärer ROS dar (GRIENGLING et al., 1994; RAJAGOPALAN et al., 1996).

Bei der hier verwendeten Chemiluminiszenzmethode, wurde dem jeweiligen Ansatz aus Gewebehomogenisat eine standardisierte Menge an NADPH zugesetzt. Die daraufhin über das initiale Niveau hinaus generierten Superoxidanionen wurden durch Lucigeninfluoreszenz quantifiziert. Hierbei reagieren kationische Radikale des Lucigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'-Biacridinium-Dinitrat) mit Superoxidanionen unter Bildung eines instabilen Dioxetan-Intermediates. Dieses zerfällt in zwei N-Methylacridon-Moleküle, von denen eines unter Emission eines Photons im Wellenlängenbereich von $\lambda = 369$ nm in seinen energetischen Grundzustand zurückfällt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals lässt somit einen Rückschluss auf die globale Aktivität der NADPH-Oxidase im untersuchten Gewebehomogenisat zu (FAULKNER et al., 1993).

Gewebepräparation:

5 mm lange Segmente der Aorta Abdominalis von jeweils 5 Tieren pro Gruppe wurden in Eppendorfgefäße überführt, in 350 μ l Kalium-Phosphat-Puffer homogenisiert, 1 min lang im Ultraschallbad (Einfachhalbwelle, Betriebsfrequenz 35 kHz, Ultraschall-Spitzenleistung 240 W) behandelt und anschließend auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Aliquotierung von 50 μ l pro Probe in gesonderte Eppendorfgefäße zur späteren Quantifizierung des Proteingehalts des Ansatzes (Proteinbestimmung nach LOWRY, s.u.).

Versuchsablauf:

Lucigenin wurde in abgedunkelter Umgebung in Kalium-Phosphat-Puffer in 10 μ M Lösung gebracht und im Wasserbad langsam auf 37°C erwärmt. 500 μ l dieses Lucigenin-Puffers wurden in der Folge mit 100 μ l der jeweiligen Probe inkubiert und die basale Fluoreszenz über 5 min als Probenleerwert bestimmt. Die anschließende Messung erfolgte ebenfalls an 100 μ l jeder Probe zusammen mit 500 μ l des Lucigenin-Puffers, wobei in diesem Fall 100 μ l einer 100 μ M Lösung von NADPH in 37°C warmem Kalium-Phosphat-Puffer zugesetzt wurden. Die Luminiszenzbestimmung erfolgte für 5 min, die Resultate wurden als RLU (relative light units) bestimmt. Für jede Probe fand eine Proteinbestimmung nach LOWRY (LOWRY et al., 1951) statt: Hierzu wurden 20 μ l der Probe mit 100 μ l der Reagenz A und 800 μ l der

Reagenz B des DC Protein Assay Kit (Biorad) in einem Eppendorfgefäß versetzt. Die Kupfer(II)-Ionen der Reagenz A bilden im alkalischen Milieu der Reagenz Komplexe mit den Peptidbindungen der im Homogenisat enthaltenen Proteine (Biuret-Reaktion), wobei die Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert werden. Die Kupfer(I)-Ionen in diesen Komplexen wiederum, reduzieren das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren: Reagenz B) zu Molybdänblau. Nach 15minütiger Inkubation wurden die Proben in eine Acryl-Messküvette überführt, die Absorption der Lösung bei 540 nm photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentration in Relation zum Standard (Rinderserumalbumin) in g/l berechnet.

Auswertung:

Der Probenleerwert der ersten Messung wurde vom Wert der NADPH-substituierten Messung subtrahiert und das Ergebnis durch die Proteinkonzentration der Probe geteilt.

Damit ergab sich für die Aktivitätsbestimmung der NADPH-Oxidase die arbiträre Einheit von $\text{RLU} \cdot \text{l} \cdot \text{g}^{-1}$.

3.2.8.2. Photometrische Quantifizierung der Lipidperoxidation

Die oxidative Degradierung von Lipiden der Zellmembran (Lipidperoxidation) durch ROS stellt eine Kettenreaktion dar, bei der zunächst hochreaktive instabile Hydroperoxide gesättigter, sowie ungesättigter Fettsäuren entstehen, die in der Folge mit benachbarten Lipiden der Zellmembran reagieren. Die Terminierung dieser Kettenreaktion ist insbesondere vom antioxidativen Potenzial der Zelle abhängig. Ist dieses Potenzial gering ausgeprägt und gleichzeitig die Last an ROS hoch, schreitet die Zerstörung der Zellmembran fort, bis das Ausmaß der Peroxidation so umfangreich ist, dass die Wahrscheinlichkeit der Spontanterminierung durch die Kollision von Hydroperoxiden ausreichend groß ist (MIHALJEVIĆ et al., 1996).

Da indirekte Messmethoden der Lipidperoxidation (z.B. die Bestimmung der Degradationsprodukte mehrfach ungesättigter Fettsäuren, Malondialdehyd und 4-Hydroxynoneal (JANERO, 1990) unspezifisch sind und häufig zur Überquantifizierung von Lipidperoxiden führen, wurde die Lipidperoxidation in diesem Fall direkt über die Redoxreaktion mit Eisenionen bestimmt. ROS reagieren avid mit Eisen(II)-Ionen

und oxidieren sie zu Eisen(III)-Ionen, die durch Reaktion mit Thiozyanat-Anionen (SCN^-) als Chromogen sichtbar gemacht werden können (MIHALJEVIĆ et al., 1996). Die Extraktion des Gewebes fand in desoxygeniertem Chloroform statt, um einen möglichen Einfluss bereits im Gewebe vorhandener Eisenionen auszuschließen und die Radikalbildung im Zuge der Prozedur zu reduzieren.

Gewebepräparation:

Segmente der Aorta Abdominalis (5 mm lange Segmente von jeweils 5 Tieren pro Gruppe), sowie ein Schwellkörper jedes Tieres wurden in HPLC-gereinigtem aqua dest. homogenisiert.

Versuchsablauf:

Die Desoxygenierung von Methanol und Chloroform erfolgte durch 30minütige Stickstoffbegasung. 500 μl einer Lösung von 100 mg ExtractR (LPO-Assay Kit) pro 15 ml Methanol wurden 500 μl des Gewebehomogenisates zugesetzt und 5 min bei 4°C und 1500 x g in Eppendorfgefäßen zentrifugiert. 500 μl der von Wasser und Proteinen getrennten Chloroformextrakt-Schicht am Boden des Gefäßes wurden in ein gesondertes Eppendorfgefäß überführt und 450 μl einer Mischung aus desoxygeniertem Chloroform und Methanol (im Verhältnis 2:1) zugefügt. Danach erfolgte der Zusatz von 50 μl SCN^- -haltigen Chromogens, woraufhin nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die photometrische Messung der Extinktion bei $\lambda = 500 \text{ nm}$ in einer Quarzküvette stattfand.

Auswertung:

Das Standardreagenz des Versuchskits wurde in 5 gestaffelten Konzentrationen dem identischen Ansatz an Chloroform-Methanol-Gemisch zugesetzt und mit 50 μl desselben Chromogens inkubiert. Hieraus ergab sich nach photometrischer Messung eine Standardkurve mit der Stoffmenge an Hydroperoxiden in nmol auf der Abszisse sowie der Absorption bei $\lambda = 500 \text{ nm}$ auf der Ordinate. Mittels Regressionsberechnung konnte so der für die jeweilige Probe bestimmten Absorption eine Stoffmenge an Hydroperoxiden in nmol zugeordnet werden. Anschließend erfolgte wie zuvor beschrieben eine Proteinbestimmung nach LOWRY (in g/l) für jede Probe, die es ermöglichte, die Hydroperoxidkonzentration der Gewebe (in μM) zu errechnen.

3.2.8.3. Quantifizierung der lokalen Expression des AT₁-Rezeptorproteins im Corpus Cavernosum (Immunblot)

Um die Expression des AT₁-Rezeptorproteins im CC zu bestimmen, kam ein Immunblot-Verfahren (Western Blot) zum Einsatz. Hierbei wurde ein aus Gewebehomogenisat gewonnenes Proteingemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, auf die ein, gegen das AT₁-Rezeptorprotein gerichteter Primärantikörper, sowie ein peroxidasekonjugierter Sekundärantikörper aufgetragen wurden. Nach Zusatz eines durch die Peroxidase katalysierten Luminiszenzfarbstoffes, konnten die Luminiszenzsignale auf einem Röntgenfilm fixiert und densitometrisch quantifiziert werden. Der Immunblot setzte sich aus folgenden Einzelschritten zusammen:

Gewebepräparation:

10-20 mg eines Schwellkörpers von 5 Tieren pro Gruppe wurden in jeweils 600 µl Lysepuffer homogenisiert, über Nacht bei -20°C inkubiert und am folgenden Tag bei 20000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Proteinbestimmung:

Um den Proteingehalt der jeweiligen Probe zu ermitteln, erfolgte eine Proteinbestimmung nach LOWRY (s.o.).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

An der Proteinbestimmung orientiert, wurde diejenige Menge an Gesamtlisat berechnet, die einem Proteingehalt von 60 µg entsprach. Diese wurde mit einer äquivalenten Menge an Probenpuffer vermischt und für 7 min bei 70°C inkubiert. Danach erfolgte die Auftragung der Lösung auf den Sammelgelteil des diskontinuierlichen Elektrophoresegels (Sammelgel/Trenngel). Die in der Sammelphase angelegte Spannung betrug 50 V, in der Trennphase 120 V.

Protein-Transfer:

Um die Proteinfractionen vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm) zu übertragen wurde letztere zunächst in Methanol gewaschen und daraufhin in Transferpuffer eingeweicht. Das Polyacrylamidgel wurde zusammen mit der Nitrozellulose-Membran in einer Blotkammer zwischen zwei in Transferpuffer eingeweichte Filterpapiere (Dicke 4 mm) positioniert und ein konstanter Strom von

200 mA über 45 min angelegt. Anschließend erfolgte die Blockung freier Oberflächen-Bindungsstellen in 5%iger Trockenmilchlösung (0,25 g Trockenmilch in 5 ml PBS) bei Raumtemperatur für 1 h.

Antikörperinkubation:

Die proteinbeladenen Nitrozellulosemembranen wurden für die Dauer von 1 h mit dem Primärantikörper (Anti-AT₁R, polyklonal, rabbit-anti-mouse, Isotyp IgG, 1:500fach in PBS verdünnt) bei 37°C inkubiert und anschließend ungebundene Antikörperfragmente mit PBS-Puffer ausgewaschen (2x5 min, 2x10 min, 2x1 min). Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-konjugiert, mouse-anti-rabbit, Isotyp IgG, 1:5000fach in PBS verdünnt) für 30 min bei Raumtemperatur, sowie ein erneutes Auswaschen mit PBS-Tween-Puffer (analog zum ersten Schritt).

Entwicklung:

Zur Detektion der gebundenen GAPDH-konjugierten Antikörper kam der Electrochemiluminescence (ECL)-Kit (GE Healthcare) zum Einsatz. Die Nitrozellulosemembran wurde mit einer luminolhaltigen Reagenz (3-Aminophthalhydrazid) bedeckt und 1 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. GAPDH katalysiert die Oxidation von Luminol zu dessen instabilem Dianion-Peroxid, das bei der Rückkehr in den energetischen Grundzustand eine bläuliche Chemilumineszenz emittiert. Dieses Luminiszenzsignal wurde auf Röntgenfilm fixiert.

Auswertung

Die Auswertung des über einen Scanner eingelesenen Röntgenfilms fand densitometrisch mit Hilfe der Labworks Analysis Software statt. Die densitometrisch ermittelte Volltondichte des AT₁R-Proteins wurde zur Dichte des housekeeping-Proteins GAPDH (analoge Vorgehensweise, Antikörper Anti-GAPDH, monoklonal, mouse-anti-rabbit, Isotyp IgG, 1:1000fach in PBS verdünnt) ins Verhältnis gesetzt.

3.3. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler berechnet. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert von $<5\%$ (0,05) angenommen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc Analyse berechnet (Microsoft Excel 2003; Graph Pad Prism, Version 4.03).

4. Ergebnisse

4.1. Effekte der AT₁-Rezeptorblockade durch Irbesartan im Modell der ApoE-Knockout Maus

4.1.1. Serumlipide

Die Fütterung der Tiere mit einer cholesterinreichen Diät führte nach 7 Wochen bei allen ApoE^{-/-}-Tieren zu einem pathologischen Lipidprofil (signifikant erhöhte Gesamtcholesterin- und LDL-Cholesterinwerte gegenüber den Wildtyptieren), ohne signifikante Differenzen zwischen den ApoE^{-/-}-Gruppen. Die Ratio aus Gesamtcholesterin zu HDL-Cholesterin lag in den ApoE^{-/-}-Gruppen signifikant über dem Niveau der Wildtyptiere. Die Triglyzerid-Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

	Wildtyp	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} - Irbesartan	ApoE ^{-/-} - Hydralazin
Gesamtcholesterin (mg/dl)	149 ± 15	1430 ± 138**	1353 ± 105**	1367 ± 144**
LDL-Cholesterin (mg/dl)	16 ± 2	889 ± 79**	813 ± 55**	926 ± 63**
HDL-Cholesterin (mg/dl)	120 ± 14	524 ± 107 [#]	527 ± 138 [#]	491 ± 71 [#]
Triglyzeride (mg/dl)	75 ± 10	108 ± 15	111 ± 13	144 ± 37
Ratio Gesamtcholesterin / HDL-Cholesterin	1,2 ± 0,02	2,8 ± 0,31*	2,7 ± 0,51*	2,8 ± 0,11*

Tab. 4.1. Pathologisches Lipidprofil der ApoE^{-/-}-Gruppen

Laborchemische Analyse der Serumlipidwerte von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach siebenwöchiger cholesterinreicher Diät und Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan bzw. dem Vasodilatator Hydralazin. Unabhängig von der jeweiligen Intervention wiesen alle ApoE^{-/-}-Tiere signifikant erhöhte Gesamtcholesterin- und LDL-Cholesterinwerte im Vergleich zu den Wildtyptieren auf. (MW±SEM; **p<0,001 vs Wildtyp, *p<0,01 vs Wildtyp, [#]p<0,05 vs Wildtyp, n=10 pro Gruppe)

4.1.2. Vitalparameter

Beide Interventionen (Irbesartan, Hydralazin) senkten den systolischen Blutdruck gleichermaßen signifikant gegenüber den unbehandelten ApoE^{-/-}-Tieren. Das Blutdruckniveau der unbehandelten Tiere (Wildtyp, ApoE^{-/-}) zeigte keine signifikanten Differenzen. Die Herzfrequenz der mit Hydralazin behandelten Tiere lag signifikant über derjenigen der Wildtyptiere und der mit Irbesartan behandelten ApoE^{-/-}-Gruppe (Tab.4.2.)

	Wildtyp	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} -Irbesartan	ApoE ^{-/-} -Hydralazin
systolischer Blutdruck (mmHg)	116 ± 3	109 ± 3	96 ± 3**	99 ± 2**
Herzfrequenz (Schläge/min)	608 ± 14	555 ± 23	550 ± 30	650 ± 8*

Tab.4.2. Senkung des systolischen Blutdruckes durch RAAS-Blockade und Intervention mit Hydralazin
 Systolischer Blutdruck von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen, gemessen mit der tail-cuff Methode nach siebenwöchiger cholesterinreicher Diät und Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan bzw. dem Vasodilatator Hydralazin. Die Intervention führte bei beiden Wirkstoffen zu einer vergleichbar signifikanten Reduktion des systolischen Blutdruckes. Die Herzfrequenz der mit Hydralazin behandelten Tiere lag signifikant über derjenigen der WT- und Irbesartan-Gruppe. (MW±SEM; **p<0,001 vs Wildtyp und ApoE^{-/-}; *p<0,01 vs ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}-Irbesartan; n=15 pro Gruppe)

4.1.3. Verbesserung der Endothelfunktion durch AT₁R-Blockade

Die endothelabhängige Relaxation war in den unbehandelten ApoE^{-/-}-Tiere war im Vergleich zu den Wildtyptieren signifikant eingeschränkt (Abb. 4.1.). Dies betraf sowohl die maximale Wirkstärke (Efficacy) der Relaxation mit Carbachol als auch die halbmaximale Wirkstärke (Potency, logED₅₀) ApoE^{-/-}: -5,00 ± 0,16; WT: -6,23 ± 0,13; p<0,001).

Durch Intervention mit Irbesartan wurde die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit in den ApoE^{-/-}-Tieren signifikant gesteigert. Die logED₅₀ von Carbachol in den mit Irbesartan behandelten Tieren (6,42 ± 0,17) unterschied sich nicht signifikant von den WT-Tieren. Im Vergleich zu unbehandelten ApoE^{-/-}-Mäusen führte die Behandlung mit Irbesartan zu einer signifikanten Steigerung der endothelabhängigen Relaxation (p<0,001), bei mit den Wildtyptieren vergleichbarer Potenz und Effektivität.

Die Intervention mit Hydralazin führte zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Relaxation (logED₅₀: -5,69 ± 0,14), die eine signifikante Differenz zur unbehandelten ApoE^{-/-}-Gruppe aufwies (p<0,01), aber signifikant geringer ausfiel als in der Irbesartan- (p<0,01) und WT-Gruppe (p<0,05). Exemplarische Messprotokolle stellt Abb. 4.3. dar.

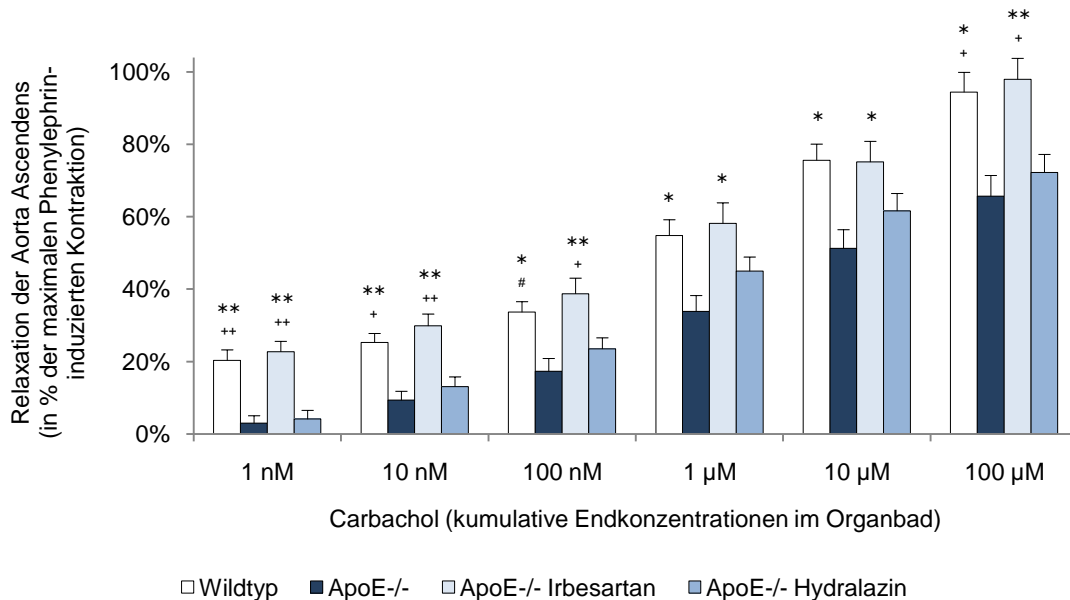


Abb. 4.1. Gesteigerte vaskuläre endothelabhängige Relaxationsfähigkeit in ApoE^{-/-}-Tieren durch AT₁R-Blockade mit Irbesartan

Relaxation isolierter Aortenringe von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach siebenwöchiger cholesterinreicher Diät und Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan bzw. dem Vasodilatator Hydralazin. Endothelabhängige Relaxation auf steigende Carbachol-Konzentrationen, als prozentualer Anteil der zuvor durch Phenylephrin induzierten Vasokonstriktion. Es bestand eine signifikante Einschränkung der vaskulären endothelialen Funktion in ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. ApoE^{-/-}-Tiere unter Intervention mit Irbesartan, nicht aber Hydralazin, wiesen eine signifikant gesteigerte endothelabhängige Relaxation im Vergleich zu unbehandelten ApoE^{-/-}-Tieren auf. (MW±SEM; **p<0,001 vs ApoE^{-/-}, *p <0,01 vs ApoE^{-/-}, ** p<0,001 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin, *p<0,01 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin, #p < 0,05 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin, n= 9-12 pro Gruppe)

Die endothelunabhängige Relaxation der Aortenringe durch Glyceroltrinitrat ergab in keinem Konzentrationsbereich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

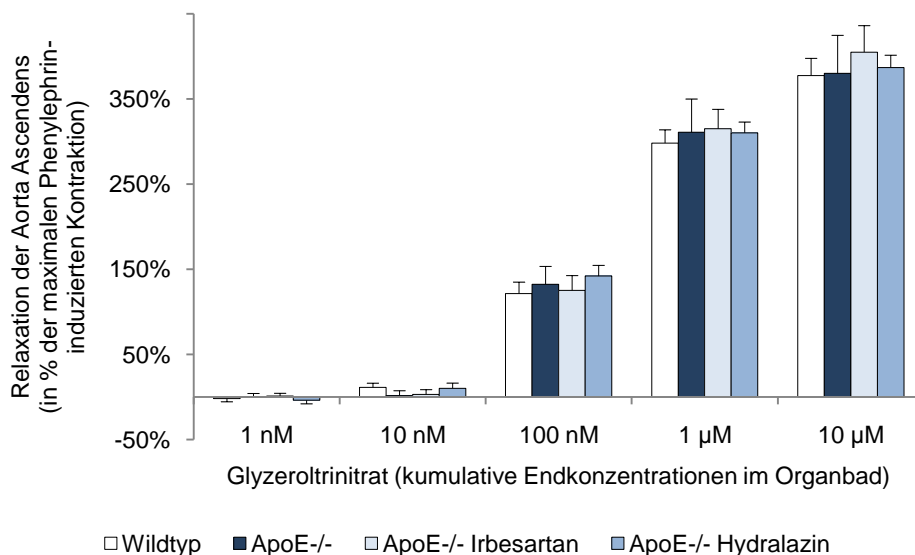


Abb. 4.2. Endothelunabhängige Relaxation der Aortensegmente durch Glyceroltrinitrat

Relaxation isolierter Aortenringe von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach siebenwöchiger cholesterinreicher Diät und Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan bzw. dem Vasodilatator Hydralazin. Endothelunabhängige Relaxation auf steigende Glyceroltrinitrat-Konzentrationen, als prozentualer Anteil der zuvor durch Phenylephrin induzierten Vasokonstriktion. Es bestanden keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen. (MW±SEM; n.s.; n= 9-12 pro Gruppe)

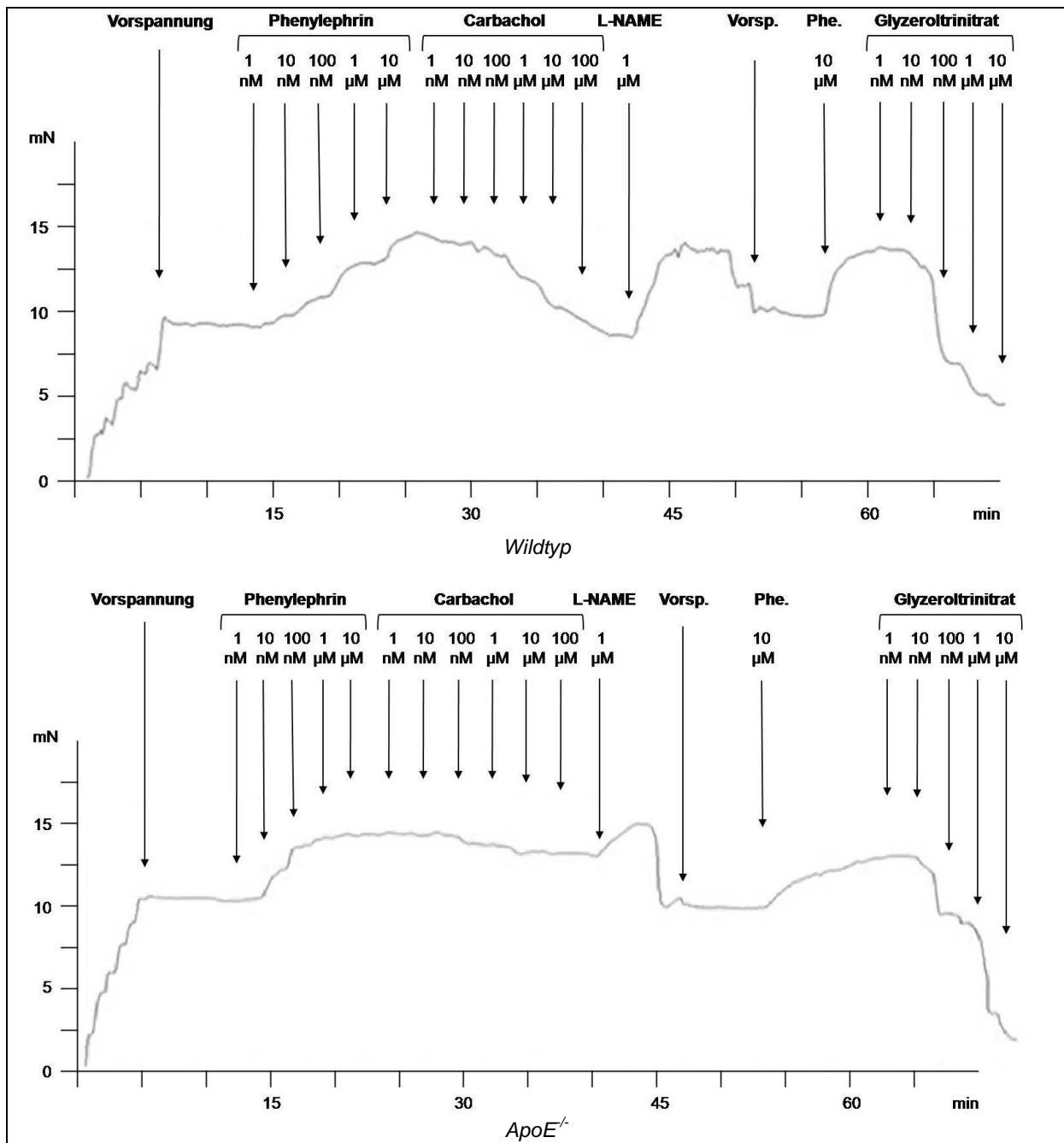


Abb. 4.3. Endothelabhängige Relaxation der Aortenringe

Isometrische Kontraktilitäts- und Relaxationsbestimmung im Organbad an Aortenringen von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach siebenwöchiger cholesterinreicher Diät. Exemplarisches Messprotokoll eines Wildtyp- und eines unbehandelten ApoE^{-/-}-Tieres. Aufzeichnung mit FMI VirtoDat. Die Pfeile indizieren den Zeitpunkt, zu dem das jeweilige Agens dem Organbad zugesetzt wurde.

Auch die CC der unbehandelten ApoE^{-/-}-Tiere wiesen eine, gegenüber den Wildtyp-tieren signifikant eingeschränkte endothelabhängige Relaxationsfähigkeit auf (logED₅₀ Carbachol ApoE^{-/-}: -6,22 ± 0,19; WT: -6,74 ± 0,06; p<0,01).

Die Intervention mit Irbesartan verbesserte die endothelabhängige Relaxation in ApoE^{-/-}-Tieren signifikant (logED₅₀ -6,87 ± 0,3; p<0,001), bei mit den Wildtyp-tieren vergleichbarer halbmaximaler und maximaler Wirkstärke.

Die Intervention mit Hydralazin führte zu einer signifikant geringeren Verbesserung der halbmaximalen Wirkstärke der endothelabhängigen Relaxation der CC von ApoE^{-/-}-Tieren im Vergleich zu unbehandelten ApoE^{-/-}-Tieren (logED₅₀ -6,80 ± 0,07; p<0,01). Die maximale Wirkstärke der endothelabhängigen Relaxation wurde durch Hydralazin nicht verändert.

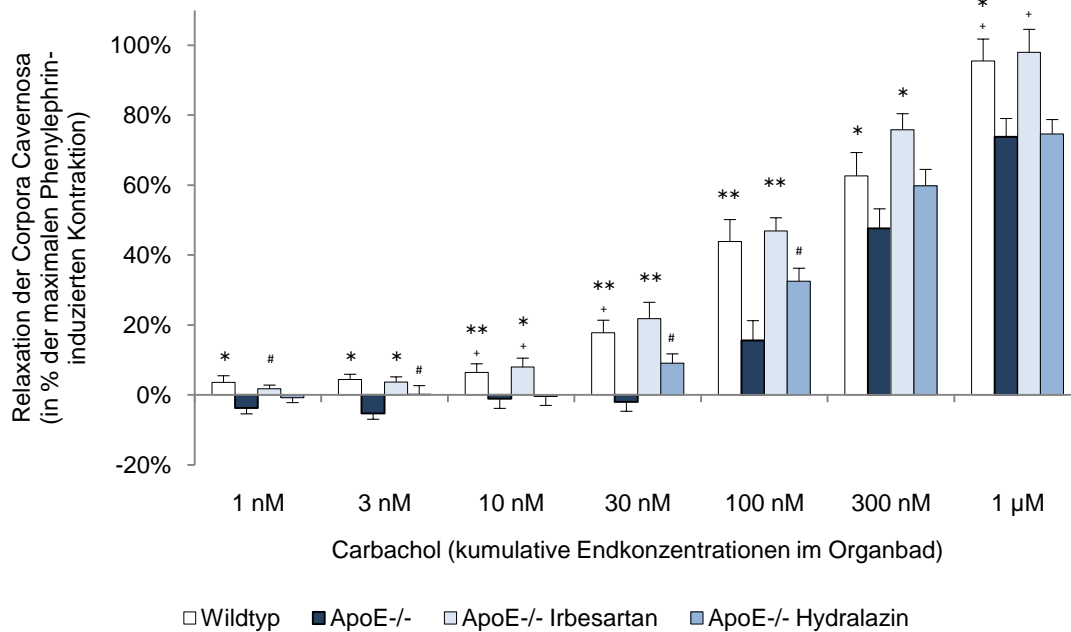


Abb. 4.4. Gesteigerte endothelabhängige Relaxationsfähigkeit der Schwellkörper in ApoE^{-/-}-Tieren durch AT₁R-Blockade mittels Irbesartan

Relaxation isolierter CC von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach siebenwöchiger cholesterinreicher Diät und Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan bzw. dem Vasodilatator Hydralazin. Endothelabhängige Relaxation auf steigende Carbachol-Konzentrationen, als prozentualer Anteil der zuvor durch Phenylephrin induzierten Konstriktion. Es bestand eine signifikante Einschränkung der endothelialen Funktion in ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. ApoE^{-/-}-Tiere unter Intervention mit Irbesartan, nicht aber Hydralazin, wiesen in den meisten Konzentrationsstufen eine signifikant gesteigerte endotheliale Relaxationsfähigkeit im Vergleich zu unbehandelten ApoE^{-/-}-Tieren auf. (MW±SEM; **p<0,001 vs ApoE^{-/-}; *p<0,01 vs ApoE^{-/-}; #p<0,05 vs ApoE^{-/-}; +p<0,05 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin, n= 10-11)

Die CC der einzelnen Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die endothelunabhängige Relaxation mittels Glyceroltrinitrat auf (Abb. 4.5.). Exemplarische Messprotokolle stellt Abb. 4.6. dar.

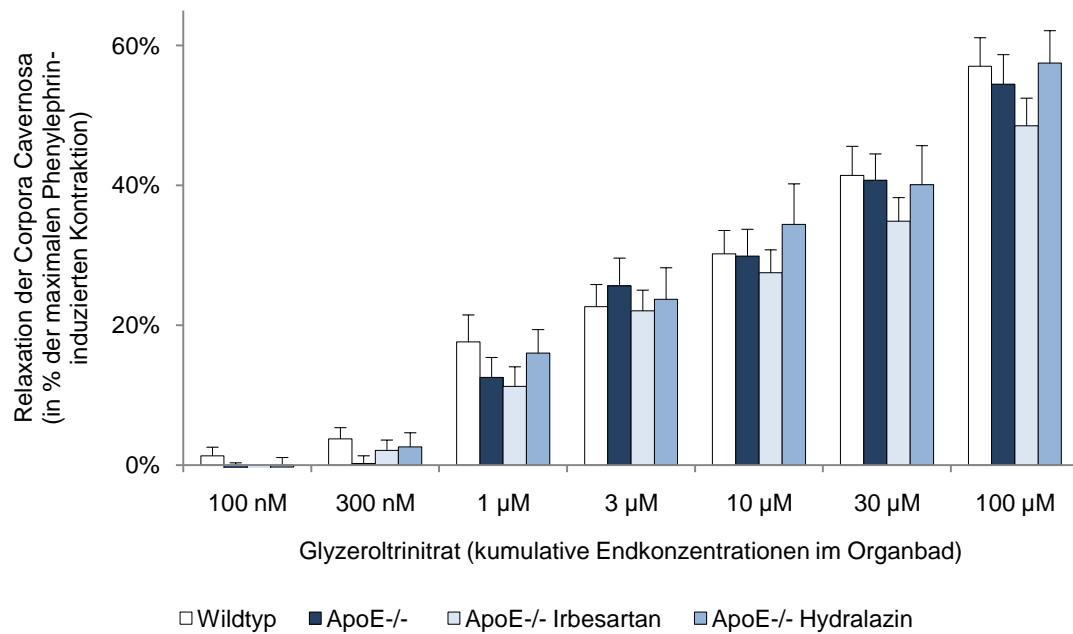


Abb. 4.5. Endothelunabhängige Relaxation der CC durch Glyzeroltrinitrat

Relaxation isolierter CC von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach siebenwöchiger cholesterinreicher Diät und Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan bzw. dem Vasodilatator Hydralazin. Endothelunabhängige Relaxation auf steigende Glyzeroltrinitrat-Konzentrationen, als prozentualer Anteil der zuvor durch Phenylephrin induzierten Konstriktion. Es bestanden keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen. (MW±SEM; n.s.; n=10-11 pro Gruppe)

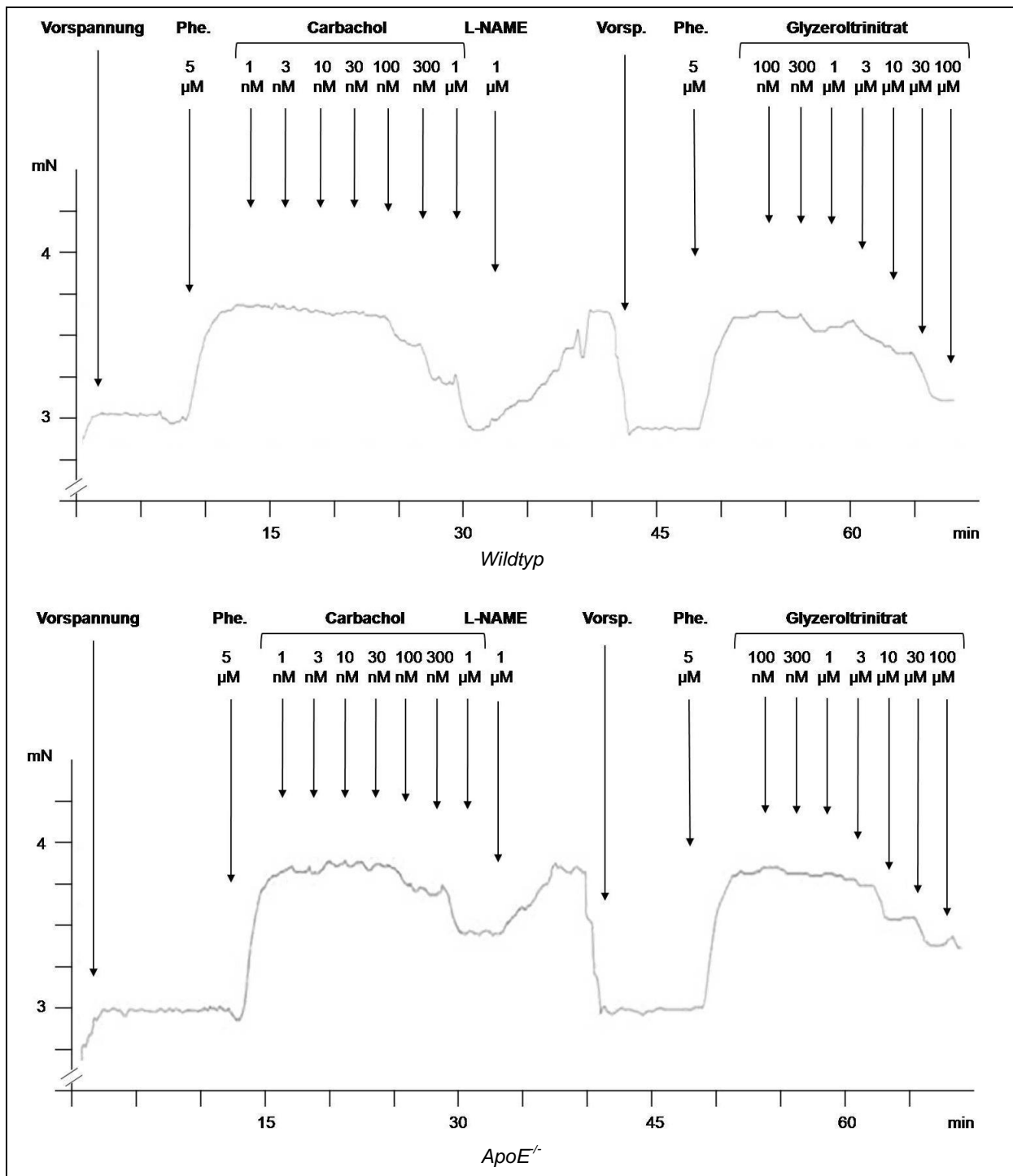


Abb. 4.6. Endothelabhängige Relaxation der Corpora Cavernosa

Isometrische Kontraktilitäts- und Relaxationsbestimmung im Organbad an Schwellkörpern von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen nach siebenwöchiger cholesterinreicher Diät. Exemplarisches Messprotokoll eines Wildtyp- und eines unbehandelten ApoE^{-/-}-Tieres. Aufzeichnung mit FMI VirtoDat. Die Pfeile indizieren den Zeitpunkt, zu dem das jeweilige Agens dem Organbad zugesetzt wurde.

4.1.4. Histologische Untersuchungen an Aorten und Corpora Cavernosa unter AT₁R-Blockade

4.1.4.1. Reduktion atherosklerotischer Läsionen

Bei den transgenen ApoE^{-/-}-Mäusen kam es unter dem, durch cholesterinreiche Diät erzeugten, pathologischen Lipidprofil zur Entwicklung einer generalisierten Atherosklerose binnen sieben Wochen, mit signifikant gesteigertem Ausmaß atherosklerotischer Plaques im Vergleich zu den Wildtyptieren. ApoE^{-/-}-Mäuse mit Irbesartan- bzw. Hydralazinintervention zeigten in der Ölrot-O-Färbung signifikant geringere Plaquebildung in der Aorta Ascendens und im Aortensinus als die unbehandelten ApoE^{-/-}-Mäuse, wobei die Plaquebildung unter Irbesartan signifikant geringer ausfiel, als unter Hydralazin.

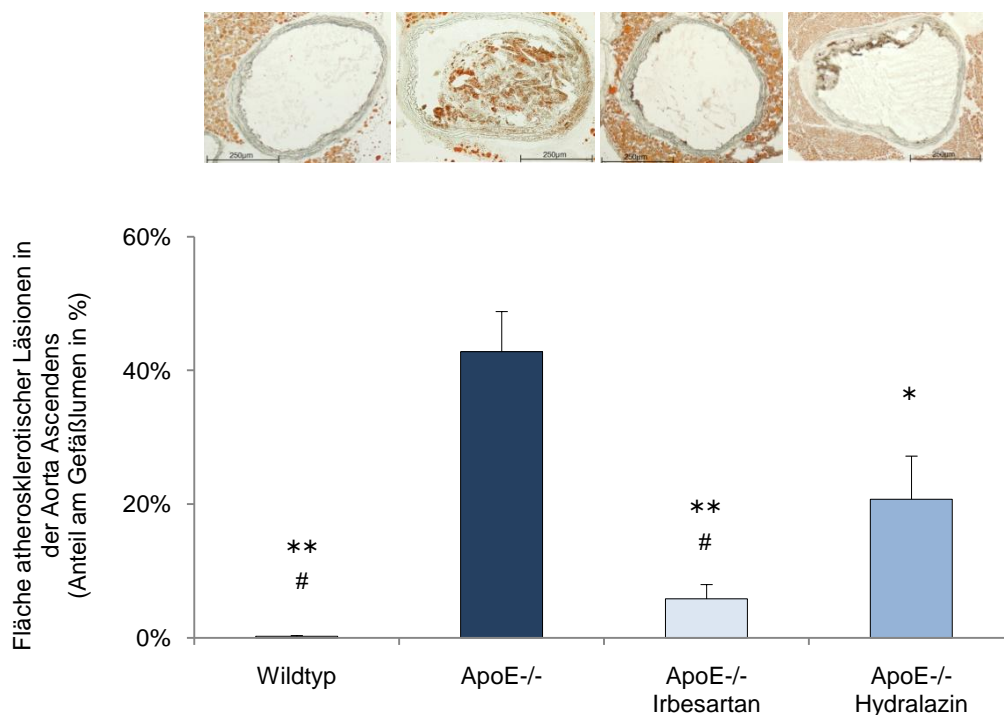


Abb. 4.7. Reduktion atherosklerotischer Läsionen in der Aorta Ascendens durch AT₁R-Blockade

Quantifizierung der atherosklerotischen Veränderungen in der Aorta Ascendens im Verhältnis zum Gefäßlumen und repräsentative histologische Transversalschnitte der Aorta Ascendens nach Öl-Rot-Färbung. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der atherosklerotischen Plaques in der Aorta Ascendens, die durch die medikamentöse Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan, verglichen mit dem Vasodilatator Hydralazin, zu einem signifikant höheren Ausmaß reduziert wurde. (MW±SEM; **p<0,001 vs ApoE^{-/-}, *p<0,01 vs ApoE^{-/-}, #p < 0,05 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin, n= 5-6 pro Gruppe)

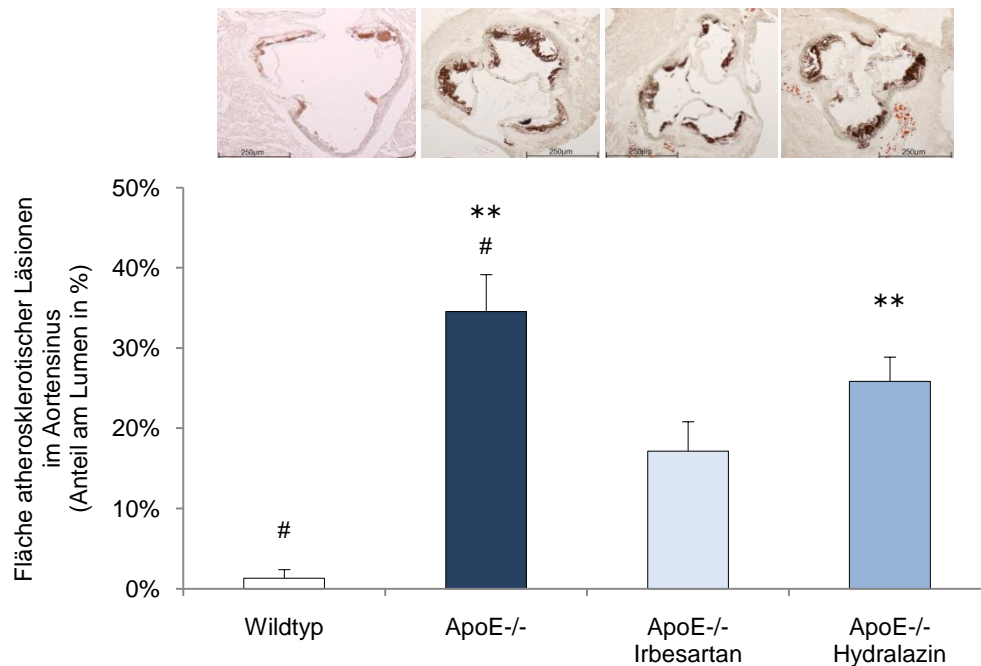


Abb. 4.8. Reduktion atherosklerotischer Läsionen im Aortensinus durch AT₁R-Blockade

Repräsentative histologische Schnitte des Aortensinus nach Öl-Rot-Färbung und Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen im Aortensinus. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der atherosklerotischen Plaques im Aortensinus, die durch die medikamentöse Behandlung mit Irbesartan, verglichen mit Hydralazin, zu einem tendenziell höheren Ausmaß reduziert wurde. (MW±SEM; **p<0,001 vs WT, #p<0,01 vs ApoE^{-/-}-Irbesartan, n= 5-7 pro Gruppe)

4.1.4.2. Reduktion des fibrotischen Remodelling

Der Gehalt an Kollagenfasern (Typ I und III), als Parameter des fibrotischen Umbaus der aortalen Gefäßwand und des trabekulären Interstitiums der CC, lag in der Sirius Red-Färbung bei unbehandelten ApoE^{-/-}-Mäusen in beiden Geweben signifikant über dem Niveau der Wildtypiere. Die ApoE^{-/-}-Tiere der Interventionsgruppen wiesen eine signifikante Reduktion des Kollagengehaltes auf, wobei der fibrotische Umbau unter Irbesartan signifikant geringer ausfiel als unter Hydralazin.

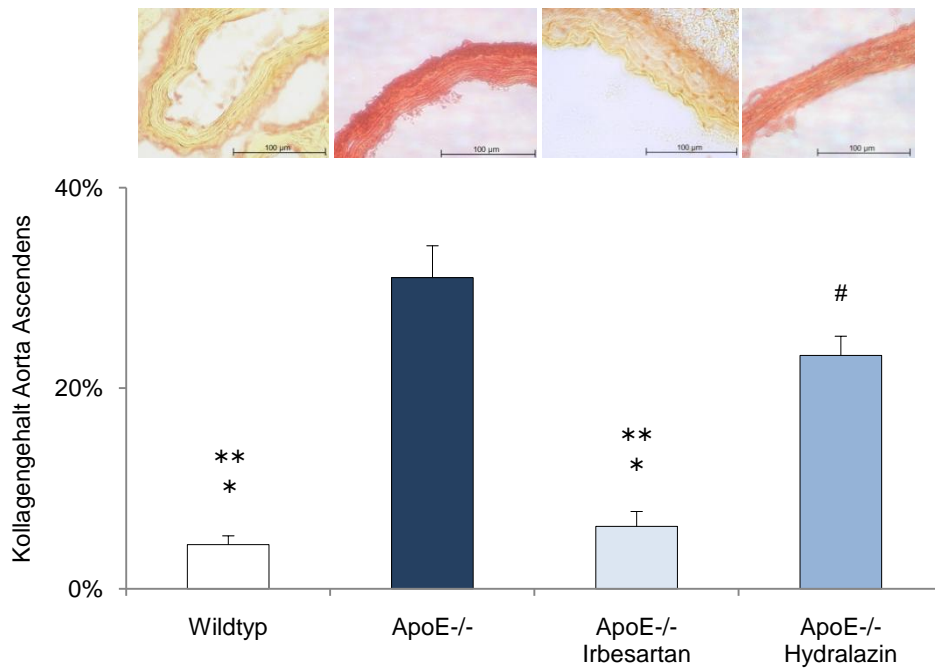


Abb. 4.9. Geringeres Ausmaß des fibrotischen Remodelling der Gefäßwand unter AT₁R-Blockade

Repräsentative histologische Schnitte der Aorta Ascendens in der Sirius Red-Färbung und Quantifizierung von Kollagenfasern in der Gefäßwand der Aorta Ascendens. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in den ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme des fibrotischen Umbaus der Gefäßwand, der durch die medikamentöse Behandlung mit Irbesartan, verglichen mit Hydralazin, zu einem signifikant höheren Ausmaß reduziert wurde. (MW±SEM; **p<0,001 vs ApoE^{-/-}, *p<0,001 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin, #p<0,05 vs ApoE^{-/-}, n=5 pro Gruppe)

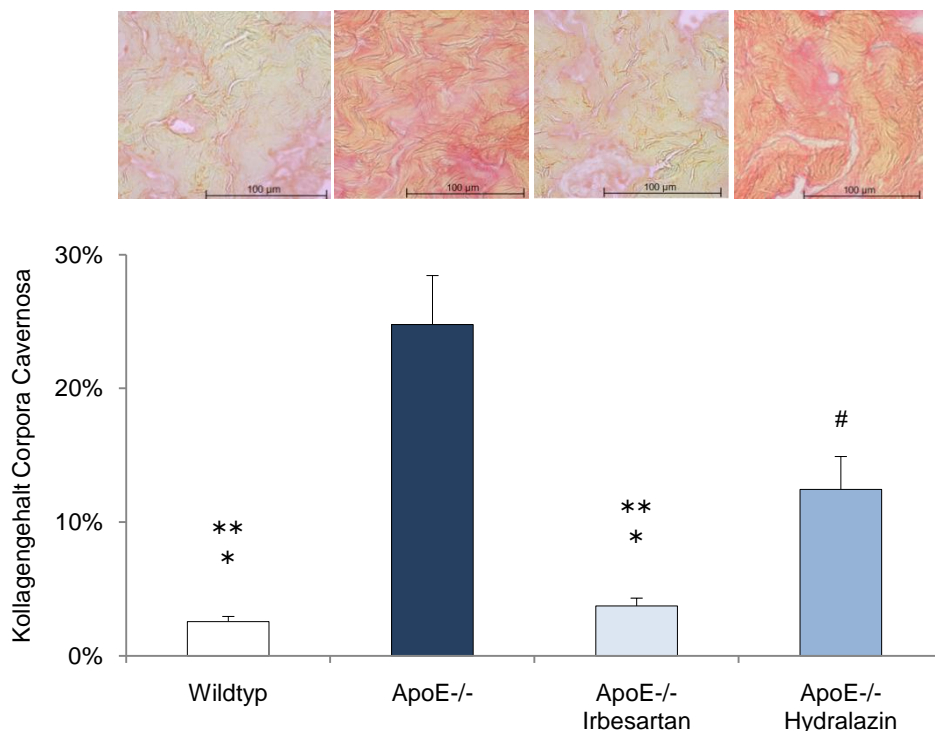


Abb. 4.10. Geringeres Ausmaß des fibrotischen Remodelling der Schwellkörper unter AT₁R-Blockade

Quantifizierung von Kollagenfasern im Schwellkörpergewebe mittels Sirius Red-Kollagenfärbung (repräsentative histologische Schnitte). Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme des fibrotischen Umbaus der CC, der durch die medikamentöse Behandlung mit Irbesartan, verglichen mit Hydralazin, zu einem signifikant höheren Ausmaß reduziert wurde. (MW±SEM; **p<0,001 vs ApoE^{-/-}, *p<0,05 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin, #p<0,01 vs ApoE^{-/-}, n=5 pro Gruppe)

4.1.4.3. Geringere Last an radikalen Sauerstoffspezies

Die semiquantitative Messung von Superoxidradikalen in Aorten- und Schwellkörpergewebe mittels DHE-Färbung ergab in beiden Geweben eine signifikant gesteigerte Radikallast bei der unbehandelten ApoE^{-/-}-Gruppe im Vergleich zu den Wildtyptieren. Die Intervention mit Irbesartan senkte die Radikallast signifikant auf das Niveau der Wildtyptiere. Die Intervention mit Hydralazin reduzierte den oxidativen Stress in beiden Geweben der ApoE^{-/-}-Tiere nicht signifikant.

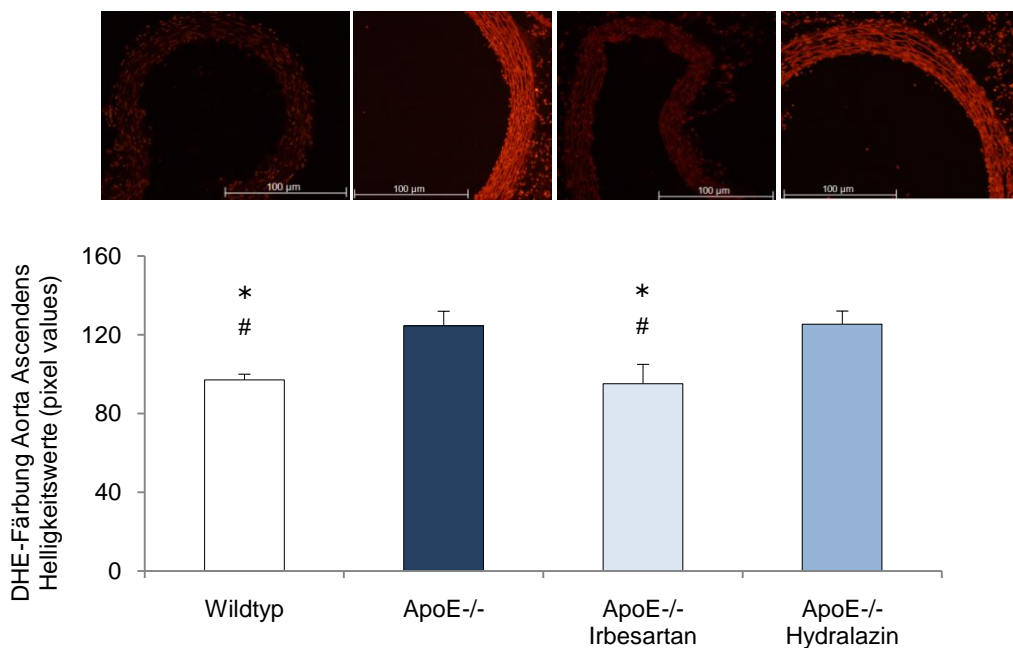


Abb. 4.11. Geringere Last an ROS in der Aorta Ascendens unter AT₁R-Blockade

Repräsentative histologische Schnitte der Aorta Ascendens in der DHE-Färbung. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der DHE-Fluoreszenzsignale von ROS im Endothel der Aorta Ascendens, die unter Behandlung mit Irbesartan, nicht aber unter Hydralazin, signifikant geringer ausfiel. (MW±SEM; *p<0,05 vs ApoE^{-/-}, #p<0,05 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin; n=6 pro Gruppe)

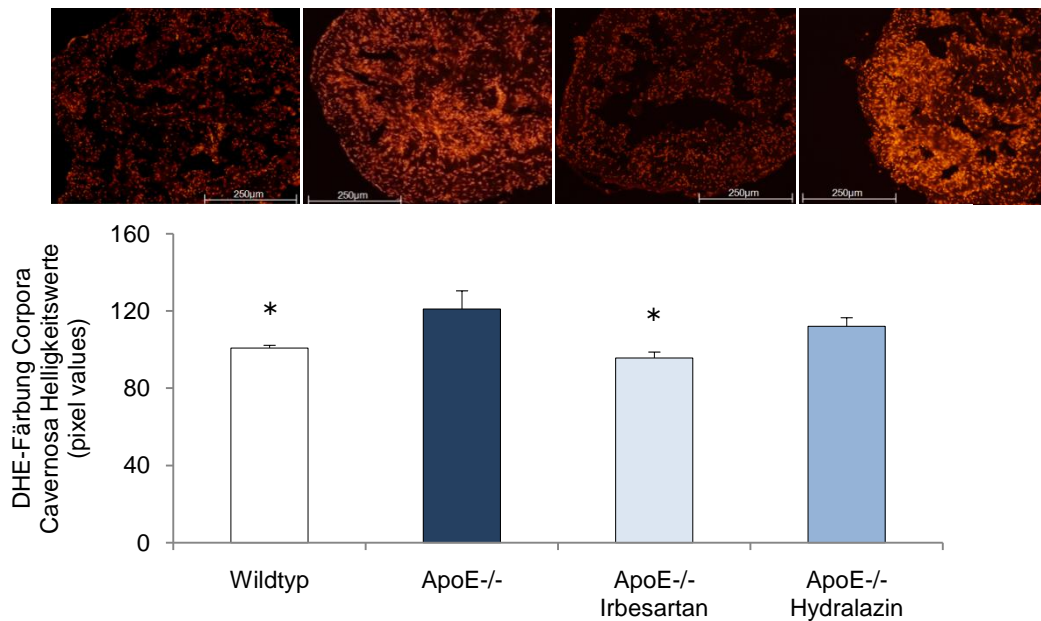


Abb. 4.12. Geringere Last an ROS im Schwellkörperendothel unter AT₁R-Blockade

Repräsentative histologische Schnitte der Corpora Cavernosa in der DHE-Färbung. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme von ROS (DHE-generierte Fluoreszenzsignale) im Endothel der Sinusoide der CC, die unter Behandlung mit Irbesartan, nicht aber unter Hydralazin signifikant geringer ausfiel. (MW±SEM; *p<0,05 vs ApoE^{-/-}; n= 5 pro Gruppe)

4.1.4.4. Gesteigerte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)

Das aortale Gefäßendothel und das Endothel der Schwellkörpersinusoide der unbehandelten ApoE^{-/-}-Tiere wiesen eine signifikant geringere Expression des eNOS-Proteins auf, als das der Wildtypiere. Durch die AT₁R-Blockade mit Irbesartan wurde die Expression der eNOS signifikant gesteigert (auf Wildtypniveau). Die mit Hydralazin behandelten ApoE^{-/-}-Tiere unterschieden sich hierbei nicht signifikant von den unbehandelten ApoE^{-/-}-Tieren.

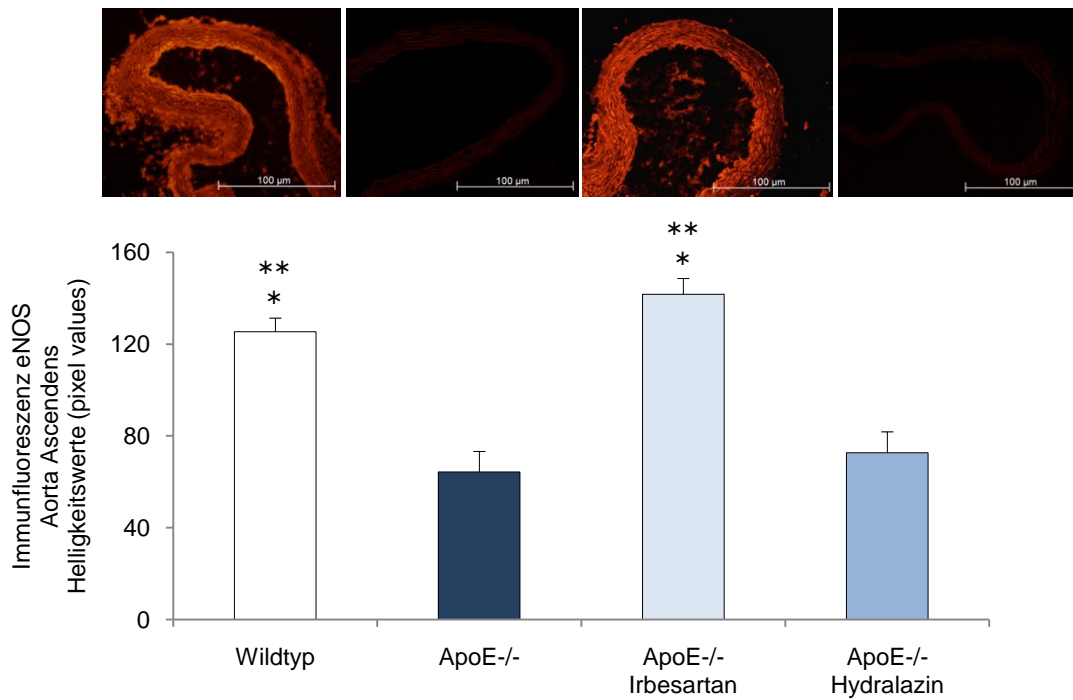


Abb. 4.13. Gesteigerte eNOS-Proteinexpression im Gefäßendothel von ApoE^{-/-}-Tieren unter AT₁R-Blockade

Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung (TRITC-konjugierte Sekundäntikörper auf anti-eNOS Primäntikörpern) des eNOS-Proteins in der Aorta Ascendens. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion des Expressionsniveaus des eNOS-Proteins im Endothel der Aorta Ascendens. Unter Behandlung mit Irbesartan, nicht aber unter Hydralazin fiel die Expression des eNOS-Proteins signifikant höher aus. (MW±SEM; **p<0,001 vs ApoE^{-/-}, *p<0,001 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin; n= 5 pro Gruppe)

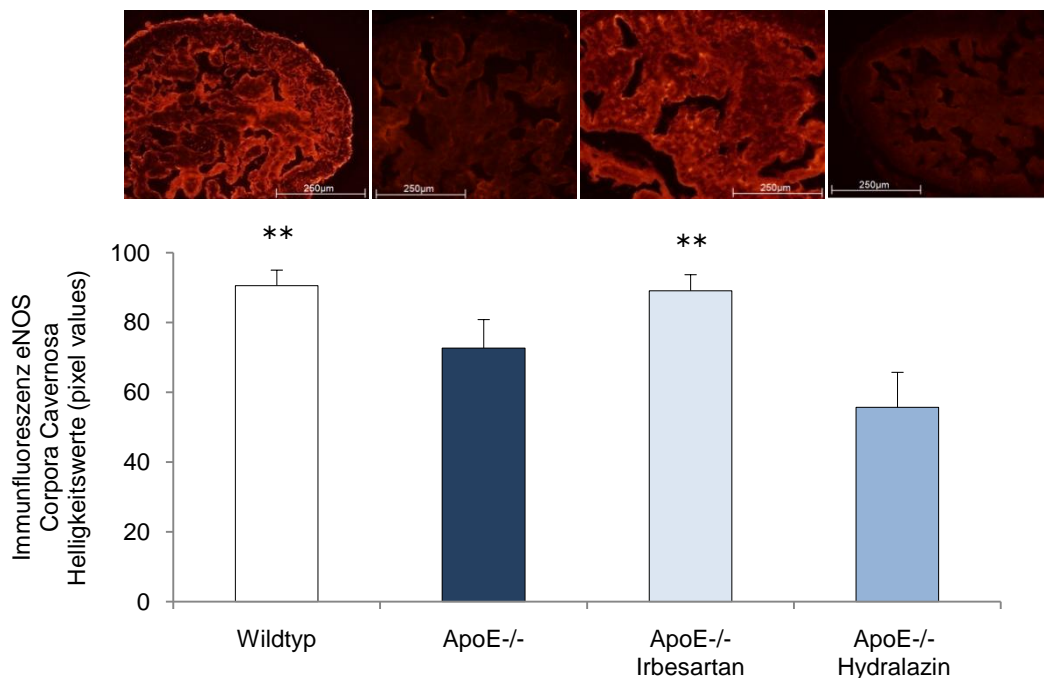


Abb. 4.14. Gesteigerte eNOS-Proteinexpression im Schwelkörperendothel von ApoE^{-/-}-Tieren unter AT₁R-Blockade

Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung (TRITC-konjugierter Sekundäntikörper auf anti-eNOS Primäntikörpern) des eNOS-Proteins im CC. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion des Expressionsniveaus des eNOS-Proteins im Sinusendothel der Schwelkörper. Unter medikamentöser Behandlung mit Irbesartan, nicht aber unter Hydralazin fiel die Expression des eNOS-Proteins signifikant höher aus. (MW±SEM; **p<0,05 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin; n= 5 pro Gruppe)

4.1.4.5. Gesteigerte endotheliale Stickstoffmonoxidfreisetzung

In der semiquantitativen Messung der Bioverfügbarkeit von NO-Molekülen im Schwellkörpergewebe (DAF-Färbung) wiesen die CC der Wildtyptiere einen signifikant höheren Gehalt an NO auf, als die CC der unbehandelten ApoE^{-/-}-Mäuse. Die Intervention mit Irbesartan, nicht aber mit Hydralazin führte zu einer signifikant gesteigerten Bioverfügbarkeit von NO in CC von ApoE^{-/-}-Tieren.

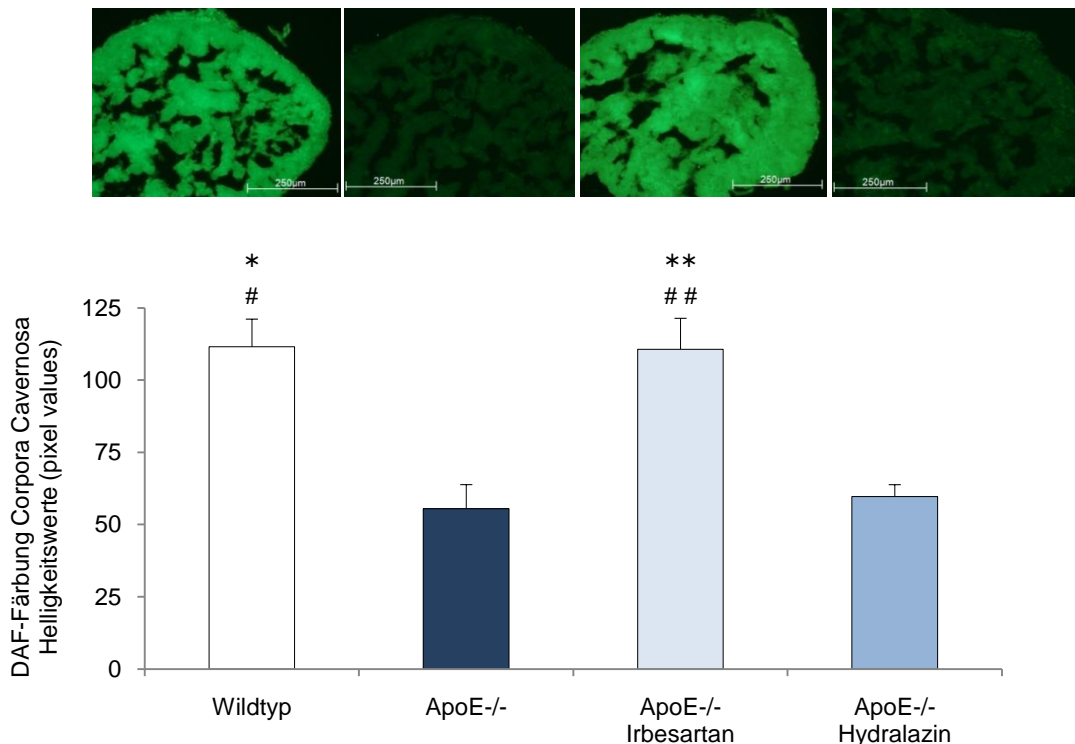


Abb. 4.15. Gesteigerter NO-Gehalt im Schwellkörperendothel von ApoE^{-/-}-Mäusen unter AT₁R-Blockade
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen DAF-Färbung von NO im CC. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion des NO-Gehaltes im Schwellkörper (semiquantitative Bestimmung). Unter medikamentöser Behandlung mit Irbesartan, nicht aber unter Hydralazin war der NO-Gehalt signifikant gesteigert. (MW±SEM; **p<0,001 vs ApoE^{-/-}, *p<0,01 vs ApoE^{-/-}, ##p<0,001 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin, #p < 0,01 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin; n= 5 pro Gruppe)

4.1.5. Untersuchungen an Gewebehomogenisat

4.1.5.1. Reduktion der NADPH-Oxidase Aktivität

In der luminometrischen Messung zeigte sich eine signifikant gesteigerte NADPH-Oxidase Aktivität in den abdominalen Aorten der unbehandelten ApoE^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren. Beide Interventionen senkten die NADPH-Oxidase Aktivität signifikant, wobei die Reduktion durch Irbesartan tendenziell stärker ausfiel.

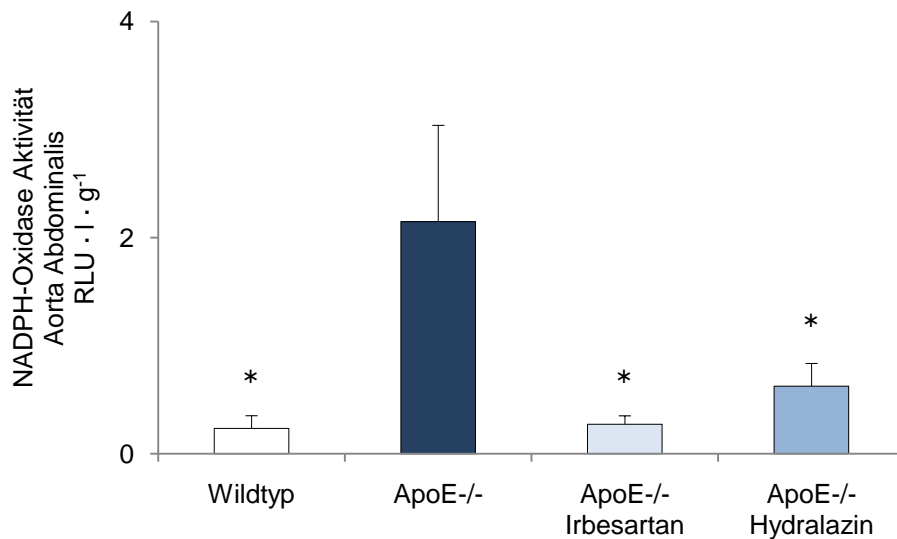


Abb. 4.16. Geringere NADPH-Oxidase Aktivität in Aorten von ApoE^{-/-}-Tieren unter AT₁R-Blockade
 Lucigeninfluoreszenzsignale in Gewebehomogenisat der Aorta Abdominalis, entsprechend den nach Zugabe einer standardisierten Menge an NADPH generierten Superoxidanionen. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der NADPH-Oxidase Aktivität, die durch beide Interventionen signifikant reduziert wurde, wobei die Reduktion durch Irbesartan tendenziell stärker ausfiel (MW±SEM; *p<0,05 vs ApoE^{-/-}; n= 5 pro Gruppe)

4.1.5.2. Reduktion der Lipidperoxidation

Sowohl in der Aorta Abdominalis, als auch in den CC der ApoE^{-/-}-Tiere war die Oxidation von Membranlipiden gegenüber den Wildtyptieren signifikant gesteigert. Irbesartan bewirkte eine signifikante Reduktion der Lipidperoxidation. Die Intervention mit Hydralazin in ApoE^{-/-}-Tieren hatte keinen signifikanten Effekt auf die Lipidperoxidation in beiden Geweben.

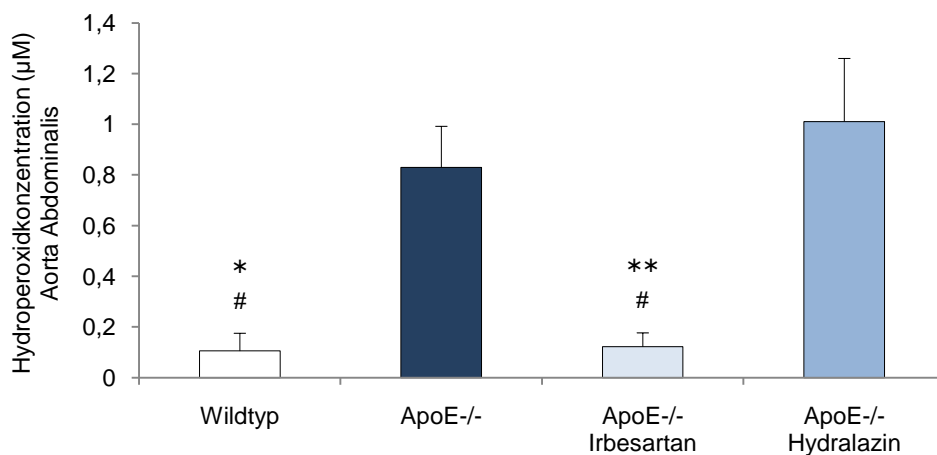


Abb. 4.17. Geringere Lipidperoxidation in Aorten von ApoE^{-/-}-Tieren unter AT₁R-Blockade
 Photometrisch gemessene Fluoreszenzsignale der Oxidation von Fe(II) durch instabile Hydroperoxide im Homogenisat der Aorta Abdominalis. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der Lipidperoxidation, die durch die AT₁R-Blockade mit Irbesartan, nicht aber durch die Intervention mit Hydralazin signifikant reduziert wurde. (MW±SEM; **p<0,01 vs ApoE^{-/-}, *p<0,05 vs ApoE^{-/-}, #p<0,01 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin; n= 5 pro Gruppe)

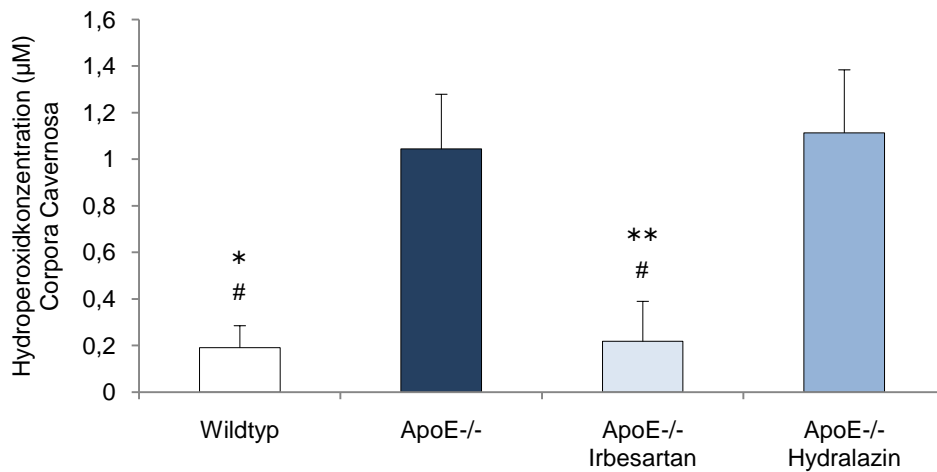


Abb. 4.18. Geringere Lipidperoxidation in CC von ApoE^{-/-}-Tieren unter AT₁R-Blockade

Photometrisch gemessene Fluoreszenzsignale der Oxidation von Fe(II) durch instabile Hydroperoxide im Homogenisat der Schwellkörper. Die siebenwöchige cholesterinreiche Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der Lipidperoxidation, die durch die AT₁R-Blockade mit Irbesartan, nicht aber durch die Intervention mit Hydralazin signifikant reduziert wurde. (MW±SEM; **p<0,01 vs ApoE^{-/-}, *p<0,05 vs ApoE^{-/-}, #p<0,05 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin; n= 7 pro Gruppe)

4.1.5.3. Reduktion der lokalen Expression des AT₁-Rezeptorproteins im Corpus Cavernosum unter AT₁R-Blockade (Immunblot)

Die unbehandelten ApoE^{-/-}-Tiere wiesen eine signifikant gesteigerte AT₁-Rezeptorproteinexpression im Vergleich zu den Wildtyptieren auf. Die Intervention mit Irbesartan, nicht aber mit Hydralazin senkte das Expressionsniveau des AT₁-Rezeptorproteins signifikant.

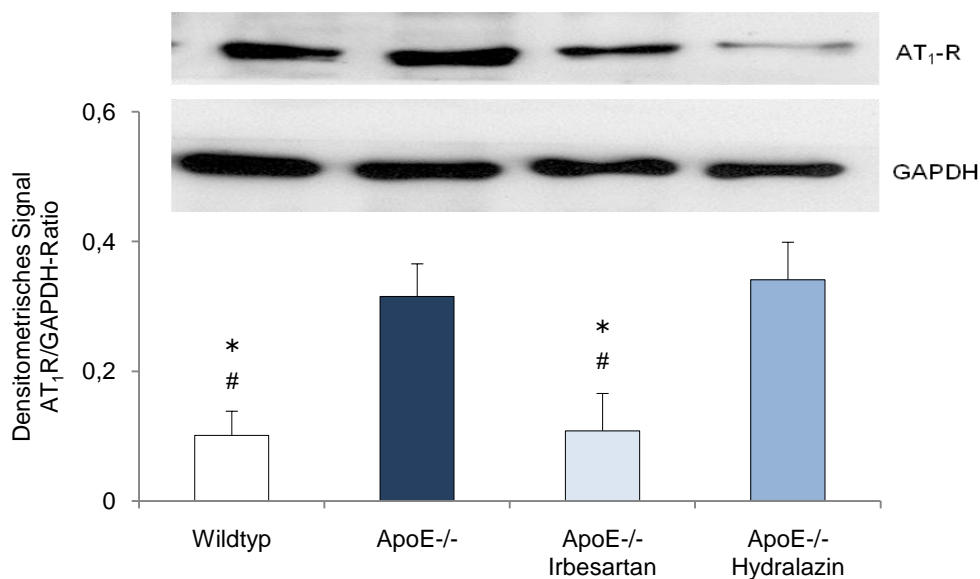


Abb. 4.19. Geringere Expression des AT₁R-Proteins in CC von ApoE^{-/-}-Tieren unter AT₁R-Blockade

Western Blot zur Quantifizierung der AT₁-Rezeptorproteinexpression im CC. Die Aktivierung des RAAS in ApoE^{-/-}-Mäusen führt zu einer vermehrten Expression des AT₁-Rezeptorproteins im CC, die durch die Behandlung mit Irbesartan, nicht jedoch durch Hydralazin, signifikant verringert wird (MW±SEM; **p<0,01 vs ApoE^{-/-}, *p<0,05 vs ApoE^{-/-}, #p<0,05 vs ApoE^{-/-}-Hydralazin; n= 7 pro Gruppe)

5. Diskussion

Die Behandlung mit dem Angiotensinrezeptorantagonisten Irbesartan verbessert durch rezeptorspezifische Wirkung am AT₁R, weitgehend unabhängig vom Effekt der erzielten Blutdrucksenkung, die Stickstoffmonoxidbioverfügbarkeit im penilen und vaskulären Endothel, wobei der oxidative Stress abnimmt. Hierzu trägt nicht nur die Blockade bereits exprimierter AT₁R bei, sondern auch die Normalisierung der pathologisch gesteigerten AT₁-Rezeptorproteinexpression im kavernösen Endothel.

In transgenen hyperlipidämischen ApoE^{-/-}-Mäusen verringerten sich konsekutiv die Atherogenese und interstitielle Fibrose der o.g. Gewebe, die kavernöse und vaskuläre Endothelfunktion in vitro verbesserte sich.

5.1. Effekte der AT₁R-Blockade auf die vaskuläre und kavernöse endotheliale Dysfunktion im Modell der ApoE^{-/-}-Maus

5.1.1. Dyslipidämie und Atherogenese in der ApoE-Knockout Maus

Die Serumcholesterinwerte der transgenen ApoE^{-/-}-Mäuse der vorliegenden Studie lagen nach siebenwöchiger cholesterinreicher Diät signifikant höher als in der Referenzgruppe der Wildtypiere. Die unbehandelten ApoE^{-/-}-Tiere unterschieden sich dabei nicht signifikant von den mit Irbesartan, respektive Hydralazin behandelten Gruppen, so dass die beschriebenen Therapieeffekte nicht auf Modulationen der Serumlipide durch die jeweilige Pharmakotherapie zurückzuführen sind.

Die Zeitspanne der Atherogenese in ApoE^{-/-}-Tieren ist im Vergleich zum Menschen erheblich beschleunigt, wobei die atheromatösen Plaques unter allen verfügbaren Tiermodellen die größten Übereinstimmungen mit menschlichen Atheromen bezüglich Prädilektionsstellen und Progression zeigen (PLUMP et al., 1992; NAKASHIMA et al., 1994; SMITH et al., 1997). Nach siebenwöchiger Dyslipidämie wiesen die unbehandelten ApoE^{-/-}-Tiere eine generalisierte Atherosklerose auf.

5.1.2. Effekte AT₁R-abhängiger und AT₁R-unabhängiger antihypertensiver Medikation auf die Atheroskleroseentstehung in ApoE-Knockout Mäusen

Beide Interventionen (Irbesartan, Hydralazin) erzielten eine vergleichbare signifikante Blutdrucksenkung in den dyslipidämischen transgenen Tieren gegenüber den unbehandelten ApoE^{-/-}- und Wildtyp-Tieren. Unter siebenwöchiger cholesterinreicher Diät kam es nicht zu einer Blutdrucksteigerung in unbehandelten ApoE^{-/-}-Mäusen. ApoE^{-/-}-Mäuse entwickeln eine signifikante Steigerung des systolischen Blutdrucks im Vergleich zu gesunden Kontrollen erst im Alter von über 7 Monaten, idR. im Sinne einer renalen Hypertonie (YANG et al., 1999). Hämodynamische Alterationen, entsprechend hypertonietyptischen Veränderungen, treten in der ApoE^{-/-}-Maus allerdings frühzeitig auf. ApoE^{-/-}-Mäuse zeigen eine reduzierte vaskuläre Compliance (ARNETT et al., 1994), korrelierend mit erhöhter Pulswellengeschwindigkeit (WANG et al., 2000), gesteigerter Pulswellenreflexion und erhöhtem Schlagvolumen (HARTLEY et al., 2000). Diese Veränderungen spiegeln einerseits die vorliegende endotheliale Dysfunktion wider und befördern gleichzeitig deren Progress zur Atheroskleroseentstehung (YANG et al., 1999), durch die Entstehung oxidativen Stresses und die Inaktivierung von NO (AGABITI-ROSEI et al., 2009).

Der Progress der Atherogenese in ApoE^{-/-}-Tieren wurde unter AT₁R-abhängiger Blutdrucksenkung signifikant stärker reduziert, als durch die AT₁R-unabhängige Vasodilatation durch Hydralazin. Dies spricht bei gleicher Blutdrucksenkung für das Vorliegen vasoprotektiver Effekte der AT₁R-Blockade über die antihypertensive Wirkung hinaus.

Bezüglich Hydralazin als Vergleichsagens ergeben sich Limitationen: Irbesartan weist eine längere Halbwertszeit auf als Hydralazin. Entsprechend dem Tag-Nacht Intervall und der korrespondierenden Futtergewohnheiten der Tiere, ist nicht auszuschließen, dass die Hydralazin-Gruppe nächtlichen hypertonen Phasen ausgesetzt war, die sich in der nicht-kontinuierlichen täglichen Blutdruckmessung mittels tail-cuff nicht widerspiegeln.

Mäuse, die mit dem Vasodilatator Hydralazin behandelt wurden, wiesen einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz, am ehesten im Rahmen eines reflektorisch gesteigerten Sympathikotonus auf. Eine Steigerung der Herzfrequenz ist als Prädiktor der Atherogenese und der endothelialen Dysfunktion anzusehen und

könnte daher die Resultate der Hydralazin-Interventionsgruppe beeinflusst haben (BEERE et al., 1984).

5.1.3. Effekte AT₁R-abhängiger und AT₁R-unabhängiger antihypertensiver Medikation auf die endotheliale Dysfunktion in der ApoE-Knockout Maus

Die endotheliale Dysfunktion führt zu einer gesteigerter Radikallast und mangelnder NO-Bioverfügbarkeit, die sowohl in eine generalisierte Atherogenese, als auch in einen erektilen Funktionsverlust münden (ROSS, 1993; VLACHOPOULOS et al., 2008). Dieser systemische pathologische Zustand kann prinzipiell alle Endothelien des Körpers betreffen.

Die nervalen und endothelialen Mechanismen der murinen erektilen Physiologie ähneln der menschlichen (MIZUSAWA et al., 2001; SEZEN et al., 2000). Unbehandelte ApoE^{-/-}-Mäuse wiesen bei intrakavernöser Druckmessung eine signifikante ED auf (BEHR-ROUSSEL et al., 2006). In diesem Zusammenhang wurde das Vorliegen einer ursächlichen endothelialen Dysfunktion und herabgesetzter Bioverfügbarkeit von NO diskutiert (D'USCIO et al., 2002), aber nicht untersucht. Der experimentelle Beweis dafür, dass in den erektil kompromittierten ApoE^{-/-}-Mäusen eine endotheliale Dysfunktion des penilen Gewebes vorliegt, fehlte bislang. Die vorliegende Studie zeigt eine signifikante Dysfunktion, sowohl des vaskulären, als auch des kavernösen Endothels der ApoE^{-/-}-Tiere, die eine erektile Dysfunktion ursächlich erklärt. Die gleichermaßen herabgesetzte endotheliale Funktion beider Gewebe in den ApoE^{-/-}-Tieren unterstreicht die postulierte Assoziation zwischen vaskulärer endothelialer Dysfunktion und kompromittierter erektiler Funktionsfähigkeit. Es handelte sich hierbei um endotheliale Effekte, da nur die von der NO-Synthese des Endothels abhängige Relaxation von Aorten und CC der ApoE^{-/-}-Tiere auf Carbachol, nicht aber die endothelunabhängige Relaxation durch Glyceroltrinitat signifikant reduziert war.

Irbesartan besitzt endothelprotektive Eigenschaften (WARNHOLTZ et al., 2007; BRAGULAT et al., 2003; WASSMANN et al., 2001; RIVIERO et al., 2002; SCHÄFER et al., 2004; SOLA et al., 2005; PERSSON et al., 2006; CERIELLO et al., 2005; CANDIDO et al., 2004) und zeigte positive Auswirkungen auf Surrogatparameter der erektilen Funktion (FOGARI et al., 1998; FOGARI et al., 2001; DÜSING, 2003; LLISTERRI et al.,

2001), sowie in der DO IT-EDE Studie (BAUMHÄKEL et al., 2008) eine Verbesserung der erektilen Funktion selbst. Die vorliegende Arbeit zeigt eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion des vaskulären und erektilen Gewebes durch Irbesartan, die als kausaler Zusammenhang dieser Beobachtungen in Frage kommt und damit die besondere pathophysiologische Bedeutung des RAAS unterstreicht.

Diese Effekte auf die endotheliale Funktion und die Atherogenese waren nur im Fall von Irbesartan, nicht aber bei äquivalenter Blutdrucksenkung durch Hydralazin zu beobachten. Dies stützt nicht nur die Hypothese, dass die unter Blockade des AT₁R beobachteten positiven Effekte auf die endotheliale und erektile Funktion zum Teil unabhängig von der Blutdrucksenkung sind, sondern legt darüber hinaus nahe, dass der Anteil der blutdruckunabhängigen Mechanismen einer direkten AT₁R-Blockade möglicherweise überwiegt.

Es ist davon auszugehen, dass unter Irbesartan die blutdruckunabhängigen antiatherosklerotischen Effekte der AT₁R-Blockade zum Tragen kamen. Dies bestätigte sich in der Untersuchung des Einflusses der AT₁R-Blockade auf die molekularen Entstehungsmechanismen der endothelialen und erektilen Dysfunktion.

5.1.4. Einfluss der AT₁R-Blockade auf die Pathomechanismen der vaskulären und kavernösen endothelialen Dysfunktion

5.1.4.1. Peniles und vaskuläres Remodelling

Die kavernöse Endothelfunktion stellt nicht die einzige Determinante erektiler Funktionsfähigkeit dar. Aus der Reduktion atherosklerotischer Gefäßveränderungen durch die Irbesartan-Intervention könnte sich ein protektiver Effekt einer Langzeitintervention mit Irbesartan auf den arteriellen Zustrom zur penilen Strombahn zeigen. Darüber hinaus hängt die trabekuläre und vaskuläre Compliance des CC in der Füllungsphase in entscheidendem Maße von der Beschaffenheit des perikavernösen Interstitiums ab. Im kavernösen Gewebe dominieren die Kollagentypen I und IV (PADMA-NATHAN, 1990), wobei Kollagen Typ IV im Wesentlichen im Bereich der Basalmembran vorkommt. Die in der vorliegenden Studie durchgeführte histologische Kollagenfärbung mittels Sirius Red färbt die Kollagentypen I und III. Somit betrifft die hier gezeigte Kollagenquantifizierung im CC insbesondere den Kollagentyp I, der eine steife Fibrillenstruktur konstituiert (WESPES,

2002). Die Arbeit von WESPES zeigt einen Zusammenhang zwischen einer Zunahme des Typ I Kollagens, sowie des Gesamtkollagengehaltes des CC und einer verringerten arteriellen Stromgeschwindigkeit in diesem Gewebe, gleichbedeutend mit einer prolongierten bis insuffizienten Füllungsphase, die in einer ED resultiert. Die histologisch quantifizierten trabekulären Umbauvorgänge korrelieren dabei signifikant mit der reduzierten kavernösen Compliance (NEHRA et al., 1998; WESPES et al., 1991).

Ang II potenziert die Stimulation des fibroblast growth factor (FGF) in glatten Gefäßmuskelzellen in hypertonen Individuen (WILLIAMS, 1998). Die vorliegende Arbeit zeigt eine signifikant gesteigerte Fibrosierung, nicht nur des vaskulären Gewebes, sondern auch des penilen Interstitiums in ApoE^{-/-}-Mäusen. Die Hemmung von Remodellingprozessen durch die AT₁R-Blockade kam nicht nur in der Gefäßwand, sondern auch im Schwellkörper zum Tragen und ging signifikant über die Reduktion des Remodelling durch Hydralazin hinaus.

5.1.4.2. Oxidativer Status des kavernösen und vaskulären Endothels unter AT₁R-Blockade

Oxidativer Stress stellt einen wichtigen Pathomechanismus in der Entstehung endothelialer inflammatorischer Prozesse und gestörter Endothelfunktion in den frühen Stadien der Atherosklerose dar (HARRISON, 1997).

Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten exprimieren die NADPH-Oxidase und weitere Enzyme, die in der Lage sind, ROS zu generieren. Im penilen Gewebe der Ratte wurde gezeigt, dass lediglich die Inhibition der NADPH-Oxidase, nicht aber Hemmstoffe anderer potentieller Superoxidquellen (Xanthinoxidase, NOS, mitochondriale Atmungskette) die Radikallast signifikant reduzierten, womit die NADPH-Oxidase die vorherrschende Rolle bei der ROS-Produktion im erektilen Gewebe einnimmt (GRIENDLING et al., 1994; RAJAGOPALAN et al., 1996). Sowohl Ang II, als auch mechanischer Stress stellen Agonisten der endothelialen und glattmuskulären NADPH-Oxidase, auf der Ebene kurzzeitiger Aktivitätsinduktion, sowie in Bezug auf längerfristige Veränderungen des Expressionsniveaus, dar (TANIYAMA et al., 2003). ROS-Produktion und konsekutive endotheliale Dysfunktion waren in Mäusen, die ein Knockout der p47^{phox} Untereinheit der NADPH-Oxidase

unterlaufen hatten, trotz Ang II-Stimulation signifikant geringer als in der Vergleichsgruppe mit intakter NADPH-Oxidase (Li et al., 2003).

Die vorliegende Studie zeigt eine signifikant gesteigerte NADPH-Oxidase Aktivität in der Aorta der hyperlipidämischen ApoE^{-/-}-Mäuse. Die Hydralazin-Vergleichsgruppe zeigte eine signifikante Reduktion der NADPH-Oxidase Aktivität bei Vasodilatation und somit reduziertem mechanischem Stress der Gefäßwand. Allerdings senkte die AT₁R-Blockade mit Irbesartan die NADPH-Oxidase Aktivität im Vergleich zur Hydralazingruppe weiter ab, was auf den regulatorischen Effekt des AT₁R auf die NADPH-Oxidase, unabhängig von der Mechanotransduktion verweist. Die Bestimmung der NADPH-Oxidase Aktivität im Schwellkörpergewebe ist bislang in der Literatur nicht beschrieben und mittels Chemiluminiszenzassay nicht durchführbar. Es existiert allerdings der Nachweis einer gesteigerten Proteinexpression der NADPH-Oxidase Untereinheit p47^{phox} bei Ang II-induzierter Hypertonie und ED in Ratten (²JIN et al., 2008). Ferner zeigten SHUKLA et al. eine signifikante Attenuierung der kavernösen Superoxidproduktion im isolierten CC in hyperlipidämischen Hasen durch Zusatz spezifischer NADPH-Oxidase Inhibitoren (SHUKLA et al., 2005).

Obgleich damit in der vorliegenden Arbeit der unmittelbare Zusammenhang zur NADPH-Oxidase als vorherrschender ROS-Quelle im erektilen Gewebe nur implizit besteht, bildet sich die Dysfunktion des kavernösen Endothels und die vorherrschende oxidative Imbalance in der direkten Quantifizierung der Radikallast ab, wobei histologische und biochemische Bestimmung übereinstimmen. Die ApoE^{-/-}-Tiere wiesen, korrelierend mit der signifikant eingeschränkten Endothelfunktion, eine signifikant gesteigerte Radikallast im vaskulären und kavernösen Endothel, sowohl in der DHE-Färbung als auch bezüglich der Lipidperoxidation auf. Unter Irbesartan liegt ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Blockade der AT₁R-abhängigen Stimulation der NADPH-Oxidase mit konsekutiv verringerter Radikallast und resultierender Verbesserung der endothelialen Dysfunktion in vitro nahe. Dies stellt eine Rezeptorspezifische Wirkung, unabhängig von der antihypertensiven Wirkung dar, die in der Hydralazingruppe nicht beobachtet wurde. Diese Beobachtung stimmt mit den Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von NO im kavernösen und vaskulären Endothel überein.

5.1.4.3. Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid im kavernen und vaskulären Endothel

Die Bioverfügbarkeit von NO wird durch mehrere Determinanten beeinflusst. Hierzu zählen die Proteinexpression der eNOS, sowie das Vorhandensein von ROS, die synthetisiertes NO inaktivieren und zum Uncoupling der eNOS beitragen (Abb. 5.1.).

In der Aorta Ascendens und in den Schwellkörpern der ApoE^{-/-}-Mäuse fand sich eine signifikant geringere eNOS-Proteinexpression als in den Wildtyp-Tieren. Zwar existieren Belege für eine initial gesteigerte eNOS-Expression im atherosklerotischen Tiermodell (KANAZAWA et al., 1996), unter fortgeschrittener Atherosklerose zeigt sich allerdings eine Reduktion der eNOS-Expression (OEMAR et al., 1998), die nach VIDAL durch die Wirkung von oxLDL und Hypercholesterinämie bedingt ist (VIDAL et al., 1998), die im hier vorliegenden transgenen Mausmodell stark ausgeprägt ist. Die Transkription, Translation und Aktivierung der eNOS durch laminare Scherkräfte stellt einen physiologischen endothelprotektiven escape-Mechanismus dar. Allerdings schwindet diese positive Wirkung unter gesteigerter Radikallast infolge des eNOS-Uncoupling (FÖRSTERMANN et al., 2006; Abb. 5.1.).

Eine AT₁R-Blokade in ApoE^{-/-}-Tieren, nicht aber die äquivalente Blutdrucksenkung durch Hydralazin erbrachte eine signifikant gesteigerte eNOS-Proteinexpression im CC- und Gefäßendothel. Diese beruhte somit zumindest teilweise auf rezeptorspezifischen Effekten der AT₁R-Blokade, die über die antihypertensive Wirkung hinausgehen.

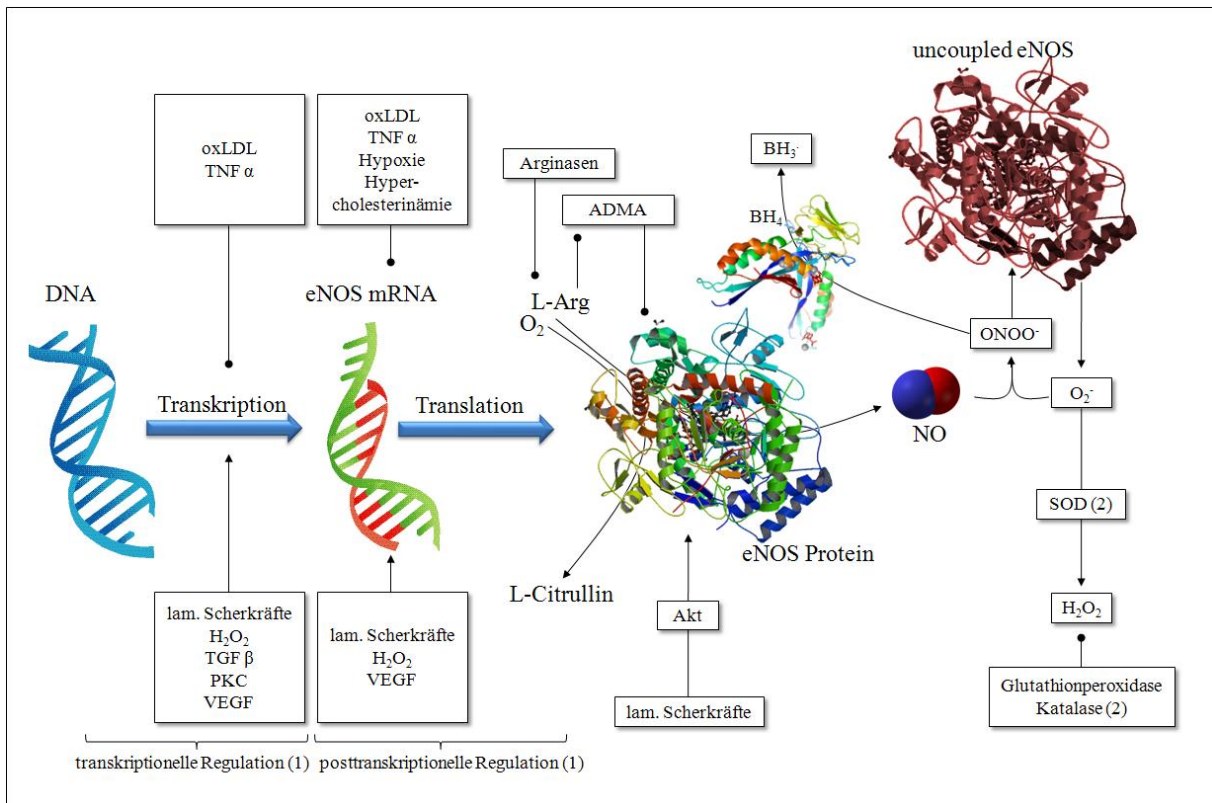


Abb. 5.1. Bioverfügbarkeit von NO; Transkriptionelle und posttranskriptionelle eNOS-Regulation; Interaktion von ROS und NO; eNOS-Uncoupling

Neben der konstitutionellen Basalexpression unterliegt die Expression der eNOS und die Stabilität der eNOS-mRNA u.a. laminaren Scherkräften und dem oxidativen Status des Endothels ((1) SEARLES, 2006; NISHIDA et al., 1992). Die physiologische intrazelluläre Konzentration L-Arg liegt mehr als 30fach über dem zur Sättigung der eNOS benötigten Level (FÖRSTERMANN et al., 2006), so dass eine tatsächliche Substratdefizienz der eNOS quasi nicht auftritt. Allerdings stehen in der Endothelzelle Arginasen, die ebenfalls L-Arg umsetzen, in Konkurrenz mit der eNOS (BACHETTI et al., 2004). In CC diabetischer Patienten mit ED wurde eine Hochregulation dieser Arginasen beobachtet (BIVALACQUA et al., 2001). Außerdem fungiert L-Arg nicht nur als Substrat der eNOS, sondern steht auch mit dem endogenen eNOS-Inhibitor asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), das einen unabhängigen Prädiktor kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt und mit ED positiv korreliert (MAAS et al., 2005), in Konkurrenz (BÖGER, 2003). Die Aktivität des eNOS-Enzyms wird, ebenfalls induziert von Scherkräften, durch Proteinkinase Akt-abhängige Phosphorylierung (DIMMELER et al., 1999). ROS vermindern die NO-Bioverfügbarkeit: O_2^- reagiert avid mit NO unter Bildung des Radikals Peroxynitrit ($ONOO^-$). ROS führen darüber hinaus zur Oxidation des eNOS-Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH_4) zu BH_3 und zum Uncoupling der eNOS, d.h. zu einer Unterbrechung des Elektronenflusses innerhalb des Enzyms, wodurch molekularer Sauerstoff statt hydroxyliertem L-Arg als Akzeptor der Elektronen fungiert (FÖRSTERMANN et al., 2006). Dies führt zur Superoxidbildung durch das eNOS-Enzym selbst. eNOS-Uncoupling wurde in Patienten mit endothelialer Dysfunktion unter Hypercholesterinämie (STROES et al., 1997), Diabetes mellitus (HEITZER et al., 2000), und arterieller Hypertonie (HIGASHI et al., 2002) nachgewiesen.

Strukturmodelle: www.pdb.org; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid; oxLDL: oxidized Low Density Lipoprotein; PKC: Proteinkinase C; SOD: Superoxiddismutase; TGF β : Transforming growth factor β ; TNF α : Tumornekrosefaktor α ; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; (2) DARLEY-USMAR et al., 1995.

Die DAF-Färbung zeigte eine signifikante Reduktion von NO im Schwellkörpergewebe der ApoE^{-/-}-Tiere, die durch Irbesartan, nicht aber durch Hydralazin signifikant verbessert wurde. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der gesteigerten eNOS-Expression und der reduzierten Radikallast als spezifischer Effekt der AT₁R-Blockade einerseits, und der gesteigerten Bioverfügbarkeit von NO andererseits ist anzunehmen. Vor dem Hintergrund der zentralen Rolle des NO in der Physiologie der Erektion fügt sich diese zumindest teilweise von der Blutdrucksenkung unabhängige Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit in die

physiologische Beobachtung der Verbesserung der endothelialen Funktion des vaskulären und penilen Gewebes der Knockout-Tiere unter AT₁R-Blockade ein.

Ferner zeigte sich, dass nicht nur die Blockade vorhandener AT₁R unter Irbesartan als Ursache für eine geringere Radikallast und gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit in Frage kommt, sondern darüber hinaus auch eine paradoxe Herabregulation der AT₁-Rezeptorproteinexpression unter Irbesartan.

5.1.4.4. Downregulation der AT₁-Rezeptorproteinexpression unter Irbesartan

Die Expression des AT₁R in vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen unterliegt komplexen Regulationsvorgängen. Frühe Arbeiten zeigten eine negative Feedback-Hemmung der AT₁R-Expression durch erhöhte Ang II-Spiegel, die unter physiologischen Bedingungen zu dominieren scheint (LASSEGUE et al., 1995). Unter dem Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren und eines proinflammatorischen Status des Endothels, verschiebt sich der Schwerpunkt allerdings auf die sog. heterologe AT₁R-Regulation (WASSMANN et al., 2006). Dieser paradoxe Mechanismus der verstärkten AT₁R-Expression durch AT₁R-abhängig gebildete Zytokine stellt einen circulus vitiosus dar, der durch das Vorliegen einer Hypercholesterinämie extern getriggert wird (Abb. 5.2.). Hypercholesterinämie erhöht die Expression des vaskulären AT₁R mit konsekutiver Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit gesteigerter ROS-Produktion (NICKENIG et al., 1997).

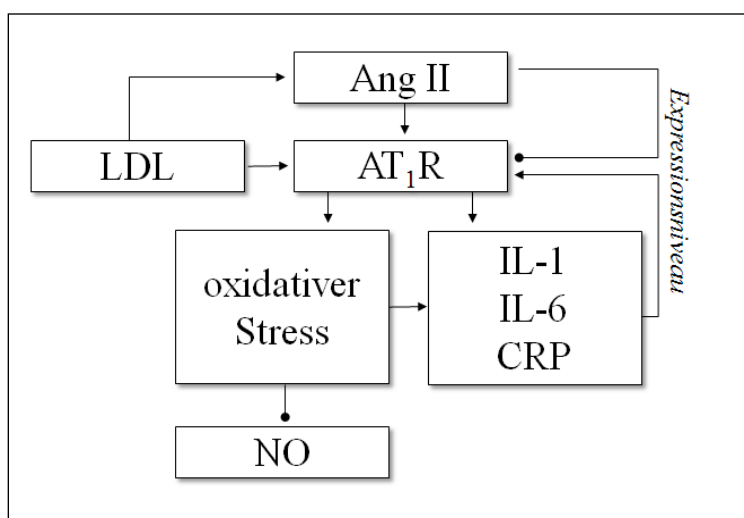


Abb. 5.2. Heterologe Regulation der AT₁R-Proteinexpression

Heraufregulation der AT₁R-Proteinexpression u.a. durch IL-1, IL-6, CRP, und LDL-Cholesterin, (WASSMANN et al., 2004; SASAMURA et al., 1997) die der physiologischen Feedbackhemmung bei erhöhten Ang II-Spiegeln entgegengerichtet ist. Hieraus resultiert oxidativer Stress, der seinerseits den proinflammatorischen Zustand aggraviert und die Bioverfügbarkeit von antioxidativen Molekülen, insbesondere NO, einschränkt.

WASSMANN et al. (¹WASSMANN et al., 2004) zeigten in hypercholesterinämischen ApoE^{-/-}-Mäusen, eine signifikant gesteigerte Bildung atherosklerotischer Läsionen, sowie eine signifikant verringerte endothelabhängige Relaxationsfähigkeit. Diese Befunde trafen allerdings nicht auf solche Tiere zu, die auch AT₁R-defizient waren. Diese ApoE/AT₁R double-knockout Mäuse wiesen im aortalen Gewebe eine signifikant geringere Last an ROS auf, als die ApoE^{-/-}-Mäuse. Die vaskuläre endotheliale Dysfunktion war somit an das Vorliegen des AT₁R gebunden, ging mit einer gesteigerten Radikallast einher und konnte durch Intervention mit Irbesartan, nicht aber Hydralazin signifikant attenuiert werden. NO spielt eine zentrale Rolle in der kavernösen Relaxation. Die entgegengerichtete Wirkung hoher Ang II-Spiegel am AT₁R im erektilen Gewebe umfasst mehrere Mechanismen die ausnahmslos blutdruckunabhängige Funktionen des AT₁R darstellen (siehe Kap. 2):

1. AT₁R-vermittelte trabekuläre Kontraktion und Einleitung der Detumeszenz
2. Ang II-bedingte Reduktion der endothelialen NO-Synthese über PKC
3. AT₁R-vermittelter prooxidativer und proinflammatorischer Status mit konsekutiver endothelialer Dysfunktion, verminderter NO-Synthese und vermehrter NO-Inaktivierung durch ROS

In der vorliegenden Studie zeigten die ApoE^{-/-}-Mäuse eine signifikante Steigerung der AT₁R-Proteinexpression im CC auf mehr als das Dreifache, verglichen mit den Wildtyptieren. Es zeigte sich, dass die reine Vasodilatation durch Hydralazin keinen Einfluss auf diese mutmaßlich dyslipidämisch bedingte heterologe Heraufregulation der Rezeptorproteinexpression hatte. Allein die AT₁R-Blockade durch Irbesartan reduzierte die AT₁R-Proteinexpression signifikant, mutmaßlich durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes hin zur negativen Feedbackhemmung bei geringerem proinflammatorischem Status. Die Normalisierung der AT₁-Rezeptorproteinexpression stellt somit eine pathophysiologischen Schlüsselstelle dar, die ursächlich für die in der vorliegenden Studie beobachtete Verbesserung der Endothelfunktion und Reduktion des oxidativen Stresses in Frage kommt.

Im Bezug auf die o.g. Mechanismen 1 und 2 indiziert die geringere AT₁R-Proteinexpression im CC, dass diese Effekte unter Irbesartan in geringerem Umfang zum Tragen kamen, was sich in der verbesserten penilen Relaxationsfähigkeit und gesteigerten NO-Bioverfügbarkeit in beiden Geweben unter AT₁R-Blockade zeigte.

5.1.5. Zusammenfassung

Die Behandlung mit dem Angiotensinrezeptorantagonisten Irbesartan verbessert die Endothelfunktion von Aorta und CC in transgenen hyperlipidämischen ApoE^{-/-}-Mäusen mit konsekutiv verringerter Atherogenese. Diese Verbesserung kommt durch weitgehend blutdruckunabhängige rezeptorspezifische AT₁R-Effekte zustande, da durch eine äquivalente AT₁R-unabhängige Blutdrucksenkung kein vergleichbarer Effekt zu erzielen ist. Die RAAS-Blockade am AT₁R führt zur Reduktion der interstitiellen Fibrose und des oxidativen Stresses, sowie zur Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit in beiden Geweben. Hierzu trägt anscheinend nicht nur die Blockade exprimierter AT₁R bei, sondern auch die Normalisierung der pathologisch gesteigerten AT₁-Rezeptorproteinexpression durch Irbesartan. Die vorliegende Studie zeigt unter AT₁R-Blockade durch Irbesartan eine Verbesserung der kavernösen Endothelfunktion in vitro, eine vermehrte Bioverfügbarkeit von NO als Hauptmediator der Erektion, und eine Normalisierung der Expression des AT₁R.

6. Literaturverzeichnis

1. Agabiti-Rosei E, Porteri E, Rizzoni D (2009) Arterial stiffness, hypertension, and rational use of nebivolol. *Vasc Health Risk Manag* 5:353-60
2. Alheid U, Frolich JC, Förstermann U (1987) Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res* 47:561-71
3. Andersson KE, Wagner G (1995) Physiology of penile erection. *Physiol Rev* 75:191-236
4. Araujo AB, Zilber SM, O'Donnell AB, McKinlay JB (2005) Erectile dysfunction and stroke risk in aging men: Prospective Results from the Massachusetts male aging study. *J Urol* 173:1074
5. Arnett DK, Evans GW, Riley WA (1994) Arterial stiffness: a new cardiovascular risk factor? *Am J Epidemiol* 140:669-82
6. Assmann G, Cullen P, Schulte H (2002) Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation* 105:310-5
7. Bachetti T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M, Grigolato P, Suzuki H, Finazzi D, Albertini A, Curello S, Ferrari R (2004) Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *J Mol Cell Cardiol* 37:515-23
8. Bacon CG, Mittelman MA, Kawachi I, Giovannucci E, Glasser DB, Rimm EB (2003) Sexual function in men older than 50 years of age: Results from the health professionals follow-up study. *Ann Intern Med* 139:161-8
9. Barksdale JD, Gardner SF (1999) The impact of first-line antihypertensive drugs on erectile dysfunction. *Pharmacotherapy* 19:573-81
10. Baumhäkel M, Werner N, Böhm M, Nickenig G (2006) Circulating endothelial progenitor cells correlate with erectile function in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J* 27:2184-8
11. Baumhäkel M, Böhm M (2007) Erectile dysfunction correlates with left ventricular function and precedes cardiovascular events in cardiovascular high-risk patients. *Int J Clin Pract* 61:361-6

12. Baumhäkel M, Schlimmer N, Böhm M; DO-IT Investigators (2008) Effect of irbesartan on erectile function in patients with hypertension and metabolic syndrome. *Int J Impot Res* 20:493-500
13. Baumhäkel M, Schlimmer N, Kratz MT, Böhm M (2009) Erectile dysfunction: indicator of end-organ damage in cardiovascular patients. *Med Klin (Munich)* 104:309-13
14. Becker AJ, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Machtens S, Scheller F, Knapp WH, Hartmann U, Jonas U (2001) Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology* 57:193-8
15. Beere PA, Glagov S, Zarins CK (1984) Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis. *Science* 226:180-2
16. Behr-Roussel D, Darblade B, Oudot A, Compagnie S, Bernabe J, Alexandre L, Giuliano F (2006) Erectile dysfunction in hypercholesterolemic atherosclerotic apolipoprotein E knockout mice. *J Sex Med* 3:596-603
17. Belova LA (2000) Angiotensin II- generating enzymes. *Biochemistry* 5:1337-45
18. Billups KL, Bank AJ, Padma-Nathan H, Katz SD, Williams RA (2008) Erectile dysfunction as a harbinger for increased cardiometabolic risk. *Int J Impot Res* 20:236-42
19. Biswas PN, Wilton LV, Shakir SW (2002) The safety of valsartan: Results of a postmarketing surveillance study on 12881 patients in England. *J Hum Hypertens* 16:795-803
20. Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ, Champion HC (2001) Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 283:923-7
21. Blatter LA, Wier WG (1994) Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium* 15:122-31
22. Böger RH (2003) When the endothelium cannot say 'NO' anymore. ADMA, an endogenous inhibitor of NO synthase, promotes cardiovascular disease. *Eur Heart J* 24:1901-2

23. Böhm M, Baumhäkel M, Probstfield JL, Schmieder R, Yusuf S, Zhao F, Koon T; ONTARGET/TRANSCEND ED- Investigators (2007) Sexual function, satisfaction, and association of erectile dysfunction with cardiovascular disease and risk factors in cardiovascular high-risk patients: substudy of the ONgoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial/Telmisartan Randomized AssessmeNT Study in ACE-INtolerant Subjects with Cardiovascular Disease (ONTARGET/TRANSCEND). *Am Heart J* 154:94-101
24. Böhm M, Kratz MT, Schlimmer N, Baumhäkel M (2008) Erectile dysfunction as cardiovascular risk marker. Role of the renin-angiotensin system. *Dtsch Med Wochenschr* 133:1313-6
25. Bookstein JJ, Vandeberg J, Machado T (1990) The cavernosal acetylcholine/papaverine response. A practical in vivo method for quantification of endothelium-dependent relaxation. Rationale and experimental validation. *Invest Radiol* 25:1168-74
26. Bragulat E, Larrousse M, Coca A, De la Sierra A (2003) Effect of long-term irbesartan treatment on endothelium-dependent vasodilation in essential hypertensive patients. *Br J Biomed Sci* 60:191-6
27. Braun M, Wassmer G, Klotz T, Reifenrath B, Mathers M, Engelmann U (2000) Epidemiology of erectile dysfunction: Results of the 'Cologne Male Survey'. *Int J Impot Res* 12:305-11
28. Brindley GS (1983) Cavernosal alpha-blockade: A new technique for investigating and treating erectile impotence. *Br J Psychiat* 143:332-7
29. Brunner HR (1997) The New Angiotensin II Receptor Antagonist, Irbesartan. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations. *AJH* 10:311-7
30. Burchardt M, Burchardt T, Baer L, Kiss AJ, Pawar RV, Shabsigh A, de la Taille A, Hayek OR, Shabsigh R (2000) Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. *J Urol* 164:1188-91
31. Busse R, Fleming I (2003) Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci* 24:24-9
32. Candido R, Allen TJ, Lassila M, Cao Z, Thallas V, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA (2004) Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis. *Circulation* 109:1536-42

33. Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JF (2000) Impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation by glycosylated human haemoglobin. *BJU Int* 85:735-41
34. Ceriello A, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Piconi L, Quagliaro L, Esposito K, Giugliano D (2005) Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. *Circulation* 111:2518-24
35. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E (2005) Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 11:194-205
36. Christensen FH, Hansen T, Stankevicius E, Buus NH, Simonsen U (2007) Elevated pressure selectively blunts flow-evoked vasodilatation in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol* 150:80-7
37. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, and Kim YM (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 282:1075-9
38. Chung WS, Sohn JH, Park YY (1999) Is obesity an underlying factor in erectile dysfunction? *Eur Urol* 36:68-70
39. Cingolani HE, Villa-Abrille MC, Cornelli M, Nolly A, Ennis IL, Garcarena C, Suburo AM, Torbidoni V, Correa MV, Camiliónde Hurtado MC, Aiello EA (2006) The positive inotropic effect of angiotensin II: Role of endothelin-1 and reactive oxygen species. *Hypertension* 47:727-34
40. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T (2002) Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/kdr. *J Biol Chem* 277:3101–8
41. Dahlén SE, Björk J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarström S, Lindgren JA, Samuelsson B (1981) Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3887-91
42. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters* 369:131-5
43. Das UN (2005) Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med Sci Monit* 11:155-62
44. Daugherty A, Rateri DL (2005) Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice. *Methods* 36:129-38

45. De Gennaro Colonna V, Rigamonti A, Fioretti S, Bonomo S, Manfredi B, Ferrario P, Bianchi M, Berti F, Muller EE, Rossoni G (2005) Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 516:253-9
46. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-5
47. Doumas M, Tsakiris A, Douma S, Grigorakis A, Papadopoulos A, Hounta A, Tsiodras S, Dimitriou D, Giamarellou H (2006) Factors affecting the increased prevalence of erectile dysfunction in Greek hypertensive compared with normotensive subjects. *J Androl* 27:469-77
48. Düsing R (2003) Effect of the angiotensin II antagonist valsartan on sexual function in hypertensive men. *Blood Press Suppl* 2:29-34
49. D'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Luscher TF (2002) Chronic ET(A) receptor blockade prevents endothelial dysfunction of small arteries in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* 53:487-95
50. Esposito K, Giugliano F, Di Palo C, Giugliano G, Marfella R, D'Andrea F, D'Armiento M, Giugliano D (2004) Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. *JAMA* 291:2978-84
51. Faulkner K, Fridovich I (1993) Luminol and lucigenin as detectors for O_2^- . *Free Radic Biol Med* 15:447-51
52. Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB (1994) Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* 151:54-61
53. Feldman HA, Johannes CB, Derby CA, Kleinman KP, Mohr BA, Araujo AB, McKinlay JB (2000) Erectile dysfunction and coronary risk factors: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Prev Med* 30:328-38
54. Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher AM (2004) Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the "vulnerable" patient. *Circulation* 110:1926-32
55. Förstermann U, Münzel T (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708-14

56. Fogari R, Zoppi A, Corradi L, Mugellini A, Poletti L, Lusardi P (1998) Sexual function in hypertensive males treated with lisinopril or atenolol: a crossover study. *Am J Hypertens* 11:1244-7
57. Fogari R, Zoppi A, Poletti L, Marasi G, Mugellini A, Corradi L (2001) Sexual activity in hypertensive men treated with valsartan or carvedilol: a crossover study. *Am J Hypertens* 14:27-31
58. Fonseca V, Desouza C, Asnani S, Jialal I (2004) Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in diabetes. *Endocr Rev* 25:153-75
59. Fonseca V, Jawa A (2005) Endothelial and erectile dysfunction, diabetes mellitus, and the metabolic syndrome: common pathways and treatments? *Am J Cardiol* 96:13-8
60. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–6
61. Garg UC, Hassid A (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83:1774-7
62. Giuliano FA, Leriche A, Jaudinot EO, DeGendre AS (2004) Prevalence of erectile dysfunction among 7689 patients with diabetes or hypertension, or both. *Urology* 64:1196-1201
63. Gräfe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, Loebe M, Gaehtgens P, Fleck E (1997) Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res* 81:804-11
64. Grandi AM, Maresca AM (2006) Blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: effects on hypertensive target organ damage. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 4:219-28
65. Greenstein A, Chen J, Miller H, Matzkin H, Villa Y, Braf Z (1997) Does severity of ischemic coronary disease correlate with erectile function? *Int J Impot Res* 9:123-6
66. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-8

67. Grimm Jr RH, Grandits GA, Prineas RJ, McDonald RH, Lewis CE, Flack JM, Yunis C, Svendsen K, Liebson PR, Elmer PJ (1997) Long-term effects on sexual function of five antihypertensive drugs and nutritional hygienic treatment in hypertensive men and women. Treatment of Mild Hypertension Study (TOMHS). *Hypertension* 29:8-14
68. Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685-95
69. Harrison DG (1997) Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100:2153-7
70. Hartley CJ, Reddy AK, Madala S, Martin-McNulty B, Vergona R, Sullivan ME, Halks-Miller M, Taffet GE, Michael LH, Entman ML, Wang YX (2000) Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:2326-34
71. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T (2000) Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 43:1435-8
72. Herbert K, Lopez B, Castellano J, Palacio A, Tamari L, Arcemen LM (2008) The prevalence of erectile dysfunction in heart failure patients by race and ethnicity. *Int J Impot Res* 20:507-11
73. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Fukuda Y, Matsuura H, Oshima T, Chayama K (2002) Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am J Hypertens* 15:326-32
74. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73:411-8
75. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265-9
76. Jaarsma T, Dracup K, Walden J, Stevenson LW (1996) Sexual function in patients with advanced heart failure. *Heart Lung* 25:262-70
77. Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 515-40

78. Jin L, Burnett AL (2008) NADPH oxidase: recent evidence for its role in erectile dysfunction. *Asian J Androl* 10:6-13
79. Jin L, Lagoda G, Leite R, Webb RC, Burnett AL (2008) NADPH oxidase activation: a mechanism of hypertension-associated erectile dysfunction. *J Sex Med* 5:544-51
80. Kanazawa K, Kawashima S, Mikami S, Miwa Y, Hirata K, Suematsu M, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M (1996) Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Pathol* 148:1949-56
81. Kansui Y, Fujii K, Goto K, Abe I, Iida M (2002) Angiotensin II receptor antagonist improves age-related endothelial dysfunction. *J Hypertens* 20:439-46
82. Kappert K, Schmidt G, Doerr G, Wollert-Wulf B, Fleck E, Graf K (2000) Angiotensin II and PDGF-BB stimulate beta(1)-integrin-mediated adhesion and spreading in human VSMCs. *Hypertension* 35:255-61
83. Kifor I, Dzau VJ (1987) Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res* 60:422-8
84. Kifor I, Williams GH, Vickers MA, Sullivan MP, Jodbert P, Dluhy RG (1997) Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J Urol* 157:1920-5
85. Kirby M, Jackson G, Simonsen U (2005) Endothelial dysfunction links erectile dysfunction to heart disease. *Int J Clin Pract* 59:225-9
86. Kirkeby HJ, Svane D, Poulsen J, Tottrup A, Forman A, Andersson KE (1993) Role of the L-arginine/nitric oxide pathway in relaxation of isolated human penile cavernous tissue and circumflex veins. *Acta Physiol Scand* 149:385-92
87. Kloner RA, Mullin SH, Shook T, Matthews R, Mayeda G, Burstein S, Peled H, Pollick C, Choudhary R, Rosen R, Padma-Nathan H (2003) Erectile dysfunction in the cardiac patient: how common and should we treat? *J Urol* 170:46-50
88. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70:2446-53

89. Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Cokkinos DV (2008) Apolipoprotein E knockout models. *Curr Pharm Des* 14:338-51
90. Krege JH, Hodgin JB, Hagan JR, Smithies O (1995) A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 25:1111-5
91. Kubes P, Suzuki M, and Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4651-5
92. Landmesser U, Harrison DG (2001) Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation* 104:2638-40
93. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C, Mueller M, Drexler H (2007) Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:943-8
94. Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK (1995) Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol* 48:601-9
95. Li JM, Shah AM (2003) Mechanism of endothelial cell NADPH-oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem* 278:12094-100
96. Listerri JL, Lozano Vidal JV, Aznar Vicente J, Argaya Roca M, Pol Bravo C, Sanchez Zamorano MA, Ferrario CM (2001) Sexual dysfunction in hypertensive patients treated with losartan. *Am J Med Sci* 321:336-41
97. Loscalzo J (2001) Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 88:756-62
98. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75
99. Lue TF (2000) Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 342:1802-13
100. Lyle AN, Griendling KK (2006) Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology* 21:269-80
101. Maas R, Wenske S, Zabel M, Ventura R, Schwedhelm E, Steenpass A, Klemm H, Noldus J, Böger RH (2005) Elevation of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and coronary artery disease in men with erectile dysfunction. *Eur Urol* 48:1004-11

102. Manrique C, Lastra G, Gardner M, Sowers JR (2009) The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. *Med Clin North Am* 93:569-82
103. McVean DE, Patrick RL, Witchett CE (1965) An aqueous Oil Red O fixative Stain for histological preparations. *Am J Clin Pathol* 43:291-3
104. Mihaljević B, Katusin-Razem B, Razem D (1996) The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic Biol Med* 21:53-63
105. Min JK, Williams KA, Okwuosa TM, Bell GW, Panutich MS, Ward RP (2006) Prediction of coronary heart disease by erectile dysfunction in men referred for nuclear stress testing. *Arch Intern Med* 166:201-6
106. Mizusawa H, Hedlund P, Hakansson A, Alm P, Andersson KE (2001) Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. *Br J Pharmacol* 132:1333-41
107. Moldovan L, Moldovan NI, Sohn RH, Parikh SA, Goldschmidt-Clermont PJ (2000) Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. *Circ Res* 86:549-57
108. Montorsi F, Briganti A, Salonia A, Rigatti P, Margonato A, Macchi A, Galli S, Ravagnani PM, Montorsi P (2003) Erectile dysfunction prevalence, time of onset and association with risk factors in 300 consecutive patients with acute chest pain and angiographically documented coronary artery disease. *Eur Urol* 44:360-4
109. Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, Rotatori F, Veglia F, Briganti A, Salonia A, Dehò F, Rigatti P, Montorsi F, Fiorentini C (2006) Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: the COBRA trial. *Eur Heart J* 27:2632-9
110. Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J (1999) Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 100:899-902
111. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14:133-40

112. Napoli C, Palinski W, Di Minno G, D'Armiento FP (2000) Determination of atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 10:209-15
113. National Institutes of Health (1992) Impotence. NIH Consensus Statement. *NIH Consens Stat* 10:1-33
114. Negro R (2008) Endothelial effects of antihypertensive treatment: focus on irbesartan. *Vasc Health Risk Manag* 4:89-101
115. Nehra A, Azadzo KM, Moreland RB, Pabby A, Siroky MB, Krane RJ, Goldstein I, Udelson D (1998) Cavernosal expandability is an erectile tissue mechanical property which predicts trabecular histology in an animal model of vasculogenic erectile dysfunction. *J Urol* 159:2229-36
116. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, and Murphy TJ (1992) Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90:2092-6
117. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF (1998) Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 97:2494-8
118. Padma- Nathan H (1990) The effects of aging, diabetes and vascular ischemia on the biochemical composition of collagen found in the corpora and tunica of potent and impotent men. *Int J Impot Res* 2:75-6
119. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-6
120. Panza JA, Quyyumi AA, Callahan TS, Epstein SE (1993) Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 21:1145-51
121. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA (1993) Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87:1468-74
122. Park JK, Kim SZ, Kim SH, Park YK, Cho KW (1997) Renin angiotensin system in rabbit corpus cavernosum: functional characterization of angiotensin II receptors. *J Urol* 158:653-8

123. Persson F, Rossing P, Hovind P, Stehouwer CD, Schalkwijk C, Tarnow L, Parving HH (2006) Irbesartan treatment reduces biomarkers of inflammatory activity in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria: an IRMA 2 substudy. *Diabetes* 55:3550-5
Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberoberto P, Verdecchia P, Schillaci G (2001) Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 104:191-6
124. Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ (2000) Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation* 102:2118-23
125. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-53
126. Ponholzer A, Temml C, Mock K, Marszalek M, Obermayr R, Madersbacher S (2005) Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in 2869 men using a validated questionnaire. *Eur Urol* 47:80-5
127. Price D, Hackett G (2008) Management of erectile dysfunction in diabetes: an update for 2008. *Curr Diab Rep* 8:437-43
128. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG (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* 97:1916-23
129. Rhoden EL, Ribeiro EP, Riedner CE, Teloken C, Souto CA (2005) Glycosylated haemoglobin levels and the severity of erectile dysfunction in diabetic men. *BJU Int* 95:615-7
130. Riveiro A, Mosquera A, Alonso M, Calvo C (2002) Angiotensin II type 1 receptor blocker irbesartan ameliorates vascular function in spontaneously hypertensive rats regardless of oestrogen status. *J Hypertens* 20:1365-72
131. Romeo JH, Seftel AD, Madhun ZT, Aron DC (2000) Sexual function in men with diabetes type 2: association with glycemic control. *J Urol* 163:788-91

132. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-9
133. Sasamura H, Nakazato Y, Hayashida T, Kitamura Y, Hayashi M, Saruta T (1997) Regulation of vascular type 1 angiotensin receptors by cytokines. *Hypertension* 30:35-41
134. Schäfer A, Fraccarollo D, Tas P, Schmidt I, Ertl G, Bauersachs J (2004) Endothelial dysfunction in congestive heart failure: ACE inhibition vs. angiotensin II antagonism. *Eur J Heart Fail* 6:151-9
135. Schwarz ER, Kapur V, Bionat S, Rastogi S, Gupta R, Rosanio S (2008) The prevalence and clinical relevance of sexual dysfunction in women and men with chronic heart failure. *Int J Impot Res* 20:85-91
136. Searles CD (2006) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:803-16
137. Sezen SF, Burnett AL (2000) Intracavernosal pressure monitoring in mice: Responses to electrical stimulation of the cavernous nerve and to intracavernosal drug administration. *J Androl* 21:311-5
138. Shukla N, Jones R, Persad R, Angelini GD, Jeremy JY (2005) Effect of sildenafil citrate and a nitric oxide donating sildenafil derivative, NCX 911, on cavernosal relaxation and superoxide formation in hypercholesterolaemic rabbits. *Eur J Pharmacol* 517:224-31
139. Simonsen U, Prieto D, Delgado JA, Hernandez M, Resel L, Sáenz de Tejada I, García-Sacristán A (1997) Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penile arteries. *Clin Sci* 92:269-75
140. Smith JD, Breslow JL (1997) The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med* 242:99-109
141. Sola S, Mir MQ, Cheema FA, Khan-Merchant N, Menon RG, Parthasarathy S, Khan BV (2005) Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome: results of the Irbesartan and Lipoic Acid in Endothelial Dysfunction (ISLAND) study. *Circulation* 111:343-8

142. Solomon H, Man JW, Wierzbicki AS, Jackson G (2003) Relation of erectile dysfunction to angiographic coronary artery disease. *Am J Cardiol* 91:230-1
143. Steinberg D, Witztum JL (2002) Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 105:2107-11
144. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T (1997) Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 99:41-6
145. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J (2003) Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35:881-900
146. Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI (1964) Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol* 78:69-72
147. Taniyama Y, Griending KK (2003) Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension* 42:1075-81
148. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani AD, Vallance P, Deanfield J (2007) Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* 356:911-20
149. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M (2009) Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol Oxf* 196:193-222
150. Van Ree JH, Van den Broek WJ, Dahlmans VE, Groot PH, Vidgeon-Hart M, Frants RR, Wieringa B, Havekes LM, Hofker MH (1994) Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 111:25-37
151. Vaughan DE, Lazos SA, Tong K (1995) Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the rennin-angiotensin system and thrombosis. *J Clin Invest* 95:995-1001
152. Vidal F, Colome C, Martinez Gonzalez J, Badimon L (1998) Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 252:378-84
153. Virag R, Bouilly P, Frydman D (1985) Is impotence an arterial disorder? A study of arterial risk factors in 440 impotent men. *Lancet* 1:181-4

154. Vlachopoulos C, Ioakeimidis N, Terentes-Printzios D, Stefanadis C (2008) The triad: erectile dysfunction-endothelial dysfunction-cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 14:3700-14
155. Wang YX, Halks-Miller M, Vergona R, Sullivan ME, Fitch R, Mallari C, Martin-McNulty B, daCunha V, Freay A, Rubanyi GM, Kauser K (2000) Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:428-34
156. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T (1999) Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99:2027-33
157. Warnholtz A, Ostad MA, Heitzer T, Thüneke F, Fröhlich M, Tschentscher P, Schwedhelm E, Böger R, Meinertz T, Münzel T (2007) AT1-receptor blockade with Irbesartan improves peripheral but not coronary endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 194:439-45
158. Wassmann S, Bäumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohé C, Ahlbory K, Rösen R, Böhm M, Nickenig G (2001) Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 103:435-41
159. Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Böhm M, and Nickenig G (2004) Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation* 110:3062-7
160. Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Böhm M, Nickenig G (2004) Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* 94:534-41
161. Wassmann S, Nickenig G (2006) Pathophysiological regulation of the AT1-receptor and implications for vascular disease. *J Hypertens Suppl* 24:15-21
162. Wespes E, Goes PM, Schiffmann S, Depierreux M, Vanderhaeghen JJ, Schulman CC (1991) Computerized analysis of smooth muscle fibers in potent and impotent patients. *J Urol* 146:1015-7

163. Wespes E (2002) Smooth muscle pathology and erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 14:17-21
164. Williams B (1998) Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *J Hypertens* 16:1921-9
165. Wu RF, Xu YC, Ma Z, Nwariaku FE, Sarosi GA Jr., Terada LS (2005) Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. *J Cell Biol* 171:893-904
166. Xie D, Odronic SI, Wu F, Phippen AM, Donatucci CF, Annex BH (2007) A mouse model of hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction. *J Sex Med* 4:898-907
167. Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC (2003) Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:26-36
168. Yang G, Chen Z, Wang H (2004) Establishment of the animal model of induced high-cholesterol-atherosclerotic erectile dysfunction and the mechanisms of atherosclerotic erectile dysfunction. *National J Androl* 10:608-11
169. Yang R, Powell-Braxton L, Ogaoawara AK, Dybdal N, Bunting S, Ohneda O, Jin H (1999) Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2762-8
170. Yavuzgil O, Altay B, Zoghi M, Gürgün C, Kayikcioglu M, and Kültürsay H (2005) Endothelial function in patients with vasculogenic erectile dysfunction. *Int J Cardiol* 103:19-26
171. Yoshida M, Imaizumi T, Ando S, Hirooka Y, Harada S, Takeshita A (1991) Impaired forearm vasodilatation by acetylcholine in patients with hypertension. *Heart Vessels* 6:218-23

7. Publikationen und Danksagung

7.1. Publikationen

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit ist folgende Publikation entstanden:

- Baumhäkel M, Custodis F, Schlimmer N, Laufs U, Böhm M (2008) Improvement of endothelial function of the corpus cavernosum in apolipoprotein E knockout mice treated with irbesartan. *J Pharmacol Exp Ther* 327:692-8

Weitere Publikationen in chronologischer Reihenfolge:

- Custodis F, Baumhäkel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Böhm M, Laufs U (2008) Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 117:2377-87
- Baumhäkel M, Schlimmer N, Büyükafsar K, Arikan O, Böhm M (2008) Nebivolol, but not metoprolol, improves endothelial function of the corpus cavernosum in apolipoprotein e-knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 325:818-23
- Böhm M, Kratz MT, Schlimmer N, Baumhäkel M (2008) Erectile dysfunction as cardiovascular risk marker. Role of the renin-angiotensin system. *Dtsch Med Wochenschr* 133:1313-6
- Baumhäkel M, Schlimmer N, Böhm M; DO-IT Investigators (2008) Effect of irbesartan on erectile function in patients with hypertension and metabolic syndrome. *Int J Impot Res* 20:493-500
- Baumhäkel M, Schlimmer N, Kratz MT, Böhm M (2009) Erectile dysfunction: indicator of end-organ damage in cardiovascular patients. *Med Klin* 104:309-13

- Baumhäkel M, Custodis F, Schlimmer N, Laufs U, Böhm M (2010) Heart rate reduction with ivabradine improves erectile dysfunction in parallel to decrease in atherosclerotic plaque load in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis* 212:55-62
- Baumhäkel M, Schlimmer N, Kratz M, Hacket G, Jackson G, Böhm M (2011) Cardiovascular risk, drugs and erectile function - a systematic analysis. *Int J Clin Pract* 65:289-98
- Schlimmer N, Kratz M, Böhm M, Baumhäkel M (2011) Telmisartan, ramipril and their combination improve endothelial function in different tissues in a murine model of cholesterol-induced atherosclerosis. *Br J Pharmacol* Accepted Article; doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.001267.x

7.2. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Böhm und Herrn PD Dr. M. Baumhäkel. Herrn Prof. Böhm danke ich vielmals für die Überlassung des spannenden Themas der vorliegenden Arbeit, dafür, meine Begeisterung für das experimentelle wissenschaftliche Arbeiten geweckt und zu jedem Zeitpunkt gefördert zu haben, für zahlreiche Anregungen und die kritische Diskussion der Inhalte. Darüber hinaus danke ich Prof. Böhm für die Möglichkeit, die experimentellen Teile dieser Dissertation in den Räumlichkeiten des Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes durchzuführen und für sein Engagement, meine wissenschaftlichen Bemühungen, auch über diese Dissertation hinaus, nach Kräften zu befördern. Herrn PD Dr. Baumhäkel gebührt mein Dank für die wissenschaftlich und menschlich ausgezeichnete und engagierte Betreuung bei allen Aspekten dieser Arbeit und darüber hinaus. Herr PD Dr. Baumhäkel verstand es zu jedem Zeitpunkt, motivierend und bedacht, mir sowohl methodisches als auch wissenschaftliches Geschick zu vermitteln und bereicherte diese Arbeit entscheidend durch seine kritische Durchsicht. Weiterhin danke ich ihm dafür, mich in weitere wissenschaftliche Projekte mit großer Akzeptanz und Diskussionsbereitschaft mit einbezogen zu haben.

Herrn Prof. Dr. Laufs danke ich für sein freundliches, motiviertes und motivierendes Engagement und die ausgezeichnete Zusammenarbeit mit der von ihm geleiteten Arbeitsgruppe. Gleiches gilt für Herrn Dr. Maack, der uns stets fundiert und professionell zur Seite stand.

Ich möchte ausdrücklich allen technischen Assistentinnen des Labors, insbesondere Frau Jäger, Frau Becker und Frau Rebmann für die qualifizierte methodische Unterstützung und das hervorragende Arbeitsklima in unserem Forschungslabor danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinem privaten Umfeld danken, meinen Eltern für ihre Unterstützung, sowie germanistische und medizinische Anregungen, und besonders Stephanie, für ihre Geduld und Motivation, die sie neben ihrer eigenen wissenschaftlichen Arbeit in vielen gemeinsamen Stunden für mich aufbrachte.