

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawatz

**Untersuchung der Wirkung von *Nebivolol*
auf das Zellwachstum und die Freisetzung von
Stickstoffmonoxid**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

DANIELA BEATRICE BERTSCH

aus Reutlingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Brehm

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. B. Gallwitz

Meinen Eltern

1	Einleitung	5
----------	-------------------	----------

1.1	Allgemeine Einführung.....	5
1.2	<i>Nebivolol</i>	15
1.3	Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	16

2	Material und Methoden	18
----------	------------------------------	-----------

2.1	Zellen.....	18
2.2	Kulturmedien und deren Zusammensetzung.....	18
2.3	KulturgefäÙe.....	19
2.4	Chemikalien.....	20
2.5	Färbungen.....	24
2.6	Antikörper.....	25
2.7	Pharmakologische Testsubstanzen.....	28
2.8	Sonstige Materialien.....	28
2.9	Geräte.....	29
2.10	Isolierung und Kultivierung humaner koronararterieller glatter Muskelzellen und Endothelzellen.....	30
2.11	Mikroskopische Präparate.....	34
2.12	Testsubstanz-Verdünnungsreihe.....	36
2.13	Zugabe von Wachstumsfaktoren.....	36
2.14	Proliferationstests und Messung der mitochondrialen Aktivität.....	37
2.15	Test zur Bestimmung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid.....	39
2.16	ELISA zur Bestimmung der Endothelin-1-Konzentration.....	41
2.17	<i>In situ</i> -Hybridisierung bei Endothelzellen auf die Expression von prä-pro ET-1 unter dem Einfluss von <i>Nebivolol</i>	41
2.18	Statistische Auswertung.....	44

3	Ergebnisse	45
3.1	Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung humaner koronararterieller Endothelzellen und glatter Muskelzellen.....	45
3.2	Einfluss von <i>Nebivolol</i> auf die Proliferation und mitochondriale Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen.....	47
3.2.1	Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen nach 7 und 14 Tagen Dauerbehandlung mit <i>Nebivolol</i>	47
3.2.2	Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen nach Einmalgaben von <i>Nebivolol</i> über 24 und 48 Stunden.....	51
3.3	Einfluss von <i>Nebivolol</i> auf die Proliferation und mitochondriale Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen.....	55
3.3.1	Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen nach 7 und 14 Tagen Dauerbehandlung mit <i>Nebivolol</i>	55
3.3.2	Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen nach Einmalgaben von <i>Nebivolol</i> über 24 und 48 Stunden.....	61
3.3.3	Hemmung des Wachstumsfaktor-induzierten akzelerierten Wachstums von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen mittels <i>Nebivolol</i> nach 7 Tagen Dauerbehandlung.....	65
3.4	Vergleich von <i>Nebivolol</i> mit Betablockern der ersten und zweiten Generation.....	74
3.4.1	Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit Carvedilol	74
3.4.2	Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit Metoprolol	79

3.4.3	Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit Propranolol	82
3.4.4	Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen mit Bisoprolol	85
3.5	Wirkung von <i>Nebivolol</i> auf die Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus humanen koronararteriellen Endothelzellen	87
3.5.1	Messung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Endothelzellen durch <i>Nebivolol</i> nach Einmalgabe über 48 Stunden.....	87
3.5.2	Messung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch <i>Nebivolol</i> unter Hemmung der endothelialen NO-Synthetase nach Einmalgabe über 48 Stunden.....	88
3.6	Auswirkung von <i>Nebivolol</i> auf apoptotische Vorgänge bei humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen	89
3.7	Färbungen	90
3.7.1	DAPI-Färbung.....	90
3.7.2	Annexin-Färbung.....	91
3.7.3	BrdU-Färbung.....	92
3.8	Einfluss von <i>Nebivolol</i> auf die Endothelin-1-Synthese bei humanen koronararteriellen Endothelzellen	93
3.8.1	Endothelin-1-Sekretion bei humanen koronararteriellen Endothelzellen unter <i>Nebivolol</i>	93
3.8.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung humaner koronararterieller Endothelzellen auf die Expression von Endothelin-1 mRNA.....	94

4	Diskussion	95
----------	-------------------	-----------

4.1	Wirkung von <i>Nebivolol</i> auf die Gefäßproliferation.....	95
4.2	Einfluss von <i>Nebivolol</i> auf das Endothel und die Endothelfunktion.....	101

5	Zusammenfassung	108
6	Literaturverzeichnis	111
7	Publikationen	121
8	Danksagung	121
9	Lebenslauf	123

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Einführung

Arteriosklerose mit Veränderungen der Funktion und Struktur von Blutgefäßen ist für die meisten kardiovaskulären, zerebrovaskulären und thromboembolischen Ereignisse verantwortlich. Für die seit langem bekannten stenosierenden Gefäßveränderungen mit Lipid- und Kalkeinlagerungen führte Marchant (1904) die Bezeichnung Atherosklerose ein. Der Prozess verläuft chronisch über Jahre bis Jahrzehnte, häufig mit schubweiser Entwicklung bis hin zum akuten Gefäßverschluss, unter Umständen mit plötzlichem Herztod.

Arteriosklerotisch bedingte Herz-Kreislaufferkrankungen gehören trotz der präventiven und therapeutischen Erfolge in den letzten Jahrzehnten weiterhin zu den häufigsten und ökonomisch bedeutendsten Erkrankungen [Fries 2003/Tunstall-Pedoe 1999]. Zahlen des statistischen Bundesamtes für das Jahr 2002 belegen, dass nahezu die Hälfte aller Todesfälle in Deutschland kardiovaskulärer Ursache ist [Statistisches Jahrbuch 2002]. Im Zusammenhang mit der Atherogenese werden neben einer familiären Disposition vor allem exogene Risikofaktoren bzw. Begleiterkrankungen wie der inhalative Zigarettenkonsum, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Adipositas und die Hyperlipoproteinämie gesehen.

In die zugrunde liegenden Pathomechanismen hat man in den letzten zehn Jahren zunehmend Einblick gewonnen. Hierzu haben auf der einen Seite zellphysiologische und molekularbiologische, andererseits aber auch große epidemiologische Studien beigetragen.

Anatomie und Pathoanatomie der Arterien

Die Arterien bestehen lichtmikroskopisch von innen nach außen aus 3 Schichten.

Die *Tunica intima* (=Intima) grenzt mit ihrer Endothelschicht direkt an das Gefäßlumen. Das Endothel besteht aus einem dünnen, meist einschichtigen platten Epithel, welches das Endothelrohr bildet. Subendothelial folgt eine Bindegewebslamelle (Lamina propria intima), sowie die Membrana elastica interna.

Die mittlere Schicht, die *Tunica media* (=Media) besteht aus einer ringförmig verlaufenden Schicht aus glatten Muskelzellen, sowie zwischen den Muskelzellen liegende elastische Fasernetze, die *Membranae fenestrae* genannt werden. Die Muskelschicht der Media reguliert die Gefäßweite der Arterien.

Die äußere Schicht, die *Tunica externa* oder auch *Adventitia* grenzt mit der *Membrana elastica externa* an die Media. Das mit kollagenen Fasern durchsetzte adventitielle Bindegewebe verbindet das Gefäß locker mit der Umgebung [aus Moll, Anatomie 1995]

Histologisch lassen sich unterschiedliche Stadien der arteriosklerotischen Wandveränderungen ausmachen.

Frühveränderungen, die so genannten Lipidflecken treten oft schon bei jungen Menschen auf und sind Folge der Einwanderung von Makrophagen (sog. Schaumzellen) in die Intima. Das zweite, morphologisch fassbare Stadium ist durch die Proliferation glatter Muskelzellen gekennzeichnet. Die proliferierenden glatten Muskelzellen bilden Kollagen, transformierte Proteoglykane und elastische Fasern, wodurch fibröse Plaques entstehen. Im Weiteren entsteht eine atheromatöse Nekrose aus Zelldetritus, Lipiden, Cholesterinkristallen und einer lumenseitigen kollagenreichen fibrösen Kappe. Zusätzlich können sich in diesen komplexen Läsionen Kalksalze ablagern [aus Böcker, Pathologie 1997].

Pathogenese der Arteriosklerose

Durch eine Vielzahl von epidemiologischen und experimentellen Untersuchungen sind die Faktoren, die die Arteriosklerose begünstigen (Risikofaktoren) zum großen Teil bekannt. Folgen dieser kardiovaskulären Risikofaktoren sind eine Verletzung der Gefäßintegrität, eine erhöhte Permeabilität für Makrophagen und Lipoproteine, sowie eine Reduktion der Reparaturmechanismen. Die initiale Endothelschädigung kann durch chemische, mechanische oder immunologische Einflüsse eingeleitet werden. Verletzungen des Endothels führen sofort zur Freisetzung freier Sauerstoffradikale, die Plasmaproteine oxidieren und die endotheliale Funktion beeinträchtigen. Die vaskuläre Dysfunktion führt unter anderem zu Freisetzung von Wachstumsfaktoren mit der Folge

der Gefäßmuskelproliferation und subintimalen Proliferation von Makrophagen. Weitere Faktoren, durch welche das Plaquewachstum begünstigt werden, sind die Synthesehemmung vasorelaxierender und antiaggregatorisch wirkender Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI), sowie eine erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1b, IL-6). Die Plaqueruptur löst das akute vaskuläre Ereignis aus.

In den vergangenen Jahren wurden auf dem Gebiet der medikamentösen und interventionellen Therapie arteriosklerotischer Gefäßveränderungen deutliche Fortschritte erzielt. Einen immer größeren Stellenwert in der Behandlung der symptomatischen Arteriosklerose nimmt vor allem die interventionelle Behandlung von Gefäßverengungen oder -verschlüssen mittels der perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) ein. Zum Einsatz kommen mittlerweile eine Vielzahl an minimal invasiven Techniken, wie die Ballonangioplastie, Stentimplantation, Rotablationsangioplastie, Ultraschallangioplastie und Lasertechniken. Aber auch die konventionelle Bypasschirurgie und Thrombendarterektomie gehören nach wie vor zum Behandlungsstandard.

Ein großer Problem dieser Behandlungsstrategien stellt jedoch nach wie vor die Bildung einer erneuten Stenose bei 30-50% der behandelten Patienten dar [Popma 1991] und schmälert somit den Langzeiterfolg der Primärtherapie.

Die Entstehung der Restenose basiert auf einer Verletzung der Gefäßintegrität im Rahmen des Eingriffes und ist ein komplexer pathophysiologischer Vorgang. Ineinandergreifende Vorgänge wie Aktivierung von Thrombozytenaggregation durch Verletzung des Endothels, Entzündungsreaktion, Freisetzung potenter Wachstumsfaktoren wie beispielsweise Platelet-derived growth factor (PDGF) und die Migration von glatten Muskelzellen aus Media und Adventitia in die Intima [Ferrell 1992], sowie die vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix [Dartsch 1990/Reidy 1985] sind entscheidende Bausteine bei Pathogenese der Restenose.



Abbildung 1.1: Histologisches Bild von zwei Koronararterienästen mit einerseits nur minimalen fibrösen Veränderungen (rechts) und andererseits hochgradiger Atherombildung (links). [aus Böcker; Pathologie]

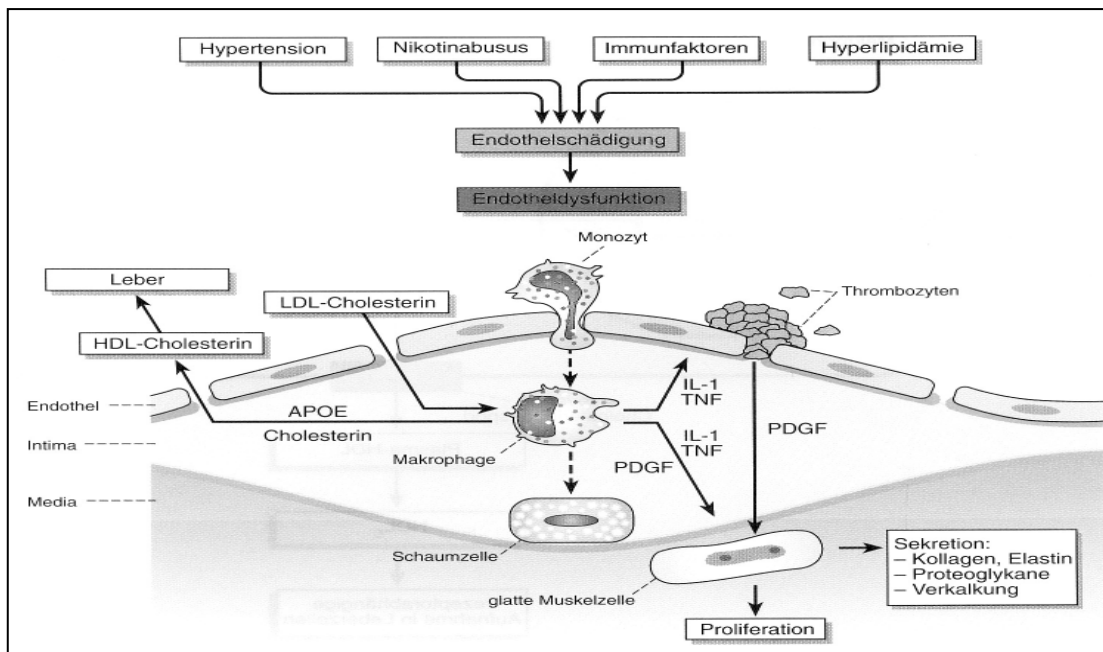


Abbildung 1.2: Synoptische Darstellung der Atherogenese [aus Böcker;Pathologie]

Klinik und Therapie der Koronarsklerose

Während der initialen Phasen der Atheromentwicklung wachsen die Plaques in der Regel nach außen in einer dem Lumen abgekehrten Richtung. Stenosen, die den Blutfluss beeinträchtigen entwickeln sich erst später. Viele dieser Plaques manifestieren sich selbst durch stabile Syndrome wie belastungsabhängige Angina pectoris oder eine Claudicatio intermittens. Eine oberflächliche Erosion des Endothels oder eine einfache Plaqueruptur bewirken einen Thrombus, der die Ursache eines akuten Myokardinfarktes sein kann [aus Harrison Innere Medizin].

Neben der medikamentösen Therapie mit Acetylsalicylsäure, Betablockern und Lipidsenkern haben sich interventionelle Kathetertechniken zur Therapie der koronaren Herzkrankheit einen festen Platz gesichert. Die primäre Erfolgsrate ist mit nahezu 90% sehr hoch. Der Langzeiterfolg nach erfolgreicher Primärtherapie wird jedoch geschmälert durch das Wiederauftreten von Stenosen. Da die Restenoseraten zwischen 25 und 40% liegen, muss es das Ziel der klinischen und experimentellen Forschung sein, den Anteil an Rezidivstenosen deutlich zu senken [aus Thiemes Innere Medizin].

Die glatte Gefäßmuskulatur

Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung intimaler Läsionen im Rahmen der Arteriosklerose [Ross, 1986] und sind Hauptbestandteil der Anhäufung fibrozellulärer Matrix bei der Genese der Restenose nach Ballonangioplastie [McBride 1988/Liu 1989]. VSMCs sind hauptsächlich in der Tunica media der Gefäßwand zu finden und sind hier für die Regelung des Gefäßtonus und des Blutdruckes zuständig. Physiologischerweise sind auch in gesunden Gefäßen VSMCs in der Tunica intima zu finden, welche sich normalerweise in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden. Untersuchungen mit ³H-Thymidin haben ergeben, dass glatte Muskelzellen in den Mitosezyklus eintreten können. Die extramediale Präsenz der VSMCs ist vor allem ein Zeichen vaskulärer Erkrankungen. Dazu kommt es zum Beispiel durch eine inflammatorische Infiltration der Gefäßwand mit Monozyten und T-Lymphozyten im Frühstadium der Arteriosklerose [Ross 1986] oder nach mechanischer Verletzung des Gefäßes während einer Ballonangioplastie. Im Gegensatz zu VSMCs der Gefäßmedia können glatte Muskelzellen nach intimaler Migration durch von

eingewanderten Monozyten produzierte Mitogene in einen synthetisierenden Phänotyp transformieren, welcher durch ein schnelles Zellwachstum und Proliferation, sowie durch Produktion extrazellulärer Matrix und Freisetzung von Wachstumsfaktoren charakterisiert ist [Liu 1989/Pauly 1994].

Dieser Vorgang nimmt wiederum Einfluss auf die Entwicklung und Migration der VSMCs der Gefäßmedia [Ross 1986/1991]. Als Auslöser dieser Zelltransformation werden aus der verletzten Gefäßwand freigesetzte Wachstumsfaktoren und Zytokine, sowie eine Entzündungsreaktion durch zirkulierende Monozyten und Makrophagen vermutet [Bowen-Pope 1985/Ross 1990].

Physiologie und Pathophysiologie des Endothels

Das Endothel ist aufgrund seiner anatomischen Position zwischen dem zirkulierenden Blut und der glatten Gefäßmuskulatur der Hauptangriffspunkt kardiovaskulärer Risikofaktoren, aber auch therapeutischer Gefäßinterventionen. Es rückt zunehmend in den Mittelpunkt der Kreislaufforschung, weil es sich mehr und mehr als hochaktives und hochdifferenziertes Stoffwechselorgan erweist. Das intakte Endothel ist eine physikalische Barriere zwischen Blut und glatter Gefäßmuskulatur. Die Endothelzellen gewährleisten eine antithrombogene Gefäßwandoberfläche. Hier werden sowohl unterschiedliche Enzyme gebildet, welche für die Aktivierung und Inaktivierung kardiovaskulärer Hormone zuständig sind, als auch Faktoren mit relaxierendem oder kontrahierendem Einfluss auf die Gefäßwand. Darüber hinaus ist das Endothel eine Quelle wachstumsregulierender Substanzen auf den glatten Gefäßmuskel.

In diesem Zusammenhang kommt vor allem dem im Endothel gebildeten Stickstoffmonoxid (NO) eine bedeutende Rolle zu. Die gefäßerweiternde Wirkung von NO ist seit langem bekannt und von Furchgott und Zawadzki 1980 zum ersten Mal beschrieben [Furchgott, Zawadzki 1980]. Sie postulieren einen sogenannten endothelialen relaxierenden Faktor (endothelial derived relaxing factor=ERDF). Heute gilt als sicher, dass ERDF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist [Palmer, Ignarro 1987].

In Säugertierzellen erfolgt die Synthese von NO über das Enzym NO-Synthetase. Als Substrat dient dabei die basische Aminosäure L-Arginin [Palmer 1988] und als

Cosubstrat molekularer Sauerstoff (O_2). NO wird in biologischen Flüssigkeiten sehr schnell inaktiviert, indem es mit physikalisch gelöstem Sauerstoff und Wasser zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) oxidiert.

Die NO-Synthetase ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches den P450-Enzymen ähnelt [Bredt 1990]. Die unterschiedlichen Isoformen kommen neben dem Endothel auch in Thrombozyten, Makrophagen, glatter Gefäßmuskulatur und Gehirn vor [Radomski 1990/Hibbs 1988/Knowles 1989]. Die NO-Synthetase kann durch L-Arginin-Analoga, wie L-N^G-Monomethyl Arginin (L-NMMA) gehemmt werden [Yang 1991/Richard 1990]. NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase im glatten Gefäßmuskel, wodurch es zu einem Anstieg an zyklischem 3'5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) und hierdurch zu einer Relaxation der Gefäßwand kommt [Rapoport 1983].

NO ist einer der potentesten körpereigenen Vasodilatoren und besonders an der Regulation von Gefäßweite und Strömung an den Koronarien beteiligt [Dole 1986]. Seine Halbwertszeit beträgt nur wenige Sekunden [Rubanyi 1986]. Neben seiner relaxierenden Wirkung ist ERDF (NO) ein potenter Hemmstoff der Plättchenadhäsion und -aggregation [Büsse 1987/Mügge 1994], vermindert den oxidativen Stress und inhibiert zudem die Proliferation glatter Muskelzellen. ERDF (NO) ist daher für den Schutz des koronararteriellen Kreislaufs ein wichtiger Faktor.

NO besitzt zahlreiche, ebenfalls im Endothel gebildete Antagonisten, wie Endothelin-1, Thromboxan A_2 und Endoperoxidasen. Ebenso entspringen dem Endothel proliferationsfördernde Substanzen, wie Basic fibroblast growth factor, Platelet derived growth factor und wiederum Endothelin.

Die endotheliale Dysfunktion

Alle bekannten Risikofaktoren, wie Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Hyperglykämie haben Teilwirkungen, die eine endotheliale Funktionsstörung bedingen, welche als ein besonders frühes Charakteristikum der Arteriosklerose betrachtet wird. Der Einstieg in die Pathogenese der Arteriosklerose ist nach heutigem Verständnis wesentlich auf eine Störung der Endothelfunktion zurückzuführen. Veränderungen der endothelialen Funktion tragen entscheidend zu den bekannten pathophysiologischen Veränderungen der koronaren Herzkrankheit bei, welche sich

durch Gefäßspasmen, Thrombusbildung und vaskuläre Proliferation manifestiert und letztendlich in der myokardialen Ischämie endet. Der zentrale Defekt der endothelialen Dysfunktion ist möglicherweise im Missverhältnis zwischen mangelhafter ERDF (NO)-Synthese bzw. -Freisetzung [Lüscher und Vanhoutte 1990/ Vanhoutte 1989] und gesteigerter Freisetzung proliferations- und kontraktionsfördernder Faktoren zu sehen.

Die Entfernung des Endothels der Gefäßwand führt zu einer Proliferation der Gefäßwand mit intimaler Hyperplasie. Durch das Endothel produzierte Wachstumsinhibitoren sind Heparin, Heparinsulfate und Transforming growth factor β [Hannan 1988]. Auf der anderen Seite werden durch das Endothel auch Wachstumsfaktoren, wie Basic fibroblast growth factor, Platelet derived growth factor und Endothelin gebildet. Unter physiologischen Bedingungen liegt ein Übergewicht der Wachstumsinhibitoren vor, welches unter pathologischen Bedingungen zugunsten der Wachstumsfaktoren abnimmt.

Betrachtet man die Synthese und Freisetzung von Vasokonstriktoren aus dem Endothel, scheint neben Angiotensin II auch Endothelin-1 (ET-1) bei der Koronarkrankheit eine bedeutende Rolle zuzukommen.

ET-1 hat zahlreiche pathophysiologische und pathologische Wirkungen, von denen vor allem die Effekte auf das kardiovaskuläre System von großem Interesse sind. So wurden bei einer Reihe von Erkrankungen, wie der Arteriosklerose [Lerman 1991], der koronaren Herzerkrankung [Liu 1990] und des pulmonalarteriellen Hypertonus [Stewart 1991/Giaid 1993] erhöhte Plasmaspiegel von ET-1 festgestellt. ET-1 gilt als eines der potentesten vasokonstriktorisches Peptide und besitzt eine wichtige Rolle bei der Regulation des lokalen Vasotonus [Rubanyi 1991/Levin 1995].

Zudem wurden erhöhte Plasmaendothelinspiegel nach Ballondilatation gefunden, welche mit dem Problem der Restenose in Verbindung gebracht werden [Tahara 1991]. An Tierversuchen konnte die proliferationsfördernde Wirkung auf intimale glatte Muskelzellen nachgewiesen werden [Azuma 1994/Kirchengast 1998]. In vivo-Studien mit ET_A/ET_B-Rezeptorantagonisten [Ferrer 1995/Douglas 1994] konnten dahingegen zeigen, dass durch die Antagonisierung von Endothelin zu einer Abnahme der Intimahyperplasie führt.

Bei ET-1 entsteht aus der kodierten mRNA zunächst Präproendothelin-1. Aus diesem geht durch Peptidasen der Vorläufer Big Endothelin-1 hervor, welches durch das endothelinkonvertierende Enzym in das fertige ET-1 umgewandelt wird [Xu 1994]. Die Synthese wird durch Stimuli, wie Angiotensin II, Adrenalin [McCumber 1989], TGF- β [Yanagisawa 1989] und weitere angeregt. Gebremst wird die ET-1-Produktion durch Faktoren, wie EDRF [Boulanger 1990], Prostaglandine [Prins 1994] und dem atrialen natriuretischen Faktor [Saijonmaa 1990]. ET-1 wird zum größten Teil in die Gefäßwand abgegeben, nur ein Viertel gelangt in das Gefäßlumen [Yoshimoto 1991]. ET-1 wird in der Zelle nicht gespeichert und besitzt eine Plasmahalbwertszeit, die nur wenige Minuten beträgt [Shiba 1989].

Die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien kardiovaskulärer Erkrankungen ist auf eine Verbesserung der Langzeitprognose primär erfolgreich behandelter Patienten gerichtet. Ein Ansatzpunkt besteht darin ein Fortschreiten der endothelialen Dysfunktion aufzuhalten bzw. die Entstehung zu unterbinden, indem versucht wird inflammatorische Vorgänge und die Thrombozytenaktivierung aufzuhalten, die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen zu hemmen, sowie den endothelabhängigen Relaxationsmechanismus, der über das NO-System vermittelt wird, zu induzieren bzw. zu potenzieren.

Betablocker

Seit Einführung des ersten Betablockers vor etwa 40 Jahren in die klinische Therapie spielt diese Substanzklasse eine wichtige Rolle in der Behandlung der arteriellen Hypertonie und der ischämischen Herzkrankheit [Yusuf 1991/Wilhelmsen 1987/Wikstrand 1991].

Für β -Adrenozeptor-Antagonisten gibt es in der Natur keine Vorbilder. Der erste wurde 1958 beschrieben. Der älteste klinisch gebrauchte ist Propranolol, welches 1964 nach systematischer Suche eingeführt wurde. β -Adrenozeptor-Antagonisten ähneln in ihrer Struktur den Katecholaminen, speziell dem Isoprenalin. Ein großer Substituent am Stickstoff macht die Antagonisten so β -Rezeptor-selektiv, dass sie auf α -Adrenozeptoren nicht mehr wirken.

Man unterscheidet zwei chemische Gruppen. Eine leitet sich vom Phenylethanolamin ab, die größere Gruppe leitet sich vom Phenoxypropanolamin ab. Hier ist in die Seitenkette eine $-O-CH_2-$ Brücke eingeschoben, der den Molekülen hohe β -Adrenozeptor-Affinität verleiht. Zu den Phenoxypropanolaminen gehören Propranolol, Atenolol, Acebutolol, Metoprolol und Bisoprolol. Carvedilol ist ein Abkömmling, in dessen Molekül zusätzlich eine α_1 -blockierende Komponente eingebaut wurde.

Durch die Blockade von β_1 -Rezeptoren wird die positiv inotrope und chronotrope Wirkung der Katecholamine am Herz und durch Blockade der β_2 -Rezeptoren deren erschlaffende Wirkung an der glatten Muskulatur aufgehoben [Mutschler und Schäfer-Korting 1996]. Mit Aufklärung der Rezeptorstruktur werden die Betablocker klassischerweise entsprechend ihrer Fähigkeit Katecholamine an ihren Zielrezeptoren kompetitiv zu hemmen in β_1 -selektive (z.B. Metoprolol, Bisoprolol, Atenolol) und nichtselektive (z.B. Propranolol) Blocker eingeteilt [Fishman 1981].

Während die nicht selektiven β -Blocker, die β_1 - und β_2 -Rezeptoren mit gleicher oder ähnlicher Affinität blockieren (z.B. Propranolol und Carvedilol), steht bei den selektiven β -Blockern (z.B. Bisoprolol, Metoprolol, *Nebivolol*) die kardiale β_1 -Blockade im Vordergrund. Therapeutisch erwünscht ist vor allem die β_1 -Blockade, unerwünschte Nebenwirkungen werden vor allem über die β_2 -Rezeptoren vermittelt und betreffen insbesondere das kardiorespiratorische System und den Stoffwechsel (Glykogenolyse, Lipolyse) [Mutschler und Schäfer-Korting 1996].

Viele β -Rezeptorenblocker besitzen vasodilatatorische Eigenschaften, welche unabhängig von der Bindung an den β -Rezeptor sind [Prichard 1986/Rosendorff 1993]. Beispielweise durch die α -blockierende Wirkung von Carvedilol [Ruffolo 1993], durch agonistische Wirkung am Dopamin-(D1)-Rezeptor [Salvetti 1986], durch einen kalziumantagonistischen Effekt [Ruffolo 1990] oder auch durch Hemmung des Angiotensin converting enzyme (ACE) [Cambridge 1987].

1.2 *Nebivolol*

Der Betablocker *Nebivolol* ist ein kompetitiver und hochkardioselektiver (β_1 -selektiver) β -Rezeptorenblocker der neueren Generation mit vasodilatierenden Eigenschaften [Janssens 1994/Van Nueten 1995]. Er besitzt eine hohe Lipophilie [Idzikowski 1991] mit der Folge einer langen Hemmwirkung am β -Rezeptor [Borchard 1996]. *Nebivolol* ist ein potenter Agonist am β_1 -Rezeptor, entfaltet jedoch am β_2 -Rezeptor eine 300-fach schwächere Wirkung. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass *Nebivolol* keine partiellen agonistischen Aktivitäten (PAA) besitzt [Janssens 1989/Loots und De Clerck 1990].

Im Gegensatz zu den bekannten β -Rezeptorenblockern wie Atenolol, Propranolol oder Pindolol tritt der blutdrucksenkende Effekt sofort nach erstmaliger Einnahme ein. Unter Dauertherapie mit *Nebivolol* konnte sowohl bei gesunden Probanden, als auch bei Patienten mit Bluthochdruck, akutem Myokardinfarkt und Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz eine Erhaltung oder sogar eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion gezeigt werden [DeCree 1991/Stoleru 1993/Goldstein 1993].

In tierexperimentellen [Gao 1991/Janssens und Cools 1994] und humanpharmakologischen [Ritter 1994/Cockroft 1995] Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die gefäßerweiternde Wirkung von *Nebivolol* über den endothelialen Stickoxidmechanismus vermittelt wird. In weiteren Versuchen (in vivo und in vitro) konnte gezeigt werden, dass *Nebivolol* andere gefäßdilatierende Eigenschaften, wie zum Beispiel α -antagonistische Effekte nicht besitzt [Janssens 1989/1991].

Chemische Eigenschaften:

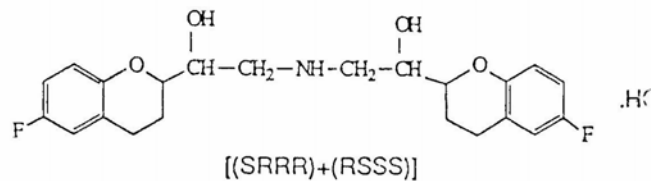
Die chemische Struktur von *Nebivolol* ähnelt nicht der typischer β -Rezeptorenblocker und besitzt vier asymmetrische Kohlenstoffatome, woraus sich 10 mögliche Stereoisomere ergeben: vier Razemate (enantiomerische Paare) und zwei Meso-Formen [Janssens 1991].

Nebivolol ($C_{22}H_{25}F_2NO_4$) oder genauer *dl-Nebivolol* ist ein razematisches Gemisch eines enantiomerischen Paares:

- SRRR (dextro-Isomer R 67138) und
- RSSS (levo-Isomer R 67145)

Das *d*-Isomer besitzt eine 175-fach höhere Affinität zum β_1 -Rezeptor als das *l*-Isomer. Die vasodilatatorische Eigenschaft der beiden Isomere ist jedoch vergleichbar, was auf einen rezeptorunabhängigen Mechanismus hinweist

Abbildung 1.3 : Strukturformel *Nebivolol*, Molekulargewicht 405,44



[Anonymous,1989]

1.3 Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Wie bereits oben ausgeführt sind an der Pathogenese von Restenosen nach primär erfolgreicher Ballondilatation zahlreiche ineinander greifende Mechanismen beteiligt, wobei der intimalen Hyperplasie durch Migration und Proliferation glatter Muskelzellen eine bedeutende Rolle zukommt. Dabei ist vor allem klinisch von Bedeutung, ob durch eine spezifische medikamentöse Behandlung solche unerwünschten Veränderungen am Herz- und Gefäßsystem günstig beeinflusst werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Betablocker *Nebivolol* in Zellversuchen auf antiproliferative Eigenschaften untersucht. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten humaner koronararterieller glatter Muskelzellen und Endothelzellen unter *Nebivolol*exposition unterschiedlicher Dauer in Proliferationstests beobachtet.

Daraus ergab sich ein weiterer Ansatz, die hierbei nachgewiesene antiproliferative Potenz von *Nebivolol* mit anderen Betablockern zu vergleichen.

Tierexperimentelle Studien an isolierten Koronararterien von Kaninchen und Schweinen haben gezeigt, dass *Nebivolol* im Gegensatz zu anderen β -Blockern wie Propranolol, Carvedilol und Celiprolol die Fähigkeit besitzt, den endothelabhängigen Relaxationsmechanismus, der über das NO-System vermittelt wird zu potenzieren [Gao 1991/Janssens und Cools 1994].

Diese Fähigkeit von *Nebivolol* sollte nun auch in der Kultur humaner koronararterieller Endothelzellen nachgewiesen werden, durch die Bestimmung der NO-Abgabe in das Zellkulturmedium unter dem Einfluss der Substanz.

In den letzten Jahren zeigte sich für Endothelin-1 eine zunehmend wichtige Rolle bei der Atherogenese. In der Kultur humaner koronararterieller Endothelzellen sollte nun überprüft werden, ob sich durch *Nebivolol* ein Effekt auf die Sekretion von ET-1 in das Zellkulturmedium erzielen lässt.

Mittels einer nicht-radioaktiven in-situ Hybridisierung, die auf Digoxigenin-Markierung der Hybridisierungssonde basiert, konnte der Einfluss von *Nebivolol* auf die prä-pro ET-1 mRNA-Synthese und somit auf die ET-1-Synthese sichtbar gemacht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellen

Die Isolierung der koronararteriellen glatten Muskelzellen (hSMC) erfolgte aus menschlichen Herzkranzgefäßen. Diese Koronararterien wurden aus bei Herztransplantationen explantierten Herzen gewonnen und uns freundlicherweise von Herrn Prof. G. Fenchel und Herrn Dr. S. Pfeiffer, Herz-Kreislaufzentrum Dresden, zur Verfügung gestellt. Die beiden männlichen Spender im Alter von 38 und 55 Jahren waren an einer Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) erkrankt. Präoperativ standen beide Patienten unter einer Dauertherapie mit Digitoxin, Furosemid, Enalapril und Warfarin. An den explantierten Herzen konnte makroskopisch keine Arteriosklerose festgestellt werden.

Für die Isolierung der glatten Muskelzellen wurde jeweils der proximale Gefäßanteil (4 cm) des Ramus interventricularis anterior (RIVA) verwendet.

Alle SMC-Kulturen wurden bis zur fünften Passage für die Zellkulturen und die nachfolgenden Versuche verwendet.

Die koronararteriellen Endothelzellen (HCAEC) wurden über die Firma Bio Whittacker/Clonetics, Verviers/Belgien bezogen.

Es sind Zellen aus nicht krankhaft veränderten humanen Koronararterien. Die Zellen wurden in kryokonserviertem Zustand (Endothelzellmedium mit 10% fötalem Kälberserum und 10% Dimethylsulfoxid [DMSO]) in Ampullen zu ca. 500000 Zellen zugestellt. Die Kulturen wurden bis zur fünften Passage für die Zellkulturen und die nachfolgenden Versuche verwendet.

Alle Kulturen wurden bei 37°C, in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ im Inkubator (Heraeus) inkubiert.

2.2 Kulturmedien und deren Zusammensetzung

- Waymouth's Medium MB 752/1 (WM) , (Gibco BRL, Eggenstein)
- Ham F 12 Nutrient Mixture (F 12) , (Gibco BRL, Eggenstein)

- Fötale Kälberserum (FCS), (Seromed-Serotec):
Das Serum wird zur Inaktivierung des Komplementsystems im Wasserbad für 30 Minuten auf 56°C erwärmt, portioniert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.
- Penicillin/ Streptomycin (Gibco BRL, Eggenstein)
- Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2 mit Zusätzen (EGM2-MV Bullet Kit) (CC-3202), (Clonetics/ Bio Whittacker, Belgien)

Als Zellkulturmedium für die humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen wurde ein Gemisch aus Waymouth's Medium (50%) und Ham F 12-Nährlösung (50%) verwendet. Das Gemisch wurde mit 10% FCS und mit 100 U/ml Penicillin und 1 µg/ml Streptomycin supplementiert.

Als Zellkulturmedium für die humanen koronararteriellen Endothelzellen wurde das Basalmedium EGM2 verwendet und mit den folgenden Zusätzen supplementiert:

5% FCS, 0,1% Long R insulin-like growth-factor-1, 0,4% Human fibroblast growth factor-B, 0,1% Ascorbinsäure, 0,1% Gentamycin und Amphotericin B, 0,04% Hydrocortison, 0,1% Endothelial growth factor vascular human (rekombiniert), 0,1% Epidermal growth factor human (rekombiniert).

Als Einfriermedium wurde ein Gemisch aus 90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid verwendet.

2.3 Kulturgefäße

- Kulturflaschen, Wachstumsfläche 75 cm² (Costar, Wodenheim)
- Makrotiterplatten (6-Loch-Schalen), Wachstumsfläche pro Loch 9,5 cm²; (Greiner, Nürtingen)
- Makrotiterplatten (12-Loch-Schalen); (Costar)
- Makrotiterplatten (24-Loch-Schalen); (Costar)
- Mikrotiterplatten 3075 (96-Well-Platten); (Costar)
- Quadriperm-Schalen (für 4 Objektträger); (Costar)

2.4 Chemikalien

Enzyme:

- Trypsin EDTA (Gibco BRL, Eggenstein). Verwendet zur Ablösung der am Kulturschalenboden adhärenen Zellen.

Pufferlösungen (selbst hergestellt):

- *PBS*: Phosphate Buffered Saline ohne Kalzium und Magnesium, pH 7,2

NaCl 8,00 g/l

KCl 0,20 g/l

Na₂HPO₄ x 2H₂O 1,15 g/l

KH₂PO₄ 0,20 g/l

Tablettenform, pyrogenfreie Chemikalien (Gibco BRL, Eggenstein). Für die Zellkultur werden 2 Tabletten mit pyrogenfreiem sterilem AMPUWA-Wasser angesetzt und eine Stunde bei 121°C autoklaviert. Die Lösung kann bei 4 °C aufbewahrt werden.

- *PBS⁺*: Wie *PBS*, mit zusätzlich

MgCl₂ x 6H₂O 0,1 g/l (Stammlösung 1,0 g/l; 100-fach-Konzentrat)

CaCl₂ x 2H₂O 0,132 g/l (Stammlösung 13,2 g/l)

- *Substratpuffer für BrdU-Immunhistochemie:*

100 mM Tris-HCl (MG 157,6 g/mol)

100 mM NaCl (MG 58,44 g/mol)

50 mM MgCl₂ (MG 203,3 g/mol)

Ein pH von 9,5 bei 20°C wird durch Zugabe von 1 N NaOH eingestellt.

- *Hepes-Puffer für Annexin-Färbung*

10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4

140 mM NaCl

5 mM CaCl₂

Wachstumsfaktoren:

- *Human Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)*; (R&D Systems, Wiesbaden)
Stammlösung 10 µg/ml in PBS⁻, 0,1% Rinderserumalbumin (BSA; Sigma Deisenhofen)
- *Transforming Growth Factor β_1 (TGF β_1)*; (R&D Systems, Wiesbaden)
Stammlösung 10 µg/ml in 4 M/l HCl, 0,1% BSA
- *Human Platelet-Derived Growth Factor AA (PDGF AA)*; (R&D Systems, Wiesbaden)
Stammlösung 10 µg/ml in 4 M/l HCl, 0,1% BSA
- *Human Platelet-Derived Growth Factor BB (PDGF BB)*; (R&D Systems, Wiesbaden)
Stammlösung 10 µg/ml in 4 M/l HCl, 0,1% BSA

MTT-Test:

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazolium-bromid, (Sigma)

100 mg MTT werden in 20 ml PBS⁻ gelöst und sterilfiltriert.

Zell-Proliferations-ELISA (kolorimetrisch):

(Cat.No. 1647229, Boehringer Mannheim)

- BrdU-Markierungsreagenz, 10 mM 5-Brom-2'-desoxyuridin in PBS, pH 7,4, 1000-fach konzentriert, steril
- Fixierungs-Denaturierungslösung
- Anti-BrdU-POD. Monoklonaler Antikörper von Maus-Maus-Hybridzellen (Klon BMG 6H8, Fab-Fragmente), Peroxydase-konjugiert (POD)
- Antikörper-Verdünnungslösung
- Waschpuffer, PBS, 10-fach konzentriert
- Substratlösung, Tetramethylbenzidin (TMB)

Zell-Proliferations-Reagens WST-1 (kolorimetrisch):

(Cat.No. 1644807, Boehringer Mannheim)

Das Reagens ist eine Fertiglösung welche das Tetrazoliumsalz 4-[3-(4-Iodophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzen Disulfonat (WST-1) und ein elektronenübertragendes Reagens enthält. Gelöst in PBS, steril.

Test zur Bestimmung von Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide Colorimetric Assay):

(Cat.No. 1756281, Boehringer Mannheim)

- Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5
- Coenzym-Tabletten; pro Tablette 0,5 mg NADPH, 0,01 FAD
- Nitrat-Reduktase (4U)
- Farbreagenz I: Sulfanilamid
- Farbreagenz II: N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid
- Kaliumnitrat-Standard (Ausgangskonzentration 80,0 mM)

ELISA zur Bestimmung von Endothelin-1

(Immundiagnostik, Bensheim)

Hemmstoffe der NO-Synthetase

- *L-NAME*(Sigma,Deisenhofen):
Kompetitiver Hemmstoff der NO-Synthetase. Molekulargewicht 269,7g/mol
Konzentration im Versuch 100 µmol/l, in Zellkulturmedium gelöst und sterilfiltriert.
- *L-NMMA* (Sigma,Deisenhofen):
L-Arginin-Analogon. Hemmt kompetitiv alle drei Isoformen der NO-Synthetase.
Molekulargewicht 248,3 g/mol, Konzentration im Versuch 100 µmol/l, in Zellkulturmedium gelöst und sterilfiltriert.

ELISA zur Bestimmung des apoptotischen Zelltodes (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}):

(Cat.No. 1774425, Boehringer Mannheim)

- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon H11-4) gegen die Histone H1, H2A, H2B, H3, H4; Biotin-markiert.

- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon MCA-33) gegen ein- und doppelsträngige DNA. Peroxydase-konjugiert.
- Positivkontrolle: DNA-Histon-Komplex
- Inkubationspuffer, Lysepuffer, Substratpuffer
- ABTS[®]-Substrattabletten (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat]) für die Peroxydase
- Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte

Sonstige Chemikalien:

Chemikalie	Firma, Ort
Aceton	Sigma, Deisenhofen
APES (Aminopropyltriethoxy-Silan)	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Bio Whittaker, Maryland, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)	Merck, Darmstadt
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Millipore	Millipore
NaOH (Natronlauge)	Merck, Darmstadt
Pyrogenfreies steriles AMPUWA-Wasser	Fresenius
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.5 Färbungen

Immunhistochemischer Assay zum Nachweis von 5-Brom-2'-desoxy-uridin (BrdU Labeling and Detection Kit II):

(Cat.No. 1299964, Boehringer Mannheim)

- BrdU-Markierungsreagenz, Stammlösung (1000-fach konzentriert) in 10mM PBS, steril.
- Waschpuffer, PBS (10-fach konzentriert)
- Inkubationspuffer: 66 mM Tris-Puffer, 0,66 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol
- Anti-BrdU, monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon BMC 9318, IgG1)
- Nukleasen zur Denaturierung von DNA in PBS/ Glycerin
- Anti-Maus-Ig gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase (AP) aus Schaf
- Substratpuffer: 100 mM Tris-Puffer, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5
- Farbsubstratlösungen: Nitroblautetrazoliumsalz (NBT), 75 mg/ml und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-phosphat (X-Phosphat).

Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von Apoptose

(Annexin-V-Fluos-Staining Kit):

(Cat.No. 1858777, Boehringer Mannheim)

- Annexin-V-Fluorescein, gebrauchsfertige Lösung Ca²⁺-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin.
- Propidiumjodid, gebrauchsfertige Lösung DNA-Farbstoff, passiert nur permeabilisierte Membranen nekrotischer Zellen
- Inkubationspuffer (Hepes-Puffer)
10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂

Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion apoptotischer Kerne mittels DAPI-Färbung

- 4'6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid x 2 HCl (Boehringer Mannheim),
Stocklösung: 5 µg DAPI pro 1 ml Methanol, bei -20°C stabil

Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von apoptotischen Zellen

(In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein)

(Cat.No. 1684795, Boehringer Mannheim)

- Enzym-Lösung, Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) aus Kälberthymus in Stabilisierungspuffer (10-fach konzentriert)
- Markierungslösung, Nukleotid-Mischung in Reaktionspuffer (1-fach konzentriert)
- Permeabilisierungslösung: 0,1% Triton X-100 in 0,1% Na-Citrat
- DNase 1µg/ml für Positivkontrolle

Fixierlösungen:

- Ethanol-Fixans: 70% Ethanol in 50 mM Glycin-Puffer, pH 2,0
2% Formaldehyd (in PBS⁺)
- 2% Formaldehyd (in PBS⁺); 4% Formaldehyd (inPBS⁺), pH 7,4
- Methanol
- Aceton

Eindeckmedien:

- Kaisers- Glycerin-Gelatine (Merck)
- Mowiol 4-88 (Hoechst AG), Einschlussmedium für Immunfluoreszenzpräparate
- Glycerol/PBS + HOECHST 33258

2.6 Antikörper

Erstantikörper:

- Anti-BrdU (Boehringer Mannheim):
Monoklonaler Antikörper von Maus-Maus-Hybridzellen (Klon BMG 6H8, Fab-Fragmente) gegen das Thymidin-Basenalogon 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon MCA-33) gegen ein- und doppelsträngige DNA. Peroxydase-konjugiert (Boehringer Mannheim).

- Anti- α -smooth muscle actin (Progen, Heidelberg):
Monoklonaler Antikörper aus der Maus (IgG_{2 α} , Klon asm-1) gegen das synthetisch hergestellte NH₂-terminale Decapeptid der α -Isoform des glattmuskulären Aktins.
- Anti-von-Willebrand-Faktor (Boehringer Mannheim):
Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (IgG_{1K}) gegen das humane von-Willebrand-Protein.

Zweitantikörper:

- Anti-Maus-Ig gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase (AP) aus Schaf
- Anti-Maus IgG aus der Ziege, Fab-spezifisch, FITC-konjugiert zur Fluoreszenzmikroskopie (Sigma, Deisenhofen)
- Anti-Kaninchen IgG aus dem Schaf, TRITC-konjugiert zur Fluoreszenzmikroskopie (Sigma, Deisenhofen)

***In situ*-Hybridisierung**

Plasmide:

pGEM541ET-1: Vektor pGEM T-easy, der als Insert die c-DNA von Endothelin-1 (Nt. 503-1043) enthält.

Digoxigenin-Markierung und in vitro-Transkription von DNA-Sonden:

Zur in vitro-Transkription wurden der MAXIscript von Ambion verwendet

- 10 x Transcription Buffer
200 mM Tris-HCl, pH 7,5
30 mM MgCl₂
10 mM Spermidin
50 mM NaCl
- 10 x DIG RNA Labeling Mix, pH 7,5 (Roche)
10 mM ATP
10 mM CTP
10 mM GTP

- 10 mM UTP
- 3,5 mM DIG-11-UTP
- Sp6/T7 RNA-Polymerase (10U/ μ l) + Ribonuclease Inhibitor (5U/ μ l)

Puffer und Enzyme:

- *5 x TE, pH 7,5*
 - 50 mM Tris
 - 5 mM EDTA
- *20 x SSC, pH 7*
 - 300 mM Natriumcitrat
 - 3 M NaCl
- *50 x Denhardt's Lösung (Sigma)*
 - 1 % Polyvinylchlorid
 - 1 % Pyrrolidon
 - 2 % BSA
- *Hybridisierungslösung*
 - 50% Formamid
 - 5 x SSC
 - 5% Dextransulfat
 - 500 μ g/ml Hefe t-RNA (Roche)
 - 200 μ g/ml Heringssperma DNA (Promega)
 - 10% 0,1 M DTT in 20 x SSC
 - 1 x Denhardt's Lösung
- *Blockierungslösungen*
 - 3 % BSA (in PBS⁺)
 - 0,5% BSA/PBS/T20
- Proteinkinase K in 5 x TE, Stocklösung 100 μ g/ml (Promega)
- RNase A in 2 x SSC, Stocklösung 100 μ g/ml (Promega)
- Lamm-Serum (Gibco BRL)
- Anti-Digoxigenin, mit kolloidalen Goldpartikeln gekoppelter anti-DIG-Antikörper, 1:30 (Roche)

- Silver Enhancement Reagens, Developer aus gepufferten reduzierenden Reagenzien, Enhancer aus gepufferter Silbersalzlösung (Boehringer Mannheim)

2.7 Pharmakologische Testsubstanzen

Substanz	Firma, Ort
<i>Nebivolol</i>	Berlin Chemie, Berlin
Carvedilol	Roche, Mannheim
Propranolol	Sigma Deisenhofen
Bisoprolol	Merck, Darmstadt
Metoprolol	Sigma Deisenhofen

2.8 Sonstige Materialien

Material	Firma, Ort
Ablebefolie für Mikrotiterplatten	
Blue Cups 10 ml, 25 ml	Greiner, Frickenhausen
Bechergläser 200ml, 500 ml	Schott
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	Langenbrink, Emmendingen
Farbdiapositivfilme 100 ASA, 400 ASA	Fuji
Mehrkanalpipette	Labsystems, Helsinki
Multipipette	Eppendorf, Hamburg

Neubauer-Zählkammer	Assistent
Pasteur-Pipetten 150 mm, 230 mm	Fortuna
Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Costar
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Safelock 2 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzen 1 ml	Braun
Sterilfilter Dynagard 0,2 µm	Microgon
Ultrafilter (Centrisart cut-off 10000)	

2.9 Geräte

Gerät	Firma, Ort
Mikroskop Axiovert	Zeiss, Oberkochen
Kamera	Polaroid
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus, Fellbach
Photometer	Beckmann
Hybridisierungsöfen	Amersham Life Science
MR 3001 K Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
pH-Meter	Wissenschaftl. techn. Werkstätten, Weilheim
Pipettboy plus	Tecnorma, Valiselen (CH)
Präparierbesteck	Erbe
Reax 2000 Vortexer	Heidolph, Kehlheim
Shaker	Heidolph
Sterilbank Lamin Air [®] HB 2472	Heraeus, Fellbach
Tischautoklav	Wolf, Geislingen

Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Julabo
Zentrifugen: Biofuge 13; Megafuge 1.0; Megafuge 2,0R	Heraeus, Fellbach

2.10 Isolierung und Kultivierung humaner koronararterieller glatter Muskelzellen und Endothelzellen

Alle Arbeitsschritte bei der Zellisolierung und Kultivierung erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Sterilbank. Sämtliche Kulturmedien und Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf die Brutschranktemperatur von 37°C erwärmt.

Isolierung glatter Muskelzellen aus Koronargefäßen des Menschen:

Die Koronargefäße werden im Rahmen einer Organtransplantation unter sterilen Bedingungen präpariert, entnommen und in Transportmedium (HEPES-gepuffertes DMEM) zur weiteren Aufbereitung im Labor verschickt. Vor Präparation [Axel 1996/Brehm 2000] wird eine silikonbeschichtete Präparationsschale unter der Sterilbank 30 Minuten unter UV-Licht sterilisiert. Die Koronargefäße werden dem Transportmedium entnommen und in der Präparationsschale mit Präparationsnadeln festgesteckt. Die Gefäßstücke werden mehrmals mit Präparationsmedium gespült, anschließend wird das perivaskuläre Fett- und Bindegewebe mit einer Präparationsschere entfernt. Das Blutgefäß wird dann der Länge nach aufgeschnitten, mit der Lumenseite nach oben in der Präparationsschale fixiert und abermals mit Präparationsmedium gespült.

Die Endothelzellen werden vorsichtig durch Abrollen eines sterilen Wattestäbchens über die Lumenseite abgeschabt. In das so deendothelialisierte Gefäßstück wird mit einem Skalpell ein Raster von ca. 5 x 5 mm quadratischen Mediastücken bis auf Höhe der Adventitia geschnitten. Die Mediastücke werden mit der Pinzette abgezogen und in eine Kulturschale gelegt. Die Gewebstücke werden dann mit einer Schere klein zerschnitten und auf dem Schalenboden verteilt. Anschließend werden die Mediastücke

im Inkubator bei 37°C ohne Kulturmedium angetrocknet. Nach drei Stunden wird Kulturmedium hinzugegeben. Nach 24 Stunden wird ein Kulturmediumwechsel vorgenommen, um nicht-adhärenente Zellen, Zelldebris und Blutbestandteile zu entfernen. Nach 10 Tagen kommt es zur ersten Aussprossung von glatten Muskelzellen aus den Koronargefäßen. Diese werden in Zellkulturflaschen transferiert und weiter passagiert. Um für spätere Experimente auf identisches Zellausgangsmaterial zurückgreifen zu können, werden die nicht für Experimente benötigten Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung gelagert (siehe Kap. 2.2.5 Kryokonservierung). Für die Versuche wurden koronararterielle glatte Muskelzellen der dritten bis fünften Passage verwendet.

Vorbereitung und Kultivierung der Endothelzellen:

Die humanen koronararteriellen Endothelzellen wurden von einem kommerziellen Anbieter (Clonetics[®], Bio Whittacker) bezogen. Die Zellen wurden in kryokonserviertem Zustand auf Trockeneis zugestellt und sofort nach der Auslieferung aufgetaut und weiterverarbeitet. Das Kryoröhrchen wird vor dem Öffnen dreimal mit der Pinzette durch eine Flamme gezogen, danach mit der Pinzette geöffnet und die Öffnung nochmals kurz durch die Flamme gezogen. Mit einer kleinen Pipette (2 ml) wird vorgewärmtes Endothelzellmedium (EGM2-MV) in das Kryoröhrchen gegeben, einige Male hin- und hergesaugt um die Zellen zu resuspendieren und anschließend in eine mit Kollagen beschichtete, mit 10 ml Kulturmedium gefüllte Zellkulturflasche (25 cm²) gegeben. Dieser Vorgang wird mit jeweils frischem Medium so lange wiederholt bis die Zellen komplett aufgetaut sind und der Inhalt des Kryoröhrchens sich in der Kulturflasche befindet. Der Inhalt der Zellkulturflasche wird nun auf insgesamt 5 Kulturflaschen à 25 cm² verteilt (2 ml der Zellsuspension pro Flasche). Anschließend wird jeweils 10 ml frisches Medium zugegeben, die Flaschen verschlossen und im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂ inkubiert. Durch das CO₂/HCO₃-Puffersystem wird ein pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 gehalten. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 Stunden um Reste des Frostschutzmittels DMSO und nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Weitere Medienwechsel erfolgen in 2-tägigen Abständen. Die Kulturen werden regelmäßig mikroskopisch auf ihre Zellmorphologie und ihr Wachstumsverhalten untersucht. Haben die Endothelzellen

eine Konfluenz von 70-90% erreicht werden sie mit Trypsin abgelöst und auf ca. 5 neue Zellkulturflaschen transferiert (siehe Kap. 2.2.4 Transfer der Zellen).

Die nicht für die Experimente benötigten Zellen werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung gelagert (siehe Kap. 2.2.5 Kryokonservierung).

Für die Versuche wurden koronararterielle Endothelzellen der dritten bis fünften Passage verwendet.

Kultivierung der glatten Muskelzellen (SMC):

Mit den SMC-Kulturen wird in ähnlicher Weise wie mit den Endothelzellkulturen verfahren. Der Auftauvorgang kryokonservierter SMC ist identisch zu dem bei Endothelzellen. Sie werden im gleichen Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium der glatten Muskelzellen (WM/F 12) wird ebenfalls jeden zweiten Tag gewechselt, die Kulturen regelmäßig mikroskopisch auf ihre Zellmorphologie und ihr Wachstumsverhalten untersucht. Nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen mit Trypsin abgelöst und auf ca. 5 neue Zellkulturflaschen transferiert (siehe Kap. 2.2.4 Transfer der Zellen).

Transfer der Zellen:

Dieser Arbeitsvorgang ist bei beiden Zellarten identisch. Für die Endothelzellen wurde das Trypsin jedoch von der Fa. Bio Whittacker bezogen.

Das Medium wird mit einer sterilen Pasteurpipette aus dem Kulturgefäß abgesaugt. Dann werden die am Boden adhärenen Zellen mit PBS⁻ gespült, das PBS wird wieder abgesaugt. Anschließend werden 2 ml Trypsin hinzupipettiert und die Kulturflaschen für 3 min bei Endothelzellen und 5 min bei glatten Muskelzellen nochmals in den Brutschrank gestellt. Die Zellen lösen sich durch das proteolytisch wirkende Trypsin vom Kulturflaschenboden und runden sich ab. Dieser Vorgang wird lichtmikroskopisch kontrolliert. Durch Anklopfen des Kulturgefäßes werden noch anhaftende Zellen vom Kulturgefäßboden gelöst, dann wird die Trypsinaktivität durch Zugabe des jeweiligen Zellkulturmediums gestoppt. Die Zellzahl wird durch auszählen mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Im Anschluss werden die Zellen in gewünschter Verdünnung in Kulturgefäße mit Kulturmedium überführt.

Kryokonservierung der Zellen:

Der Vorgang der Kryokonservierung wird bei beiden Zellarten in der gleichen Art und Weise durchgeführt.

Zunächst wird so vorgegangen wie beim Zelltransfer. Die Zellsuspension wird jedoch nicht erneut ausgesät, sondern in Fötalem Kälberserum (FCS) aufgenommen und über 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellsediment in eiskaltem Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert. Dann wird die Suspension in 1 ml-Portionen auf die bei -20°C vorgekühlten Kryoröhrchen verteilt, sofort für 1-2 Stunden bei -20°C und für weitere 24 Stunden bei -80°C tiefgefroren. Danach werden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Auftauen der Zellen:

Die tiefgefrorenen Zellen werden in auf 37°C erwärmtes Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension über 5 Minuten bei 500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand mit dem zytotoxischen DMSO wird abgesaugt. Das Zellsediment wird in ein Kulturgefäß mit frischem Kulturmedium aufgenommen und in den Brutschrank gestellt. Eine mikroskopische Beurteilung der Zellen, sowie ein Wechsel des Kulturmediums erfolgen nach 24 Stunden.

2.11 Mikroskopische Präparate**DAPI-Färbung:**

DAPI (Diamidino-Phenylindol-Dihydrochlorid) ist ein Reagens zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von DNA in von Mykoplasmen infizierten Zellen.

Es wird zunächst eine Zellkultur auf in Sechslöchschalen ausgelegten sterilen Deckgläsern ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert. Das Kulturmedium wird dann abgesaugt und die Deckgläser mit PBS⁺ gewaschen. Nun werden 200 µl der DAPI-Stocklösung (5 µl DAPI/ml Methanol) mit 9,8 ml Methanol verdünnt und jeweils 2 ml des Lösungsansatzes über die Deckgläser gegeben. Anschließend werden die Zellen im

Brutschrank für 20-30 Minuten inkubiert. Falls keine weiteren Färbungen durchgeführt werden, werden die Deckgläser erneut mehrmals mit PBS⁺ gewaschen und in Mowiol eingeschlossen. Die Untersuchung erfolgt fluoreszenzmikroskopisch bei Rotanregung. DAPI komplexiert mit doppelsträngiger DNA. Die Zellkerne fluoreszieren blau-weiß. Eine Infektion mit Mykoplasmen würde als kleine blau-weiße Punkte zwischen den Zellen und auf der Zelloberfläche zu erkennen sein.

Diese Färbung wurde des Weiteren dazu verwendet, um den Einfluss von *Nebivolol* auf die Zellkernmorphologie zu untersuchen. Hierzu wurden die Deckgläser mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen von *Nebivolol* inkubiert. Die weitere Vorgehensweise ist identisch der Färbung zum Nachweis von Mykoplasmen.

Ein normaler Zellkern färbt sich homogen blau-weiß. Bei apoptotischen Kernen kondensiert der Kern und zerfällt in Kernfragmente, welche durch diese Färbung sichtbar gemacht werden können.

Nachweis von α -glattmuskulärem Aktin:

Der Nachweis des Zytoskelettproteins α -Aktin ist ein spezifischer Marker zur Differenzierung glatter Muskelzellen.

Die Färbung erfolgt als Doppelfärbung an bereits mit DAPI markierten Deckgläsern (s.o.). Nach dem Waschen mit PBS⁺ wird der Erstantikörper anti- α -SM-Aktin in einer Konzentration von 1:50 mit den Zellen für ca. 40 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS⁺ wird für weitere ca. 30 Minuten mit dem Zweitantikörper (Anti-Maus-IgG, FITC-konjugiert) in einer Konzentration von 1:25 inkubiert. Die in PBS⁺ gewaschenen Zellen werden nun in Mowiol eingebettet und bei Blauanregung mikroskopiert. Die Aktinfilamente der glatten Muskelzellen fluoreszieren grün.

Immunhistochemie zum Nachweis von BrdU:

Der Kit dient zum immunzytochemischen Nachweis von BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin), welches anstelle von Thymidin in zelluläre DNA eingebaut wird.

Die auf sterilen Deckgläsern mit *Nebivolol* kultivierten Zellen werden in vitro kurze Zeit (ca. 30 Minuten) mit BrdU inkubiert. Die Proben werden mit Ethanol fixiert und mit dem monoklonalen Anti-BrdU-Antikörper inkubiert. Der Antikörper bindet an

BrdU, das in zelluläre DNA inkorporiert ist. Die Antikörperpräparation enthält spezifische Nukleasen, wodurch BrdU nach Fixierung mit saurem Ethanol für den Antikörper zugänglich wird. Der gebundene monoklonale Antikörper wird mit Anti-Maus-Ig-Alkalische Phosphatase inkubiert und dann durch Lichtmikroskopie nachgewiesen.

Annexin-Färbung:

In frühen Apoptose-Stadien finden Änderungen in der Zellmembran statt. Eine dieser Änderungen ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Membran, welches normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist. Annexin ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS und wird deshalb zur Detektion apoptotischer Zellen eingesetzt. Da nekrotische Zellen durch den Verlust der Membran-Integrität ebenfalls Annexin binden, empfiehlt sich eine Differenzierung der apoptotischen von nekrotischen Zellen durch die simultane Anwendung eines DNA-Farbstoffes, wie Propidiumjodid (PI).

Die auf sterilen Deckgläsern kultivierten Zellen wurden über etwa 5 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von *Nebivolol* inkubiert. Mit einer Markierungslösung aus 20 µl Annexin-V-Fluos in 1000 µl HEPES-Puffer und 20 µl Propidiumjodid wird die Analyse von Phosphatidylserin auf dem äußeren Membranlayer apoptotischer Zellmembranen durchgeführt. Zur Abgrenzung nekrotischer Zellen wird mit PI gegengefärbt.

2.12 Testsubstanz-Verdünnungsreihe

Herstellung der Verdünnungsreihen:

Um die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen nicht zu beeinträchtigen, wurden die Verdünnungsreihen jeweils am Tag der Verwendung aus der Trockensubstanz frisch hergestellt. Dazu wurde die Trockensubstanz portionsweise abgewogen und im jeweiligen Lösungsmittel unmittelbar vor Zugabe zu den Zellen gelöst. *Nebivolol* und *Carvedilol* wurden in Methanol gelöst. *Metoprolol*, *Propranolol* und *Bisoprolol* konnten aufgrund ihrer Hydrophilie in Zellkulturmedium gelöst werden. Es wurde jeweils eine 10^{-3} molare Stocklösung hergestellt und anschließend sterilfiltriert. Für die nachfolgenden Verdünnungen wurde ein Teil der höher konzentrierten Lösung mit neun Teilen Kulturmedium verdünnt.

So wurden folgende Konzentrationen ($\mu\text{mol/l}$) hergestellt: 0,1, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 100. Gleichzeitig wurde bei jedem Versuch eine Methanolkontrolle in der Verdünnung 1:100 mitgeführt.

2.13 Zugabe von Wachstumsfaktoren

Da Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Atherogenese zukommt, wurden die Proliferationstests auch unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren durchgeführt.

Die Wachstumsfaktoren wurden in folgenden Konzentrationen verwendet, die in Vorversuchen [Brehm 2000/Axel 1997] eine maximale Stimulation der glatten Muskulatur zeigten, und zur fertigen Verdünnungsreihe der Testsubstanz hinzupipettiert.

- Basic FGF 15 ng/ml
- PDGF AA 20 ng/ml
- PDGF BB 20 ng/ml
- TGF β_1 10 ng/ml

Die Zellkultur humaner koronararterieller glatter Muskelzellen wurde über 7 Tage geführt.

Ein Wechsel des Zellkulturmediums, welches mit der Testsubstanz (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) und den Wachstumsfaktoren versetzt war, erfolgte in 3-tägigen Abständen.

2.14 Proliferationstests und Messung der mitochondrialen Aktivität

Zellproliferation kann durch direkte Bestimmung der Zellzahl oder auch des mitotischen Index bestimmt werden. Alternativ kann durch indirekte Messungen die metabolische Aktivität vitaler Zellpopulationen bestimmt werden. Dies geschieht durch Tetrazoliumsalze wie MTT oder auch WST-1. Ein anderer indirekter Parameter zur Bestimmung von Zellproliferation ist die Beobachtung der DNA-Synthese durch Markierung der DNA mitotisch aktiver Zellen durch Nukleotidanaloga, wie [^3H]-Thymidin oder das hier verwendete BrdU.

Mit den Proliferationstests wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen sowohl von *Nebivolol*, als auch von weiteren Betablockern der ersten und zweiten Generation auf die mitotische und mitochondriale Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen und glatter Muskelzellen untersucht.

BrdU-ELISA:

Die Zellen werden in einer Zelldichte von 12000 Zellen/Loch bei 7-tägiger Kultivierung in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 Stunden erstmalig unterschiedlichen Verdünnungsstufen der jeweiligen Testsubstanz ausgesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C im Brutschrank und erstreckt sich über definierte Zeiträume (24 Stunden bis 14 Tage). Etwa 20 Stunden vor Ende des Versuchs wird das Pyrimidinanalogon BrdU in einer Konzentration von 100 μM zu den Zellen hinzugegeben und bis zum Abbruch mitinkubiert. Während dieser Markierungsphase wird das BrdU anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Nachdem das Kulturmedium abgesaugt wurde, werden die Zellen in einem Schritt fixiert und denaturiert durch Zugabe einer Fixierungs-Denaturierungslösung. Durch die Denaturierung der DNA wird das eingebaute BrdU für den Antikörper besser zugänglich gemacht. Nach etwa 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Fixierungs-Denaturierungslösung abgesaugt und anschließend die Antikörperlösung

zugegeben (Anti-BrdU-POD, 1:100), es folgt die erneute Inkubation für etwa 1,5 Stunden im Brutschrank. Anschließend wird die Antikörperlösung abgesaugt und die Platte dreimal mit Waschpuffer gespült. Die gebildeten Immunkomplexe werden nun durch Zugabe des Substrates in einer Substratreaktion sichtbar gemacht. Die Reaktion wird nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur durch die Zugabe von 1 M Schwefelsäure gestoppt und sofort am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Der entstandene Farbstoff und demzufolge die gemessenen Absorptionswerte korrelieren direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und somit der Anzahl proliferierender Zellen der Kulturreihe.

MTT-Test:

Das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol]-2,5 Diphenyltetrazolium-bromid) wird in aktiven Mitochondrien durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System der Atemkette zu Formazan gespalten.

Die Zellen werden in einer Zelldichte von 10000 Zellen/Loch bei 7-tägiger Kultivierung in eine 96-Loch-Mikotiterplatte ausgesät und nach 24 Stunden erstmalig unterschiedlichen Verdünnungsstufen der jeweiligen Testsubstanz ausgesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C im Brutschrank und erstreckt sich ebenfalls über definierte Zeiträume (24 Stunden bis 14 Tage). 6 Stunden vor Versuchsende werden aus jedem Loch 100 µl Kulturmedium abpipettiert und je 25 µl des in PBS⁻ gelösten gelben Farbstoff MTT zugegeben. Der Versuchsansatz wird für weitere 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nun werden 100 µl/Loch des in der Zwischenzeit gelösten SDS (1g SDS in 10 ml Aqua bidest. unter Zugabe von 29 µl 6,8 n HCl) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden an einem dunklen Ort bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wird das wasserunlösliche, dunkelbraune Formazan gelöst und kann so nach einem Tag am ELISA-Reader bei 570 nm gemessen werden. Die Absorption entspricht der Anzahl metabolisch aktiver Zellen.

WST-1-Test:

Ein weiteres Tetrazoliumsalz, welches zu Messungen der Zellproliferation und -vitalität eingesetzt wird, ist WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat). Im Gegensatz zu MTT wird es in ein wasserlösliches Produkt

gespalten und kann somit ohne die Zugabe eines Lösungsvermittlers sofort ausgewertet werden. Es besitzt darüber hinaus eine höhere Sensitivität als MTT.

Für den Versuch wird erneut eine Zellkultur in Mikrotiterplatten (MTP) angelegt mit einer Zelldichte von 10000 Zellen/Loch. Auch hier werden nach 24 Stunden erstmalig unterschiedliche Verdünnungsstufen der jeweiligen Testsubstanz zugesetzt. Die Inkubationszeiträume mit der Testsubstanz erstrecken sich über 24 oder 48 Stunden. Am Versuchsende werden aus jedem Loch 100 µl Kulturmedium abpipettiert und je 10 µl des hellroten Farbstoffes WST-1 zugegeben. Der Ansatz wird nun für 0,5 bis 1 Stunde an einem dunklen Ort bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wird durch das mitochondrial aktive Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System ein dunkelrotes, wasserlösliches Formazansalz gebildet. Nach kurzem, kräftigem Schütteln der MTP um den Farbstoff gleichmäßig im Loch zu verteilen, kann somit unmittelbar das Ergebnis am ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden. Die Absorptionsrate entspricht der Anzahl metabolisch aktiver Zellen.

2.15 Test zur Bestimmung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass Stickstoffmonoxid (NO) zahlreiche biologisch bedeutende Funktionen zukommen. Es fungiert als inter- und intrazellulärer Botenstoff, der ein breites physiologisches Wirkungsspektrum aufweist. Beispielsweise der Regulation der Gefäßweite über Neurotransmitterfunktionen.

Mit dieser Test-Kombination sollte der Einfluss von *Nebivolol* auf die NO-Freisetzung aus humanen koronararteriellen Endothelzellen Muskelzellen überprüft werden.

Die Synthese von NO erfolgt über das Enzym NO-Synthetase. NO wird in biologischen Flüssigkeiten sehr schnell inaktiviert, indem es zu Nitrit und Nitrat oxidiert. Der Nachweis von NO erfolgt über Nitrit, indem das in der Probe vorhandene Nitrat durch NADPH (Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat) in Gegenwart des Enzyms Nitrat-Reduktase zu Nitrit reduziert wird. Das bei dieser Reaktion gebildete Nitrit reagiert mit einem Farbreagenz unter Bildung eines rot-violetten Diazo-Farbstoffes, welcher die Messgröße darstellt.

Für den Versuch wird in einer 48-Loch-Platte eine Zellkultur mit 25000 Zellen/Loch angelegt. Nach 24 Stunden wird die Kultur unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Testsubstanz *Nebivolol* über einen Testzeitraum von 48 Stunden ausgesetzt. Am Ende der Inkubationsphase werden nun jedem Loch 300 µl Überstand entnommen und zusammen mit 300 µl Kalium-Phosphat-Puffer in einen Membranfilter pipettiert und über 45 Minuten bei 5300 rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wird eine Kaliumnitrat-Standardreihe (80 µM bis 0,25 µM) zur Erstellung einer Eichkurve hergestellt.

Der folgende Inkubationsansatz besteht aus Leerwert (500 µl Aqua bidest.), Proben (je 500 µl Ultrafiltrat) und Standard (je 500 µl aus der Standardreihe). Zu den Ansätzen wird nun 50 µl eines Reaktionsgemisches bestehend aus NADPH/FAD zupipettiert und gut vermischt. Nach 1 Minute werden 20 µl an Nitrat-Reduktase zugegeben, erneut vermischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wird das in den Proben vorhandene Nitrat zu Nitrit reduziert. Nun werden aus den verschiedenen Ansätzen je drei mal 150 µl in eine Mikrotiterplatte (MTP) abpipettiert. In die MTP werden zunächst 75 µl/Loch Farbreagenz I, dann 75 µl Farbreagenz II/Loch hinzupipettiert und erneut gut vermischt. Während einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur reagiert das Nitrit mit den Farbreagenzien Sulfanilamid und N-Ethylendiaminodihydrochlorid unter Bildung eines rot-violetten Diazo-Farbstoffes. Anschließend wird die Extinktion am ELISA-Reader bei 550 nm gemessen.

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt über Eichkurven, die anhand von Standard-Lösungen erstellt wurden. Dabei werden die für die Kaliumnitrat-Standardlösungen erhaltenen Extinktionsdifferenzen (Ordinate) im Koordinatensystem gegen die jeweilige Nitratkonzentration in µM (Abszisse) aufgetragen.

2.16 ELISA zur Bestimmung der Endothelin-1-Konzentration

Die Endothelin-1-Konzentrationen aus den Zellkulturüberständen humaner koronararterieller Endothelzellen wurden nach 4-tägiger Inkubation der Zellkultur mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz *Nebivolol* bestimmt.

Für die Bestimmungen wurde ein spezifischer ELISA-Test verwendet. Bei dem Test besteht eine Kreuzreaktion mit Endothelin-2, jedoch nicht mit Endothelin-3 oder Big Endothelin-1. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,38 fmol/ml [Brehm 1998a/b]

2.17 *In situ*-Hybridisierung bei Endothelzellen auf die Expression von prä-pro ET-1 unter dem Einfluss von *Nebivolol*

Die *in situ*-Hybridisierung ermöglicht die Detektion von RNA bzw. DNA in Zellen und Geweben. Mit Hilfe von RNA:RNA- *in situ*-Hybridisierungen kann die Verteilung von RNA-Sequenzen in den Präparaten untersucht, sowie eine grobe Quantifizierung der mRNA in verschiedenen Proben vorgenommen werden. Eine Möglichkeit der nicht-radioaktiven Sondenmarkierung ist der Einbau von Digoxigenin in die Ribosonde. Durch die RNA-Polymerase wird in jede 20. bis 25. Position des Transkriptes DIG-11-UTP eingebaut. Durch goldmarkierte Anti-DIG-Antikörper in Verbindung mit Silver Enhancement Reagenzien ist ein lichtmikroskopischer Nachweis der *in situ*-Hybridisierung möglich.

Digoxigenin-Markierung und *in vitro* Transkription von DNA-Sonden:

Zur *in vitro* Synthese von RNA-Transkripten, ausgehend von klonierten DNA-Templaten werden SP6-, T3- und T7-Phagen RNA-Polymerasen verwendet. Diese Phagen RNA-Polymerasen besitzen eine hohe Spezifität für ihre jeweiligen Promotoren, die eine exakte Transkription eines Stranges der Template-DNA ermöglichen.

Zur Synthese von Transkripten mit definierter Länge muss die Template-DNA mit einem Restriktionsenzym, das distal vom Promotor schneidet linearisiert werden.

Zur Synthese der DIG-markierten Sonden wurde in einem 20 µl-Ansatz 1 µg der Template-DNA mit 2 µl 10 x Transkriptions-Puffer, 2 µl DIG RNA Labeling Mix,

sowie 2 µl der entsprechenden RNA-Polymerase versetzt und 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot der Transkriptionsreaktion wurde in einem FA-RNA-Gel analysiert. Um die Template-DNA zu entfernen wurde der Ansatz 2 Minuten bei 95°C erhitzt, abgekühlt, mit 1 µl DNase I versetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die freien Nukleotide zu entfernen wurde eine NH₄OA₂/EtOH-Fällung durchgeführt. Zum DNase I behandelten Ansatz wurden 30 µl Wasser, 5 µl 5 M Ammoniumacetat und 3 Volumen 100% Ethanol gegeben und 30 Minuten bei – 20°C gekühlt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 14.000 g und 4°C wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Wiederholung der Präzipitation des Pellets in 50 µl Wasser aufgenommen und bei – 80°C gelagert.

Vorbehandlung von Objektträgern

Objektträger, die für die in situ-Hybridisierung verwendet werden, sollten mit Aminopropyltriethoxy-Silan (APES), welches durch geladene Gruppen die Bindung der Präparate unterstützt, beschichtet sein. Die mit Ethanol gereinigten Objektträger wurden 4 Stunden bei 200°C gebacken. Die Objektträger wurden je 5 Minuten in Aceton, 5 Minuten in 2 % APES/Aceton und zweimal 5 Minuten in DEPC-H₂O behandelt. Anschließend erfolgte die Trocknung der Objektträger bei 100°C. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung steril aufbewahrt.

Aussaat und Fixierung von Zellen auf Objektträgern:

Für den Versuch wurden zunächst mit APES-beschichtete Objektträger steril in Quadriperm-Schalen ausgelegt.

Die Endothelzellen wurden zweimal mit PBS⁻ gewaschen, abtrypsiniert, in 1 ml Medium aufgenommen und ausgezählt. Pro Objektträger wurden ca. 350.000 Zellen in Quadriperms ausgesät. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde nach etwa 1 Stunde Wachstumsmedium zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Kultur der Testsubstanz *Nebivolol* für etwa 10-12 Stunden in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt. Nach diesem Zeitraum wird das Kulturmedium abgesaugt und zunächst mit PBS⁺ gewaschen und zur Fixierung 20 Minuten in 2% Formaldehyd/PBS bei 4°C gelagert und nach zweimaligem Waschen in H₂O, sowie einer aufsteigenden

Alkoholreihe (je 5 Minuten 50% → 70% → 95% → 99%) in 99% Ethanol bei – 20°C aufbewahrt.

Vorbereitung der Proben, Prähybridisierung, Hybridisierung, Posthybridisierung, Markierung und Färbung:

Um unspezifische Hybridisierung und Wechselwirkungen mit Proteinen oder anderen Zellbestandteilen zu verhindern, müssen vor der in situ-Hybridisierung die Proben vorbehandelt werden, außerdem erleichtert die Permeabilisierung das Eindringen der Sonden und Nachweisreagenzien.

Um unspezifische Hintergrundsignale zu vermeiden wurde eine Prähybridisierung durchgeführt. Dabei wurden 30 µl der Hybridisierungslösung auf die Objektträger gegeben und 3 Stunden bei 44°C Hybridisierungstemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Die Präparate wurden in H₂O gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 Minuten 50% → 70% → 95% → 99%) dehydriert und im Anschluss an der Luft getrocknet. Nach Linearisierung der DIG-markierten Sonde 5 Minuten bei 95°C in Hybridisierungslösung wurden 30 µl des Ansatzes auf die Zellen gegeben und bei 46°C über Nacht inkubiert.

Zur Entfernung der unspezifisch hybridisierten Sonden wurden 4 Waschschrte bei sinkender Temperatur und abnehmender Salzkonzentration durchgeführt; 5 x SSC bei 48°C, 2 x SSC bei 42°C, 1 x SSC bei 37°C, 0,5 x SSC bei 37°C je 15 Minuten. Da RNA-Sonden recht fest am Präparat haften, mussten die restlichen nicht-hybridisierten Sonden durch eine RNaseA-Behandlung entfernt werden. Das Enzym spaltet nur Einzelstränge, die doppelsträngigen Hybridmoleküle werden nicht angegriffen. Dazu wurden die Präparate 20 Minuten bei 37°C mit 10 µg RNase A inkubiert und erneut 30 Minuten in 0,5 x SSC gewaschen.

Um eine unspezifische Bindung des goldmarkierten Anti-DIG-Antikörpers und somit ein Hintergrundsignal zu vermeiden, wurden die Präparate 30 Minuten in 1% BSA/2% Schafserum/PBS/Tween 20 geblockt. Die Antikörperbindung erfolgte 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:30 in 1% BSA/PBS/Tween 20. Die Objektträger wurden anschließend zweimal in PBS/Tween 20 und fünfmal in deionisiertem Wasser gewaschen. Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit der Goldfärbung erfolgte eine Silberpräzipitation. Dazu wurde die Developer- und Enhancer – Lösung im Verhältnis

1:1 gemischt und 50 µl der Mischung auf das Präparat gegeben. Hierbei entsteht durch Silberablagerung auf kolloidalen Goldpartikeln ein braunes bis schwarzes Signal, welches mikroskopisch beobachtet wurde und nach Einsetzen der Silberpräzipitation durch dreimaliges Waschen mit deionisiertem Wasser unterbrochen wurde. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit Maiers Hämalaunlösung und die Eindeckelung der Präparate mit Kaisers Gelatine.

2.18 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte über die Varianzanalyse. Mit Hilfe des Students-Newman-Keuler Test wurden die Daten auf statistische Signifikanz überprüft. Ergebnisse bei denen zwei oder mehr Behandlungsgruppen untersucht wurden, wurden durch den Zwei-Wege-ANOVA [Axel 1997/Brehm 2000] überprüft. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet, ein $p < 0,01$ wurde als hochsignifikant angesehen. Die Werte wurden als Prozentzahl bezogen auf Kontrollkulturen ausgedrückt. Jeder Versuch wurde in 6-facher Ausfertigung durchgeführt. Für die statistischen Vergleiche wurden Mittelwerte \pm SEM gebildet. Für jeden Versuch wurden ausschließlich Zellen eines Spenders verwendet. Der IC_{50} wurde als die Konzentration definiert, bei der eine 50%-ige Inhibition verzeichnet werden konnte.

3 ERGEBNISSE

3.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung humaner koronararterieller Endothelzellen und glatter Muskelzellen

Isolierung und Kultivierung humaner koronararterieller Endothelzellen:

Die koronararteriellen Endothelzellen (HCAEC) stammen aus nicht krankhaft veränderten humanen Koronararterien und wurden als Reinkulturen von der Firma Bio Whittacker/Clonetics (Verviers, Belgien) bezogen. Die Zellen wurden bereits vor Auslieferung auf Vitalität, Wachstumsverhalten und Wachstumsrate getestet. Außerdem wurde eine Kontamination mit Mykoplasmen, Viren, Pilzen und Bakterien durch Tests ausgeschlossen [siehe auch Kap. 2.2.1].

Die Zellen sind adhärent am Boden der Kulturflasche und wachsen in kleinen Kolonien. Als Zeichen der Wachstumsaktivität zeigen sich mitotische Figuren. Bei Endothelzellen kann es zu einer irreversiblen Kontaktinhibition kommen, wenn die Kultur länger als zwei Tage im konfluenten Zustand gehalten wird. Deshalb wurde die Kultur bereits bei einer 90%-igen Konfluenz passagiert.

Charakterisierung humaner koronararterieller Endothelzellen:

Die Endothelzellen wurden bereits vor Auslieferung durch den Nachweis des von Willebrand Faktor VIII und von acetyliertem LDL identifiziert.

Eine Verunreinigung mit glatten Muskelzellen wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung gegen α -glattmuskuläres Aktin ausgeschlossen.

Isolierung und Kultivierung humaner koronararterieller glatter Muskelzellen:

Die Isolierung glatter Muskelzellen aus Mediaexplantaten führt zu Reinkulturen [siehe Kap. 2.2.1]. Die Zellen sind am Boden des Kulturgefäßes adhärent, besitzen eine spindelförmige Gestalt und wachsen in fischzugartigen Strukturen. Im Gegensatz zu den Endothelzellen besitzen die glatten Muskelzellen keine Kontaktinhibition und zeigen im postkonfluenten Zustand das typische „hill and valley“ Wachstumsmuster mit der Bildung knotenartiger Strukturen.

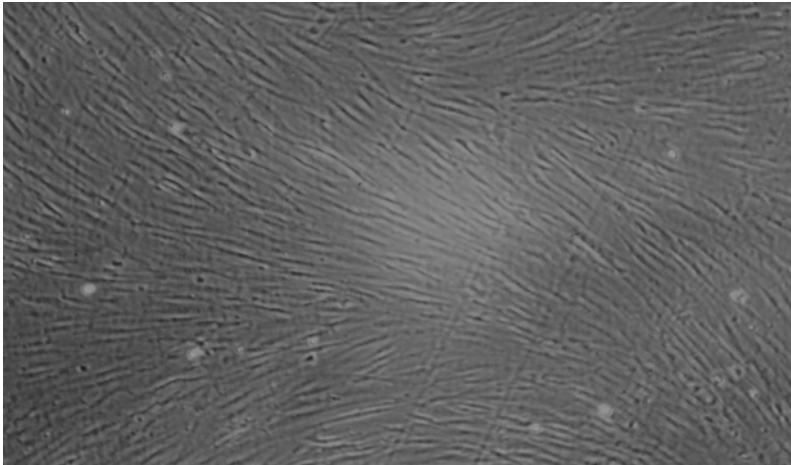


Abbildung 3.1: Humane koronararterielle glatte Muskelzellen, nativ

Charakterisierung humaner koronararterieller glatter Muskelzellen:

Die glatten Muskelzellen wurden durch den Nachweis von α -glattmuskulärem Aktin in einer Immunfluoreszenzfärbung identifiziert. Eine Verunreinigung durch Endothelzellen wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den von Willebrandt-Faktor VIII ausgeschlossen, hierbei würden eventuell vorhandene Endothelzellen rot fluoreszieren.

Eine Kontamination durch Mykoplasmen wurde mit einer DAPI-Färbung überprüft. Außer den blau fluoreszierenden Zellkernen konnte keine extrazelluläre doppelsträngige DNA und somit keine Mykoplasmenkontamination nachgewiesen werden.

3.2 Einfluss von *Nebivolol* auf die Proliferation und mitochondriale Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen

Welchen Einfluss zeigt der β -Rezeptorenblocker *Nebivolol* auf das Wachstumsverhalten koronararterieller Endothelzellen?

Zur Klärung dieser Frage kamen zum einen ein BrdU-ELISA zum Einsatz, durch welchen die Proliferation der Zellen bestimmt werden konnte. Des Weiteren wurde durch den MTT-Test die mitochondriale Aktivität als Zeichen der Vitalität der Zellen überprüft.

Für beide Ansätze wurden Zellen desselben Spenders und derselben Passage in Mikrotiterplatten ausgesät. Der Versuchsaufbau und die Versuchsbedingungen waren durch eine parallele Durchführung beider Tests identisch, wodurch die Zusammengehörigkeit der Ergebnisse gewährleistet werden kann.

3.2.1 Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen nach 7 Tagen Dauerbehandlung mit *Nebivolol*

Einen Tag nach Aussaat der Zellen kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen am Boden der Mikrotiterplatte (MTP) adhärent sind und Wachstumsaktivität eintritt. Dies wurde durch eine mikroskopische Kontrolle der MTPs überprüft.

Im Anschluss wurden die Zellen der Testsubstanz *Nebivolol* in Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 $\mu\text{mol/l}$ ausgesetzt und so über 7 Tage inkubiert. Die *Nebivolol*-Verdünnungsreihe wurde alle zwei Tage im Rahmen des Kulturmediumwechsels über die gesamte Versuchsdauer erneuert.

BrdU-ELISA nach 7 Tagen Dauerbehandlung

Tabelle 3.1: BrdU-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=12), Prozentangaben bezogen auf die Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	97,03	95,02	89,51	65,67	50,66	51,87	45,60
s	12,40	14,30	6,54	8,55	10,58	7,26	9,85	4,70

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

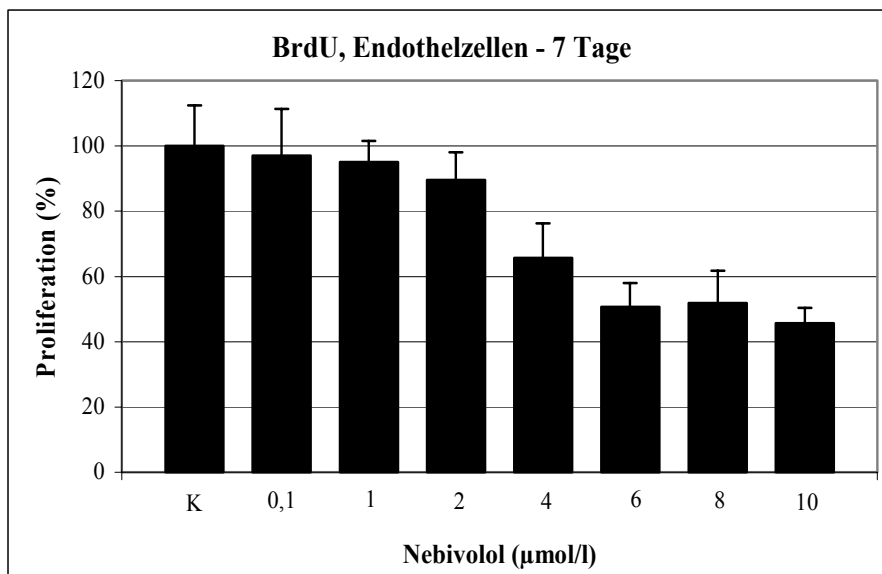


Abbildung 3.2: Auswirkung der Dauerinkubation koronararterieller Endothelzellen mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die Proliferation bei einer Testdauer von 7 Tagen

Bei einer Testdauer von 7 Tagen bewirkt *Nebivolol* ab einer Konzentration von 4 $\mu\text{mol/l}$ eine signifikante Hemmung der Proliferation koronararterieller Endothelzellen auf 65,67%. Die IC_{50} liegt zwischen 6 und 8 $\mu\text{mol/l}$.

Mitochondriale Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen nach 7 Tagen Dauerbehandlung mit *Nebivolol*

Tabelle 3.2: MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=12), Angaben in Prozent bezogen auf die Kontrolle

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	77,77	76,57	64,09	53,13	33,43	26,34	22,60
s	23,72	17,86	18,78	19,61	15,43	9,22	4,38	2,28

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

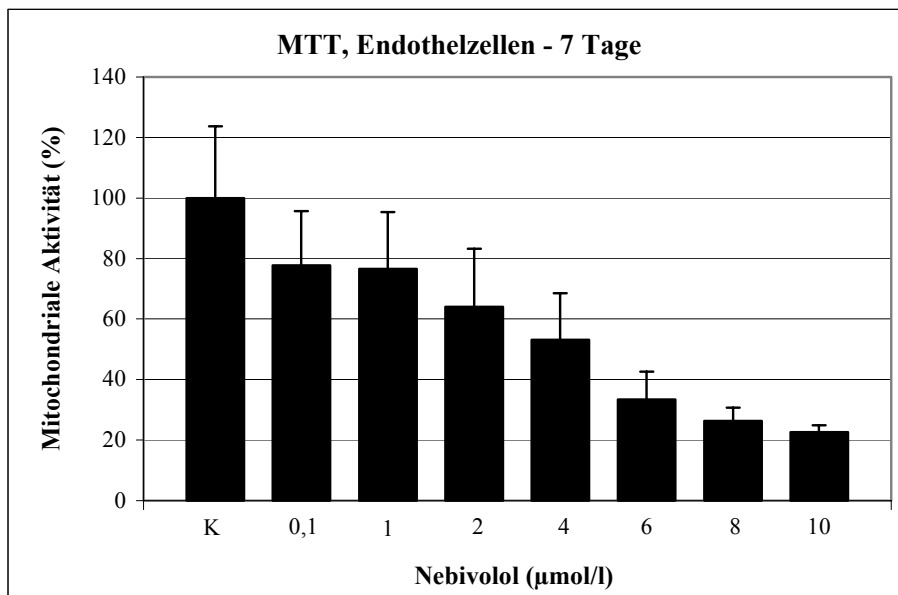


Abbildung 3.3: Auswirkung der Dauerinkubation koronararterieller Endothelzellen mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die mitochondriale Aktivität bei einer Testdauer von 7 Tagen

Im MTT-Test zeigt die Aktivität der Endothelzellen einen etwas stärkeren Abfall als die Proliferation im BrdU-Test. Die IC_{50} liegt etwa zwischen 4 und 6 $\mu\text{mol/l}$. Bei 10 $\mu\text{mol/l}$ sind noch etwa 25% der Zellen metabolisch aktiv.

Mitochondriale Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen nach 7 Tagen Dauerbehandlung mit *Nebivolol* und Hemmung der NO-Synthetase

Um eine Abhängigkeit zwischen verminderter Aktivität der endothelialen NO-Synthetase und der Stoffwechselaktivität koronararterieller Endothelzellen zu überprüfen, wurde simultan zur 7-tägigen Dauerbehandlung mit *Nebivolol* eine kompetitive Hemmung der endothelialen NO-Synthetase mittels L-NAME in einer Konzentration von 100 µmol/l durchgeführt.

Tabelle 3.3: MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [µmol/l] und Hemmung der endothelialen NO-Synthetase mittels L-NAME, Testdauer 7 Tage (n=12), Angaben in Prozent bezogen auf die Kontrolle

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	92,30	89,84	75,44	54,33	37,25	20,45	24,40
s	21,28	26,06	23,80	19,04	12,12	11,43	5,49	3,25

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

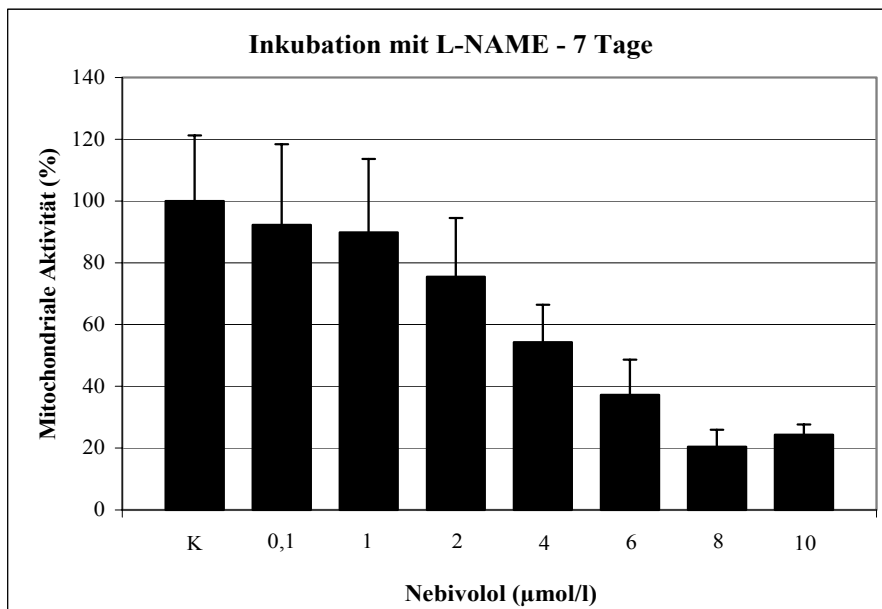


Abbildung 3.4:

Auswirkung der Dauerinkubation koronararterieller Endothelzellen mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die mitochondriale Aktivität unter simultaner Hemmung der endothelialen NO-Synthetase mittels L-NAME bei einer Testdauer von 7 Tagen

Es zeigt sich, dass unter kompetitiver Hemmung der endothelialen NO-Synthetase mittels L-NAME kein zusätzlicher Effekt auf die Stoffwechselaktivität der Endothelzellen entsteht. Die Werte liegen in etwa im Bereich der Dauerinkubation über 7 Tage ohne die Zugabe von L-NAME.

Die Hemmung der Stoffwechselaktivität durch *Nebivolol* scheint somit einem vom NO-System unabhängigen Mechanismus zu folgen.

3.2.2 Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen nach Einmalgaben von *Nebivolol* über 24 und 48 Stunden

Zur Klärung der Frage, ob auch kürzere Einwirkzeiten von *Nebivolol* ausreichen um die koronararteriellen Endothelzellen nachhaltig in ihrer Proliferation zu hemmen, wurden weitere Versuche mit kürzeren Inkubationszeiten durchgeführt.

Hierbei kam der WST-Test zum Einsatz, wie MTT ebenfalls ein Tetrazoliumsalz, welches im Testeinsatz eine höhere Sensitivität zeigt.

BrdU-ELISA nach Einmalgabe von *Nebivolol* über 24 Stunden

Tabelle 3.4: BrdU-Ergebnisse nach Einmalgabe von *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 24 Stunden (n=12), Prozentangaben bezogen auf die Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	107,10	122,70	123,40	102,60	46,15	22,57	45,80
s	12,92	14,94	10,33	11,01	13,05	17,29	6,98	23,80

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

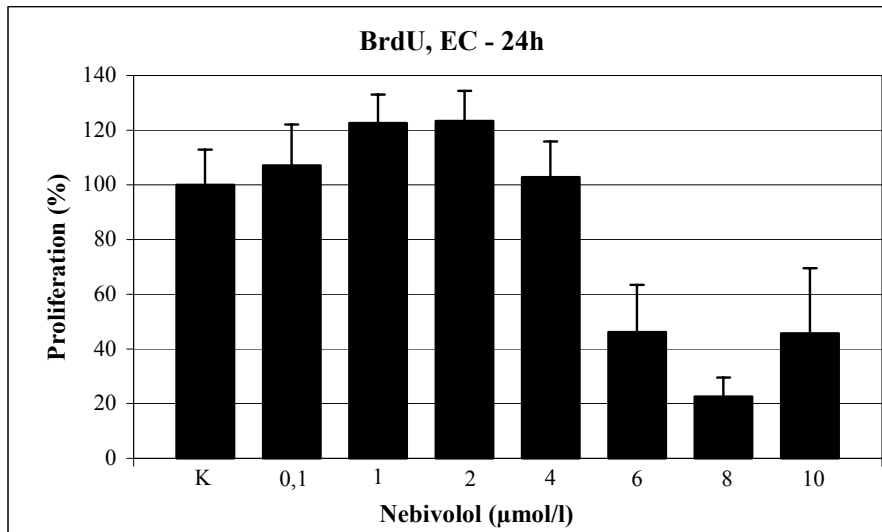


Abbildung 3.5: Auswirkung der Einmalgabe von *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die Proliferation koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 24 Stunden

Auch die wesentlich kürzere Einwirkzeit von 24 Stunden von *Nebivolol* reicht aus, um die koronararteriellen Endothelzellen nachhaltig in ihrem Wachstum zu bremsen. Während es initial im Bereich der Konzentrationen 0,1 bis 2 µmol/l zu einem leichten Anstieg der Proliferation kommt, zeigt sich erneut ab 6 µmol/l ein deutlicher Abfall der Wachstumsrate auf 46,15% im Vergleich zur Kontrolle.

Verifikation der mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen mittels WST-Test nach Einmalgabe von *Nebivolol* über 24 Stunden

Tabelle 3.5: WST-Ergebnisse nach Einmalgabe von *Nebivolol* [µmol/l], Testdauer 24 Stunden (n=12), Prozentangaben bezogen auf die Kontrolle

<i>WST</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	98,57	106,70	107,80	116,99	84,86	69,96	58,10
s	7,80	13,85	11,87	13,50	14,36	18,72	15,86	5,60

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

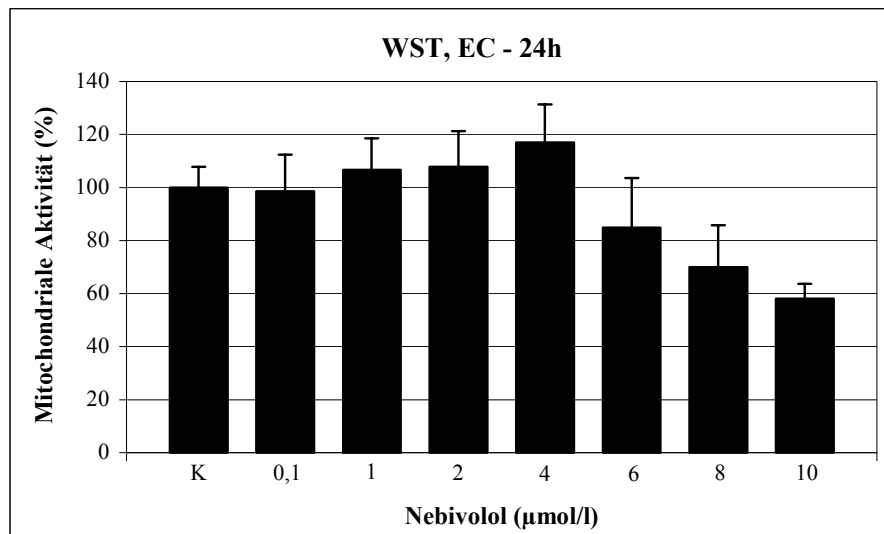


Abbildung 3.6: Auswirkung der Einmalgabe von *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 24 Stunden

Der WST-Test zeigt im Vergleich zum BrdU ebenfalls einen leichten Anstieg der Aktivität im Bereich der niedrigen Konzentrationen bis 4 µmol/l. Dann kommt es allerdings auch hier zu einem signifikanten Abfall der mitochondrialen Aktivität bis 84,86% im Vergleich zur Kontrolle bei 6 µmol/l. Im höheren Konzentrationsbereich kam es zu einem Abfall bis maximal 58,1% bei 10 µmol/l. Im Vergleich dazu war im BrdU-Test in diesem Konzentrationsbereich eine geringere Proliferationsrate festzustellen. Obwohl eine geringere Proliferationsaktivität nachgewiesen wurde, zeigten die Zellen nach 24 Stunden noch eine mitochondriale Aktivität von annähernd 60% bezogen auf die Kontrolle im höchsten Konzentrationsbereich.

Verifikation der mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller Endothelzellen mittels WST-Test nach Einmalgabe von *Nebivolol* über 48 Stunden

Tabelle 3.6:

WST-Ergebnisse nach Einmalgabe von *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 48 Stunden (n=12), Prozentangaben bezogen auf die Kontrolle

WST	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	127,80	148,90	136,90	129,10	112,50	39,22	5,41
s	7,41	9,50	4,15	6,57	15,88	7,57	4,93	1,36

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

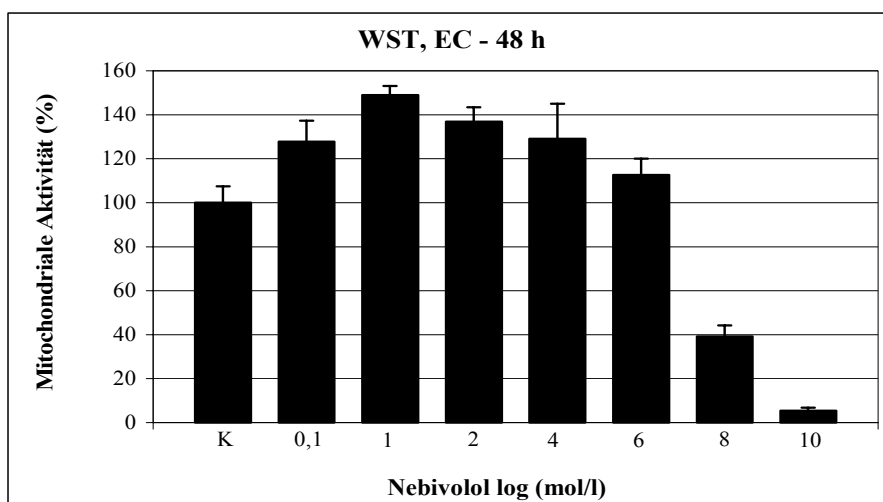


Abbildung 3.7:

Auswirkung der Einmalgabe von *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 48 Stunden (n=12).

Wie schon im Test über 24 Stunden, zeigt sich auch während einer Inkubationsdauer von 48 Stunden ein Anstieg der mitochondrialen Aktivität koronararterieller Endothelzellen in den Konzentrationsbereichen bis 6 $\mu\text{mol/l}$. Allerdings kommt es dann zu einem rapiden Abfall der mitochondrialen Aktivität unter 50% bezogen auf die Kontrolle ab einer Konzentration von 8 $\mu\text{mol/l}$. Im Bereich der höchsten Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ lässt sich nach 48-stündiger Behandlung nahezu keine Stoffwechselaktivität mehr nachweisen.

3.3 Einfluss von *Nebivolol* auf die Proliferation und mitochondriale Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen

Die Wirkung des β -Blocker *Nebivolol* auf das Wachstumsverhalten humaner koronararterieller glatter Muskelzellen wurde ebenfalls durch die BrdU- und MTT-Testung untersucht.

Versuchsaufbau und Versuchsbedingungen wurden auch bei dieser Zellart durch eine parallele Durchführung beider Tests gleichgehalten.

3.3.1 Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen nach 7 und 14 Tagen Dauerbehandlung mit *Nebivolol*

Einen Tag nach Aussaat, nachdem die Zellen am Boden der Mikrotiterplatte adhärent sind, wurde die Zellkultur der Testsubstanz *Nebivolol* in Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 $\mu\text{mol/l}$ ausgesetzt und so über 7 bzw. 14 Tage inkubiert. Die *Nebivolol*-Verdünnungsreihe wurde 2-tägig im Rahmen des Mediumwechsels über die gesamte Versuchsdauer erneuert.

BrdU-ELISA nach 7 Tagen Dauerbehandlung mit *Nebivolol*

Tabelle 3.7: BrdU-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=12), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	116,10	110,60	107,00	82,55	60,21	38,77	16,50
s	14,08	11,72	15,00	12,36	15,69	10,46	9,45	2,27

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

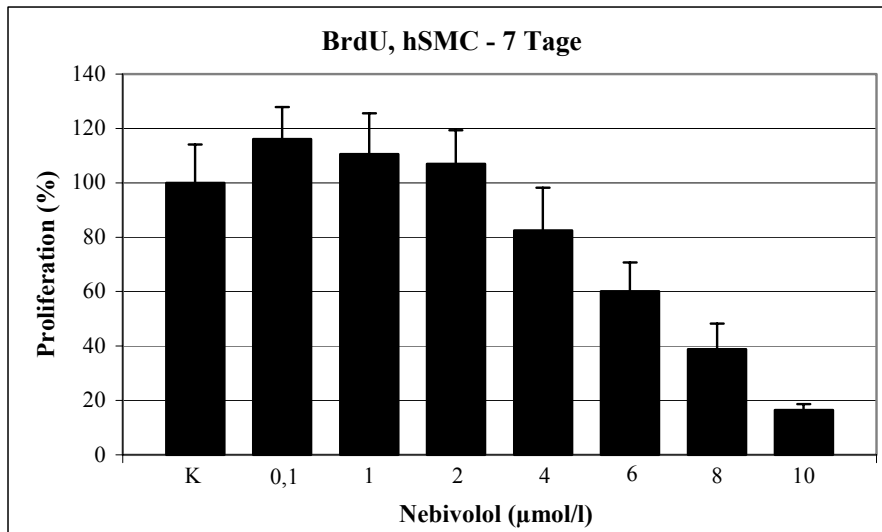


Abbildung 3.8: Auswirkung der Dauerinkubation koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die Proliferation bei einer Testdauer von 7 Tagen

Bei einer Testdauer von 7 Tagen bewirkt *Nebivolol* ab einer Konzentration von 4 µmol/l eine signifikante Hemmung der Proliferation auf 82,55% bezogen auf den Kontrollansatz. Der IC₅₀ liegt zwischen 6 und 8 µmol/l.

BrdU-ELISA nach 14 Tagen Dauerbehandlung mit *Nebivolol*

Um die Auswirkung einer verlängerten Einwirkung von *Nebivolol* auf koronararterielle glatte Muskelzellen zu überprüfen, wurde nun die Testdauer auf 14 Tage ausgedehnt.

Tabelle 3.8: BrdU-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [µmol/l], Testdauer 14 Tage (n=12), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	100,50	101,90	101,30	114,00	95,35	51,29	8,44
s	12,71	7,91	14,05	18,12	3,13	9,46	7,08	2,45

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

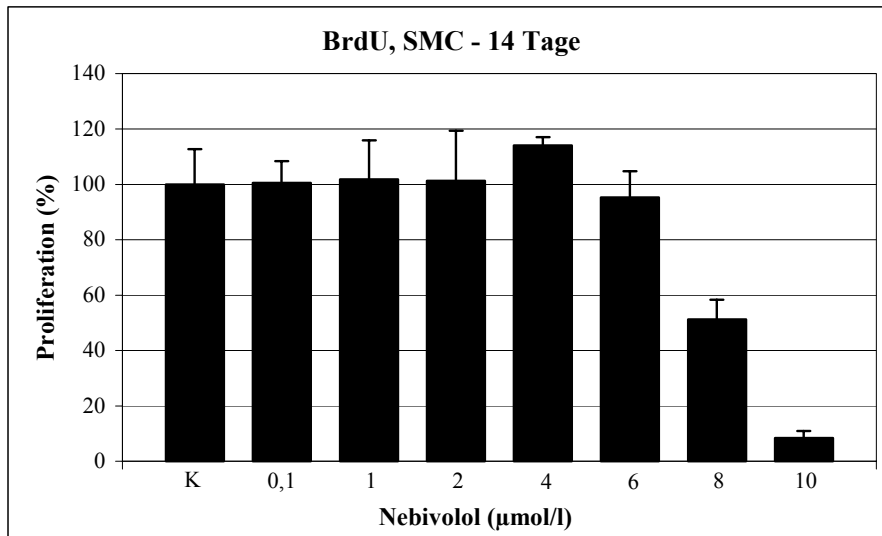


Abbildung 3.9: Auswirkung der Dauerinkubation koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die Proliferation bei einer Testdauer von 14 Tagen

Bei einer Testdauer von 14 Tagen sieht man ab einer Konzentration von 8 µmol/l eine deutliche Hemmung der Proliferationsrate. In den darunter liegenden Konzentrationsbereichen bis 0,1 µmol/l kann bei längerer Inkubation keine Proliferationshemmung mehr nachgewiesen werden.

Mitochondriale Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen nach 7 Tagen Dauerbehandlung mit *Nebivolol*

Tabelle 3.9: MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [µmol/l], Testdauer 7 Tage (n=12), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	106,70	85,65	76,97	89,89	82,18	58,77	20,70
s	11,85	11,28	8,51	8,52	6,82	15,87	17,04	6,00

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

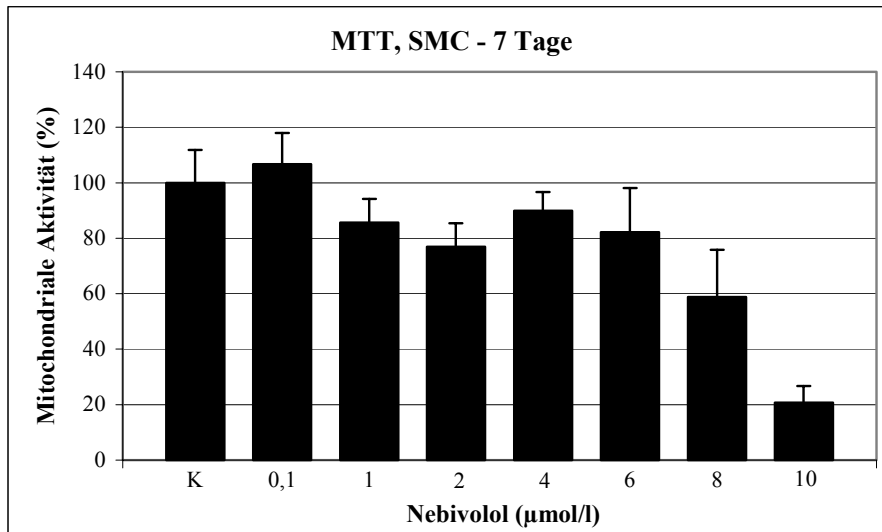


Abbildung 3.10: Auswirkung der Dauerinkubation koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die mitochondriale Aktivität bei einer Testdauer von 7 Tagen

Im MTT-Test zeigt die Aktivität der Zellen im Vergleich zum BrdU keinen so kontinuierlichen und steilen Abfall. Bis zur Konzentration von 8 µmol/l undulieren die Werte zwischen 80 und 100% bis es dann zu einem deutlichen Abfall bis minimal 20% bezogen auf die Kontrolle bei einer Konzentration von 10 µmol/l kommt.

Insgesamt zeigt sich bei 7-tägiger Inkubation ein geringerer Aktivitätsverlust der koronararteriellen glatten Muskelzellen im Vergleich zur Proliferation. Bis zu einer Konzentration von 8 µmol/l hält sich die Aktivität auf einem Plateau von etwa 80%, während die Proliferation schon früher und deutlicher abfällt.

Mitochondriale Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen nach 14 Tagen Dauerbehandlung mit *Nebivolol*

Tabelle 3.10: MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 14 Tage (n=12), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	127,40	125,20	117,40	71,87	51,41	47,13	34,20
s	25,99	30,89	24,37	21,74	14,08	9,03	8,93	9,54

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

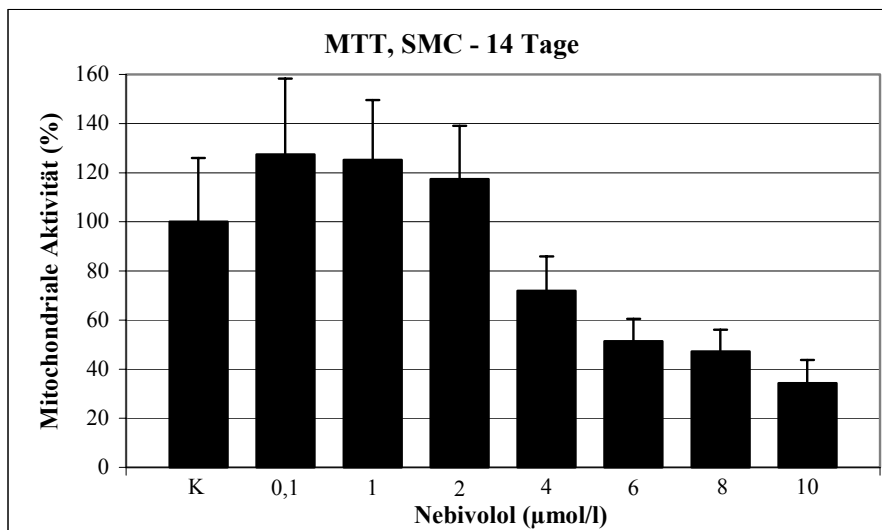


Abbildung 3.11: Auswirkung der Dauerinkubation koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die mitochondriale Aktivität bei einer Testdauer von 14 Tagen

Nachdem die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei 14-tägiger Inkubation erst ab einer Konzentration von 8 $\mu\text{mol/l}$ signifikant reduziert ist, zeigt sich ein Abfall der Stoffwechselaktivität bereits ab 4 $\mu\text{mol/l}$. Allerdings zeigt sich kein rascher Abfall der mitochondrialen Aktivität, welche bei 10 $\mu\text{mol/l}$ noch etwa bei 35% liegt, während die Proliferationsrate unter 10% liegt.

Verifikation der mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen nach 7 Tagen Dauerbehandlung mit *Nebivolol* mittels WST-Test

Tabelle 3.11: WST-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=12), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>WST</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	161,00	128,40	141,30	123,60	81,79	49,71	32,10
s	12,26	3,15	8,03	7,78	8,07	8,29	9,42	1,63

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

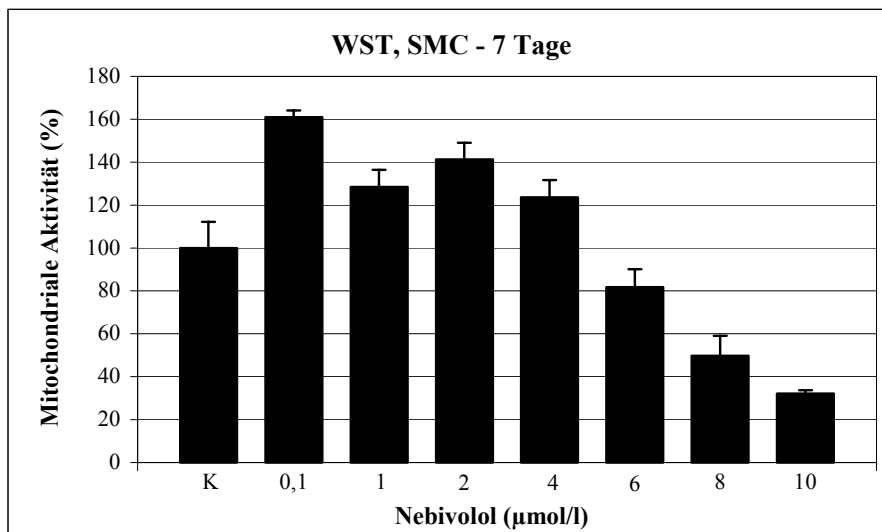


Abbildung 3.12: Auswirkung der Dauerinkubation koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die mitochondriale Aktivität bei einer Testdauer von 7 Tagen

Ähnlich wie auch im MTT-Test zeigt sich auch beim WST-Test bis 6 $\mu\text{mol/l}$ eine Stoffwechselaktivität die über 80% im Vergleich zur Kontrolle liegt. Im Bereich der niedrigen Konzentrationen liegt die Stoffwechselaktivität sogar über der Kontrolle. Ein Abfall auf etwa 50% beginnt ab 8 $\mu\text{mol/l}$, im Bereich der höchsten Konzentration liegt die Aktivität noch bei etwa 30%, während die Proliferationsrate bei 16% liegt.

3.3.2 Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen nach Einmalgaben von *Nebivolol* über 24 und 48 Stunden

BrdU-ELISA nach Einmalgabe von *Nebivolol* nach 24 Stunden

Tabelle 3.12: BrdU-Ergebnisse nach Einmalgabe von *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 24 Stunden, Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	102,70	105,30	99,06	89,51	82,95	72,56	65,10
s	23,64	21,21	9,53	8,14	9,83	9,09	4,88	3,56

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

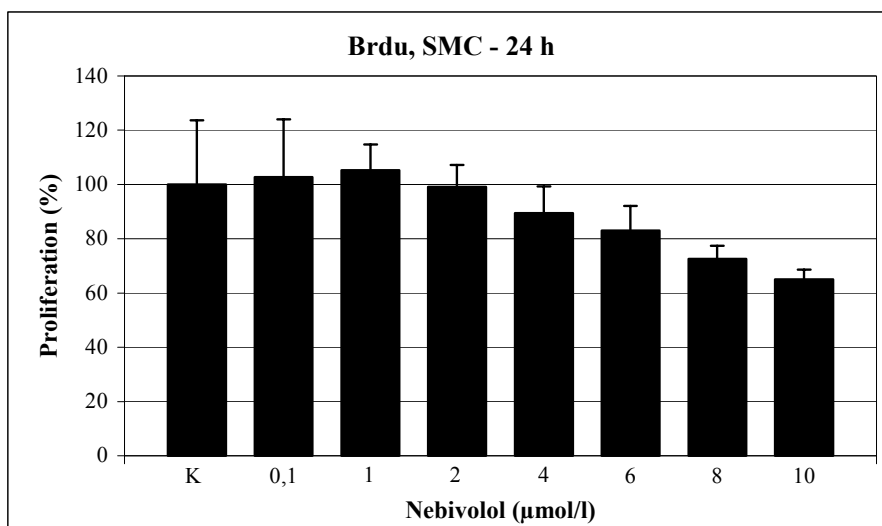


Abbildung 3.13: Auswirkung der Dauerinkubation koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die Proliferation bei einer Testdauer von 24 Stunden

Im Diagramm zeigt sich ein langsamer, aber kontinuierlicher Abfall der Proliferationsrate. Ab einer Konzentration von 6 $\mu\text{mol/l}$ liegt die Wachstumsrate bei etwa 80% und fällt auf minimal 65% ab.

Auch die wesentlich kürzere Einwirkzeit von 24 Stunden von *Nebivolol* reicht aus, um die koronararteriellen glatten Muskelzellen signifikant in ihrem Wachstum zu bremsen.

Verifikation der mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen nach Einmalgaben von *Nebivolol* mittels WST-Test über 24 Stunden

Tabelle 3.13: WST-Ergebnisse nach Einmalgabe von *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 24 Stunden (n=12), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>WST</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	97,19	92,75	92,24	102,04	85,46	86,78	71,80
s	7,86	2,87	5,57	2,53	3,48	2,28	9,89	3,60

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

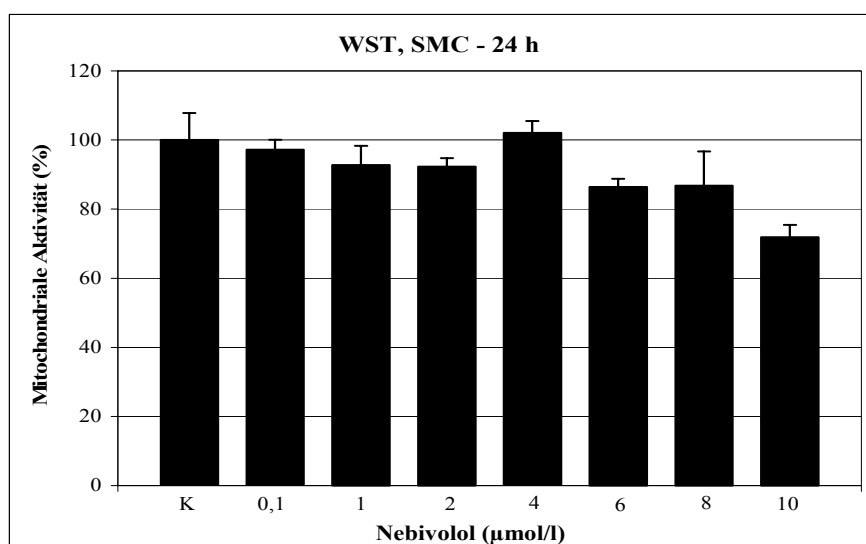


Abbildung 3.14: Auswirkung der Einmalgabe von *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 24 Stunden

Bei einer verkürzten Testdauer auf 24 Stunden sieht man über den Konzentrationsbereich bis 8 $\mu\text{mol/l}$ relativ stabile Werte, welche nicht unter 85% im Vergleich zur Kontrolle sinken. In den Proben der höchsten Konzentration bei 10 $\mu\text{mol/l}$ lässt sich immer noch eine Stoffwechselaktivität der koronararteriellen glatten Muskelzellen von über 70% nachweisen.

Auch hier lässt sich nachweisen, dass die Proliferationsrate deutlicher abfällt, als die mitochondriale Aktivität.

BrdU-ELISA bei humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen nach Einmalgabe von *Nebivolol* über 48 Stunden

Tabelle 3.14: BrdU-Ergebnisse nach Einmalgabe von *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 48 Stunden (n=12), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	111,60	95,56	94,88	91,09	77,54	50,47	43,00
s	7,00	7,32	14,63	3,13	6,43	14,96	10,78	5,75

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

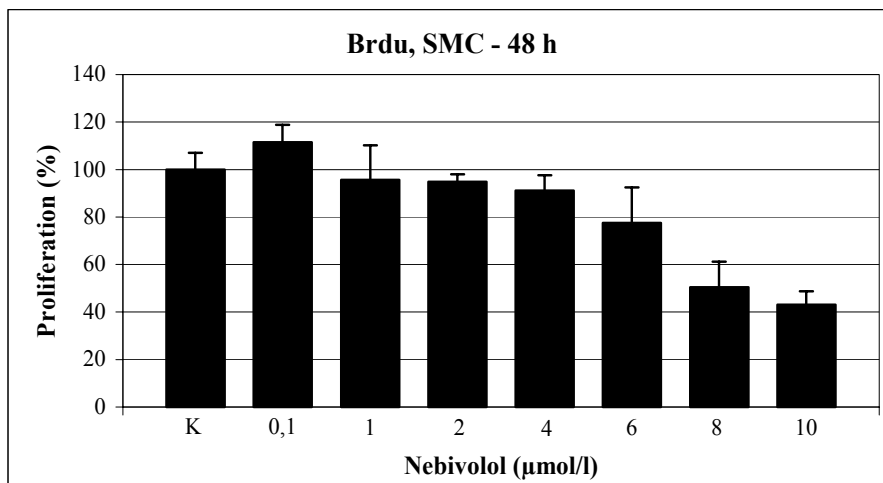


Abbildung 3.15: Auswirkung der Einmalgabe von *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 48 Stunden

Ähnlich wie auch schon die Daten der 24-stündigen Inkubation zeigen, kommt es auch bei einer Testdauer von 48 Stunden zu einem sichtbaren Abfall der Proliferationsrate koronararterieller glatter Muskelzellen. Die Änderungen treten ebenfalls ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ ein, sind jedoch um ca. 10 bis 15 Prozentpunkte ausgeprägter, als bei den 24-Stunden-Werten.

Verifikation der mitochondrialen Aktivität humaner koronararterieller glatter Muskelzellen nach Einmalgabe von *Nebivolol* mittels WST-Test über 48

Tabelle 3.15: WST-Ergebnisse nach Einmalgabe von *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 48 Stunden (n=12), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

WST	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	105,80	109,10	106,90	131,42	123,37	91,54	58,20
s	8,53	7,45	3,37	1,17	3,91	5,50	16,23	17,8

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

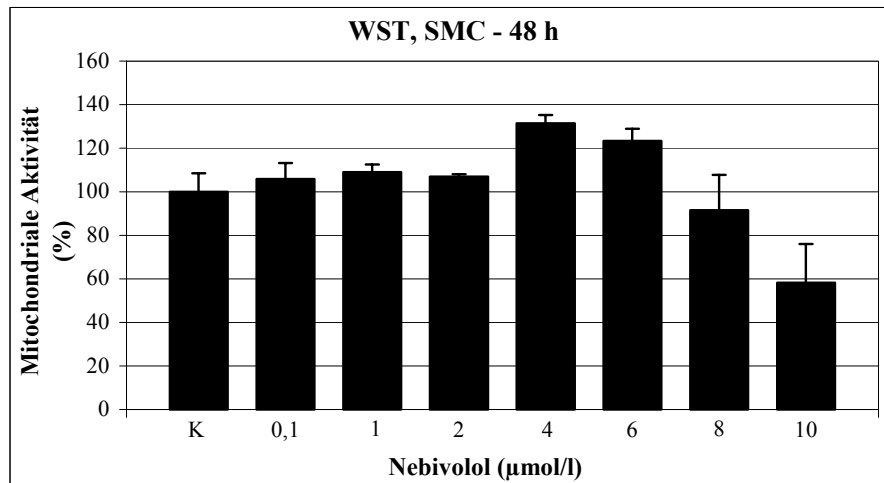


Abbildung 3.16: Auswirkung der Einmalgabe von *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 48 Stunden

Auch bei diesem Testansatz zeigt sich, dass bei kürzeren Inkubationszeiten ein signifikanter Abfall der mitochondrialen Aktivität erst im Konzentrationsbereich zwischen 8 und 10 $\mu\text{mol/l}$ eintritt.

Selbst in der höchsten Konzentrationsstufe liegt die Stoffwechselaktivität noch bei ca. 60%.

Im Vergleich mit dem WST-Test über 48 Stunden fällt auch hier auf, dass die Hemmung der Proliferation durch *Nebivolol* ausgeprägter ausfällt, als die Wirkung auf die mitochondriale Aktivität.

3.3.3 Hemmung des Wachstumsfaktor-induzierten akzelerierten Wachstum von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen mittels *Nebivolol* nach 7 Tagen Dauerbehandlung

Wie bisher gezeigt, kann durch *Nebivolol* eine signifikante Hemmung der Proliferation sowohl koronararterieller Endothelzellen, als auch glatter Muskelzellen induziert werden. In diesem Zusammenhang kommt es auch zu einer Abnahme der mitochondrialen Aktivität, welche jedoch weniger ausgeprägt beeinflusst wird.

Gegenstand der folgenden Untersuchungen war nun, ob diese Ergebnisse auch unter dem kontinuierlichen Einfluss von Wachstumsfaktoren reproduzierbar sind.

Bei 7-tägiger Testdauer und einer Dauerbehandlung mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l) wurden jetzt noch zusätzlich verschiedene Wachstumsfaktoren, die in Vorversuchen eine maximale Stimulation des Zellwachstums zeigten, über die Testdauer hinweg zugegeben.

Untersuchungen mit *PDGF AA* an humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen

Tabelle 3.16: BrdU- und MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [µmol/l], sowie Wachstumsstimulation mittels PDGF AA, Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	109,20	104,40	100,80	71,80	64,33	38,13	20,70
s	4,88	2,08	2,57	4,26	22,81	3,10	7,14	1,96
<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	106,10	93,98	87,42	93,05	96,34	68,92	24,00
s	12,26	4,09	2,85	3,91	3,18	3,66	8,16	9,23

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

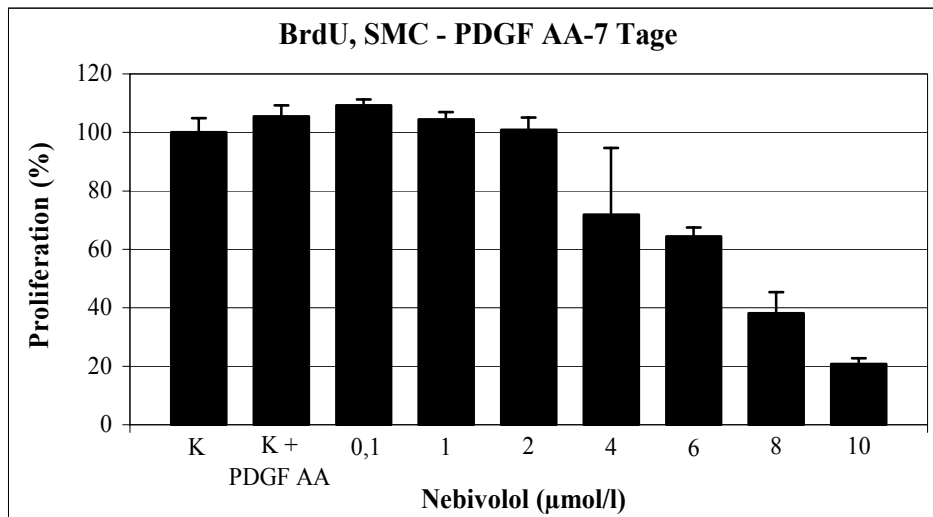


Abbildung 3.17: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l), sowie Wachstumsstimulation mittels PDGF AA (20 ng/ml) auf die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

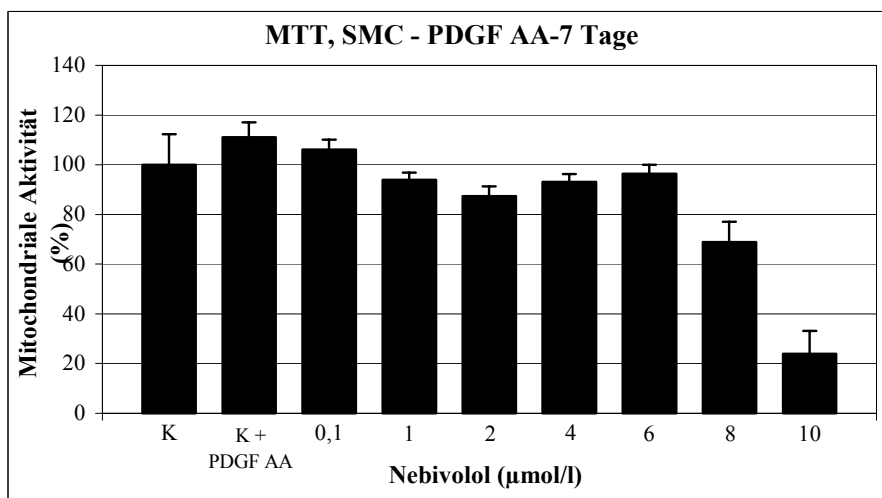


Abbildung 3.18: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l), sowie Wachstumsstimulation mittels PDGF AA (20 ng/ml) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

Durch die Zugabe von PDGF AA wird eine Steigerung der Proliferation auf etwa 110% im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Unter der Behandlung mit *Nebivolol* kam es auch unter diesen Bedingungen zu einem Abfall der Proliferation ab einer Konzentration von 4 µmol/l auf ca. 70%. In den Proben der Maximalkonzentration war die Proliferationsrate auf 1/5 der Kontrolle gesunken.

Auch im MTT-Test sieht man deutlich die Auswirkung der Inkubation mit *Nebivolol*. Die mitochondriale Aktivität steigt zunächst etwas an, pendelt sich bis zur Konzentration von 6 µmol/l im Kontrollbereich ein und fällt dann zunächst langsam auf ca. 70%, im Bereich der höchsten Konzentration relativ deutlich auf 24% ab.

Untersuchungen mit PDGF BB an humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen

Tabelle 3.17: BrdU- und MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], sowie Wachstumsstimulation mittels PDGF BB, Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	104,60	110,80	110,40	91,82	52,27	36,61	20,40
s	3,21	3,38	7,09	5,41	3,61	9,18	1,67	2,41

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	103,10	91,77	68,68	64,31	62,97	51,43	35,00
s	5,85	3,10	4,70	2,33	0,98	5,26	1,66	10,00

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

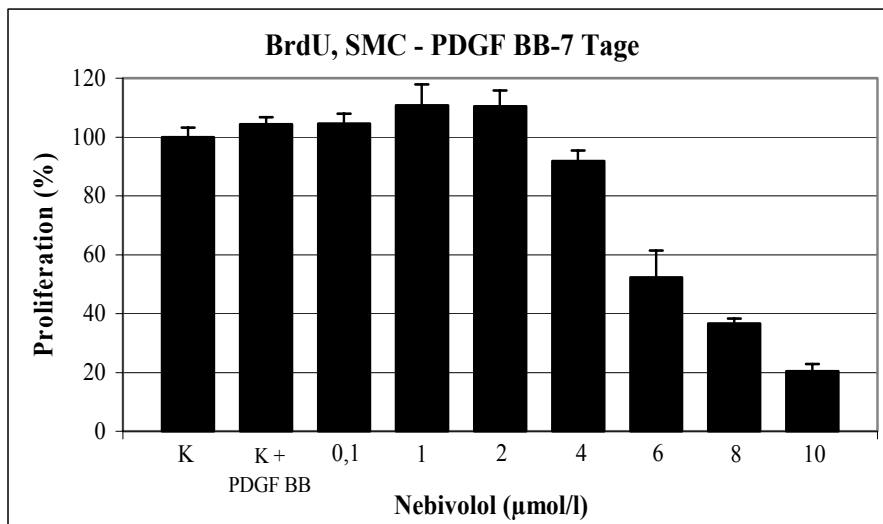


Abbildung 3.19:

Auswirkung der Dauerinkubation mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$), sowie Wachstumsstimulation mittels PDGF BB (20 ng/ml) auf die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

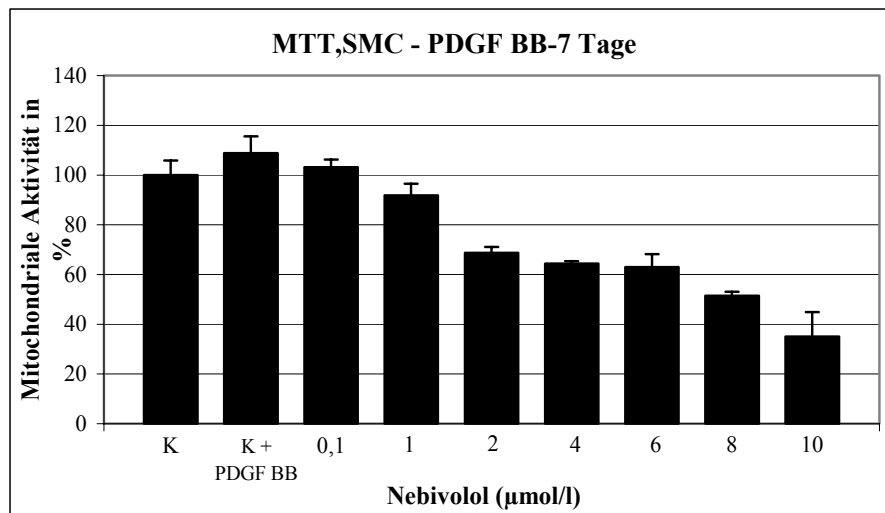


Abbildung 3.20:

Auswirkung der Dauerinkubation mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l), sowie Wachstumsstimulation mittels PDGF BB (20 ng/ml) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

Auch bei Inkubation der koronararteriellen Muskelzellen mit PDGF BB zeigt sich ein fast linearer Abfall der Proliferation ab einer Konzentration von 4 µmol/l bis auf minimal 20% im Vergleich zur Kontrolle bei 10 µmol/l.

Im MTT-Test zeigt sich die Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität zwar schon früher im Bereich von 2 µmol/l, der Abfall der mitochondrialen Aktivität verläuft jedoch wesentlich langsamer und liegt bei 8 µmol/l immer noch über 50%.

Bei 10 µmol/l liegt die Stoffwechselaktivität noch bei 35% im Bezug zur Kontrolle.

Untersuchungen mit *TGF β₁* an humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen

Tabelle 3.18: BrdU- und MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], sowie Wachstumsstimulation mittels *TGF β₁*, Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	119,00	109,80	100,80	96,14	82,68	61,42	40,30
s	13,23	9,95	8,63	7,58	11,87	7,39	14,30	21,90

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	83,06	75,14	69,87	66,77	81,22	78,47	41,60
s	6,95	5,08	6,23	5,96	5,09	5,29	8,10	25,20

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

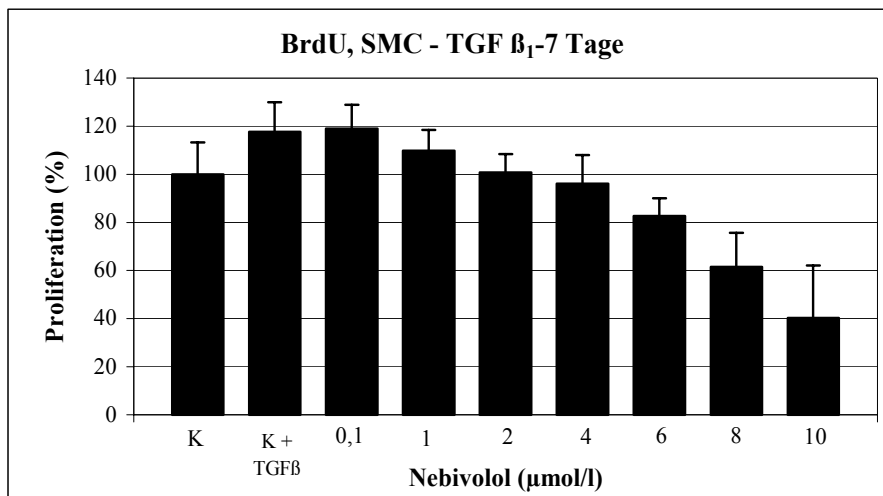


Abbildung 3.21: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$), sowie Wachstumsstimulation mittels *TGF β₁* (20 ng/ml) auf die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

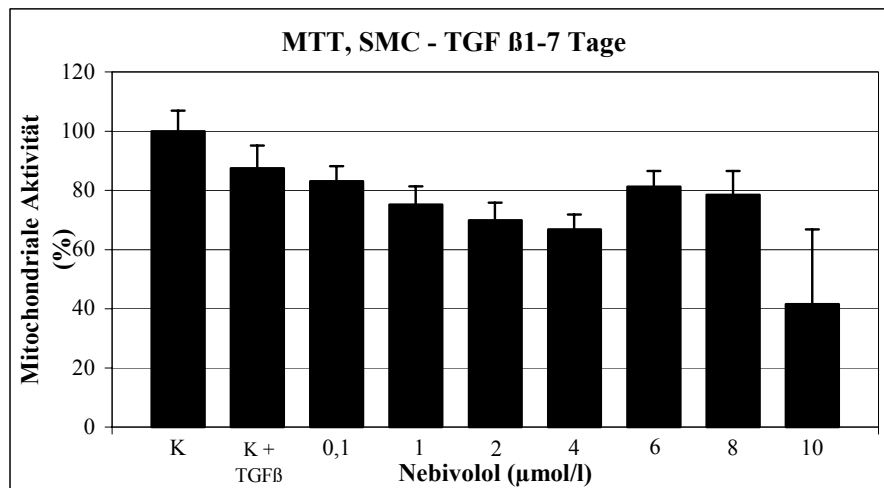


Abbildung 3.22: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 μmol/l), sowie Wachstumsstimulation mittels TGF β₁ (20 ng/ml) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

Unter dem Einfluss von TGFβ₁ steigt die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen auf 117,7% im Vergleich zur Kontrolle. Ab einer Konzentration von 6 μmol/l kommt es zu einem sichtbaren Abfall der Proliferation auf ca. 80%.

Über die nachfolgenden Konzentrationsstufen fällt die Wachstumsrate bis minimal 40% kontinuierlich weiter ab.

Im MTT-Test konnte ein Einfluss von TGFβ₁ auf die mitochondriale Aktivität nicht nachgewiesen werden. Man sieht, dass die Aktivität ab dem Konzentrationsbereich 0,1 μmol/l auf etwa 80% reduziert ist. Die Stoffwechselaktivität hält sich jedoch im Gegensatz zum Diagramm des BrdU-Tests über nahezu alle Konzentrationen stabil auf hohem Niveau und fällt dann erst bei der höchsten Konzentrationsstufe auf ca. 40% ab.

Untersuchungen mit *bFGF* an humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen

Tabelle 3.19: BrdU- und MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], sowie Wachstumsstimulation mittels bFGF, Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	112,90	106,40	103,80	83,74	57,92	25,26	14,90
s	9,60	2,97	4,98	3,02	2,54	6,01	4,77	2,16

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	97,31	85,32	80,45	92,67	95,48	65,26	31,70
s	6,24	2,36	2,49	4,04	2,88	3,30	11,11	3,67

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

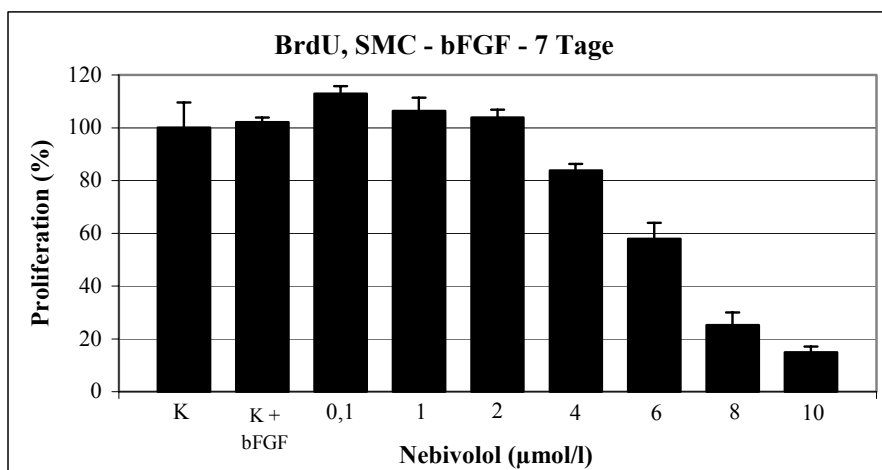


Abbildung 3.23: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$), sowie Wachstumsstimulation mittels bFGF (20 ng/ml) auf die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

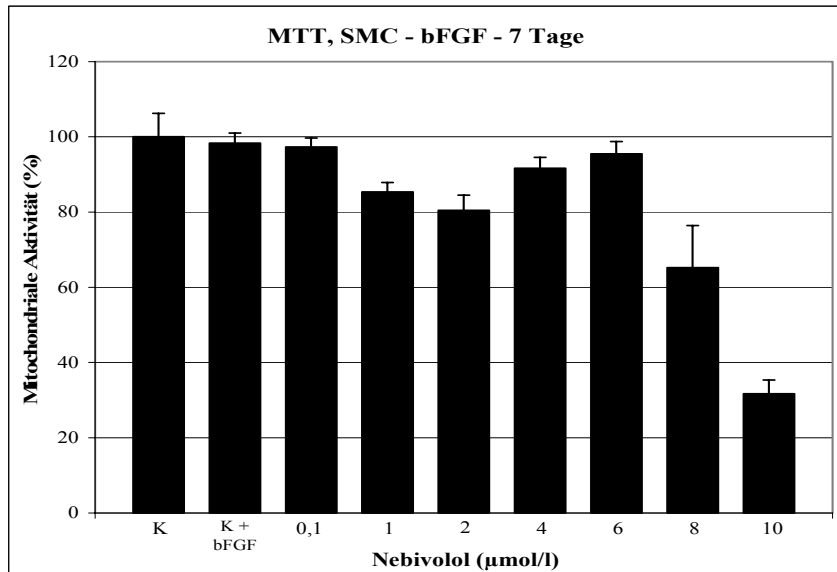


Abbildung 3.24: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l), sowie Wachstumsstimulation mittels bFGF (20 ng/ml) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

Unter der Behandlung mit bFGF konnte die Proliferation der koronararteriellen glatten Muskelzellen nur unwesentlich gesteigert werden, auch die mitochondriale Aktivität wurde durch den Wachstumsfaktor nicht beeinflusst.

In diesem Testansatz wurde die Proliferation bereits ab einer Konzentration von 4 µmol/l deutlich auf 83,74% herabgesetzt und zeigt dann im weiteren Verlauf den bereits bekannten kontinuierlichen Abfall bis minimal 15%.

Im MTT-Test zunächst wieder der plateauartige Verlauf bis 6 µmol/l, bei 8 µmol/l lässt sich immer noch eine Aktivität von 65% nachweisen und fällt erst bei maximaler Konzentration unter 50% ab.

3.4 Vergleich von *Nebivolol* mit Betablockern der ersten und zweiten Generation

3.4.1 Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit *Carvedilol*

BrdU-ELISA nach 7 Tagen Dauerbehandlung humaner koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Carvedilol*

Tabelle 3.20: BrdU-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Carvedilol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	106,20	106,80	108,10	93,74	77,80	73,31	74,5
s	11,05	11,52	12,80	6,94	2,79	2,14	2,52	7,24

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

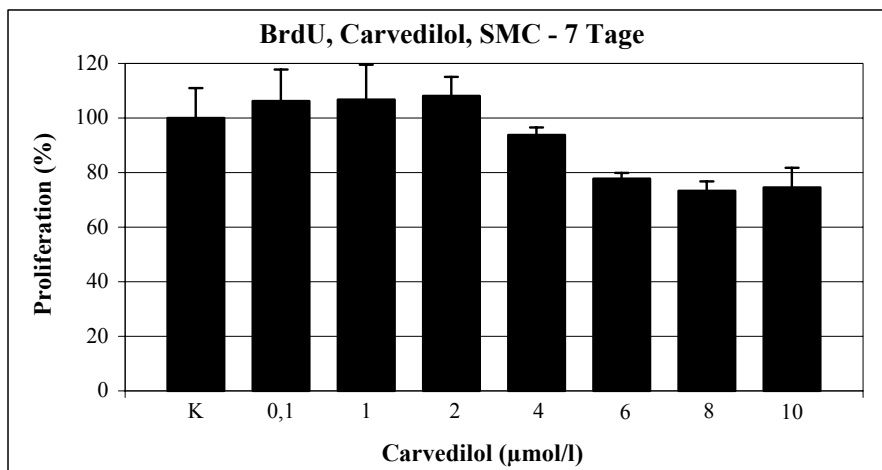


Abbildung 3.25: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Carvedilol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

Mitochondriale Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung humaner koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Carvedilol*

Tabelle 3.21: MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Carvedilol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	101,90	98,23	111,70	105,20	118,05	121,90	139,00
s	7,45	3,72	4,30	8,11	3,65	6,68	6,05	9,14

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

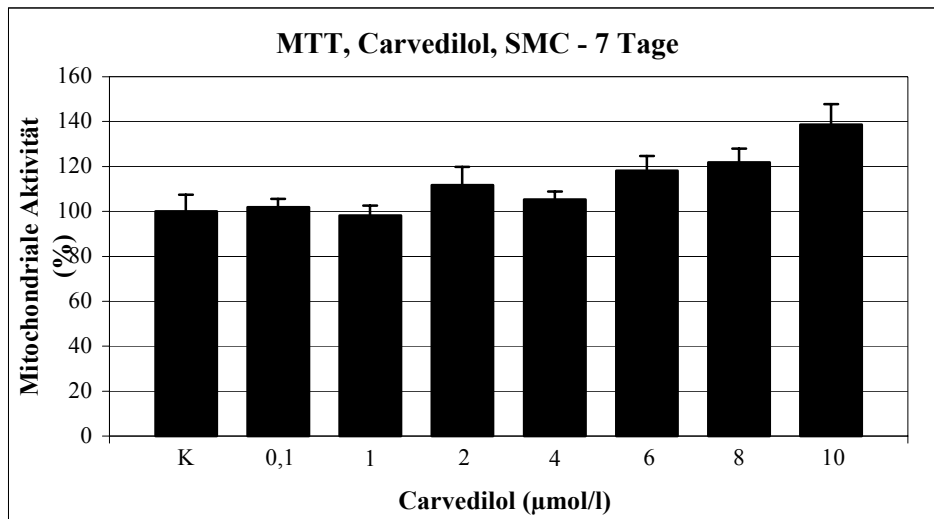


Abbildung 3.26: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Carvedilol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

BrdU-ELISA nach 7 Tagen Dauerbehandlung humaner koronararterieller Endothelzellen mit *Carvedilol*

Tabelle 3.22: BrdU-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Carvedilol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	104,50	103,30	103,30	100,90	92,80	92,42	80,90
s	5,97	6,13	4,13	4,66	4,29	4,85	5,19	8,13

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

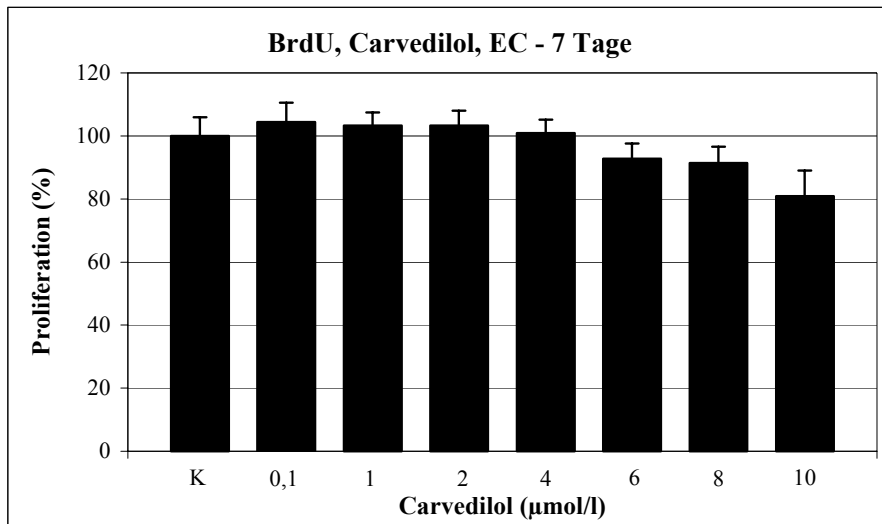


Abbildung 3.27: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Carvedilol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die Proliferation koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

Mitochondriale Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung humaner koronararterieller Endothelzellen mit *Carvedilol*

Tabelle 3.23:

MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Carvedilol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	100,90	102,40	92,32	84,91	64,65	68,93	62,60
s	12,32	10,00	12,30	11,14	8,48	6,54	5,27	5,53

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

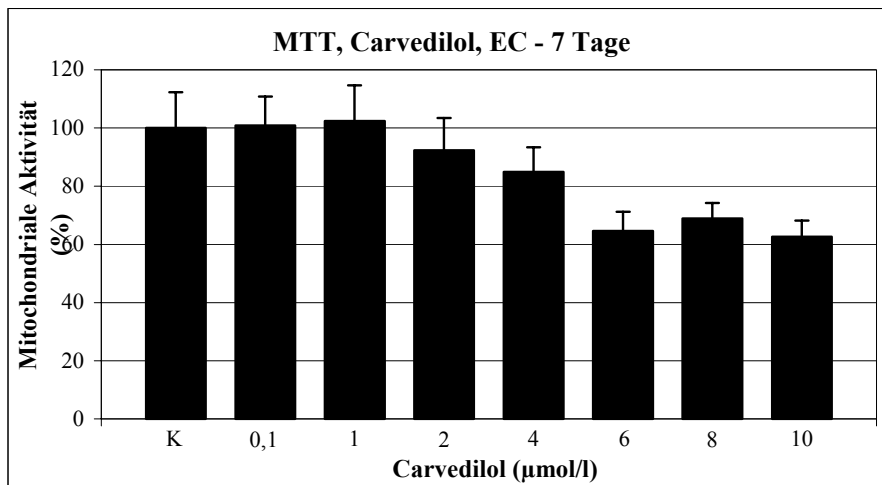


Abbildung 3.28: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Carvedilol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

**Verifikation der mitochondrialen Aktivität mittels WST-Test nach 7 Tagen
Dauerbehandlung koronararterieller Endothelzellen mit *Carvedilol***

Tabelle 3.24: WST-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Carvedilol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>WST</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	106,20	102,50	103,60	106,30	109,00	112,20	101,00
s	11,68	3,11	2,01	3,59	1,70	2,64	2,30	4,31

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

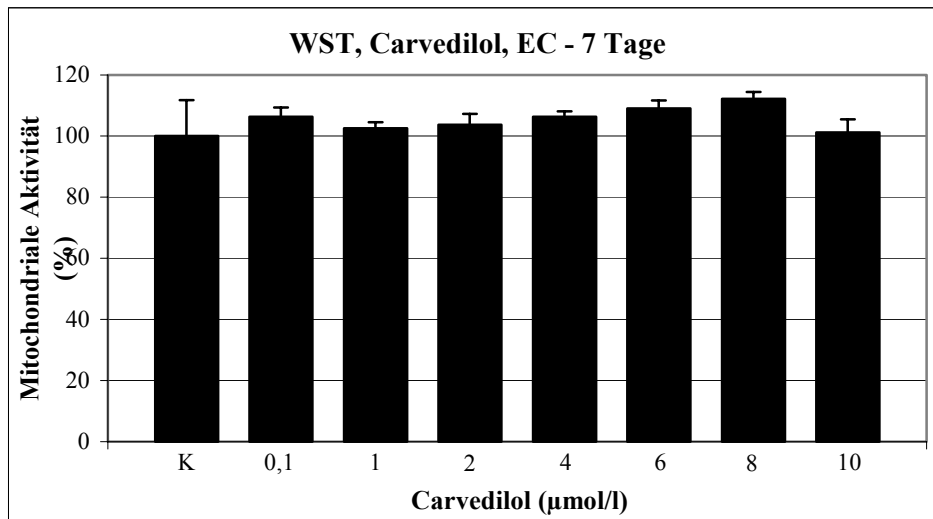


Abbildung 3.29: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Carvedilol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

3.4.2 Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit *Metoprolol*

BrdU-ELISA und mitochondriale Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung humaner koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Metoprolol*

Tabelle 3.25: BrdU- und MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Metoprolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	128,90	127,40	128,50	131,50	111,80	127,30	135,00
s	18,86	7,80	10,14	13,35	8,77	26,61	12,39	6,39

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	110,70	110,10	110,50	108,80	104,00	107,50	114,00
s	7,77	4,19	5,53	3,17	5,46	5,63	4,93	7,71

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

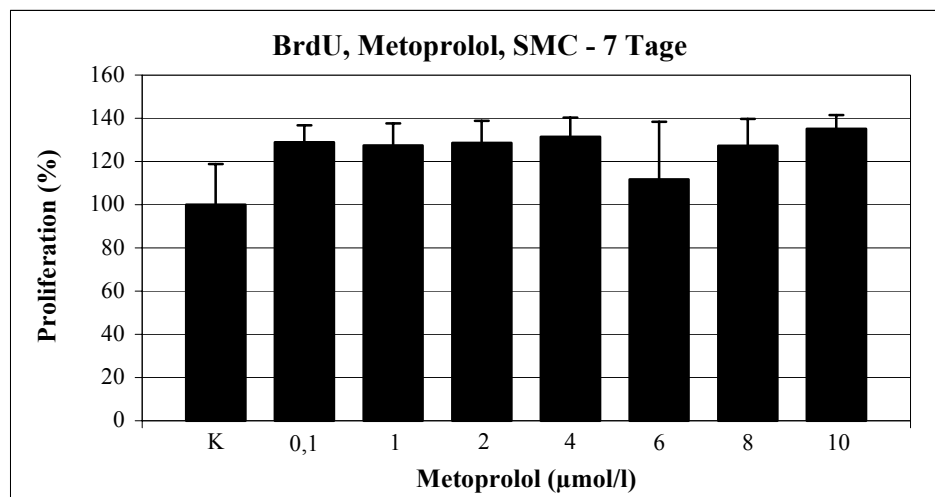


Abbildung 3.30: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Metoprolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

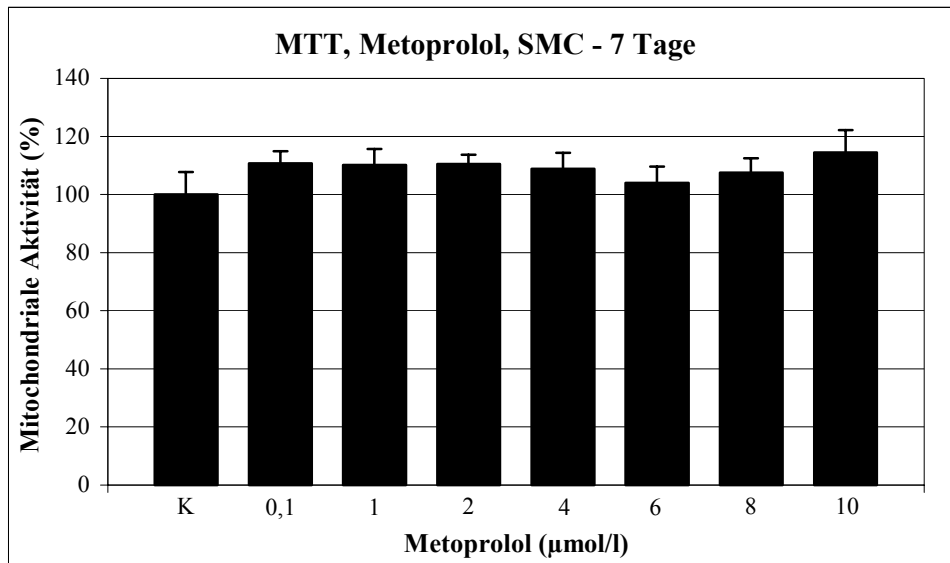


Abbildung 3.31: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Metoprolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

BrdU-ELISA und mitochondriale Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung humaner koronararterieller Endothelzellen mit *Metoprolol*

Tabelle 3.26: BrdU- und MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Metoprolol* [µmol/l], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	103,80	96,50	98,07	96,26	97,54	94,09	102,00
s	9,48	7,12	3,75	8,74	5,79	5,67	2,63	3,10

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	75,77	86,62	90,91	87,15	79,11	84,83	133,00
s	22,30	17,84	19,07	21,92	23,50	21,20	22,03	14,60

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

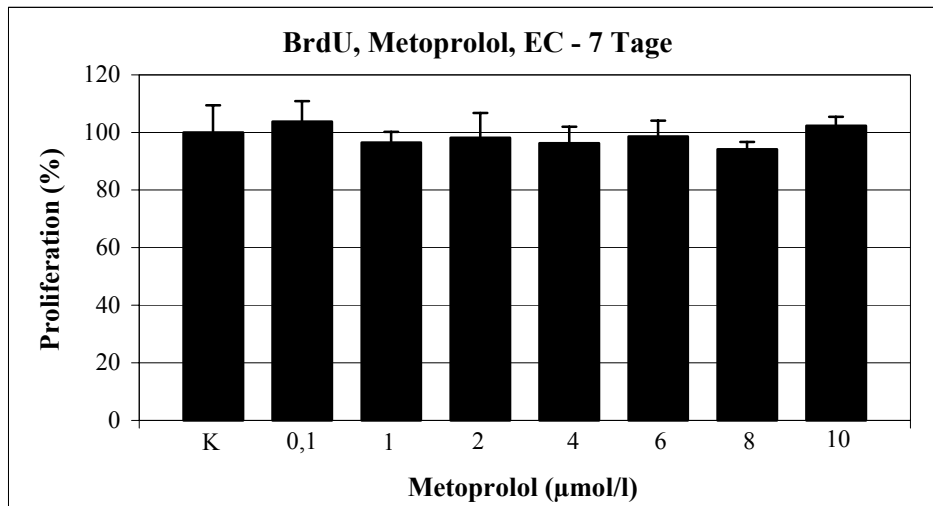


Abbildung 3.32: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Metoprolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die Proliferation koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

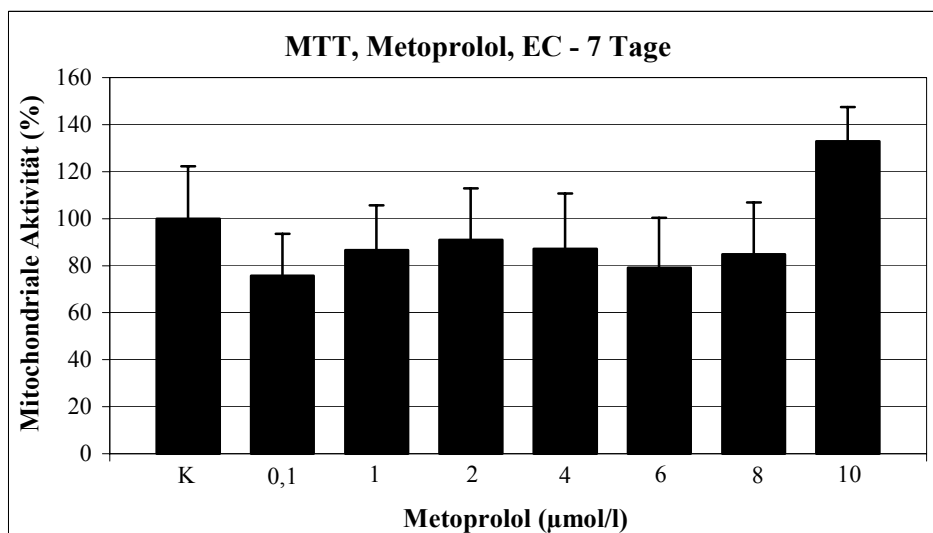


Abbildung 3.33: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Metoprolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen (n=6)

3.4.3 Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit *Propranolol*

BrdU-ELISA und mitochondriale Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung humaner koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Propranolol*

Tabelle 3.27: BrdU- und MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Propranolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	123,10	123,10	125,20	137,00	135,40	117,20	144,00
s	14,42	8,74	10,38	11,99	4,67	10,62	10,63	6,28

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	97,33	97,33	97,56	94,46	90,52	89,25	99,70
s	6,22	9,63	4,00	7,95	6,89	4,30	3,74	2,92

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

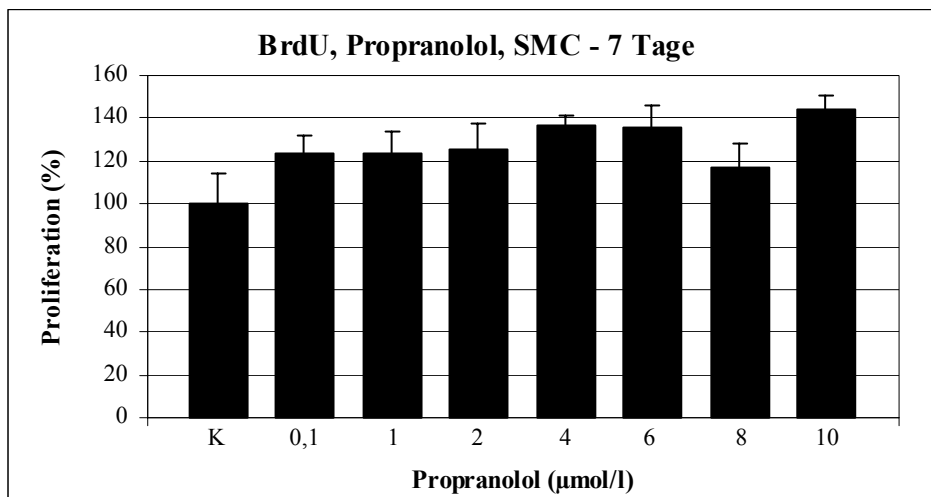


Abbildung 3.34: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Propranolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

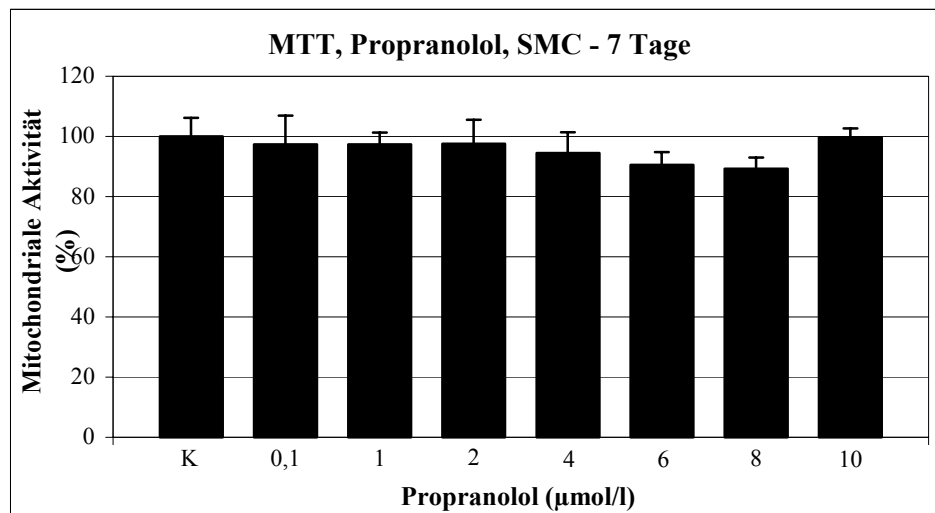


Abbildung 3.35: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Propranolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

BrdU-ELISA und mitochondriale Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung humaner koronararterieller Endothelzellen mit *Propranolol*

Tabelle 3.28: BrdU- und MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Propranolol* [µmol/l], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

<i>BrdU</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	93,44	104,90	112,20	107,40	103,00	98,09	89,10
s	12,18	10,84	7,37	8,84	10,70	9,27	10,78	5,66

<i>MTT</i>	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	76,55	84,48	82,82	79,08	77,77	77,00	126,00
s	13,79	14,31	14,30	18,64	17,80	19,27	9,05	11,50

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

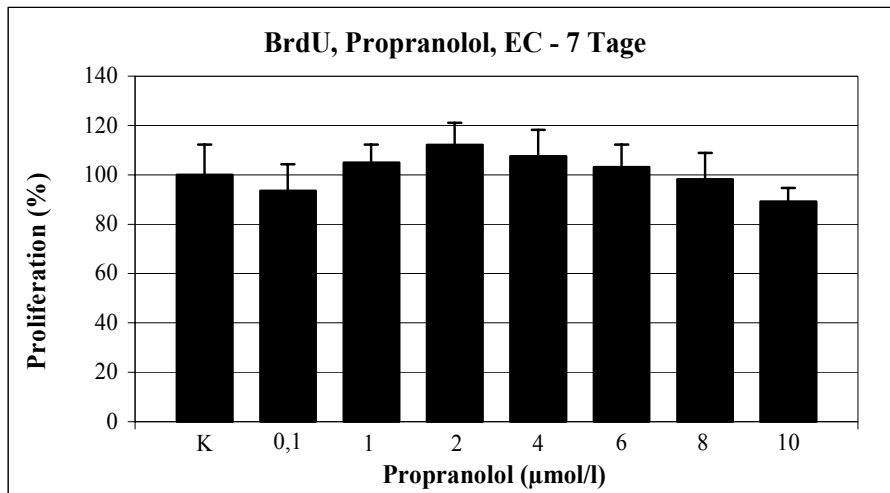


Abbildung 3.36: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Propranolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die Proliferation koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

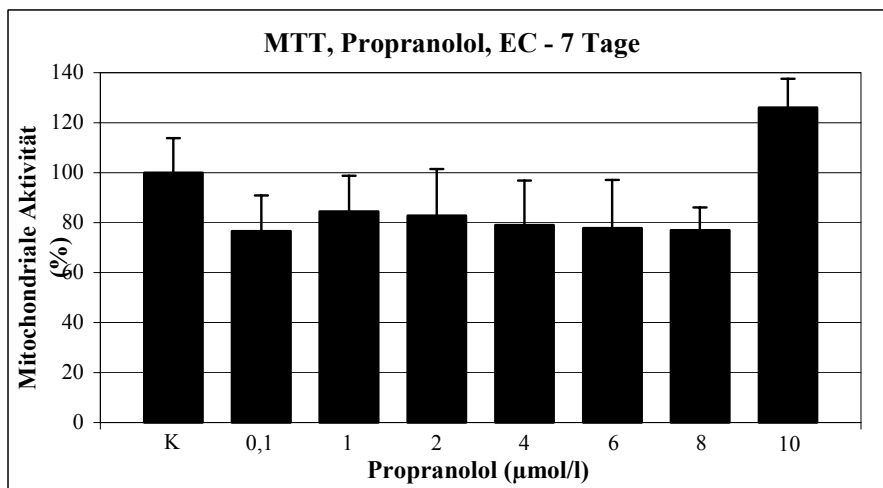


Abbildung 3.37: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Propranolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller Endothelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

3.4.4 Messung der Proliferation und mitochondrialen Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen *Bisoprolol*

BrdU-ELISA und mitochondriale Aktivität nach 7 Tagen Dauerbehandlung humaner koronararterieller glatter Muskelzellen mit *Bisoprolol*

Tabelle 3.29:

BrdU- und MTT-Ergebnisse nach Dauerbehandlung mit *Bisoprolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 7 Tage (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

BrdU	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	108,10	108,30	113,50	107,90	102,70	118,40	117,00
s	7,58	5,30	4,55	11,10	8,21	5,81	3,89	9,13

MTT	K	0,1	1	2	4	6	8	10
m	100,00	97,00	107,40	102,40	100,80	114,10	97,90	114,00
s	8,74	5,56	11,53	8,80	11,20	9,94	8,26	6,93

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

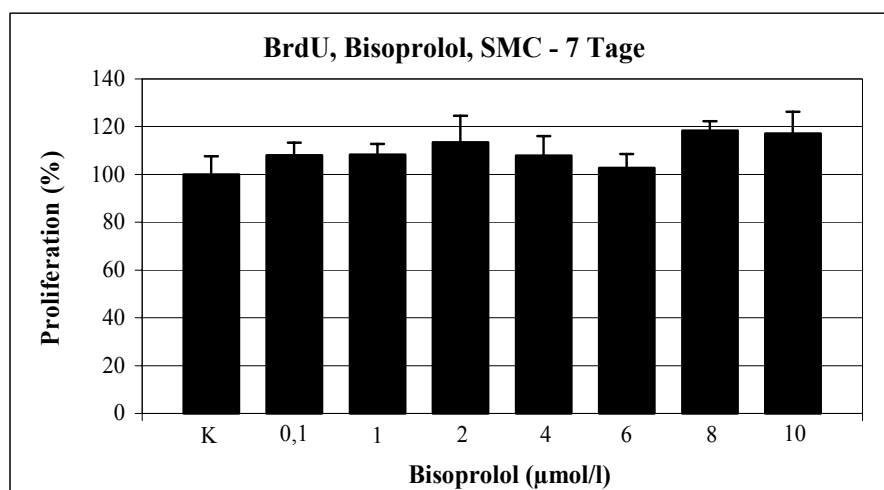


Abbildung 3.38: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Bisoprolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die Proliferation koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

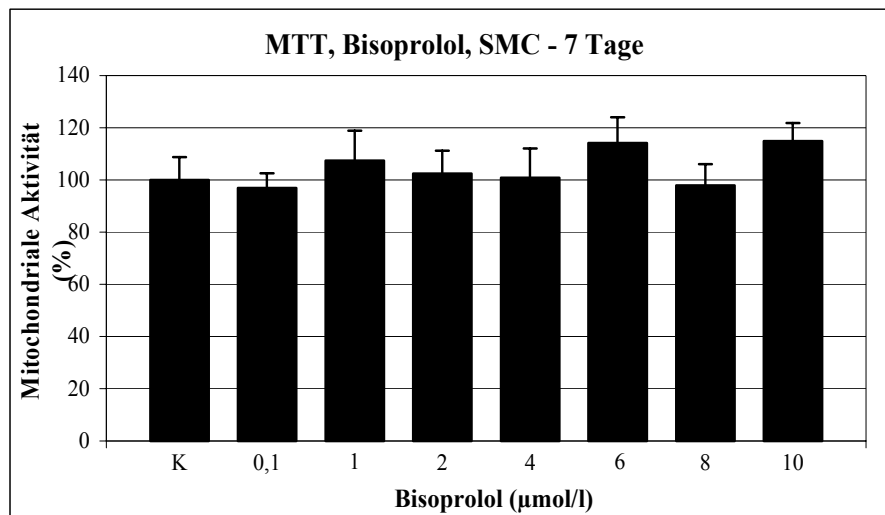


Abbildung 3.39: Auswirkung der Dauerinkubation mit *Bisoprolol* (0,1 bis 10 µmol/l) auf die mitochondriale Aktivität koronararterieller glatter Muskelzellen bei einer Testdauer von 7 Tagen

Zusammenfassend sieht man im Vergleich von *Nebivolol* mit unterschiedlichen Betablockern, dass die Dauerinkubation von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen mit Bisoprolol, Propranolol, Metoprolol und Carvedilol in den Konzentrationsstufen von 0,1 bis 10 µmol/l unterschiedliche Effekte auf das Zellwachstum ausübt.

Die Inkubation mit Metoprolol oder Bisoprolol zeigt keinerlei Einfluss auf das Zellwachstum oder die metabolische Aktivität.

Unter Propranolol kommt es im BrdU-ELISA sogar zu einer signifikanten Steigerung der Zellproliferation auf bis zu 144±6% bei 10 µmol/l bezogen auf die Kontrolle, wogegen sich keine Einflüsse auf die metabolische Aktivität nachweisen lassen.

Bei Carvedilol kann eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferation im BrdU-ELISA bis auf 73,3±2,5% bei 8 µmol/l bezogen auf die Kontrolle gezeigt werden. Im MTT-Test sieht man jedoch eine Steigerung der mitochondrialen Aktivität auf bis zu 139±9% bei 10 µmol/l.

3.5 Wirkung von *Nebivolol* auf die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus humanen koronararteriellen Endothelzellen

3.5.1 Messung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Endothelzellen durch *Nebivolol* nach Einmalgabe über 48 Stunden

Tabelle 3.30: NO-Messung nach Einmalgabe von *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$], Testdauer 48 Stunden (n=12), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

	K	0,1	1	5	10
m	100,00	103,98	136,93	132,07	116,16
s	36,23	35,81	13,66	25,75	37,93

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

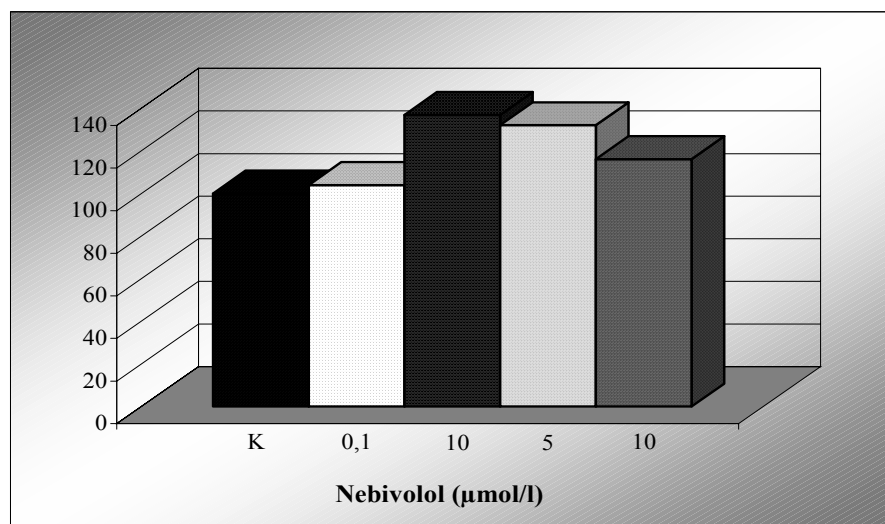


Abbildung 3.40: Auswirkung einer Einmalgabe von *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die NO-Freisetzung aus koronararteriellen Endothelzellen bei einer Testdauer von 48 Stunden

Ab einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ kommt es zu einer Steigerung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung in das Kulturmedium. Eine maximale NO-Freisetzung wird ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Eine weitere Steigerung der *Nebivolol*-Konzentration erbrachte keine Zunahme der NO-Freisetzung.

3.5.2 Messung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch *Nebivolol* unter Hemmung der endothelialen NO-Synthetase nach Einmalgabe über 48 Stunden

Tabelle 3.31: NO-Messung nach Einmalgabe von *Nebivolol* [$\mu\text{mol/l}$] und unter Hemmung der endothelialen NO-Synthetase, Testdauer 48 Stunden (n=6), Prozentangaben bezogen auf Kontrolle

	K	0,1	1	5	10
m	100,00	94,46	97,09	108,60	108,10
s	2,82	10,16	2,65	4,12	5,65

+L-NMMA	K	0,1	1	5	10
m	100,00	95,94	95,02	100,26	105,20
s	2,12	9,36	10,15	12,02	2,41

[m= Mittelwert; s= Standardabweichung; K= Kontrolle]

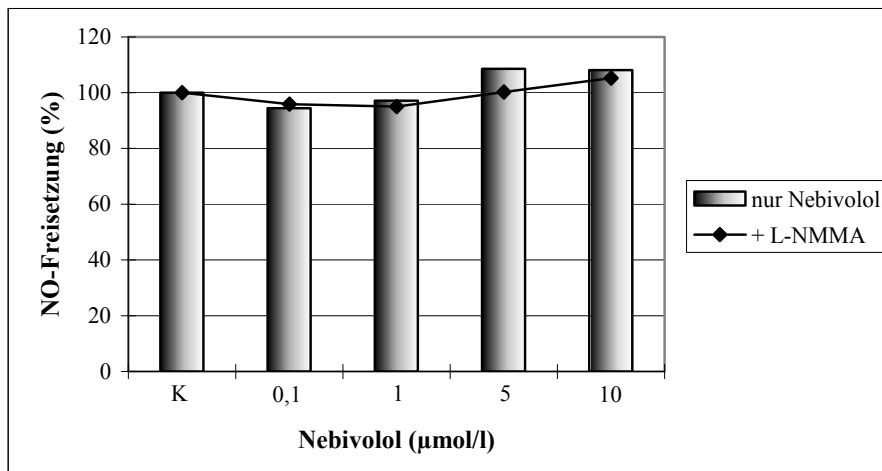


Abbildung 3.41: Auswirkung einer Einmalgabe von *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die NO-Freisetzung aus koronararterieller Endothelzellen unter Hemmung der endothelialen NO-Synthetase mittels L-NMMA (100 $\mu\text{mol/l}$) bei einer Testdauer von 48 Stunden

3.6 Auswirkung von *Nebivolol* auf apoptotische Vorgänge bei humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen

Um herauszufinden ob unter *Nebivolol* apoptotische Vorgänge eintreten, wurden die Bildung hypoploider DNA, sowie die Inkorporation von Propidiumiodid als Hinweis auf eine etwaige Membranschädigung gemessen.

Humane koronararterielle glatte Muskelzellen wurden nach 24-stündiger Inkubation für weitere 48 Stunden mit *Nebivolol* inkubiert.

Als Positivkontrolle wurde der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ mitgeführt, hierunter traten 50% der Zellen in die Apoptose ein.

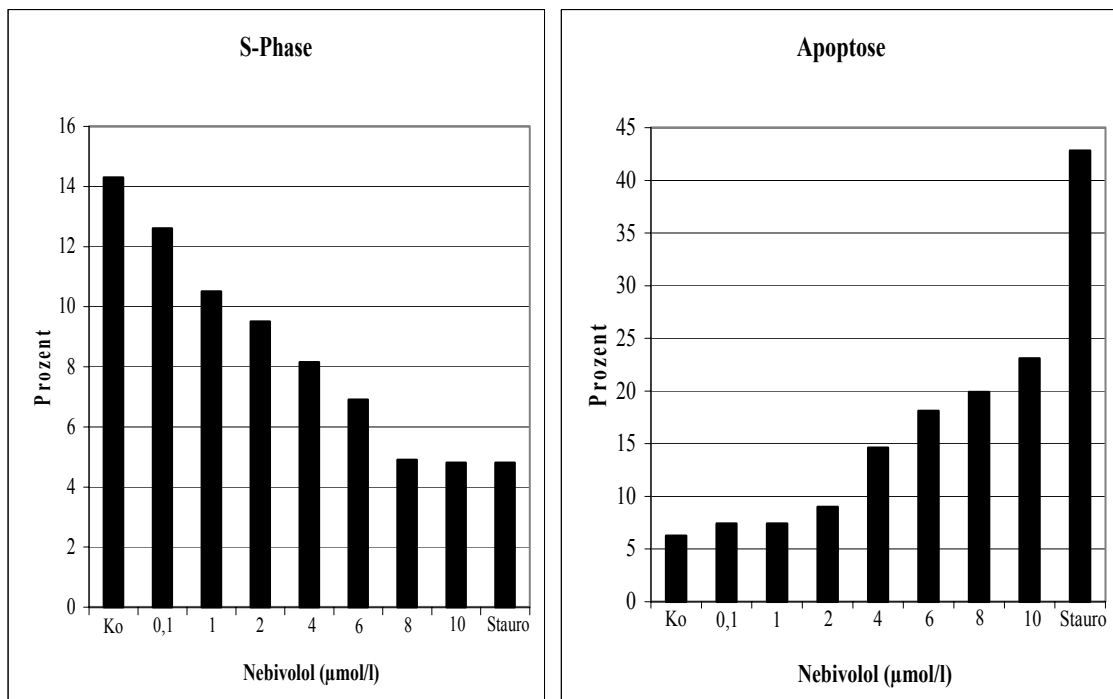


Abb. 3.42 Einfluss von *Nebivolol* auf den Ablauf des Zellzyklus und auf die Induktion apoptotischer Vorgänge.

Die Inkubation zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme der apoptotischen Vorgänge von 6% bei den Kontrollzellen bis auf 23% im Kulturansatz, welcher eine *Nebivolol*-konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ enthielt. Im Weiteren sieht man eine Abnahme der Anzahl der Zellen in der S-Phase von 16% in der Kontrolle auf 5% bei 10 $\mu\text{mol/l}$.

Der Anteil der Zellen in der G₁-Phase bleibt unverändert, während der Anteil der glatten Muskelzellen in der G₂-Phase von 24% in der Kontrolle auf 17% abnimmt.

3.7 Färbungen

3.7.1 DAPI-Färbung

Mittels der DAPI-Färbung wurde die Kernmorphologie koronararterieller glatter Muskelzellen nach Einmalgaben von *Nebivolol* (0,1 bis 10 µmol/l) und einer Inkubationszeit von 24 Stunden sichtbar gemacht. Ein normaler Zellkern färbt sich homogen blau-weiß; eventuell sind Nukleonen zu erkennen. Eine apoptotische Zelle zeigt gewisse Charakteristika. So kommt es zu Membranausstülpungen und es zeigt sich die typische Kondensationsfigur des Zellkerns vor seinem Zerfall. Ab einer Konzentration von 5 µmol/l zeigen sich Zellkernfragmente und Einschlusskörperchen als Hinweise auf durch *Nebivolol* induzierte apoptotische Vorgänge in den glatten Muskelzellen.

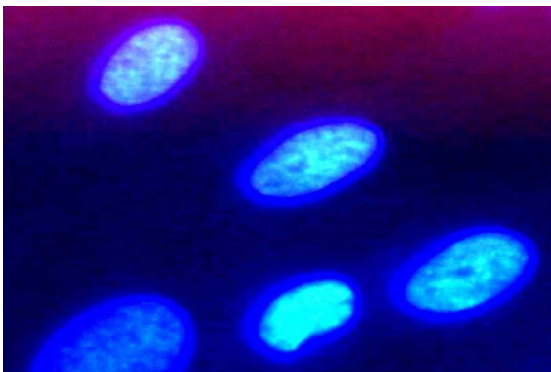


Abb. 3.43a Kontrolle

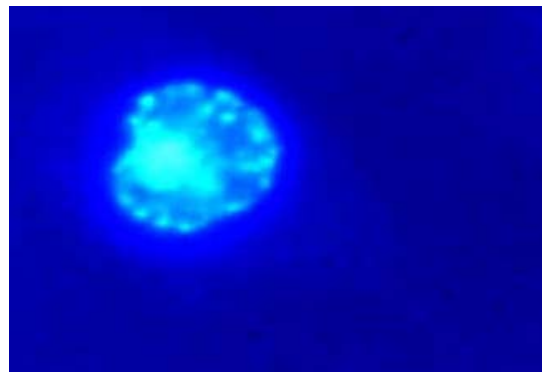


Abb. 43b *Nebivolol* 10 µmol/l

Abbildung 3.43 ab: DAPI-Färbung von Kontrollzellen (a) und mit Ausbildung von Kondensationsfiguren nach 24-stündiger Behandlung mit *Nebivolol* 10 µmol/l.

3.7.2 Annexin-Färbung

In frühen Apoptose-Stadien finden Änderungen in der Zellmembran statt, zum Beispiel die Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran. Durch den Phospholipid-bindenden Farbstoff Annexin kann das an der Membranaußenseite gelegene Phosphatidylserin apoptotischer Zellen sichtbar gemacht werden.

In der Fluoreszenzmikroskopie stellt sich die Zellmembran sterbender Zellen durch das gebundene Annexin hellgrün fluoreszierend dar.

Da nekrotische Zellen durch die den Verlust der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden wurden die Zellen simultan mit dem DNA-Farbstoff Propidiumjodid gefärbt. Hierzu wurden humane koronararterielle glatte Muskelzellen nach 24-stündiger Inkubation mit *Nebivolol* unterschiedlicher Konzentrationen (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) der Färbung unterzogen.

Die spezifische Färbereaktion zeigten nur wenige Zellen, welche den höheren Konzentrationsstufen 5 und 10 $\mu\text{mol/l}$ ausgesetzt waren. Die Kerne zeigten keine Färbereaktion durch das Propidiumjodid, so dass die Abbildungen Zellen in einer frühen Phase der Apoptose zeigen.

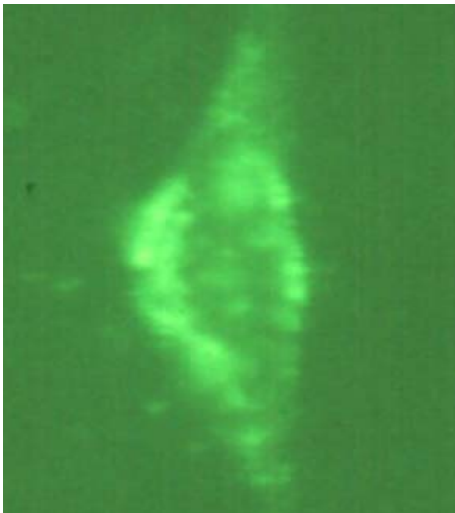


Abb. 3.44a *Nebivolol* 5 $\mu\text{mol/l}$

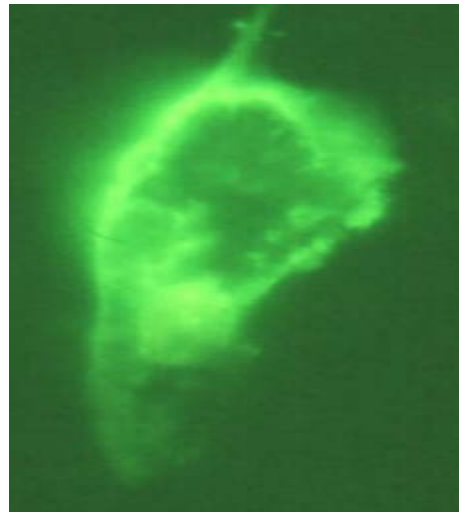


Abb. 3.44b *Nebivolol* 10 $\mu\text{mol/l}$

Abbildung 3.44 a und 3.44 b: Nachweis von Phosphatidylserin an der Membranaußenseite apoptotischer Zellen durch die Annexin-Färbung, angedeutet bei 5 $\mu\text{mol/l}$ und deutlich bei 10 $\mu\text{mol/l}$

3.7.3 BrdU-Färbung

Wie bereits durch den BrdU-ELISA gezeigt, bewirkt *Nebivolol* sowohl bei humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen, als auch Endothelzellen eine Proliferationshemmung. Mittels der BrdU-Färbung wurden die Testergebnisse lichtmikroskopisch verifiziert. Hierzu wurden koronararterielle glatte Muskelzellen nach Einmalgaben von *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$), sowie dem Proliferationsmarker BrdU über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert.

Das BrdU wird in die DNA proliferierender Zellen inkorporiert und im Rahmen der Färbung durch einen Anti-BrdU-Antikörper sichtbar gemacht.

Zellen mit hoher Proliferationsaktivität stellen sich durch die gesteigerte DNA-Synthese im Zellkern mit einem dunkelbraun bis schwarz angefärbten Zellkern dar. In Zellen mit geringerer DNA-Synthese wird durch die Färbung lediglich die Randzone des Zellkerns mehr oder weniger ausgeprägt angefärbt.

Im Vergleich zu der mitgeführten Kontrolle ohne Zugabe von *Nebivolol* zeigen sich bereits ab einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Zellen mit einer abgeschwächten Färbungsreaktion des Zellkernes. In den Konzentrationsstufen 5 $\mu\text{mol/l}$ und 10 $\mu\text{mol/l}$ zeigen sich in der Mehrzahl schwächer ausgeprägte Färbungsreaktionen der Zellkerne, als Ausdruck der verminderten DNA-Synthese durch *Nebivolol*.

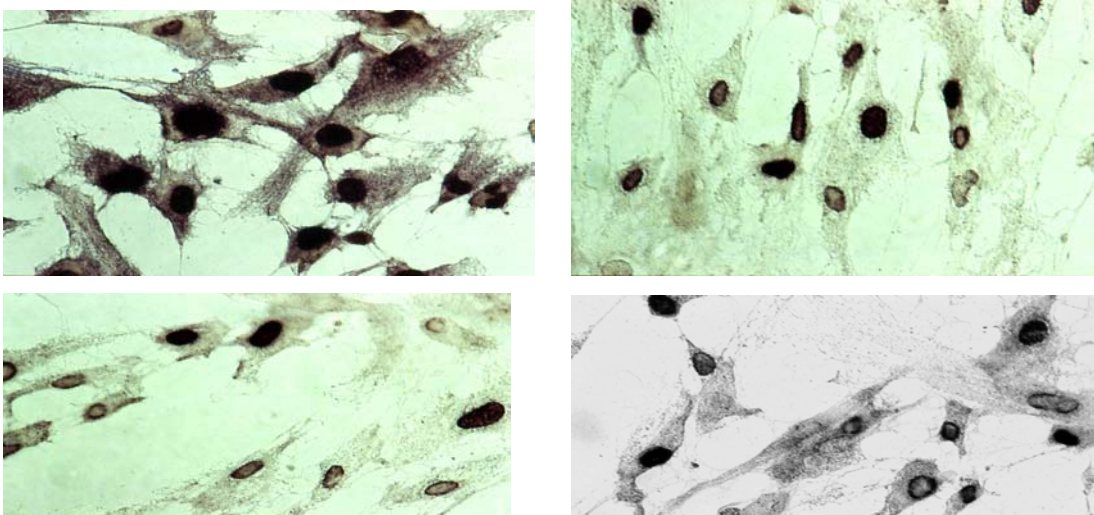


Abbildung 3.45 a-d:

BrdU-Färbung von Kontrollzellen (Abb. 44a) und nach 24-stündiger Behandlung mit *Nebivolol* (0,1 bis 10 $\mu\text{mol/l}$) (Abb. 44b-d).

3.8 Einfluss von *Nebivolol* auf die Endothelin-1-Synthese in humanen koronararteriellen Endothelzellen

3.8.1 Endothelin-1-Sekretion bei humanen koronararteriellen Endothelzellen unter *Nebivolol*

Endothelin-1 spielt als Mediator bei arteriosklerotischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Es wurde nun die basale Endothelin-1-Sekretion in unbehandelten Zellkulturen mit *Nebivolol*-behandelten Zellkulturen humaner koronararterieller Endothelzellen nach 4 Tagen verglichen.

Tabelle 3.32: Endothelin-1-Konzentrationen nach Einmalgabe von *Nebivolol*, Testdauer 4 Tage (n=4)

<i>Nebivolol</i> (µmol/l)	ET-1±s (fmol/ml/10.000 Zellen)
Kontrolle	0,50±0,05
<i>Nebivolol</i> 0,1	0,55±0,09
<i>Nebivolol</i> 1	0,54±0,04
<i>Nebivolol</i> 5	0,26±0,04*
<i>Nebivolol</i> 10	0,13±0,01*
<i>Nebivolol</i> 10 + L-NAME (500µmol/l)	0,49±0,04

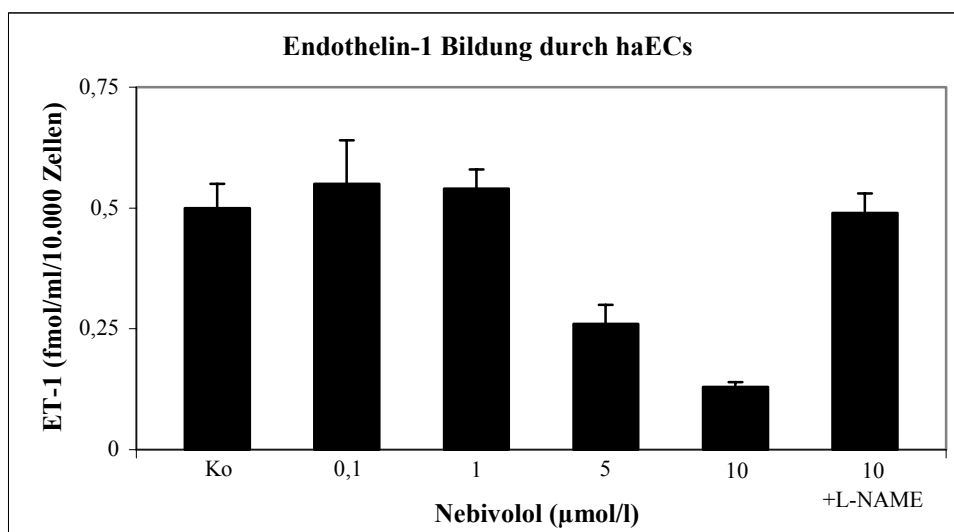


Abb. 3.45: Auswirkung von *Nebivolol* auf die Endothelin-1-Sekretion humaner koronararterieller Endothelzellen.

Durch die unbehandelten Kulturen wurde durch die Endothelzellen $0,5 \pm 0,05$ fmol/ml/ 10.000 Zellen Endothelin-1 produziert.

Unter steigenden Konzentrationen von *Nebivolol* nimmt die Endothelin-1-Konzentration im Wachstumsmedium konzentrationsabhängig um 86% auf $0,13 \pm 0,01$ fmol/ml/ 10.000 Zellen ab.

In Anwesenheit von L-NAME (500 μ mol/l) konnte durch *Nebivolol* keine Abnahme der Endothelin-1-Konzentration erreicht werden.

3.8.2 *In situ*-Hybridisierung humaner koronararterieller Endothelzellen auf die Expression von Endothelin-1 mRNA

Da Endothelin-1 nicht in der Zelle gespeichert wird, sondern nach Bedarf de novo synthetisiert wird, konnte der Einfluss von *Nebivolol* auf die Expression von Endothelin-1 mRNA zusätzlich durch eine *In situ*-Hybridisierung dargestellt werden.

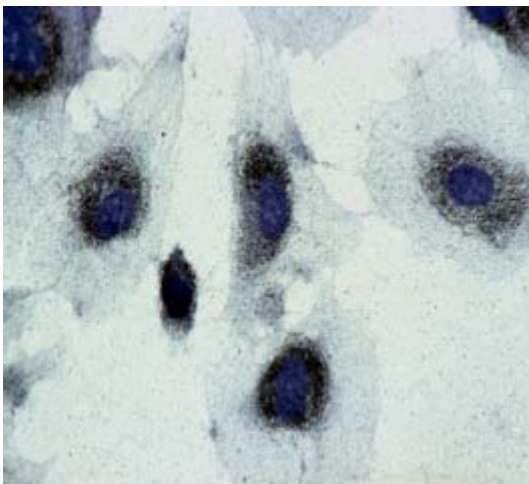


Abb. 3.45a Kontrolle

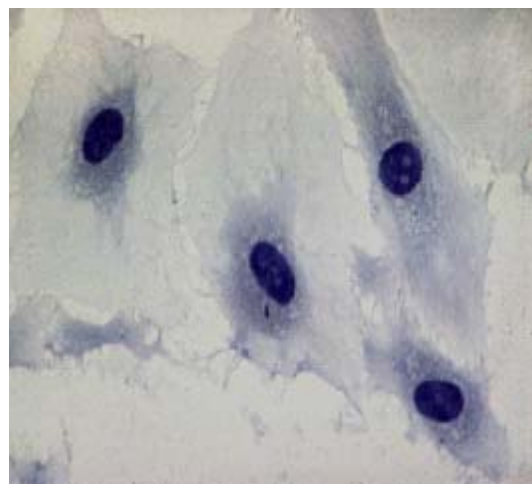


Abb. 3.45b *Nebivolol* 2 μ mol/l

Wie in den Abbildungen zu sehen ist, produzieren die Kontrollzellen große Mengen präpro-ET-1 mRNA, zu sehen am dunklen zytoplasmatischen Signal um den Zellkern. Nach 12-stündiger Inkubation mit 2 μ mol/l *Nebivolol* ist die präpro-ET-1 mRNA-Expression nur noch deutlich abgeschwächt zu sehen.

4 DISKUSSION

4.1 Wirkung von *Nebivolol* auf die Gefäßproliferation

Die Proliferation glatter Muskelzellen der Gefäßwand spielt eine grundsätzliche Rolle bei der Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen. Zudem wird durch die Produktion proinflammatorischer Substanzen und durch Synthese extrazellulärer Matrixproteine aus glatten Gefäßmuskelzellen das Wachstum des atheromatösen Plaque unterhalten.

Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, die durch Schädigung der Gefäßwand den arteriosklerotischen Prozess in Gang setzen, führt die Proliferation glatter Muskelzellen auch sekundär nach Ballonangioplastie bei etwa 20% der so behandelten Patienten zur Ausbildung von Restenosen in den ersten 6 Monaten [Dzau 2002].

Ziel der Entwicklung von Therapiestrategien, welche in die Pathophysiologie der überschießenden Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nach Schädigung der Gefäßwand eingreifen, soll sein, die Häufigkeit von Restenosen nach Ballondilatation oder auch nach Bypasschirurgie weiter reduzieren. Darüber hinaus könnte durch den Eingriff moderner pharmakologischer Substanzen in die pathophysiologischen Abläufe der Atherogenese der Verlauf daraus resultierender Erkrankungen abgeschwächt werden.

Vor diesem Hintergrund war ein Bestandteil der Untersuchungen den neuartigen Betablocker *Nebivolol* hinsichtlich seiner antiproliferativen Wirkung auf humane koronararterielle glatte Muskelzellen im Zellkulturmodell zu prüfen.

Wirkung von *Nebivolol* auf humane koronararterielle glatte Muskelzellen:

Mit dieser Arbeit konnte durch einen Betablocker eine dosisabhängige antiproliferative Wirkung an humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen nachgewiesen werden.

Die humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen wurden mit unterschiedlichen *Nebivolol*-konzentrationen inkubiert. Mittels BrdU-ELISA konnte gezeigt werden, dass bereits nach Einmalgaben von *Nebivolol* und kurzen Inkubationszeiten über 24 bzw. 48 Stunden die Mitoserate konzentrationsabhängig abnimmt.

Auch nach 7-tägiger Inkubation konnte eine signifikante Reduktion des Zellwachstums nachgewiesen werden. Im MTT- und WST-Test, durch welche die Anzahl metabolisch aktiver Zellen gemessen wurde, konnten vergleichbare Ergebnisse gezeigt werden.

Die Dauerinkubation über 14 Tage zeigte ebenfalls eine Proliferationshemmung. Somit ergeben sich keine Hinweise auf die Entwicklung einer Resistenz gegenüber dem Medikament unter längerer Einwirkdauer.

Wirkung von *Nebivolol* auf durch Wachstumsfaktoren stimulierte humane koronararterielle glatte Muskelzellen:

Um zu sehen, ob *Nebivolol* auch beschleunigtes Zellwachstums inhibieren kann, wurden die humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen mit den Wachstumsfaktoren PDGF AA, PDGF BB, bFGF und TGF β_1 inkubiert. Im Kontrollansatz konnte für alle Wachstumsfaktoren in der verwendeten Konzentration von 20 ng/ml eine erhöhte Proliferation festgestellt werden. Im Vergleich war nach Zugabe von *Nebivolol* ein konzentrationsabhängiger antiproliferativer Effekt unter allen Wachstumsfaktoren nachweisbar

Vergleich von *Nebivolol* mit unterschiedlichen Betablockern:

Die Dauerinkubation von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen über 7 Tage mit Metoprolol, Propranolol, Bisoprolol, Carvedilol und *Nebivolol* in verschiedenen Konzentrationsstufen zeigte unterschiedliche Effekte auf das Wachstumsverhalten der Zellkulturen. Die Inkubation mit Metoprolol und Bisoprolol hatte keine Einflüsse auf die Proliferation und die metabolische Aktivität. Durch Propranolol konnte man sogar eine diskrete Zunahme der Proliferation im BrdU-ELISA sehen.

Nur die Inkubation mit Carvedilol zeigte einen konzentrationsabhängigen Rückgang des Zellwachstums um etwa 40%. Demgegenüber nahm jedoch die im MTT-Test gemessene metabolische Aktivität der Zellen unter Carvedilol zu.

Somit wird im Vergleich mit anderen Betablockern nur durch *Nebivolol* sowohl die Proliferation, als auch die metabolische Aktivität reduziert.

Einfluss von *Nebivolol* auf die Morphologie der glatten Muskelzellen:

Die Auswirkungen auf die Morphologie koronararterieller glatter Muskelzellen durch die Inkubation mit *Nebivolol* wurden durch mikroskopische Analysen untersucht. In den Nativpräparaten sieht man unter steigenden Konzentrationen von *Nebivolol* eine Abnahme des Zellvolumens und die Zellen nehmen eine spindelförmige Gestalt an. Die Zellen bleiben jedoch nach der Inkubationsperiode adhärent, was gegen einen zytotoxischen Einfluss von *Nebivolol* spricht.

Im Weiteren zeigte die DAPI-Färbung konzentrationsabhängig eine Auflockerung und Kondensation der nuklearen Chromatinstruktur als Folge einer DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen. Diese Zellmorphologie lässt auf Apoptosevorgänge in den durch *Nebivolol* beeinflussten Inkubationsansätzen schließen.

Einfluss von *Nebivolol* auf das Apoptoseverhalten humaner koronararterieller glatter Muskelzellen:

Zur Aufklärung, ob *Nebivolol* Apoptose in den humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen induziert, wurde die Bildung hypoploider DNA gemessen. Hierzu wurden die glatten Muskelzellen über 24 Stunden mit Wachstumsmedium inkubiert, bevor *Nebivolol* für 48 Stunden hinzugegeben wurde. Ebenso wurde die Aufnahme von Propidiumjodid als Marker der Zellmembranschädigung gemessen. Durch die *Nebivolol*applikation konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Apoptose um bis zu 23% gezeigt werden.

In der Annexin V-Färbung konnte dies bestätigt werden.

Die Anzahl der Zellen in der S-Phase nahm von 16% in der Kontrolle auf minimal 5% ab. Der Anteil der Zellen in der G₁-Phase blieb unverändert, während der Anteil glatter Muskelzellen in der G₂-Phase von 24% im Kontrollansatz auf 17% unter *Nebivolol*inkubation abgenommen hatte. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin mitgeführt. Hierunter zeigten 50% der Zellen apoptotisches Verhalten.

Aus dieser Datenlage ergibt sich die Vermutung, dass die Blockade der β -Adrenozeptoren nicht der Grund für die antiproliferativen Eigenschaften von *Nebivolol* sein kann. Denn für keinen der anderen klassischen Betablocker konnten Einflüsse auf das Wachstumsverhalten der Zellen und die metabolische Aktivität nachgewiesen

werden. Unter Propranolol zeigte sich sogar eine diskrete Zunahme der Proliferation. Nur für Carvedilol konnte eine Reduktion der Wachstumsrate humaner koronararterieller glatter Muskelzellen gezeigt werden. Gleichzeitig verringert sich jedoch die Stoffwechselaktivität der Zellen unter Carvedilol nicht. Die antiproliferative Wirkung von Carvedilol wurde bereits in früheren Versuchen nachgewiesen [Sung 1993; Patel 1995].

Arteriosklerose ist das Resultat aus unterschiedlichen pathophysiologischen Prozessen. Hierzu zählen die endotheliale Dysfunktion, Entzündungsreaktionen, intimale Proliferation und Veränderung der Bindegewebmatrix. Ein wesentlicher Bestandteil sowohl der Atherogenese, als auch der Entwicklung von In-stent-Restenosen und Bypassverschlüssen ist die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen [Ross 1973].

Kommt es zu einer Verletzung der Gefäßwand werden durch geschädigte Endothelzellen, aber auch durch Entzündungszellen, Thrombozyten und glatte Muskelzellen Mediatoren freigesetzt, wodurch die intimale Proliferation, Zellmigration, Apoptose und Anhäufung extrazellulärer Matrix angeregt werden [Ross 1995]. Basic Fibroblast Growth Factor beispielsweise induziert im Tiermodell die Proliferation von in der Gefäßwand gelegenen glatten Muskelzellen [Lindner 1991]. Auch Platelet derived growth factor (PDGF) führt zu einer Migration der glatten Muskelzellen in die Intima. Mitogene Einflüsse besitzen darüber hinaus Transforming growth factor β , Angiotensin II und Epidermal growth factor [Majeski 1991/Nabel 1993]. Gleichzeitig kommt es zu einer Hemmung der antiproliferativ wirksamen Faktoren. Beispielsweise ist die endotheliale Stickstoffmonoxidproduktion erniedrigt und wird durch freie Radikale rasch inaktiviert [Ignarro 1987/Kinsella 1986].

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Nebivolol* auch unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen inhibiert. Die gemeinsame Endstrecke der durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren vermittelten intimalen Proliferation ist der Zellzyklus.

Glatte Gefäßmuskelzellen einer unbeschädigten Gefäßwand proliferieren normalerweise nicht, sie befinden sich in einem Ruhezustand, der G₀-Phase, in der die Zellen zwar stoffwechselaktiv sind, jedoch keine Zellteilung stattfindet.

Der Übertritt von der G₀-Phase in die G₁-Phase, also der Anstoß zur Zellproliferation bedarf unter anderem der Bindung von Wachstumsfaktoren an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die durch Endothelschädigung freigesetzten Wachstumsfaktoren aktivieren in der Zelle eine Signalkette, wodurch der Mitosezyklus eingeleitet wird. In der G₁-Phase (gap Phase 1) wird die DNA-Replikation vorbereitet und in der S-Phase (Synthese-Phase) durchgeführt. Nach der anschließenden G₂-Phase (gap Phase 2) wird die Zellteilung vorbereitet und dann in der Mitosephase (M) vollzogen [Elledge 1996]. Der Phasenablauf des Zellzyklus wird durch spezifische Regulationsproteine koordiniert.

Diese Regulationsproteine sind phasenspezifische Holoenzyme, Cyklin-CDK-Komplexe genannt, bestehend aus Kinasen (Cyklin-abhängige Kinasen; CDKs) und Regulatoruntereinheiten, den Cyklinen. Die Regulatorkomplexe im Zellzyklus können wiederum durch äußere Faktoren, wie p 53, E2 F, GAX und GATA-6 beeinflusst werden. Solche Transkriptionsfaktoren, sowie auch andere antimitogenetische Substanzen können durch Inhibition der Cyklin-CDK-Komplexe den Mitosezyklus in seinen verschiedenen Phasen stoppen. GATA-6, wie auch GAX werden in „ruhenden“ glatten Muskelzellen exprimiert und stimulieren die Bildung von CDK-Inhibitoren, wie p27^{KIP1} oder p21^{CIP1} [Majeski 1991/Perlman 1998].

In der Folge wird der Zellzyklus im weiteren Ablauf gehemmt [Smith 1997/Narita 1996]. Die Tatsache, dass der antiproliferative Effekt von *Nebivolol* unter allen ausgetesteten Wachstumsfaktoren gezeigt werden konnte, lässt darauf schließen, dass *Nebivolol* die Fähigkeit besitzt in die Mechanismen des Zellzyklus einzugreifen. Dies könnte etwa über die Aktivierung von CDK-Inhibitoren ablaufen [Perlman 1998].

Es ist bekannt, dass die Proliferation humaner koronararterieller glatter Muskelzellen auch durch eine Steigerung der Stickstoffmonoxid-Bildung (NO-Bildung) reduziert werden kann [von der Leyen et al. 1995]. Demgegenüber wurde beobachtet, dass durch eine gestörte NO-Synthese es zu einer Steigerung der Proliferation von Gefäßmuskelzellen kommt [Ross 1999].

Der Zellzyklus glatter Muskelzellen wird nicht nur über Transkriptionsfaktoren gesteuert. Stickstoffmonoxid (NO) bewirkt eine Hemmung der Cyklin A-Aktivität, indem die Bildung von Cyklin A mRNA unterbunden wird. Zusätzlich wird durch NO vermehrt p21, ein Hemmstoff der Cyklin-abhängigen Kinasen gebildet. Beides führt

dazu, dass durch NO der Ablauf des Zellzyklus unterbrochen wird [Ishida 1997]. In anderen Untersuchungen konnte in vivo nachgewiesen werden, dass durch eine induzierte Überexpression der NO-Synthetase mit konsekutiver gesteigerter NO-Synthese eine Verminderung der Atherogenese und von Restenosen erreicht werden kann [von der Leyen 1995/Qian 1999].

Wie weiter unten ausgeführt, wird durch *Nebivolol* eine Steigerung der endothelialen NO-Produktion vermittelt, womit eine Beeinflussung des Zellzyklus durch NO als weiterer antiproliferativer Faktor ebenfalls als Möglichkeit in Betracht kommt.

Der antiproliferative Effekt von *Nebivolol* beruht jedoch vermutlich nur teilweise auf einem NO-vermittelten Mechanismus. Eine Hemmung des Zellwachstums wird auch in rein glattmuskulären Zellkulturen in Abwesenheit von NO-produzierenden Endothelzellen erreicht.

Bei den Kalzium-Kanal-Blockern Nifedipin und Verapamil konnte in vitro für hohe Dosierungen ebenfalls eine Inhibition des Zellwachstums festgestellt werden [Nichols 1989,1996]. Auch Carvedilol entwickelt in hohen Konzentrationen blockierende Eigenschaften auf Kalzium-Kanäle [Nichols 1989,1996].

Für *Nebivolol* existieren dagegen keine Ergebnisse bezüglich des Einflusses auf spannungsabhängige Kalzium-Kanäle.

Aus den Erkenntnissen über die molekularen und pathogenetischen Mechanismen der proliferativen Gefäßerkrankungen wurden so verschiedene Behandlungsstrategien entwickelt, welche teilweise durch Hemmung einzelner Faktoren in den Prozess der Gefäßproliferation eingreifen sollen. Solche Substanzen sind zum Beispiel Heparine, ACE-Hemmer, Antagonisten von Wachstumsfaktoren wie Terbinafin oder Trapidil, Somatostatinanaloga und Zytostatika wie Etoposid oder Doxorubicin. Die klinischen Studien konnten jedoch die in Tiermodellen nachgewiesenen antiproliferativen Eigenschaften der Substanzen nicht bestätigen [Gershlick 2002].

Dies liegt wohl unter anderem daran, dass die Arteriosklerose eine komplexe und multifaktorielle Erkrankung ist und die Fokussierung auf einen dieser Faktoren für eine erfolgreiche Behandlung unzureichend ist.

Deshalb scheint es nötig den Blick auf die gemeinsame Endstrecke der proliferationsfördernden Mechanismen zu richten, nämlich den Zellzyklus.

Nebivolol könnte eine solche Substanz sein, deren antiproliferative Eigenschaften durch eine Unterbrechung des Zellzyklus vermittelt werden. Die Unterbrechung des Zellzyklus kann zum einen durch zytostatische Mechanismen, zum anderen durch Zytotoxizität erreicht werden. Zytotoxizität würde eine Zerstörung der glatten Gefäßmuskelzelle bedeuten, wohingegen durch Zytostase die Abläufe des Zellzyklus blockiert werden ohne den Zelltod zu induzieren. Da bekannt ist, dass durch das Absterben glatter Gefäßmuskelzellen eine Destabilisierung der Gefäßwand und auch des atheromatösen Plaques ausgelöst wird, sollte deshalb ein zytostatischer Therapieansatz bevorzugt werden [Fuster 1994].

Unter *Nebivolol* kam es zu einer Steigerung der apoptotischen Vorgänge bei humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen um bis zu 23% im Bereich der höchsten Konzentrationsstufe. Da vermutet wird, dass es in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen zu einer Abnahme der apoptotischen Vorgängen kommt, könnte die Induktion der Apoptose durch *Nebivolol* ein weiterer Faktor sein, welcher dem Wachstum des atheromatösen Plaques entgegenwirkt.

4.2 Einfluss von *Nebivolol* auf das Endothel und die Endothelfunktion

Das Gefäßendothel synthetisiert und setzt ein großes Spektrum vasoaktiver Substanzen frei und beeinflusst so wesentliche Vorgänge in der Kreislaufregulation durch die Regulation des Gefäßtonus. Das Endothel bildet eine Barriere zwischen Blut und Arterienwand und ist somit auch kontinuierlich den Angriffen der atherogenen Risikofaktoren ausgesetzt.

Die Endothelzellen setzen Stickstoffmonoxid (NO) frei. Nach Diffusion in die glatten Gefäßmuskelzellen kommt es über die Aktivierung der Guanylatzyklase und Erhöhung der intrazellulären Guanosin-Monophosphatkonzentration (cGMP) zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen mit Gefäßdilataion. Des Weiteren besitzt NO eine antithrombotische und antiproliferative Wirkung.

Die Störung der Endothel-abhängigen Gefäßrelaxation ist eng mit einer verminderten NO-Produktion bzw. mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit verknüpft und wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Die endotheliale Dysfunktion ist ein wesentlicher Pathomechanismus in der Entstehung von essentieller Hypertonie, Arteriosklerose und Herzinsuffizienz. Ein Therapieziel der Behandlung der kardiovaskulären Erkrankungen ist demnach die Endothelfunktion durch Steigerung der NO-Verfügbarkeit zu verbessern.

In den Endothelzellen wird außerdem das vasokonstriktorisch wirksame Peptid Endothelin-1 (ET-1) gebildet. In der Frühphase der Atherogenese, sowie bei instabiler Angina pectoris ist die Produktion und Sekretion von Endothelin-1 erhöht [Grantham1998; Lerman 1991]. Durch synergistische Effekte von Endothelin-1 und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise Transforming growth factor- α (TGF- α) auf Zellzyklusproteine sieht man eine gesteigerte DNA-Amplifikation und dadurch eine beschleunigte Zellteilung und Zellvermehrung [Daub 1996; Yeh 1991]. Neben der gesteigerten Zellproliferation wird durch Endothelin-1 auch die Bildung extrazellulärer Matrix gefördert [Rizvi1997; Douglas 1994]. Sowohl Vasokonstriktion, als auch Proliferation wird über spezifische ET_A-Rezeptoren auf glatten Muskelzellen vermittelt [Lüscher 2001].

Dagegen verhindert eine Blockade des Endothelin-Rezeptors die Bildung einer Neointima nach Ballonangioplastie im Tiermodell [Grantham 1998; Douglas 1994]. Unter der Verwendung von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wurde eine verbesserte NO-Freisetzung bei Tieren mit gestörter Endothelfunktion festgestellt [Barton 1998].

Einfluss von *Nebivolol* auf die Proliferation und Apoptose humaner

koronararterieller Endothelzellen:

Wie bei den humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen kommt es auch bei den Endothelzellen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Proliferationsrate. Der MTT-Test zeigt ebenfalls eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der metabolischen Aktivität.

Durch die gemeinsame Inkubation mit *Nebivolol* und L-NAME, einem Hemmstoff der Stickstoffmonoxid-Synthese, war die antiproliferative Wirkung von *Nebivolol* auf

humane koronararterielle Endothelzellen unverändert nachweisbar. Somit scheint die Verlangsamung des endothelialen Zellwachstums nicht NO-vermittelt zu sein.

Die Inkubation der Endothelzellen mit unterschiedlichen Betablockern erbrachte ähnliche Resultate wie bei den humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen. Metoprolol und Bisoprolol beeinflussen die Zellproliferation und die metabolische Aktivität nicht. Durch Propranolol wurde auch hier eine diskrete Zunahme der metabolischen Aktivität beobachtet. Wie bei den glatten Muskelzellen konnte Carvedilol auch bei den untersuchten Endothelzellen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation induzieren, während im MTT-Test wiederum eine Zunahme der metabolischen Aktivität zu sehen ist.

Auch die Betrachtung der apoptotischen Wirkung auf humane koronararterielle Endothelzellen durch *Nebivolol* lieferte vergleichbare Messergebnisse zu den glatten Muskelzellen. Die Zellen in der S-Phase nahmen von 16% auf 4% ab, die apoptotischen Zellen zeigten eine Zunahme von 7% in der Kontrolle auf 25% unter höchster Konzentration und es kam zu einer Reduktion des Anteils der Endothelzellen in der G₂-Phase.

Sekretion von Endothelin-1 (ET-1) aus humanen koronararteriellen

Endothelzellen:

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Effekte von *Nebivolol* auf die Endothelin-1-Sekretion können ein weiterer Faktor der antiproliferativen Wirkung sein.

Es wurde zunächst die basale ET-1-Sekretion von unbehandelten Endothelzellen in das Wachstumsmedium gemessen.

Unter Inkubation mit *Nebivolol* in steigenden Konzentrationen nahm die ET-1-Konzentration im Wachstumsmedium konzentrationsabhängig um bis zu 86% ab. Unter Anwesenheit eines Hemmstoffes des NO-Synthase konnte dagegen durch *Nebivolol* keine Abnahme der ET-1-Sekretion beobachtet werden. Dies lässt auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einerseits gesteigerter NO-Produktion und andererseits verminderter Endothelinproduktion schließen.

Durch in situ-Hybridisierung kann die Expression von prä-pro ET-1 mRNA dargestellt werden. Die Kontrollzellen zeigen eine starke Expression der mRNA mit starkem

cytoplasmatischem Signal. Nach 12-stündiger *Nebivolol*inkubation wird in diesen Zellen die prä-pro ET-1 mRNA nur noch stark vermindert exprimiert.

Bei einer Reihe von Krankheiten, insbesondere solcher des Herzkreislaufsystems wurden erhöhte Plasmaspiegel von Endothelin-1 festgestellt. In arteriosklerotischen Plaques wurden sowohl eine gesteigerte Expression der prä-pro-ET-1 mRNA nachgewiesen [Winkles 1993], als auch erhöhte Endothelin-1-Spiegel [Zeiger 1995]. Zudem ist Endothelin-1 ein pathogenetischer Faktor bei der Entwicklung von Restenosen nach Ballondilatation [Azuma 1994]. Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten eine Abnahme der Intimahyperplasie zu verzeichnen ist [Douglas 1994].

Unter *Nebivolol*inkubation sehen wir eine Abnahme der prä-pro-ET-1 mRNA. Dies kann durch den direkten Einfluss von *Nebivolol* auf den Signaltransduktionsmechanismus geschehen oder aber durch parakrine Effekte über die gesteigerte NO-Freisetzung auf transkriptionaler Ebene.

Durch die Verringerung der Endothelin-1-Sekretion unter *Nebivolol* könnten die Verläufe von Erkrankungen mit gestörter Endothelfunktion wie die Arteriosklerose, die kardiale Hypertrophie oder auch die vaskulären Komplikationen bei Diabetes mellitus günstig beeinflusst werden.

Einfluss von *Nebivolol* auf die Produktion von Stickstoffmonoxid auf humane koronararterielle Endothelzellen:

In der Untersuchung konnte gezeigt werden, dass *Nebivolol* über die antiproliferativen Eigenschaften hinaus zu einer gesteigerten NO-Freisetzung in Endothelzellen führt.

Hierzu wurden die Endothelzellen mit steigenden Konzentrationen des Medikaments über 4 Tage inkubiert. Über eine Messung der Nitratkonzentration im Wachstumsmedium konnte indirekt die NO-Konzentration ermittelt werden. Unter dem Einfluss von *Nebivolol* konnte eine gesteigerte Nitratbildung nachgewiesen werden.

NO ist eine körpereigene Substanz mit Anti-Arteriosklerotischer Wirkung. Aus anderen Untersuchungen geht hervor, dass *Nebivolol* eine endothelabhängige Vasodilatation bei Kaninchenkoronarien induziert [Gao 1991]. Demgegenüber kann durch Blockade des Enzyms NO-Synthase III (NOS III) mit L-NMMA oder auch durch eine

Deendothelialisierung des arteriellen Gefäßes die Vasodilatation unterbunden werden [Gao 1991].

Klinische Studien bei Menschen zeigten eine dosisabhängige Vasodilatation an Arteriolen des Unterarmes sowohl bei gesunden Probanden, als auch bei Patienten mit essentiellen Hypertonus. Dieser Effekt wird durch den Hemmstoff der NO-Synthetase L-NMMA inhibiert [Cockroft 1995, Dawes 1999].

Bislang konnte noch nicht endgültig geklärt werden über welche Rezeptoren und Übertragungswege die *Nebivolol*-vermittelte Aktivierung der NO-Synthetase läuft. Weder sein Antagonismus am β_1 -Rezeptor, noch der Agonismus am α -Adrenozeptor und Histaminrezeptor scheinen für die vasodilatatorischen Eigenschaften verantwortlich [Gao 1991]. Auch eine Kreuzreaktion zu 5 HT_{1A}-Rezeptoren (5-Hydroxytryptohan) scheint hierbei keine wesentliche Rolle zu spielen [Chlopicki 2002]. Obwohl *Nebivolol* keine β_2 -agonistische Eigenschaft besitzt, werden durch seine Metabolite endotheliale β_2 -Rezeptoren stimuliert [Broeders 2000]. Durch eine Erhöhung des endothelialen freien Calciums kommt es in der Folge zur Aktivierung der NOS III.

In Endothelzellen ist außerdem der β_3 -Adrenozeptor zu finden. Durch diesen Rezeptorsubtyp findet ebenfalls eine NO-vermittelte Vasodilatation statt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *Nebivolol* ferner eine agonistische Wirkung auf den β_3 -Rezeptor besitzt [Dessy 2005].

Die Strukturformel von *Nebivolol* ähnelt in auffallender Weise der Strukturformel des Geschlechtshormons 17 β -Estradiol. Für 17 β -Estradiol werden ebenfalls Mechanismen berichtet, welche über die Bindung an Plasmamembranstrukturen zu einer vermehrten NO-Bildung mit nachfolgender Relaxation der vaskulären glatten Muskelzellen führt [Wyckoff 2001]. Durch Hermes et al. konnten nachweisen, dass durch diese Strukturverwandtschaft *Nebivolol* an den endothelialen Östrogenrezeptor bindet. In der Studie wurden vasoaktive Effekte festgestellt, welche zumindest teilweise auf die Interaktion zwischen Östrogenrezeptor und *Nebivolol* zurückzuführen waren [Hermes 2004].

Neben diesen unmittelbaren vasodilatatorischen Eigenschaften unter längerfristiger *Nebivolol*-behandlung war auch eine Verbesserung der endothelialen Funktion bei Patienten mit essentiellen Hypertonus [Tzemos 2001] zu beobachten.

Die Abnahme des NO-Gehaltes spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und geschieht über mehrere Mechanismen. Zum einen ist in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen die Freisetzung von Sauerstoffradikalen gesteigert, was eine rasche Inaktivierung von NO durch Oxidation zu Peroxynitrit zur Folge hat. Zum anderen führt Peroxynitrit wiederum zu einer Entkopplung der NOS III und dementsprechend zu einer nachlassenden NO-Produktion, so dass der NO-Mangel hierdurch weiter verstärkt wird.

In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen ist die Freisetzung von Sauerstoffradikalen gesteigert. Dies hat zur Folge, dass NO im Rahmen eines chemischen Prozesses durch Oxidation zu Peroxynitrit umgewandelt wird [Ohara 1993]. Die Inaktivierung von NO wird als wichtige Ursache der endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit essentiellm Hypertonus angesehen.

Studien mit gesunden Probanden konnten zeigen, dass die Urinausscheidung von Isoprostan 8-iso-PGF_{2α}, einem spezifischen Marker für oxidativen Stress nach 7-tägiger *Nebivolol*-Behandlung reduziert werden konnte [Troost 2000].

Nebivolol kann die Oxidation von NO zu Peroxynitrit vermindern. In der Untersuchung von Cominacini et al. wurden tierische und humane Endothelzellen oxidativem Stress ausgesetzt und mit *Nebivolol* und Atenolol behandelt. Während durch die Inkubation der Zellen mit freien Radikalen eine Abnahme der NO- und Nitrit-Konzentration gemessen wurde, konnte durch *Nebivolol* ein signifikanter Abfall der basalen NO- und Nitritkonzentrationen vermieden werden. Demgegenüber stellte sich ein solcher Effekt bei Atenolol nicht ein [Cominacini 2003]. Vermutlich werden die erhöhten NO-Konzentrationen durch verschiedene Mechanismen erreicht. *Nebivolol* beeinflusst die Aktivierung der NADPH-Oxidase und vermindert so die Produktion von Sauerstoffradikalen. In der Folge wird die Inaktivierung von NO durch Oxidation zu Peroxynitrit verzögert. Zudem wird die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS), dem Enzym, welches NO aus L-Arginin synthetisiert, in Anwesenheit von *Nebivolol* mehr als verdoppelt [Cominacini 2003].

Diese Ergebnisse konnten durch Mollnau et al. unterstrichen werden. Im Tiermodell wurde hier die Auswirkung von *Nebivolol* auf die Endothelfunktion untersucht und es konnte eine Inhibition der Superoxidproduktion im Gefäß festgestellt werden. Durch den antioxidativen Effekt wird die Entkopplung der NO-Synthase vermieden und so die

Voraussetzung für einen ungestörten Ablauf der NO – cGMP – cGK –Signalkaskade mit nachfolgender Vasodilatation geschaffen. Zusätzlich konnte eine dosisabhängige Hemmung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in isolierten neutrophilen Leukozyten durch *Nebivolol* erreicht werden [Mollnau 2003].

Diese Erkenntnisse können das therapeutische Einsatzspektrum von *Nebivolol* über die Blutdrucksenkung hinaus erweitern. Die gestörte endothelabhängige Vasodilatation spielt eine zentrale Rolle in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen. Oxidativer Stress führt zu Vasospasmen und Thrombozytenaggregation und in der Folge zu Ischämien am Endorgan. Darüber hinaus scheinen freie Radikale auch zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NF- κ B beizutragen [Cominacini 2000].

Dieser Transkriptionsfaktor ist an der Plaqueentstehung beteiligt und regelt apoptotische Vorgänge [Curtin 2002].

So könnte durch den antioxidativen Einfluss von *Nebivolol* womöglich der Induktion arteriosklerotischer Vorgänge und den daraus entstehenden Komplikationen vorgebeugt werden.

Zum Schluss sollte noch angemerkt werden, dass die hier eingesetzten *Nebivolol*-Konzentrationen, mit denen eine Proliferationshemmung bei humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen erreicht wurde, höher sind als die Serumspiegel unter therapeutischer Dosierung des Medikaments beim Menschen. Die Serumspiegel von β -Blockern spiegelt jedoch nicht unbedingt die an den Zielzellen erreichte Konzentration wieder. Für Propranolol beispielsweise ist bekannt, dass es in Myokardzellen akkumuliert. Auch für Carvedilol wurde beschrieben, dass in vitro höhere Konzentrationen der Substanz benötigt werden um eine Inhibition des Zellwachstums zu erreichen als in vivo [Sung 1993].

Die hohe Lipophilie von *Nebivolol* kann zu einer Anreicherung der Substanz in der Zellmembran mit der Folge einer erhöhten lokalen Konzentration mit Potenzierung der Wirkung führen. So kann es sein, dass die für eine antiproliferative Wirkung benötigten in vivo-Spiegel nicht unbedingt mit den in vitro verwendeten Konzentrationen korrelieren müssen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In den vergangenen Jahren wurden auf dem Gebiet der medikamentösen und interventionellen Therapie arteriosklerotischer Gefäßveränderungen deutliche Fortschritte erzielt. Die interventionelle Behandlung von Gefäßverengungen oder -verschlüssen mittels perkutaner transluminaler Ballonangioplastie nimmt einen hohen Stellenwert ein. Ein großes Problem dieser Behandlungsstrategie stellt jedoch nach wie vor die Restenosierungsrate von 30-50% bei konventioneller PTCA mit Stentimplantation dar. Alleine die Drug-eluting Stents zeigten eine deutliche Reduktion der Restenose, was aber mit einer erhöhten Inzidenz von späten Stent-Thrombosen einhergeht. Daher wird eine längere Aspirin- und Clopidogrel-Therapie notwendig. Die Entstehung der Restenose, aber auch der Prozess der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen sind komplexe pathophysiologische Vorgänge und basieren auf einer Verletzung der Gefäßintegrität mit Veränderung der endothelialen Funktion.

In der vorliegenden Studie konnte durch einen Betablocker eine dosisabhängige antiproliferative Wirkung an humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *Nebivolol* konzentrationsabhängig zu einer vermehrten Freisetzung von NO bei Endothelzellen führt. Diese Eigenschaften unterscheiden *Nebivolol* von den üblichen Betablockern.

Das Endothelin-System hat einen großen pathophysiologischen Einfluss auf das kardiovaskuläre System. Endothelin-1 ist ein potentes vasokonstriktorisches Peptid, zudem ist eine proliferationsfördernde Wirkung auf intimale glatte Muskelzellen bekannt. Durch die Inkubation von Endothelzellen mit *Nebivolol* kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Endothelin-1-Sekretion. Mittels in situ-Hybridisierung konnte eine stark verminderte Expression der prä-pro ET-1 mRNA als Ursache der verminderten Endothelinproduktion nachgewiesen werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann noch nicht genau gesagt werden, welche Mechanismen für den antiproliferativen Effekt verantwortlich sind. Anhand der Tatsache, dass *Nebivolol* auch unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren die Proliferation der

vaskulären glatten Muskelzellen inhibiert, ergibt sich der Hinweis, dass *Nebivolol* möglicherweise die Fähigkeit besitzt in den Zellzyklus einzugreifen. Weitere hemmende Einflüsse auf das Wachstumsverhalten der glatten Muskelzellen sind durch die nachgewiesene Steigerung der NO-Verfügbarkeit, durch die Abnahme der Endothelin-1-Sekretion und durch die nachgewiesene Induktion apoptotischer Vorgänge denkbar. Die Blockade der β -Rezeptoren scheint nicht der Grund der antiproliferativen Wirkung zu sein, da für keinen der anderen klassischen Betablocker Einflüsse auf das Wachstumsverhalten der Zellen nachgewiesen werden konnte.

Die Einflüsse von *Nebivolol* auf die Produktion von Stickstoffmonoxid in Endothelzellen ist ebenfalls noch Gegenstand von Untersuchungen. Eine *Nebivolol*-vermittelte verbesserte Kopplung der NO-Synthetase (NOS) oder die verhinderte Entkopplung der NOS scheint hierbei der zentrale Mechanismus zu sein. Denn die antioxidativen Mechanismen verhindern die NOS-Inaktivierung und die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoff-Radikalen. Es gibt Hinweise auf Interaktionen mit β_2 -, β_3 - und endothelialen Östrogenrezeptoren. Die Interaktionen mit den Östrogenrezeptoren spiegeln sich wieder in der SENIORS-Studie, in der Frauen unter *Nebivolol* tendenziell besser abschnitten als Männer.

Hinzu kommt, dass durch die antioxidative Potenz von *Nebivolol* eine rasche Inaktivierung von NO verhindert werden kann.

Der Betablocker *Nebivolol* besitzt durch seine Angriffspunkte an Endothelzellen und glatten Muskelzellen die Charakteristika einer modernen pharmakologischen Substanz, welche zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden kann. Die Kombination einer vermehrten NO-Bildung mit der Eigenschaft der Proliferationshemmung könnte helfen die Rezidivrate von Restenosierungen, aber auch die Progression der Arteriosklerose zu verlangsamen. Darüber hinaus zeichnen sich positive Effekte auf die endotheliale Funktion ab.

Natürlich bedarf es noch weiterer Erkenntnisse darüber, ob diese Eigenschaften auch unter therapeutischen Konzentrationen des Medikamentes beim Menschen nachweisbar bleiben.

Vieles deutet jedoch darauf hin, dass *Nebivolol* die Potenz besitzt in die grundlegenden Pathomechanismen arteriosklerotischer Vorgänge einzugreifen und so daraus entstehenden Komplikationen vorgebeugt werden kann.

6 LITERATUR

Anonymous

Nebivolol
Drugs of the future (1989) 14: 957-959

Axel DI et al.

Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery
Circulation (1997) 96: 636-645

Axel DI et al.

Induction of cell-rich and lipid-rich plaques in a transfilter coculture system with human vascular cells
J Vasc Res (1996) 33: 327-339

Azuma H et al.

Role of endothelin-1 in neointima formation after endothelial removal in rabbit carotid arteries
Am J Physiol (1994) 267: H2259-H2267

Barton M et al.

ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophie and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension
Hypertension (1996) 31: 499-504

Boecker W, Denk H, Heitz Ph U

Pathologie,
Urban & Schwarzenberg; 1. Auflage, 1997

Borchard U

β -Rezeptorenblocker
Aesopus-Verlag, 3. Auflage 1996

Boulanger C et al.

Release of endothelin from porcine aorta: inhibition by endothelium derived nitric oxide
J Clin Invest (1990) 88:310-314

Bredt DS et al.

Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme
Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87: 682

Brehm BR et al.

Prevention of human smooth muscle cell proliferation without induction of apoptosis by the topoisomerase I inhibitor topotecan
Biochem Pharmacol (2000)

Brehm BR et al.

Dynamic regulation of β -adrenergic receptors by endothelin-1 in smooth muscle cells
Cardiovasc Pharmacol (1998a) 31 (Suppl.1): S77-S80

Brehm BR et al.

Comparison of endothelin-1 and big-endothelin-1 in unstable versus stable angina pectoris
J Cardiovasc Pharmacol (1998b) 31 (Suppl.1): S90-93

Broeders MA et al.

Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release. Endothelial β_2 -adrenergic receptor-mediated nitric-oxide release
Circulation (2000) 102: 677-684

Büsse R et al.

Endothelium derived relaxing factor inhibits platelet activation
Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. (1987) 336: 566- 571

Cambridge D et al.

Pharmacological profile in vivo of a novel angiotensin converting enzyme inhibitor and β -blocker
J Cardiovasc Pharmacol (1987) 10(Suppl.11): S64-S68

Ceol M et al.

Increased glomerular α_1 (IV) collagen expression and deposition in long-term diabetic rats is

prevented by chronic glycosaminoglycan treatment.

Lab Invest (1996) 74: 484-495

Chlopicki S et al.

NO-Dependent vasodilation induced by Nebivolol in coronary circulation is not mediated by β -adrenoceptors or by 5-HT_{1A}-Receptors

J Physiol Pharmacol (2002) 53: 615-624

Cockcroft JR et al.

Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for L-arginine/NO-dependent mechanism

J Pharmacol Exp Ther (1995) 274: 1067-1071

Cominacini L et al.

Nebivolol and its 4-Keto-Derivative increase nitric oxide in endothelial cells by reducing its oxidative inactivation

J Am Coll Cardiol (2003) 42: 1838-1844

Cominacini L et al.

Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces activation of NF- κ B through an increase production of intracellular reactive oxygen species

J Biol Chem (2000) 275: 12633-12638

Curtin JF et al.

Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis

J Immunol Methods (2002) 265: 49-72

Dartsch PC et al.

Growth characteristics and cytoskeletal organization of smooth muscle cells from human primary stenosing and restenosing lesions

Arteriosclerosis (1990) 10: 62-75

Daub H et al.

Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors

Nature (1996) 379: 557-560

Dawes M et al.

The vasodilator action of nebivolol in forearm vasculature of subjects with essential hypertension

Br J Clin Pharmacol (1999) 48: 460-463

De Cree J et al.

Non-invasive cardiac haemodynamics of nebivolol

Drug Invest. (1991) 3(Suppl.1): 25-30

Dessy C et al.

Endothelial β_3 -adrenoceptors mediate nitric-oxide dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third generation β -blocker Nebivolol

Circulation (2005) 112: 1198-1205

Dole WP et al.

Endothelium and large coronary artery responses to 5-hydrotryptamine in vivo

Blood vessels (1986) 23:64

Douglas SA et al.

A role for endogenous endothelin-1 neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670

Circ Res (1994) 75: 190-197

Dzau VJ et al.

Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies

Nature Med (2002) 11: 1249-1256

Elledge SJ et al.

Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis

Science (1996) 274: 1664-1671

Ferrell et al.

A dilemma for the 1990s. Choosing appropriate experimental animal model for the prevention of

- restenosis
Circulation (1992) 85: 1630-1631
- Fishman WH et al.**
β-Adrenoceptor antagonists
N Engl J Med (1981) 305: 500-506
- Fishman WH et al.**
Alpha and beta blocking drugs.
In: Fishman WH, Sonnenblick EH, editors, Cardiovascular pharmacotherapeutics, New York
(1997) pp. 59-64
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K**
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Spektrum Akademischer Verlag, 7. Auflage (1996)
- Furchgott RF, Zawadzki JV**
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth by acetylcholine
Nature (1980) 228: 373-376
- Fuster V et al.**
Mechanisms leading to myocardial infarction: Insights from studies of vascular biology
Circulation (1994) 90: 2126-2146
- Fries R et al.**
Vom Risikofaktor zur symptomatischen koronaren Herzkrankheit
Med. Klinik (2003) 98: 218-225
- Gao Y et al.**
Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries
J. Cardiovasc. Pharmacol. (1991) 17: 964-969
- Gao Y et al.**
Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine arteries
Drug Invest (1991) 3: 118-119
- Gershlick AH et al.**
Treating atherosclerosis: Local drug delivery from laboratory studies to clinical trials
Atherosclerosis (2002) 160: 259-271
- Giaid A et al.**
Expression of endothelin-1 in lungs of patients with pulmonary hypertension
N Engl J Med (1993) 328: 1732-1739
Hypertension (1989) 18: 658-667
- Goldstein M et al.**
Administration of Nebivolol after coronary artery bypass in patients with altered left ventricular function
J Cardiovasc Pharmacol (1993) 22: 253-258
- Grantham JA et al.**
Enhanced endothelin-converting enzyme immunoreactivity in early atherosclerosis.
J Cardiovasc Pharmacol (1998) 31: 22-26
- Hannan RL et al.**
Endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta
Growth factors (1988) 1:7
- Harrisons Innere Medizin 1**
ABW Wissenschaftsverlag, 15. Auflage 2002
- Hermes J et al.**
Estrogen receptor-mediated vascular responsiveness to Nebivolol: a novel endothelium-related mechanism of therapeutic vasorelaxation
J Cardiovasc Pharmacol (2004) 43: 638-644
- Hibbs JB et al.**
Nitric oxide : a cytotoxic activated macrophage molecule
Biochem Biophys Res Commun (1988) 157(1): 87
- Idzikowski C et al.**
A study to assess the effects of Nebivolol on sedation and psychomotor performance in normal

- volunteers
Drug Invest. (1991) 3 (Supp.1): 183-185
- Ignarro LJ et al.**
Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid
J. Pharm. Exp. Ther. (1986) 237: 893-900
- Ignarro LJ et al.**
Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery vein is nitric oxide
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84: 9265-9269
- Ihl-Vahl R et al.**
Regulation of β -adrenergic receptors in acute myocardial ischemia : subtype-selective increase of mRNA specific for β_1 -adrenergic receptors
J Mol Cell Cardiol (1995) 27: 437-452
- Ihl-Vahl R et al.**
Differential regulation of mRNA specific for β_1 - and β_2 -adrenergic receptors in human failing hearts. Evaluation of the absolute cardiac mRNA levels by two independent methods
J Mol Cell Cardiol (1996) 27: 1-10
- Ishida A et al.**
Induction of the cyclin-dependent kinase-inhibitor p21 (Sdi/CIP1/WAF1) by nitric-oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells
J Biol Chem (1997) 272: 10050-10057
- Janssens WJ et al.**
Animal pharmacology of Nebivolol
Drug Invest. (1991) 3 (Supp.1): 13-24
- Janssens WJ et al.**
Nebivolol is devoid of intrinsic sympathomimetic activity
Europ. J. Pharmacol. (1989) 159: 89-95
- Janssens WJ et al.**
Pharmacology Nebivolol: A Review of existing Data up to August 1994
Nebivolol Dokumentation 1994
- Janssens WJ, Cools F**
Release of ERDF from isolated porcine coronary arteries, but not from rat aorta, induced by Nebivolol and its enantiomers
Nebivolol Dokumentation 1994
- Kirchengast M**
Endothelin an restenosis
Cardiovascular Research (1998) 39: 550-555
- Kinsella MG et al.**
Modulation of sulfated proteoglycan synthesis by bovine aortic endothelial cells during migration
J Cell Biol (1986) 102: 678-687
- Knowles RG et al.**
Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase
Proc Natl Acad Sci USA (1990) 86:1
- Lerman A et al.**
Circulating and tissue endothelin immunoreactivity an advanced atherosclerosis
N Engl J Med (1991) 325: 997-1001
- Lerman A et al.**
Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis
New Engl J Med (1991) 325: 997-1001
- Levin ER**
Endothelins
N Engl J Med (1995) 333: 356-363

- Lindner V et al.**
Proliferation of smooth muscle cell after vascular injury is inhibited by antibody against basic fibroblast growth factor
Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88: 3739-3743
- Liu J et al.**
Ischemia and reperfusion increase ¹²⁵I-labeled endothelin-1 binding in rat cardiac membranes
Am J Phys (1990) 258: H829-H835
- Liu J et al.**
Restenosis after coronary angioplasty
Circulation (1989) 79: 1374-1387
- Loop FD et al.**
Influence of the internal mammary graft in 10-year survival and other cardiac events.
N Engl J Med (1986) 314: 1-6
- Loots W, De Clerck F**
Differential effects of Nebivolol an adrenoceptors in the heart in resistant arterioles in the rat
Europ. J. Pharmacol. (1990) 179: 177-186
- Lüscher TF et al.**
Vascular effects of newer cardiovascular drugs: focus on Nebivolol and ACE-inhibitors
J Cardiovasc Pharmacol (2001) 38;Suppl.3: S3-S11
- Lüscher TF et al.**
Endothelial dysfunction in coronary artery disease
Annu Rev Med (1993) 44: 395-418
- Lüscher TF, Vanhoutte PM**
The endothelium: modulator of cardiovascular function
CRC Press 1990, Boca Raton, S. 1-215
- Markewitz BA et al.**
Endothelin-1 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase
Am J Physiol (1997) 272: L1078-K1083
- Majeski MW et al.**
Production of transforming growth factor β -1 during repair of arterial injury
J Clin Invest (1991) 88: 904-910
- McBride W et al.**
Restenosis after successful coronary angioplasty
N Engl J Med (1988) 318: 1734-1737
- McCumber et al.**
Endothelin: Visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 7285-7289
- Moll K.J., Moll M**
Anatomie, Kurzlehrbuch,
Jungjohann Verlag; 14. Auflage, 1995
- Mollnau H et al.**
Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidaemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells
Arterioscl Thromb Vasc Biol (2003) 23: 615-621
- Mügge A**
Abnorme Endothel-vermittelte Regulation des Gefäßtonus bei Arteriosklerose
Z. Kardiol. (1994) 83:759-767
- Mutschler E, Schäfer-Korting M**
Arzneimittelwirkungen,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 7. Auflage 1996
- Nabel EG et al.**
Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo
J Clin Invest (1993) 91: 1822-1829

Narita N et al.

The gene for transcription factor GATA-6 resides on mouse chromosome 18 and is expressed in myocardium and vascular smooth muscle
Genomics (1996) 36: 345-348

Nichols AJ et al.

In vitro pharmacologic profile of the novel β -adrenoceptor antagonist and vasodilator, carvedilol
Pharmacology (1989) 39: 327-336

Nichols AJ et al.

Studies in the mechanism of arterial vasodilatation produced by the novel antihypertensive agent carvedilol
Fundam Clin Pharmacol (1991) 5: 25-38

Ohara Y et al.

Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production
J Clin Invest (1993) 91: 677-684

Palmer RMJ et al.

Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-Arginine
Nature (1988) 333:664

Palmer RMJ et al.

Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium derived relaxing factor
Nature (1987) 327: 524-526

Patel MK et al.

Inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by the novel multiple-action antihypertensive agent carvedilol
J Cardiovasc Pharmacol (1995) 25: 652-657

Pauly RR et al.

Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation
Circ Res (1994) 75(1): 41-54

Pauwels PJ et al.

The receptor binding profile of the new antihypertensive agent nebivolol and its stereoisomers compared with various β -adrenergic blockers
Mol Pharmacol (1988) 34: 843-851

Perlman H et al.

GATA-6 induces p21(CIP1) expression and G1 cell cycle arrest
J Biol Chem (1998) 273: 13713-13718

Popma JJ et al.

Clinical trials of restenosis after angioplasty
Circulation (1991) 84: 1426-1436

Prichard BNC et al.

The additional properties of beta adrenoceptor blocking drugs
J Cardiovasc Pharmacol (1986) 8(Suppl.4): S1-S15

Prins BA et al.

Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured human endothelial cells
J Biol Chem (1994) 269: 11938-11944

Qian H et al.

Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecules expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits
Circulation (1999) 99: 2979-2982

Qiu SQ et al.

Lipoprotein(a) blood levels in unstable angina pectoris, acute myocardial infarction and after thrombolytic therapy.
Am J Cardiol (1991) 67: 1175-1179

- Radmoski MW et al.**
An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation
Proc. Natl Acad Sci USA (1990) 87: 5193
- Rapoport RM et al.**
Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP
Circ Res (1983) 52:352
- Reidy MA et al.**
A reassessment of endothelial injury and arterial lesion
Lab Invest (1985) 53: 513-520
- Richard V et al.**
Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries
Am J Physiol (1990) 259: H1433
- Ritter JM**
A study to investigate the possible vasodilator effect of Nebivolol on forearm blood flow in healthy volunteers
Nebivolol Dokumentation 1994 und 1994 a-c
- Rizvi MA et al.**
Nitric oxide modulates basal and endothelin-induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels
J Mol Cell Cardiol (1997) 29: 1779-1789
- Rosendorff C**
Beta-blocking agents with vasodilator activity
J Hypertens (1993) 11(Suppl.4): S37-S40
- Ross R**
Atherosclerosis- an inflammatory disease
N Engl J Med (1999) 340: 115-126
- Ross R**
Cell biology of atherosclerosis
Annu Rev Physiol (1995) 57: 791-804
- Ross R et al.**
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's
Nature (1993) 362: 801-809
- Ross R et al.**
Polypeptide growth factors and atherosclerosis
Trends Cardiovasc Med (1991) 1: 277-282
- Ross R et al.**
The pathogenesis of atherosclerosis: an update
N Engl J Med (1986) 314: 488-500
- Ross R et al.**
Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesion of atherosclerosis
Science (1973) 180: 1332-1339
- Rubanyi GM**
The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases
J Cardiovasc Pharmacol (1993) 22: S1-S14
- Rubanyi GM et al.**
Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor
Am J Physiol (1986) 250: H822
- Ruffolo jr. RR et al.**
Preclinical and clinical pharmacology of carvedilol
J Hum Hypertens (1993) 7(Suppl.1): S2-S15
- Ruffolo jr. RR et al.**
The pharmacology of carvedilol
Eur J Clin Pharmacol (1990) 38(Suppl): S82-S88

Saijonmaa O et al.

Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells
Biochem Biophys Res Commun (1990) 166: 324-329

Schiffrin EL et al.

Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. Brief review
Hypertension (1995) 25: 1135-1142

Salvetti A et al.

Antihypertensive and renal effects of teriatolol, a new betablocking agent
Am J Nephrol (1986) 6(Suppl.2): 45-49

Shen YH et al.

Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways
FEBS Lett (1998) 433: 125-131

Shiba R et al.

Elimination of intravenously injected endothelin-1 from the circulation of the rat
J Cardiovasc Pharmacol (1989) 13 (Suppl 5): S98-S101

Smith RC et al.

p21CIP1-mediated inhibition of cell proliferation by overexpression of the gax homeodomain gene
Genes Dev (1997) 11: 1674-1689

Statistisches Bundesamt (2003)

Statistisches Jahrbuch 2002, Kapitel Gesundheitswesen

Stewart DJ et al.

Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension. Marker or mediator of disease?
Ann Int Med (1991) 114:464-469

Stoleru L et al.

Effects of d-nebivolol and l-nebivolol on left ventricular systolic and diastolic function: comparison with dl-nebivolol and atenolol
J Cardiovasc Pharmacol (1993) 22: 183-190

Sung CP et al.

Carvedilol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation.
J Cardiovasc Pharmacol (1993) 21: 221-227

Tahara A et al.

Circulating immunoreactive endothelin in patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty
Metabolism (1991) 40: 1235-1237

Thiemes Innere Medizin

Georg Thieme Verlag, 1999

Tunstall-Pedoe H et al.

Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations
Lancet (1999) 353: 1547-1557

Troost R et al.

Nebivolol decreases systemic oxidative stress in healthy volunteers
Br J Clin Pharmacol (2000) 50: 377-379

Tzemos N et al.

Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study
Circulation (2001) 104: 511-514

Van Bortel L

Pharmacological properties of Nebivolol
Nebivolol Dokumentation 1994

Van de Water A et al.

Pharmacologic and haemodynamic profile of nebivolol, a chemically novel, potent and selective β_1 -adrenergic antagonist.
J Cardiovasc Pharmacol (1988) 11: 552-563

- Van Nueten L, Walgraeve H**
Pharmacodynamic effects of Nebivolol
Nebivolol Dokumentation 1995
- Vanhoutte PM**
Endothelium and control of the vascular function. State of the art lecture
Hypertension (1989) 13: 658-667
- Von der Leyen HE et al.**
Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene.
Proc Natl Acad Sci USA (1995) 92: 1137-1141
- Wikstrand J et al.**
Metoprolol versus thiazide diuretics in hypertension – morbidity results from the MAPHY study
Hypertension (1991) 17: 579-588
- Wilhelmsen L et al.**
Beta-blockers versus diuretics in hypertensive men: main results from the HAPPHY trial.
J Hypertens (1987) 5: 561-572
- Winkles JA et al.**
Endothelin-1 and endothelin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries
Biochem Biophys Res Commun (1993) 191: 1081-1088
- Wyckoff MH et al.**
Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through G α (i)
J Biol Chem (2001) 276: 27071-27076
- Xu D et al.**
ECE-1: A membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1
Cell (1994) 78: 473-485
- Yanagisawa M et al.**
A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells
Nature (1988) 332: 411-415
- Yang Z et al.**
Different activation of endothelial L-arginine and cyclooxygenase pathway in human internal mammary artery and saphenous vein
Circ Res (1991) 68:52
- Yeh YC et al.**
Synergistic effects of endothelin-1 and transforming growth factor α or epidermal growth factor on DNA replication and G1 to S phase transition
Biosci Rep (1991) 11: 171-180
- Yoshimoto S et al.**
Effect of carbon oxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells
Stroke (1991) 22: 378-383
- Yue TL et al.**
Carvedilol, a new vasodilating beta-adrenoceptor blocker, inhibits oxidation of low-density lipoproteins by vascular smooth muscle cells and prevents leukocyte adhesion to smooth muscle cells.
J Pharamcol Exp Ther (1995) 273: 1442-1449
- Yusuf S et al.**
Randomized trials to assess the long term-effects of therapies on angiographic end points
Chest (1991) 99: 1243-1247
- Yusuf S et al.**
Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. Treatments following myocardial infarction
J Am Med Assoc (1988) 260: 2088

Zeiber AM et al.

Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina.

Circulation (1995) 91: 941-947

Veröffentlichungen der eigenen Daten

1. Brehm BR, Wolf SC, Bertsch D, Klaussner M, Wesselborg S, Schüler S, Schulze-Osthoff K
Effects of nebivolol on proliferation and apoptosis of human coronary artery smooth muscle and endothelial cells
Cardiovascular Research (2001) 49: 430-439
2. Brehm BR, Bertsch D, von Fallois J, Wolf SC
β-blockers of the third generation inhibit endothelin-1 liberation, mRNA-Production and proliferation of human coronary smooth muscle and endothelial cells
Journal of Cardiovascular Pharmacology (2000) 36 (Suppl.1): S401-S403
3. Brehm BR, Bertsch D, Wolf SC
Nebivolol hemmt die Proliferation sowohl von humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen als auch von Endothelzellen und steigert die NO-Freisetzung
Perfusion (1998), 11: 475-484

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben ganz herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. B. Brehm für die Bereitstellung des interessanten Themas und die intensive Betreuung dieser Arbeit.

Insbesondere möchte ich mich für sein Engagement, seine Motivation und seine Ausdauer mit mir bedanken.

Frau Professor Dr. med. S. Wolf für ihre Unterstützung und Hilfe.

Frau Dr. M. Klaussner und Herr Dr. R. Bernhard für die Hilfsbereitschaft in vielen praktischen Fragen des Laboralltags und bei der *in situ*-Hybridisierung im Besonderen

Und ganz besonders meinen Eltern für die geduldige und liebe Unterstützung, ihre wohlwollende Hilfe und den beständigen Rückhalt über die Jahre.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name	Daniela Beatrice Bertsch
geboren	am 08.12.1974 in Reutlingen
Eltern	Friedlinde Bertsch, geb. Vollmer Dieter Bertsch

Schulbildung:

1981-1985	Grund- und Hauptschule Lichtenstein
1985-1994	Friedrich-Schiller-Gymnasium Pfullingen
1994	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

10·1994-5·2001	Eberhard-Karls-Universität Tübingen Studium der Humanmedizin
09.09.1996	Ärztliche Vorprüfung
28.08.1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
28.03.2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08.05.2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit:

7·2001-12·2002	Ärztin im Praktikum an der Medizinischen Klinik des Klinikum am Steinenberg, Reutlingen (Chefarzt Prof. Dr. B. Braun)
1·2003-6·2006	Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik des Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
7·2006-8·2007	Assistenzärztin am Kantonsspital Münsterlingen (Schweiz), Medizinische Klinik (Chefarzt Prof. Dr. M. Krause)
seit 9·2007	Kardiologische Ausbildung im Herz-Neuro-Zentrum Bodensee, Kreuzlingen (Chefarzt Dr. med. M. Pieper)