

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Tübingen  
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie  
Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

**Einfluss von Homocystein auf die endothelabhängige  
Gefäßrelaxation bei normalen und Streptozotocin  
induzierten diabetischen Ratten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Eva Natalie Häntschel  
aus  
Nürtingen

2007

Dekan : Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Risler

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Bisheriger Kenntnisstand.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Endothelabhängige Gefäßrelaxation.....	1
1.1.2 Homocystein (Hcy).....	2
1.1.3 Diabetes mellitus.....	9
<b>1.2 Zielsetzung.....</b>	<b>13</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Materialien.....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Substanzen .....	14
2.1.2 Herstellung der Lösungen .....	15
2.1.3 Geräte .....	16
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Versuchstiere .....	17
2.2.2 Das Schuler Organbad .....	17
2.2.3 Versuchsvorbereitung .....	18
2.2.4 Versuchsdurchführung.....	19
2.2.5 Homocystein-Diabetes-Studie.....	21
2.2.6 Statistische Auswertung.....	22
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Die Gefäßrelaxation.....</b>	<b>23</b>
3.1.1 Endothelabhängig .....	23
3.1.2 Endothelunabhängig .....	24
<b>3.2 Einfluss von Homocystein auf die Gefäßrelaxation .....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Endothelabhängige Relaxation .....	26
3.2.2 Endothelunabhängige Relaxation .....	27

---

<b>3.3</b>	<b>Untersuchung der endothelabhängigen Gefäßrelaxation nach Hemmung der SAH-Hydrolase .....</b>	<b>31</b>
3.3.1	Eigeneffekt von Adenosin auf die Gefäßrelaxation .....	31
3.3.2	Irreversible Hemmung der SAH-Hydrolase .....	32
3.3.3	Irreversible Hemmung der SAH-Hydrolase nach vorausgegangener Inkubation mit Homocystein und Adenosin .....	36
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von Homocystein auf die Gefäßrelaxation bei Diabetes mellitus .....</b>	<b>39</b>
3.4.1	Endothelabhängige Relaxation bei Typ 1 Diabetes mellitus und Hyperhomocysteinämie .....	39
3.4.2	Endothelunabhängige Relaxation bei Typ 1 Diabetes mellitus und Hyperhomocysteinämie .....	41
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1	Einfluss von Homocystein auf die Vasoelaxation .....	45
4.2	Einfluss einer Hemmung der SAH-Hydrolase auf die Vasorelaxation .....	48
4.3	Einfluss von Hyperhomocysteinämie auf die Vasorelaxation bei Typ 1 Diabetes mellitus .....	52
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>58</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XVIII</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>XX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µM	mikromolar; Mikromol pro Liter
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
Ado	Adenosin
Adodia	Adenosin-2',3'-Dialdehyd
AGE	<i>Advanced Glycosylation Endproducts</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ca.	circa
CBS	Cystathion-β-Synthase
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Relaxation
EDHF	endothelialer hyperpolarisierender Faktor
EDR	endothelabhängige Relaxation
EDRF	endothelialer relaxierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoxid
Hcy	Homocystein
HHcy	Hyperhomocysteinämie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
l	Liter

---

LNA	L-Nitroarginin
M	mol pro Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar; Millimol pro Liter
MP	Methylierungspotential
MTHFR	5,10-Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
nM	nanomol pro Liter
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Seite
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAHH	S-Adenosylhomocystein-Hydrolase
SAM	S-Adenosylmethionin
SEM	Standardfehler des Mittelwerts; <i>standard error of the mean</i>
SNP	Natriumnitroprussid
STZ	Streptozotocin
Tab.	Tabelle
tHcy	totales Homocystein (Gesamthomocystein)
U	Umdrehung
vs.	versus

# 1 Einleitung

## 1.1 Bisheriger Kenntnisstand

### 1.1.1 Endothelabhängige Gefäßrelaxation

Als die innerste Zellschicht von Blutgefäßen ist das Endothel wesentlich an der Regulation der Gefäßaktivität beteiligt [1]. Das Endothel kann dabei über Produktion von vasoaktiven Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) [2], Prostazyklin [3] und den *endothelium derived hyperpolarizing factor* (EDHF) [4] den Gefäßtonus steuern.

#### Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid wird von einer Gruppe von Enzymen die als NO-Synthasen (NOS) bezeichnet werden aus L-Arginin synthetisiert [5, 6]. Hierbei entsteht gleichzeitig L-Citrullin. Bisher werden drei Isoformen der NOS unterschieden, die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS), und die endotheliale NOS (eNOS) [7]. Von der eNOS synthetisiertes Stickstoffmonoxid gilt als der entscheidende vasorelaxatorische Mediator. Noch vor der eindeutigen Identifizierung als Stickstoffmonoxid wurde er als endothelabhängiger relaxierender Faktor (*endothelium derived relaxing factor* EDRF) beschrieben [8, 9].

Zu den wichtigen Funktionen des Stickstoffmonoxids zählt die lokale Regulation des Gefäßtonus, die Organdurchblutung, Endothelpermeabilität und Endothelwachstum sowie die Blutgerinnung durch Hemmung der Blutplättchenaggregation und –adhäsion [10, 11].

In der glatten Gefäßmuskulatur bindet das vom Endothel sezernierte NO an die zytosolische Guanylatcyclase (GC) was eine Zunahme der intrazellulären Konzentration des zyklischen Guanosin-3',5'-Monophosphats (cGMP) in den glatten Gefäßmuskelzellen zur Folge hat [12, 5]. Eine Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinase führt zu Phosphorylierung und Regelung der Aktivität  $Ca^{2+}$ -regulierender Proteine sowie zur Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen [13, 14]. Durch die darauf folgende Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen

werden spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle inaktiviert und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom vermindert. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sinkt und die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur wird gehemmt [15].

### Endotheliale Dysfunktion

Ein voll funktionstüchtiges Endothel ist von großer Bedeutung für das kardiovaskuläre System. Eine Funktionsstörung des Endothels, eine endotheliale Dysfunktion, zeigt sich unter anderem in der Abschwächung der endothelabhängigen Regulationsfähigkeit des Gefäßtonus [16] und einem Anstieg des Blutdrucks. Eine Erhöhung des Blutdrucks wurde sowohl durch Hemmung der eNOS mit L-Nitroarginin (LNA) im Tiermodell gezeigt [17] als auch bei der eNOS knockout Maus nachgewiesen [18, 19].

Zu den Risikofaktoren die zu endothelialer Dysfunktion führen können, zählen neben kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, Hypertonie und Herzinsuffizienz auch Diabetes mellitus und Hyperhomocysteinämie [20, 21].

#### 1.1.2 Homocystein (Hcy)

Homocystein ( $\alpha$ -Amino- $\gamma$ -thiobuttersäure) ist eine sulfhydrylgruppenhaltige Aminosäure, die im Jahre 1932 von du Vigneaud et al. als Zwischenstufe des Stoffwechsels der essentiellen Aminosäure Methionin identifiziert wurde [22].

Das gesamte, im Plasma enthaltene Homocystein (tHcy) lässt sich in verschiedene Formen unterteilen [23]:

- über Disulfidbrücken an Plasmaproteine gebunden (70%-80%)
- oxidiert zu Homocystin und Disulfiden mit niedrigem Molekulargewicht (20%-30%)
- freies Thiol (annähernd 1%)

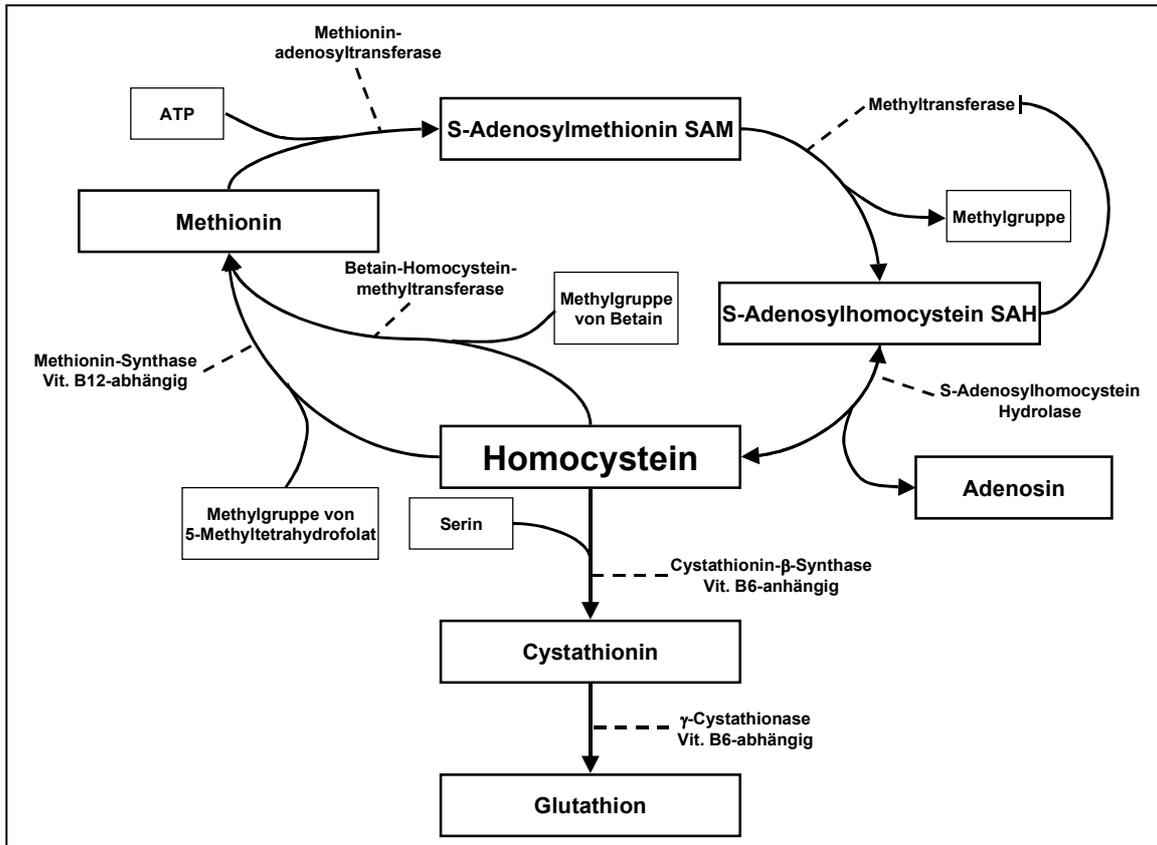
### 1.1.2.1 Homocystein als Zwischenprodukt des Methionin-Stoffwechsels

Die essentielle Aminosäure Methionin reagiert zunächst mit ATP in Anwesenheit der Methionin-Adenosyltransferase zu S-Adenosylmethionin (SAM). SAM wiederum wandelt sich in seiner Funktion als wichtigster Methylgruppendonator, in einer von Methyltransferasen katalysierten Reaktion, in S-Adenosylhomocystein (SAH) um. Hierbei dienen u.a. Neurotransmitter, DNA, RNA, sowie Proteine und Hormone als Akzeptoren der Methylgruppen [24, 25]. SAH ist ein potenter Hemmstoff der Methyltransferasen, es kommt daher zu einer Produkthemmung. Durch die SAH-Hydrolase (SAHH) wird SAH in einer reversiblen Hydrolyse in Adenosin und Homocystein umgewandelt [26, 27]. Adenosin wird anschließend durch die Adenosin-Kinase oder die Adenosin-Desaminase weiter verstoffwechselt. Über zwei irreversible Wege kann der Metabolismus von Hcy weitergeführt werden, durch Remethylierung oder Transsulfurierung [26, 28].

Die Remethylierung unterteilt sich in zwei unterschiedliche Reaktionen, bei denen jeweils wieder Methionin entsteht. Dies geschieht einerseits durch Übertragung einer Methylgruppe von 5-Methyltetrahydrofolat (5-Methyl-THF) auf Homocystein. Die Methionin-Synthase, ein Vitamin B<sub>12</sub>-abhängiges Enzym, katalysiert diese Reaktion. Alternativ wurde in Leber und Niere die Remethylierung mit Betain als Methylgruppendonator und Betain-Homocystein-Methyltransferase als katalysierendes Enzym beobachtet [29].

Die Transsulfurierung erfolgt über den Umbau von Homocystein mit Serin zu Cystathionin, eine von Cystathion- $\beta$ -Synthase (CBS) katalysierte Reaktion. Als Kofaktor wird Vitamin B<sub>6</sub> benötigt. Auf einem weiterführenden Weg wird Cystathionin ebenfalls Vitamin B<sub>6</sub>-abhängig von  $\gamma$ -Cystathionase in Glutathion umgewandelt [30].

Abbildung 1 (S. 4) zeigt die schematische Darstellung des Methionin-Stoffwechsels mit Homocystein im Mittelpunkt.



**Abbildung 1 Homocystein als Mittelpunkt des Methionin-Stoffwechsels**

1.1.2.2 Hyperhomocysteinämie (HHcy)

Definition der Hyperhomocysteinämie

Hyperhomocysteinämie beschreibt eine Erhöhung des tHcy-Spiegels über den Normbereich hinaus. Von einigen Autoren wurde von Werten zwischen 5 und 15 µmol/l bei gesunden Erwachsenen berichtet [31], jedoch werden bereits Plasma-Hcy-Konzentrationen von >10 µmol/l mit einer Erhöhung des Risikos für die Entstehung vaskulärer und renaler Erkrankungen assoziiert [32, 33].

Einteilung des Schweregrades der Hyperhomocysteinämie

Werte von 12-30 µmol/l finden sich bei moderater Hyperhomocysteinämie, die meist auf ernährungsbedingten Vitaminmangel zurückzuführen ist. Bei mittlerer

Hyperhomocysteinämie liegt der tHcy-Spiegel im Plasma bei 30-100 µmol/l, ab 100 µmol/l liegt eine schwere Hyperhomocysteinämie vor [34-36].

Ein erhöhter Homocystein-Spiegel, im Nüchternzustand oder nach Methionin-Belastung, gilt heutzutage als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen [20]. Ein Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und Artherosklerose wurde erstmals im Jahre 1969 von McCully beschrieben [37].

### Epidemiologie der Hyperhomocysteinämie

Bei ca. 10 % der allgemeinen Bevölkerung werden erhöhte tHcy-Spiegel gemessen. Bei Patienten mit KHK liegt in 10-20 % der Fälle, bei unter peripherer arterieller Verschlusskrankheit leidenden Patienten in 25-40 % der Fälle eine Hyperhomocysteinämie vor [38, 39, 32].

### Äthiologie der Hyperhomocysteinämie

Der Zunahme der Plasmaspiegel von Homocystein liegen verschiedenartige Ursachen zugrunde. Diese können erworben oder hereditär sein.

#### Erworbene Ursachen

Die mit Abstand häufigste Ursache für HHcy ist ein Mangel an Vitaminen. Dazu zählen Vitamin B<sub>6</sub> [40], B<sub>12</sub> [41] oder Folsäure [42]. Vitamin B<sub>6</sub>-Mangel reduziert den Homocystein-Abbau über den Transsulfurierungsweg zu Cystathionin. Erniedrigte Konzentrationen an Vitamin B<sub>12</sub> und Folat hemmen den Remethylierungsweg bei dem Methionin entsteht (siehe Abb. 1, S. 4). Durch therapeutische Gabe von Folat und Vitamin-B-Komplexen konnte eine Erniedrigung erhöhter Plasma-Hcy-Konzentrationen erreicht werden [43, 44].

Ein weiterer Grund für die Entwicklung erhöhter Homocystein-Werte ist eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Chronisches Nierenversagen mit unzureichender Metabolisierung des Plasmahomocysteins im Nierengewebe [45-47] kann zur HHcy führen. Ebenso zählen zu den weiteren Ursachen Faktoren wie Alter, männliches Geschlecht, Koffein-, Tabak- und Alkoholkonsum [48-52]. Des weiteren können Erkrankungen wie Hyperthyreoidismus [53], perniziöse Anämie, sowie Karzinome (Mamma-, Ovar- oder Pankreaskarzinome) und

akute lymphatische Leukämie die Entwicklung einer HHcy begünstigen [54, 55]. Zu weiteren Verursachern erhöhter Plasma-Hcy-Werte zählen Medikamente wie Methotrexat, Theophyllin, Phenytoin und Antiepileptika [40, 56].

#### Hereditäre Ursachen

Zu den hereditären Ursachen bei HHcy zählen Veränderungen der 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR). Homozygote Träger der thermolabilen Variante dieses Enzyms weisen eine verminderte Verfügbarkeit an 5-Methyl-Tetrahydrofolat auf. Durch eine Punktmutation des MTHFR-Gens, bei der Cytosin zu Thymin an der Nukleotidposition 677 (C677T) substituiert wird, kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Alanin zu Valin an der Position 223 (A223V). Folge dieser Veränderung ist eine etwa 30%ige Reduktion der Enzymaktivität der MTHFR [57]. Die Synthese von 5-Methyl-Tetrahydrofolat ist MTHFR-abhängig. Dieses ist in seiner Funktion als Methylgruppendonator an der Remethylierung von Homocystein zu Methionin beteiligt und führt bei herabgesetzter Verfügbarkeit somit zu einer deutlichen Erhöhung des Hcy-Spiegels, insbesondere bei zusätzlichem Folatmangel [58, 59].

Eine weitere erblich bedingte, seltene Ursache für die Entwicklung einer schweren HHcy ist ein homozygoter Mangel der Cystathionin- $\beta$ -Synthase (CBS) [60]. Es wird von über 90 bekannten Mutationen die einen CBS-Mangel zur Folge haben berichtet [30]. Patienten mit heterozygotem CBS-Mangel können eine moderate HHcy aufweisen [60], jedoch sollen die Hcy-Werte in 30-50 % der Fälle im Normbereich liegen [36, 61].

#### 1.1.2.3 Wirkungsmechanismen von Homocystein

Bisher sind die genauen Wirkungsmechanismen, die bei erhöhtem Hcy-Spiegel zu endothelialer Dysfunktion führen, nicht bekannt. Zu den Interaktionsmöglichkeiten von Homocystein werden das Gerinnungs- und Fibrinolysesystem, oxidative Mechanismen, Interaktionen mit Stickstoffmonoxid sowie Beeinflussung von Transmethylierungsreaktionen in Betracht gezogen

[62-66]. Die endotheliale Schädigung und Dysfunktion gilt als Hauptmechanismus der zu arteriosklerotischen Erkrankungen bei HHcy beiträgt. Inwiefern Homocystein selbst für die Entstehung endothelialer Schädigung und Dysfunktion verantwortlich ist konnte bisher nicht vollkommen geklärt werden. Als indirekte Wirkungsmechanismen werden mögliche Interaktionen mit Stickstoffmonoxid in Betracht gezogen. Einerseits wird die Verminderung der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid, was Folge einer erhöhten endothelialen Synthese des endogenen Inhibitors der NO-Synthase, des asymmetrischen Dimethylarginins (ADMA), sein kann, in Betracht gezogen [67, 68], andererseits wird eine gesteigerte oxidative Inaktivierung von Stickstoffmonoxid durch freie Sauerstoffradikale, die bei der Autooxidation von Hcy gebildet werden, als zweiter möglicher Mechanismus angesehen [69].

Es wurde bereits gezeigt, dass Homocystein die Produktion und/oder Bioaktivität von vasoregulatorischen Mediatoren wie NO verändert [70, 71]. HHcy durch heterozygoten CBS-Mangel führt zu endothelialer Fehlfunktion, wobei die endothelabhängige vasodilatatorische Funktion durch verminderte NO-Bioaktivität geschwächt wird [72].

Neben diesen Interaktionsmöglichkeiten von Hcy wird auch die Senkung des Methylierungspotentials (MP) als Ursache für die Entstehung vaskulärer Dysfunktion in Betracht gezogen [73].

### Sauerstoffradikale

Im Plasma unterzieht sich Homocystein, wie andere Thiol-Gruppen-haltige Aminosäuren einer Autooxidation, was die Entstehung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) wie Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) und Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) fördert [74].  $H_2O_2$  entsteht mit Hilfe der Superoxiddismutase (SOD) aus  $O_2^-$ . Durch Hyperhomocysteinämie wird eine gesteigerte Produktion von  $O_2^-$  induziert. Der inhibitorische Effekt von Homocystein auf die endothelabhängige Relaxation soll in Zusammenhang mit dem intrazellulären Anstieg des  $O_2^-$  stehen. Die vermehrte Anwesenheit von  $O_2^-$  führt dabei zu einer Inaktivierung und somit herabgesetzter Bioverfügbarkeit von NO aufgrund der Zusammenlagerung und Bildung von Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) [75, 76]. Diese Reaktion verläuft etwa 3mal

schneller als die Dismutasereaktion von  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$  und Sauerstoff [77], weshalb es nie zu einer Produkthemmung kommen kann.

#### Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)

ADMA ist ein endogener Inhibitor der NOS. Die Aktivität der NOS kann daher durch Bildung von ADMA in bestimmten physiologischen oder pathophysiologischen Situationen beeinflusst werden und zu einer reduzierten NO-Synthese führen. Einige Autoren vermuten, dass die negativen Auswirkungen von Homocystein auf das kardiovaskuläre System auf eine Anhäufung von ADMA zurückzuführen ist. Ein erhöhter ADMA-Spiegel im Plasma wurde bisher bei Patienten mit Hypercholesterinämie [78], peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) [79], arteriellem Hypertonus [80] und Nierenerkrankungen beobachtet [81]. Auch HHcy wird mit erhöhten ADMA-Werten in Verbindung gebracht. Homocystein besitzt die Fähigkeit, den Abbau von ADMA über die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) zu L-Citrulin und Dimethylamin zu hemmen [65].

#### Beeinflussung des Methylierungspotentials

SAM überträgt in einer von Methyltransferasen katalysierten Reaktion Methylgruppen auf Akzeptoren wie DNA, RNA, Proteine und Hormone unter der Bildung von SAH (siehe Abb. 1, S. 4) [24, 25]. Die SAH-Hydrolase überführt anschließend SAH in einer reversiblen Reaktion unter Wasserabspaltung in Adenosin und Homocystein [26, 27]. Der Quotient aus SAM und SAH wird als Methylierungspotential (MP) bezeichnet und beschreibt den Status der zellulären Transmethylierungsreaktionen [82]. Durch Akkumulation von SAH, einem Produktinhibitor aller SAM-abhängigen Transmethylierungsreaktionen, kommt es aufgrund des verminderten MPs zu Hypomethylierung der Akzeptoren [27]. Erhöhte Plasma-Hcy-Konzentrationen können über die von der SAHH katalysierten Rückreaktion mit Adenosin zu einer Erhöhung des intrazellulären SAH-Levels und somit zu einer Verminderung des MPs führen [83, 84]. Da Homocystein auf diesem Wege die intrazellulären Transmethylierungsvorgänge zu regulieren vermag, wird ein Zusammenhang

---

zwischen dem endothelschädigenden Effekt von Hcy und der Veränderung des MPs vermutet.

### 1.1.3 Diabetes mellitus

#### 1.1.3.1 Definition des Diabetes mellitus

Bei Diabetes mellitus handelt es sich um eine chronische Stoffwechselerkrankung bei der eine Störungen des Glukose-Stoffwechsels vorliegt. Kennzeichen dieser Erkrankung ist ein dauerhaft erhöhter Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie). Die Ursache liegt in einem absoluten oder relativen Mangel des blutzuckersenkenden Hormons Insulin, bzw. in einer verminderten Insulinwirkung (Insulinresistenz). Insulin wird in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas gebildet. Bei einem Anstieg der Konzentration an Glukose im Plasma wird die Sekretion von Insulin stimuliert. Dieses bewirkt durch eine verstärkte Aufnahme der freien Glukose in fast alle Körperzellen einen Rückgang der Glukosekonzentration im Plasma.

#### 1.1.3.2 Klassifikation des Diabetes mellitus

Es werden insbesondere vier Typen des Diabetes mellitus, den zugrunde liegenden Ursachen nach unterschieden [85], wobei hier nur auf den Typ 1 Diabetes eingegangen werden soll, da dieses Modell bei der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Der Typ 1 Diabetes, früher auch als insulinabhängiger Diabetes mellitus bezeichnet, ist gekennzeichnet durch einen absoluten Insulinmangel, es wird kein eigenes Insulin mehr gebildet. Ursache dafür ist in der Regel eine Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer immunologisch vermittelten Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas kommt. Dieser Autoimmunprozess kann unter Umständen aufgrund einer Virusinfektion

ausgelöst werden. Meist sind Kinder, Jugendliche oder junge Erwachsene vom Typ 1 Diabetes betroffen. Eine Sonderform des Typ 1 Diabetes ist der LADA (latenter autoimmuner Diabetes im Erwachsenenalter; latent autoimmune diabetes with adult onset). Die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen und somit der Verlust der Insulinsekretion verläuft hier deutlich langsamer [86].

### 1.1.3.3 Chronische Komplikationen des Diabetes mellitus

Die Folgeschäden des Diabetes mellitus, meist bedingt durch schlechte Blutzuckereinstellung, sind verantwortlich für eine erhöhte Morbidität und Mortalität der betreffenden Patienten. Sie werden hauptsächlich auf Veränderungen der Gefäße, sogenannte Angiopathien zurückgeführt [87, 88]. Es werden hierbei zwei Formen unterschieden.

#### Mikroangiopathie

Typische Spätkomplikation des Diabetes mellitus ist die diabetische Mikroangiopathie, die spezifische Veränderungen des mikrovaskulären Systems, wie eine Verhärtung und Verengung der kleinen arteriellen Gefäße umfasst. Anhaltender Glukoseüberschuß fördert eine Bindung der Glukose an Aminogruppen von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren sowie, durch anschließende irreversible Umlagerung, die Entstehung von Advanced Glycosylation Endproducts (AGE). Durch Bindung der AGE an einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor der Zellmembran (Receptor for Advanced Glycation Endproducts, RAGE) kommt es einerseits zu monozytärer Expression von Gewebsthromboplastin (Tissue Factor; TF), das die prokoagulatorische Aktivität dieser Zellen steigert, andererseits führt die Ablagerung von Kollagen zu einer Verdickung der Basalmembran der kapillaren Gefäßwände [89]. Aufgrund der Stenose von Gefäßen werden Durchblutungsstörungen begünstigt. Besonders betroffen von der diabetischen Mikroangiopathie sind Retina, Niere und das periphere Nervensystem [89, 90]. Bei chronischem Nierenversagen kann es in vielen Fällen durch Akkumulation von Homocystein zur Entwicklung einer Hyperhomocysteinämie kommen [44, 45, 91].

### Makroangiopathie

Diabetes gilt als einer der wesentlichen Risikofaktoren für makroangiopathische Erkrankungen wie Arteriosklerose. Der altersbedingte Prozess der Gefäßverkalkung, v. a. der Arterien, läuft bei Diabetikern schneller ab, begünstigt durch metabolische Störungen wie Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie, endotheliale Dysfunktion sowie Veränderungen des Gerinnungssystems. Aufgrund vermehrter Einlagerung von Makrophagen und fetthaltigen Zellen, den Schaumzellen, kommt es in den Gefäßen zu einer erhöhten Entwicklung fibröser Plaque [92]. Die arteriosklerotischen Veränderungen können zur Entstehung von symptomatischer koronarer Herzkrankheit, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und zerebrovaskulären Durchblutungsstörungen führen [89, 93].

#### 1.1.3.4 Beeinflussung der Vasorelaxation

Aufgrund bisheriger kontroverser Beobachtungen besteht Unklarheit über eine Beeinflussung der endothelabhängigen Relaxation der Aorta bei Streptozotocin (STZ)-induziertem Diabetes mellitus. Hauptsächlich wird in der Literatur von einer Abschwächung der Acetylcholin (ACh)-induzierten Relaxation von Aortenringen aus diabetischen Ratten berichtet [94]. Aufgrund unveränderter Oberflächenstruktur endothelialer Zellen von STZ-behandelten Ratten gegenüber Kontrollen wird auf metabolische Veränderungen des EDRF als Ursache für die abgeschwächte Relaxationsfähigkeit geschlossen. In anderen Studien wird dagegen von einer unveränderten oder sogar verbesserten Relaxationsantwort auf ACh bei Diabetes berichtet. Glocker und Quast [95] stellten weder eine Veränderung der maximalen endothelabhängigen Relaxation noch der  $EC_{50}$ -Werte bei Aortenringen von diabetischen Ratten gegenüber unbehandelten Kontrolltieren fest. Eine verstärkte Vasorelaxation konnten Shen et al. bei Gefäßringen der thorakalen Aorta von Mäusen mit STZ-induziertem Diabetes beobachten [96]. Mögliche Ursachen für diese Diskrepanzen könnten in der Dauer des STZ-induzierten Diabetes der betreffenden Versuchstiere, Unterschieden in der Größe der verwendeten

Gefäße, in den Versuchsvoraussetzungen oder in der Zusammensetzung von Organbadlösungen liegen [97]. Die zugrundeliegenden Mechanismen einer möglichen Beeinflussung der endothelabhängigen Relaxation bleiben weiter unklar.

## 1.2 Zielsetzung

Sowohl Diabetes mellitus als auch Hyperhomocysteinämie stellen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Die genauen Wirkungsmechanismen über die ein erhöhter Homocysteinspiegel zu endothelialer Dysfunktion führt sind derzeit noch nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst den Einfluss von Homocystein auf die endotheliale Gefäßrelaxation insbesondere im Hinblick auf Interaktionen mit dem SAH-Metabolismus zu untersuchen. Mit Hilfe isometrischer Kraftaufnahme an isolierten Aortenringen von Ratten im Organbad sollte die endothelabhängige Relaxation nach Inkubation mit Homocystein, Adenosin und Adenosin-2',3'-Dialdehyd, einem Hemmstoff der SAH-Hydrolase, untersucht werden.

Des Weiteren galt es, Erkenntnisse über den Einfluss eines erhöhten Homocysteinspiegels bei Typ 1 Diabetes auf die endothelabhängige Gefäßrelaxation zu gewinnen. Hierfür sollten Untersuchungen anhand eines Tiermodells mit diabetischen Ratten, Ratten mit induzierter HHcy, sowie diabetischen Ratten mit HHcy erfolgen. Nach einer Erkrankungsdauer von 4 Wochen sollte die endothelabhängige Relaxation auf ACh sowie auf SNP ermittelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Substanzen

Die zur Durchführung der Versuche benötigten Chemikalien, die im Text verwendeten Abkürzungen sowie deren Bezugsquellen sind in folgender Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 1**      **Substanzen und Bezugsquellen**

<b>Substanz</b>		<b>Bezugsquelle</b>
Acetylcholin	ACh	Sigma
Adenosin	Ado	Sigma
Adenosin-2',3'-Dialdehyd	Adodia	Sigma
Carbogen		Linde Gas Therapeutics
DL-Homocystein-Thiolacton		Fluka Chemika
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Merck
Glucose		Sigma
Homocystein	Hcy	Sigma
Hydroxy-Ethyl-Piperazinyl-Ethan-Sulfonsäure	HEPES	Sigma
Kaliumchlorid	KCl	Sigma
Kalium-Dihydrogen-Phosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Kalziumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	Merck
L-Nitroarginin	LNA	Sigma
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Natriumnitroprussid	SNP	Sigma
Noradrenalin / (-)-Arterenol	NA	Sigma
Streptozotocin	STZ	Sigma
Trapanal		Byk Gulden
Tris-(Hydroxy-Methyl)-Aminomethan	TRIS	Sigma

### 2.1.2 Herstellung der Lösungen

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Substanzen in Aqua bidest gelöst

#### Krebs-Henseleit-Lösung

Für einen Versuchsdurchgang bestehend aus je zwei Dosis-Wirkungs-Kurven pro 4 Aortenringe wurden 10l Krebs-Henseleit-Lösung bestehend aus folgenden Substanzen in den in Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen hergestellt.

**Tabelle 2**      **Zusammensetzung Krebs-Henseleit-Lösung**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
CaCl <sub>2</sub>	1,25
EDTA	0,03
Glukose	11
KCl	4,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
MgSO <sub>4</sub>	1,2
NaCl	118
NaHCO <sub>3</sub>	24

Anschließend wurde der Puffer den Versuch überdauernd mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast.

#### Noradrenalin / (-)-Arterenol

Für die Versuche wurde eine 0,5 mM Lösung NA hergestellt. Um diese vor vorzeitigem Zerfall zu schützen enthielt die NA-Lösung 0,06 mM EDTA, und wurde in einem lichtgeschützten Gläschen aufbewahrt.

#### Weitere Lösungen

Alle nachfolgend aufgeführten Lösungen (Tab. 3, S. 16) wurden in den angegebenen Konzentrationen sowie deren Verdünnungen verwendet.

**Tabelle 3**      **Konzentrationen der Versuchslösungen**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration in [mM]</b>
ACh	10
SNP	10
Hcy	100
Ado	10
LNA	10
Adodia	10

### 2.1.3 Geräte

Die zur Durchführung der Versuche benötigten Geräte sind in nachfolgender Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4**      **Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
2-Kanal-Brücken-Verstärker	301	HUGO SACHS ELEKTRONIK
Einhänge-Thermostat	MS nach DIN 12879	LAUDA
Kraft-Weg-Aufnehmer K	351	HUGO SACHS ELEKTRONIK
Mikroskop	WILD M3B	Leica
Multi-Pen-Recorder	R-OX und R-03M	Rikadenki Electronics GmbH
Organbad	SCHULER	HUGO SACHS ELEKTRONIK
Blutzuckermessgerät	Accu Chek Aviva	Roche Diagnostics GmbH

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere

Zur Isolation von Gefäßsegmenten der Aorta descendens wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 250 g von der Firma Charles River bezogen. Die Tiere wurden im Tierstall mit einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Futter und Wasser.

### 2.2.2 Das Schuler Organbad

Für die Messung der endothelabhängigen Relaxation an Aortenringen wurde hier das Organbad nach Schuler verwendet.

Dieses besteht aus 4 zylinderförmigen Kammern die jeweils ein Volumen von 20 ml fassen. Ringe des zu untersuchenden Gefäßes werden jeweils mit Hilfe zweier L-förmiger Edelstahl-Haken zwischen einen fixierten Haken und einen Kraftaufnehmer eingespannt. Anschließend werden diese von oben in die zugehörige Kammer geschoben. Spannungsänderungen werden vom Kraftaufnehmer registriert und über einen Verstärker vom Schreiber aufgezeichnet.

Um die Messungen unter physiologischen Bedingungen durchführen zu können, werden die Organbad-Kammern mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt. Die Temperatur des Puffers wird konstant auf 37°C gehalten. Jede Kammer wird mit Carbogen begast. Der in den Kammern befindliche Puffer kann durch Betätigung einer Pumpe jederzeit durch „neuen“ Puffer ersetzt werden. Die aufgrund des Versuchs in den Gefäßringen vorhandenen Substanzen können auf diese Weise durch mehrmaliges Spülen ausgewaschen werden.

### 2.2.3 Versuchsvorbereitung

#### 2.2.3.1 Isolation des Gefäßsegments

Die Versuchstiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von ungefähr 240g. Nach Decapitation und Entbluten der Ratte wurde durch einen kleinen Schnitt zunächst das Abdomen eröffnet und nach rechts und links sowie nach kranial bis zum Processus xiphoideus erweitert. Anschließend erfolgte mittels Schnitt durch das Diaphragma die Eröffnung der Pleura. Nach Durchtrennung der Rippen auf rechter und linker Seite konnte der ventrale Anteil des Thorax entfernt werden. Mit Hilfe einer Klemme wurde die Pulmo sinister nach rechts gelegt, um so eine gute Sicht auf die Aorta thoracica zu gewährleisten. Nun konnte ein möglichst großes Gefäßsegment der Aorta descendens entnommen werden. Hierbei war besondere Vorsicht geboten, um eine Verletzung des Endothels durch Ziehen oder Quetschen und somit eine negative Beeinflussung der Versuchsergebnisse zu vermeiden.

Um das Gefäßsegment weiter zu bearbeiten, wurde dieses in eine mit vorgewärmter Krebs-Henseleit-Lösung gefüllte Petrischale gelegt. Dort konnte die Aorta mit Hilfe eines Mikroskops vorsichtig von umgebendem Fett- und Bindegewebe befreit werden. Anschließend wurde das nun saubere Gefäß in 4 gleich große Ringe geschnitten. Dies war gewährleistet durch ein Gerät mit fünf parallel, in Abständen von 3 mm angeordneten, sauberen und scharfen Rasierklingen.

#### 2.2.3.2 Kalibrierung und Äquilibration

Anschließend erfolgte die Kalibrierung des Kraftaufnehmers mit Hilfe eines 1g-Eichgewichtes. Der Ausschlag des Schreibers sollte dabei 10cm/g entsprechen. Um die isometrische Kontraktions- und Relaxationsmessung durchzuführen, mussten die Ringe zwischen Kraftaufnehmer und einen fixierten Haken eingespannt werden, wobei sorgfältigst darauf geachtet werden musste das

Präparat nicht zu stark zu dehnen. Jede Kammer des Organbades ist für einen Gefäßring vorgesehen. Die einzelnen Kammern wurden mit neu hergestelltem Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt und den Versuch über mit Carbogen begast.

Um eine für die maximale Kontraktion optimale Vorspannung zu erhalten, wurden die Ringe zunächst vorsichtig auf etwa 12 mN vorgedehnt. Während einer einstündigen Äquillibrierungsphase konnten sich die Aortenringe auf das geeignete Vorspannungsniveau bei 10 mN einpendeln. Dieses Niveau konnte bei Abweichung am Kraftaufnehmer korrigiert werden. Während der Äquillibrierungsphase mussten die Kammern in 15-minütigem Abstand gespült werden, d.h. die in den Kammern befindliche Krebs-Henseleit-Lösung wurde gegen neuen Puffer ausgetauscht.

#### 2.2.3.3 Relaxationstest mit Acetylcholin

Anschließend erfolgte ein Relaxationstest, bei dem festgestellt werden sollte, ob das Endothel der Gefäßringe weitgehend unversehrt ist. Dazu wurden die Aortenringe mit 0,3  $\mu\text{M}$  NA kontrahiert und gewartet bis das Maximum der Kontraktion erreicht war. Dieses befand sich in der Regel bei einer Kraft von etwa 10 mN. Bei anschließender Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  ACh sollte bei intaktem Endothel eine Relaxation von >70 % erfolgen. War dies nicht der Fall, so wurden diese Aortenringe nicht weiter für die Versuchsdurchführung im Organbad herangezogen.

#### 2.2.4 Versuchsdurchführung

Alle Kammern mit für die Versuchsdurchführung geeigneten Aortenringen mussten nach dem Relaxationstest zunächst 3x in einem Zeitraum von 15 min mit Krebs-Henseleit-Lösung gewaschen werden. Die Ausgangsspannung wurde auf 10 nM eingestellt.

Die isometrischen Kontraktions- und Relaxationsmessungen wurden, soweit nicht anders vermerkt wie folgt durchgeführt.

Pro Aortenring wurden zwei Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) erhoben. Um die Kontraktion der Gefäßringe zu induzieren, wurde den Organbad-Kammern jeweils 0,3  $\mu\text{M}$  NA zugegeben. Nach Erreichen der maximalen Kontraktion konnte die erste Konzentration der je nach Versuch verwendeten relaxierenden Substanz zugefügt werden. Sobald der Schreiber ein Plateau der nun ausgelösten Relaxation verzeichnete, wurde die nächsthöhere Konzentration nach kumulativem Schema hinzugegeben. Die in Tabelle 5 aufgeführten Substanzen wurden je nach Versuch zur Induktion der Gefäßrelaxation zur Aufzeichnung der KWK in den angegebenen Konzentrationen verwendet.

**Tabelle 5** *Kumulatives Pipettierschema*

<b>ACh</b>	<b>SNP</b>	<b>Adenosin</b>
	100 pM	
	300 pM	
1 nM	1 nM	
3 nM	3 nM	
10 nM	10 nM	
30 nM	30 nM	
100 nM	100 nM	100 nM
300 nM	300 nM	300 nM
1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
3 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
		30 $\mu\text{M}$
		100 $\mu\text{M}$
		300 $\mu\text{M}$
		1 mM

Nach Zugabe der höchsten Konzentration und Erreichen des Plateaus und der damit maximalen Relaxation war die Aufzeichnung der ersten KWK beendet. Die Aortenringe wurden erneut mit Krebs-Henseleit-Puffer gespült, dies erfolgte nach oben angegebenen Schema. Nach Erreichen des stabilen Ausgangsniveaus bei 10 mN wurde ein erneuter Versuch durchgeführt und die zweite KWK aufgezeichnet.

### 2.2.5 Homocystein-Diabetes-Studie

Für dieses Projekt erfolgte eine Unterteilung der Versuchstiere in 3 Gruppen.

Gruppe 1: Über einen Zeitraum von 4 Wochen wurde diesen Tieren Trinkwasser mit einer Konzentration von 2,4 mM Homocystein-Thiolacton verabreicht.

Gruppe 2: Den Tieren dieser Gruppe wurden zu Beginn der Studie Streptozotocin (60 mg/kg intraperitoneal, jeweils frisch hergestellt in Citratpuffer) gespritzt, um einen Typ 1 Diabetes mellitus zu induzieren

Gruppe 3: Diese Tiere wurden ebenfalls mit Streptozotocin (60 mg/kg intraperitoneal) behandelt, um einen Typ 1 Diabetes zu induzieren. Das Trinkwasser enthielt eine Konzentration von 0,4 mM Homocystein-Thiolacton

Die Versuchstiere hatten weiterhin freien Zugang zu Futter und Wasser.

Nach einem Zeitraum von 4 Wochen wurden Versuche mit den isolierten Aortenringen dieser Tiere durchgeführt.

#### 2.2.5.1 Bestimmung der Blutzuckerwerte

Die Bestimmung der Blutzuckerwerte der Versuchstiere erfolgte mit Hilfe eines Blutzuckermessgeräts, und wurde erstmals vor der Behandlung der Tiere mit Streptozotocin und/oder Homocystein, sowie bei den diabetischen Tieren 1 Woche nach Streptozotocin-Injektion zur Kontrolle durchgeführt. Das benötigte Blut wurde hierbei nach minimalem Kappen der Schwanzspitze gewonnen.

#### 2.2.5.2 Plasma-Homocysteinspiegel

Um den Hcy-Spiegel im Plasma zu bestimmen, wurde allen Versuchstieren zu Beginn der Homocystein-Diabetes-Studie Blut aus der Schwanzvene entnommen. Eine weitere Blutentnahme erfolgte vor dem Herauspräparieren der Aorta für die Organbad-Versuche. Das Tier wurde zunächst mit einer intraperitonealen Injektion von Trapanal in einer Dosierung von 90 mg/kg narkotisiert. Hier wurde das Blut nach Eröffnung des Abdomens durch Punktion der rechten Vena iliaca communis gewonnen.

Anschließend wurde das Blut in EDTA-Röhrchen überführt, dieses mit dem Deckel fest verschlossen und durch mehrmaliges vorsichtiges Drehen auf den Kopf und zurück vermischt. Nach guter Kühlung des Röhrchens in einem mit Eis gefüllten Becherglas folgte die Zentrifugation für 5 min bei 2°C mit 10.000 U/min. Hierbei wurde das Plasma von den Blutzellen getrennt. Anschließend konnte ca. 2 ml des Blutplasmas in Eppendorf-Cups abpipettiert und bei -60°C bis zur Analyse eingefroren werden. Die Analyse der Hcy-Spiegel erfolgte im Zentrallabor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen.

#### 2.2.6 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Daten erfolgte durch Angabe der Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). Die Relaxation der Gefäßringe wurde prozentual bezogen auf die maximale Kontraktion angegeben.

Die graphische Darstellung der KWK erfolgte mit dem Programm Origin 7G SR1.

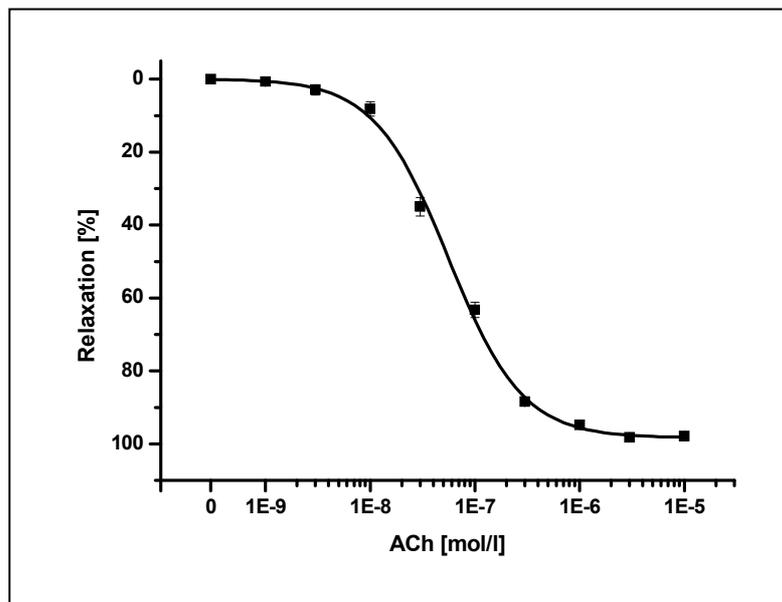
Die Ergebnisse wurden mithilfe des t-Tests auf Signifikanz überprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Gefäßrelaxation

#### 3.1.1 Endothelabhängig

Zunächst wurde in Vorversuchen die endothelabhängige Gefäßrelaxation (EDR) anhand von Kontrolltieren untersucht. Hierfür wurden die Aortenringe mit  $0,3 \mu\text{M}$  Noradrenalin (NA) kontrahiert und bei Erreichen des Kontraktionsmaximums mittels kumulativer Zugabe von Acetylcholin (ACh) in Konzentrationen von  $1 \text{ nM}$ - $10 \mu\text{M}$  die endothelabhängige Relaxation erzeugt.



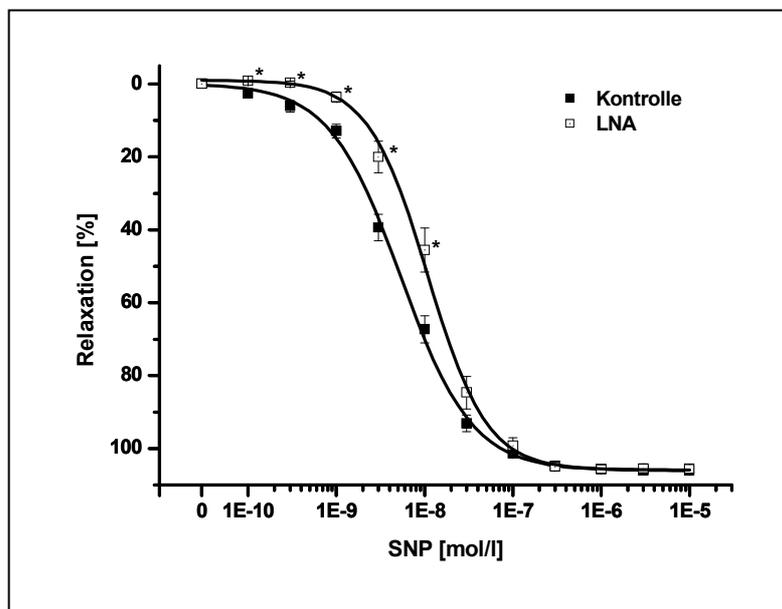
**Abbildung 2 Endothelabhängige Vasorelaxation**

*Kumulative KWK von ACh ( $1 \text{ nM}$  -  $10 \mu\text{M}$ ) auf mit NA ( $0,3 \mu\text{M}$ ) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrolltieren ( $n=72$  Ringe). Dargestellt sind  $MW \pm SEM$ .*

Abbildung 2 zeigt die entsprechende sigmoidförmige KWK. Die maximale Relaxation wurde bei einer ACh-Konzentration von  $3 \mu\text{M}$  mit  $98,2 \pm 0,6 \%$  erreicht. Die  $EC_{50}$  lag bei  $55,9 \pm 3,1 \text{ nM}$  ACh.

### 3.1.2 Endothelunabhängig

In weiteren Vorversuchen wurde eine KWK der endothelunabhängigen Gefäßrelaxation von Kontrolltieren ermittelt (Abb. 3). Bei einigen Aortensegmenten wurde nach der Kontraktion mit  $0,3 \mu\text{M}$  NA durch Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  L-Nitroarginin (LNA) die NO-Synthese und somit die endotheliale NO-Bildung gehemmt. Zur Erzeugung der Vasorelaxation wurde bei diesen Versuchen Natriumnitroprussid (SNP), ein NO-Donor verwendet. Die kumulative Zugabe von SNP erfolgte hierbei in Konzentrationen von  $0,1 \text{ nM}$ - $10 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 3 Endothelunabhängige Vasorelaxation**

Kumulative KWK von SNP ( $0,1 \text{ nM}$  -  $10 \mu\text{M}$ ) auf mit NA ( $0,3 \mu\text{M}$ ) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrolltieren (Kontrolle;  $n=14$  Ringe) sowie Aortenringen die nach Kontraktion mit  $0,1 \text{ mM}$  LNA behandelt wurden ( $n=11$  Ringe). Dargestellt sind  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0,05$  LNA vs. Kontrolle.

Wie aus Abbildung 3 zu entnehmen, kommt es bei beiden Versuchsbedingungen zu einer annähernd übereinstimmenden maximalen Relaxationsfähigkeit der Aortenringe. Sie zeigte ihre volle Ausprägung in beiden Fällen bei einer SNP-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$ , bei den Kontrollringen mit

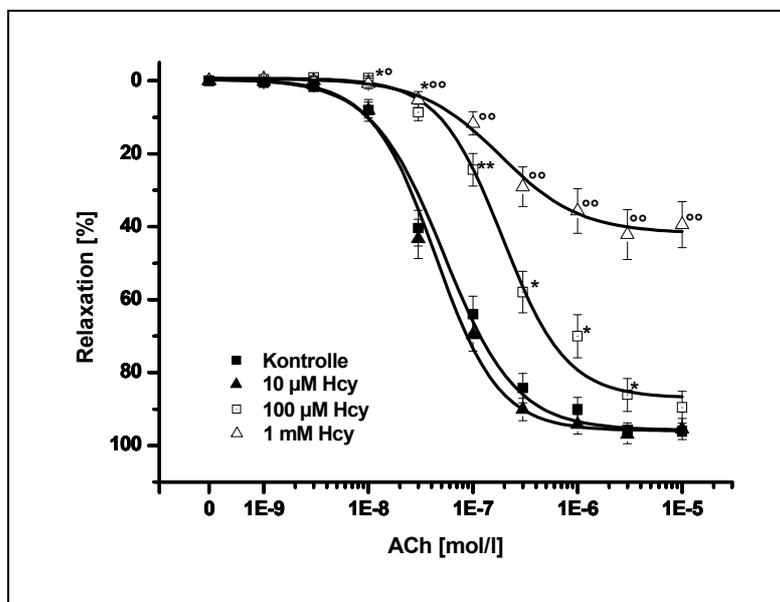
---

106,0±0,6 % sowie die den mit LNA behandelten Gefäßringen mit 105,6±1,2 %. Die Hemmung der NO-Synthase bewirkte allerdings eine Rechtsverschiebung der KWK. Bei den Kontrollringen setzte die Vasorelaxation bereits nach Zugabe der ersten Konzentration von 0,1 nM SNP ein, die mit LNA behandelten Ringe dagegen reagierten erst nach einer Dosis von 1 nM relaxierend auf SNP. Die  $EC_{50}$  lag bei den LNA-Aortenringen mit 10,8±1,1 nM im Gegensatz zu der  $EC_{50}$  der Kontrollringe mit 5,4±0,4 nM entsprechend höher.

### 3.2 Einfluss von Homocystein auf die Gefäßrelaxation

#### 3.2.1 Endothelabhängige Relaxation

Um die Auswirkungen von erhöhtem Homocystein *in vitro* auf die endothelabhängige Gefäßrelaxation anhand eigener Versuche zu überprüfen, erfolgte in diesen Versuchen eine Inkubation der Aortenringe mit Homocystein im Organbad. Hierfür wurden unterschiedliche Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  sowie 1 mM gewählt und der Inkubationszeitraum auf 1 Stunde festgelegt. Anschließend wurden die KWK wie gewohnt durch Zugabe von Acetylcholin aufgezeichnet. Die Auswertung dieser Versuche sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4 Vasorelaxation auf ACh nach Inkubation mit Hcy**

Kumulative KWK von ACh (1 nM -10  $\mu\text{M}$ ) auf mit NA (0,3  $\mu\text{M}$ ) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrolltieren (Kontrolle; n=21 Ringe) sowie Aortenringe die zuvor eine Stunde mit 10  $\mu\text{M}$  (n=7 Ringe), 100  $\mu\text{M}$  (n=7 Ringe) bzw. 1 mM (n=12 Ringe) Hcy inkubiert wurden. Dargestellt sind MW $\pm$ SEM. \*P < 0,05, \*\*P < 0,001 Hcy 100  $\mu\text{M}$  vs. Kontrolle; °P < 0,05, °°P < 0,001 Hcy 1 mM vs. Kontrolle.

Die Behandlung der Gefäßringe mit einer niedrigen Hcy-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigte im Vergleich zu unbehandelten Ringen (Abb. 4, S. 26) keine

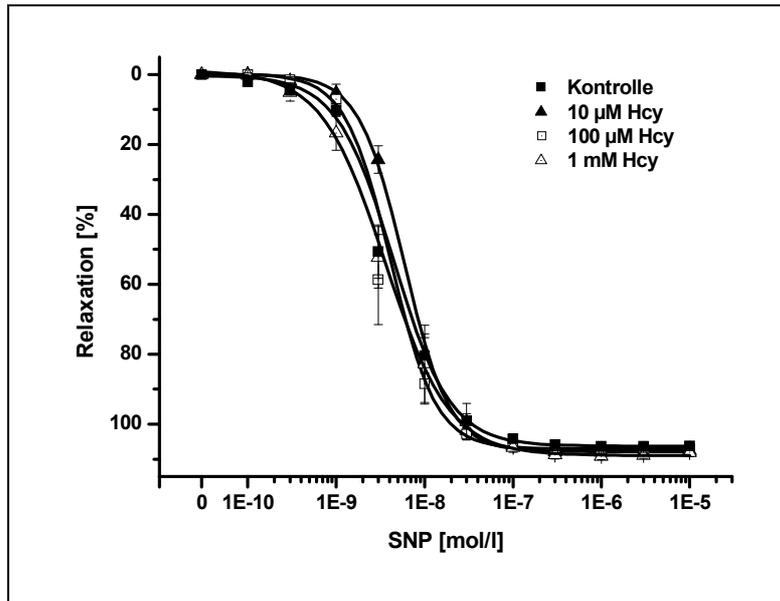
signifikanten Veränderungen. Die mit 10  $\mu\text{M}$  Hcy inkubierten Aortenringe erreichten ihre maximale Relaxation von  $96,9 \pm 2,5$  % bei einer ACh-Konzentration von 3  $\mu\text{M}$ , die  $\text{EC}_{50}$  lag bei  $43,6 \pm 5,0$  nM ACh. Die Kontrollringe erzielten eine maximale Vasorelaxation von  $96,1 \pm 1,4$  % bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Die  $\text{EC}_{50}$  wurde bei  $52,8 \pm 6,2$  nM erreicht. Eine Behandlung der Aortenringe mit einer Hcy-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  dagegen führte schon ab einer ACh-Dosis von 10 nM zu einer signifikanten Abschwächung der endothelabhängigen Relaxation. Die KWK erreichte eine maximale Gefäßrelaxation von  $89,5 \pm 4,3$  % nach einer Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ACh. Die  $\text{EC}_{50}$  lag hier wesentlich höher bei  $192,2 \pm 29,8$  nM ACh. Eine noch stärkere relaxationshemmende Wirkung zeigte die Inkubation der Gefäßringe mit 1 mM Hcy. Die maximale ACh-induzierte Vasorelaxation wurde bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  mit nur  $42,2 \pm 6,8$  % erreicht. Auch der  $\text{EC}_{50}$  war mit  $185,0 \pm 71,3$  nM ACh deutlich erhöht.

Anhand dieser Versuche konnte die konzentrationsabhängig hemmende Wirkung des Homocysteins auf die endothelabhängige Relaxation bestätigt werden. Neben der verminderten Vasorelaxation konnte eine Rechtsverschiebung der KWK auf ACh festgestellt werden.

### 3.2.2 Endothelunabhängige Relaxation

#### 3.2.2.1 SNP-induzierte Vasorelaxation

Bei diesen Versuchen sollte die Wirkung von Hcy auf die endothelunabhängige Relaxation untersucht werden. Diese Versuche wurden daher unter denselben Versuchsbedingungen wie zuvor durchgeführt. Die Gefäßringe wurden über einen Zeitraum von 1 Stunde mit Homocystein-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  sowie 1 mM inkubiert. Die Vasorelaxation wurde nach anschließender Kontraktion der Ringe mit Natriumnitroprussid durchgeführt (Abb. 5, S. 28).



**Abbildung 5 Vasorelaxation auf SNP nach Inkubation mit Hcy (1)**

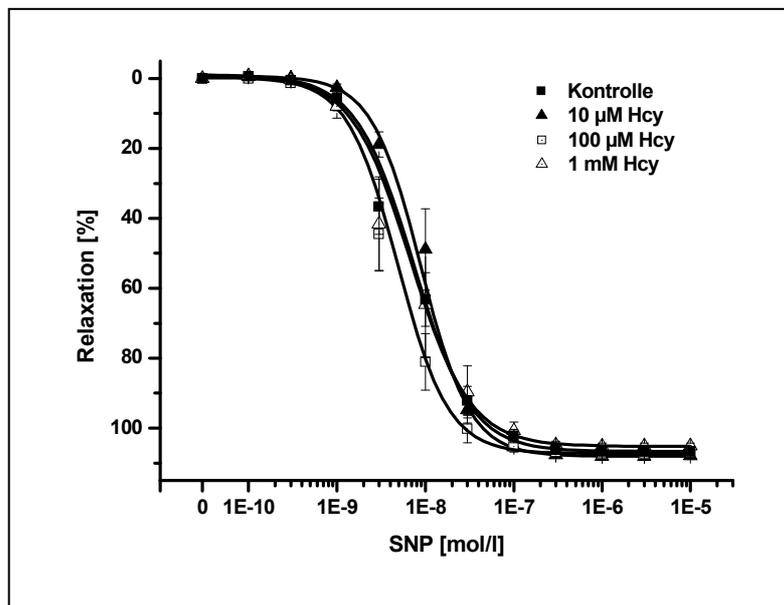
Kumulative KWK von SNP (0,1 nM -10 µM) auf mit NA (0,3 µM) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrolltieren (Kontrolle; n=15 Ringe) sowie Aortenringe die zuvor eine Stunde mit 10 µM (n=7 Ringe), 100 µM (n=6 Ringe) bzw. 1 mM (n=4 Ringe) Hcy inkubiert wurden. Dargestellt sind MW±SEM.

Abbildung 5 zeigt keinen signifikant veränderten Verlauf der vier Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Die Relaxationsfähigkeit der Aortenringe wurde durch die Inkubation mit Hcy nicht abgeschwächt. Die maximale Relaxation der Kontrollringe lag bei  $106,3 \pm 0,5$  %, der mit 10 µM inkubierten Ringe bei  $108,0 \pm 0,6$  %. Mit 100 µM Hcy behandelte Gefäßsegmente wiesen eine maximale Relaxationsfähigkeit von  $107,2 \pm 0,6$  % auf, sowie  $109,2 \pm 0,9$  % bei mit 1 mM inkubierten Ringen. Die Betrachtung der  $EC_{50}$  lässt ebenso eine mögliche konzentrationsabhängige Beeinflussung des Verlaufs der kumulativen KWKs ausschließen. Die  $EC_{50}$  lag für die Kontrolle bei  $4,5 \pm 0,4$  nM, für die Inkubation mit 10 µM bei  $5,9 \pm 0,5$  nM, sowie bei  $4,2 \pm 0,5$  nM für 100 µM Hcy und  $3,6 \pm 0,6$  nM für 1 mM Hcy.

Die endothelunabhängige Relaxation wurde diesen Versuchen nach nicht durch Homocystein beeinflusst, egal in welcher Konzentration eine Inkubation der Gefäßringe stattfand.

### 3.2.2.2 SNP-induzierte Vasorelaxation in Anwesenheit von LNA

Ob der Einfluss von endotheliale NO bei der SNP-induzierten Relaxation durch eine vorausgehende Inkubation der Gefäßringe mit Hcy verändert wird, sollte in dieser Versuchsreihe gezeigt werden. Hierfür wurde nach Kontraktion der Aortenringe mit  $0,3 \mu\text{M}$  NA und Erreichen des Kontraktionsplateaus zusätzlich  $0,1 \text{ mM}$  LNA zugegeben um die NO-Synthase zu hemmen und die endotheliale NO-Bildung zu unterbinden.



**Abbildung 6 Vasorelaxation auf SNP nach Inkubation mit Hcy (2)**

Kumulative KWK von SNP ( $0,1 \text{ nM}$  -  $10 \mu\text{M}$ ) auf mit NA ( $0,3 \mu\text{M}$ ) und anschließend LNA ( $0,1 \text{ mM}$ ) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrolltieren (Kontrolle;  $n=16$  Ringe) sowie Aortenringe die zuvor eine Stunde mit  $10 \mu\text{M}$  ( $n=6$  Ringe),  $100 \mu\text{M}$  ( $n=7$  Ringe) bzw.  $1 \text{ mM}$  ( $n=4$  Ringe) Hcy inkubiert wurden. Dargestellt sind  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ .

Gegenüber der SNP-induzierten Vasorelaxation ohne vorausgegangene zusätzliche Behandlung mit LNA zeigte diese Versuchsreihe keine signifikante Veränderung der maximalen Relaxationsfähigkeit (Abb. 6). Die Kontrollringe erreichten eine Relaxation von  $106,7 \pm 0,9 \%$ , mit  $10 \mu\text{M}$  Hcy behandelte Gefäßsegmente von  $108,1 \pm 0,5 \%$ . Aortenringe mit  $100 \mu\text{M}$  Hcy-Inkubationskonzentration konnten Relaxationswerte von  $107,3 \pm 0,9 \%$  erreichen,

bei 1 mM Hcy lag die maximale Ausprägung der Vasorelaxation bei  $105,2 \pm 0,9$  %. Die Relaxation der Gefäßringe setzte in Anwesenheit von LNA erst bei einer SNP-Konzentration von 0,3 nM ein, ohne LNA-Behandlung erfolgte die Vasorelaxation ab 0,1 nM SNP. Auch führte die LNA-Zugabe zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Rechtsverschiebung der KWK. Die  $EC_{50}$  waren bei allen 4 Kurven erhöht. Sie lag bei der Kontrolle bei  $7,3 \pm 0,8$  nM SNP, bei mit 10  $\mu$ M Hcy behandelten Ringen bei  $8,9 \pm 0,9$  nM SNP. Bei mit 100  $\mu$ M Hcy inkubierten Gefäßsegmenten lag die  $EC_{50}$  bei  $4,9 \pm 0,6$  nM SNP sowie bei mit 1 mM behandelten Ringen bei  $6,8 \pm 1,4$  nM SNP.

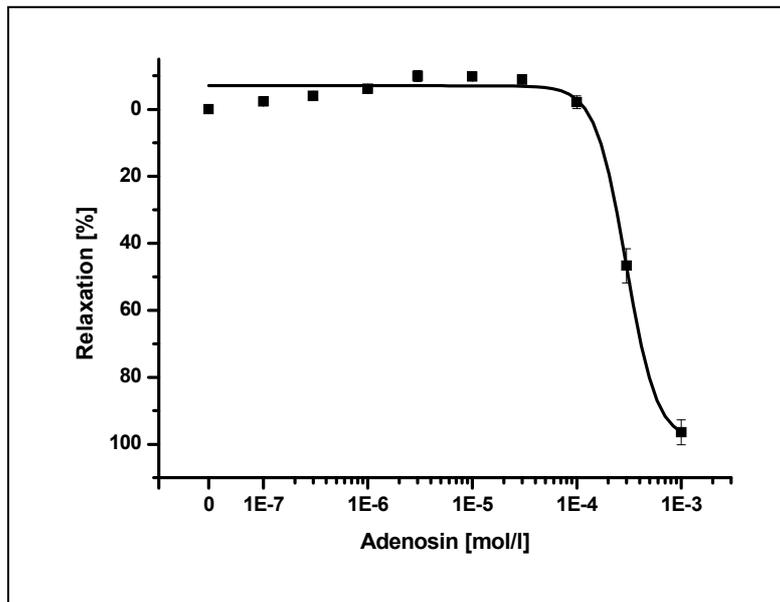
Ein Veränderung des Einflusses von endothelialelem NO auf die SNP-induzierte Relaxation bei mit Hcy inkubierten Aortenringen gegenüber Kontrollringen konnte demnach nicht nachgewiesen werden.

### **3.3 Untersuchung der endothelabhängigen Gefäßrelaxation nach Hemmung der SAH-Hydrolase**

S-Adenosylmethionin wirkt in einer Methylierungsreaktion als Methylgruppendonator und überträgt in Anwesenheit von Methyltransferasen eine Methylgruppe auf einen Akzeptor. Dabei entsteht S-Adenosylhomocystein, das wiederum ein Inhibitor von Methyltransferasen ist. In einer reversiblen Reaktion kann SAH durch die SAH-Hydrolase in Homocystein und Adenosin abgebaut werden. Der Quotient aus SAM und SAH wird als Methylierungspotential bezeichnet. Inwieweit der SAH-Metabolismus über eine Veränderung des Methylierungspotentials durch erhöhte Homocystein-Konzentrationen einen Einfluss auf die EDR hat soll in folgenden Versuchen geklärt werden.

#### **3.3.1 Eigeneffekt von Adenosin auf die Gefäßrelaxation**

Zunächst wurde die Wirkung von Adenosin (Ado) auf die Vasorelaxation der Aortenringe untersucht. Diese wurden wie gewohnt mit 0,3  $\mu$ M NA kontrahiert. Nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsmaximums wurden im weiteren Verlauf nach kumulativem Pipettierschema Adenosin in Konzentrationen von 100 nM-1 mM zugegeben.



#### **Abbildung 7 Vasorelaxation auf Adenosin**

Kumulative KWK von Ado (100 nM -1 mM) auf mit NA (0,3 µM) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrolltieren (Kontrolle; n=8 Ringe). Dargestellt sind  $MW \pm SEM$ .

Abbildung 7 zeigt einen sehr ungewöhnlichen Verlauf der KWK. Zu Beginn lässt sich statt einer Relaxation der Gefäße der gegenteilige Effekt, eine Verstärkung der Vasokonstriktion feststellen die ihr Maximum bei einer Adenosin-Konzentration von 3 µM mit  $9,9 \pm 1,7$  % erreicht. Nach weiterer Zugabe von Adenosin zeigte sich ein leichter relaxierender Effekt der sich bis zu einer Konzentration von 100 µM Adenosin dem Maximum der zunächst durch NA hervorgerufenen Kontraktion annäherte. Ab 100 µM Adenosin setzte eine starke Gefäßrelaxation ein die bei 1 mM ein Maximum von  $96,5 \pm 3,7$  % Relaxation erreichte. Die  $EC_{50}$  liegt bei diesem Versuch bei  $0,3 \pm 0,02$  mM.

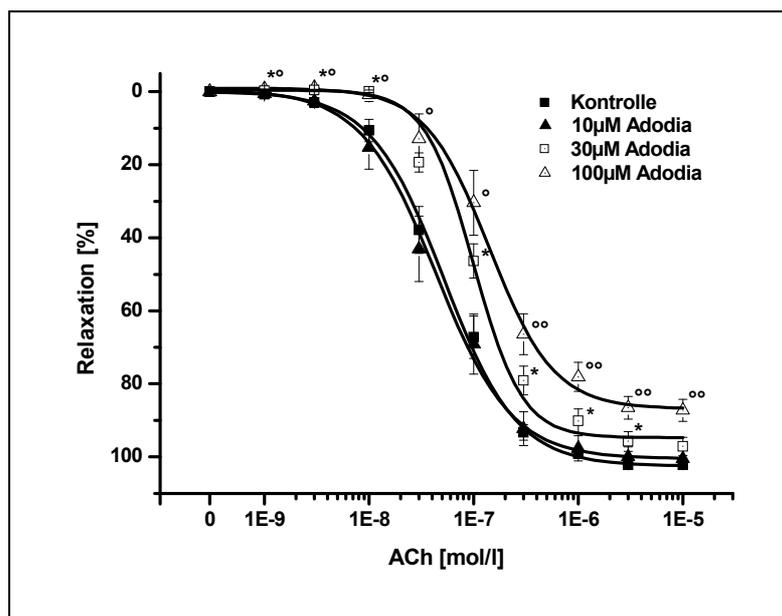
#### 3.3.2 Irreversible Hemmung der SAH-Hydrolase

In diesen Versuchen sollte über eine Hemmung der SAH-Hydrolase eine Akkumulation von SAH hervorgerufen werden. Folge dieser erhöhten SAH-Konzentration ist eine Abnahme der Methylierungsreaktionen, in denen Methylgruppen von SAM unter anderem auf DNA, RNA, Proteine und

Phospholipide übertragen werden. Inwiefern die Beeinflussung des Methylierungspotentials eine Wirkung auf die EDR zeigt, sollte einerseits konzentrationsabhängig, andererseits zeitabhängig überprüft werden.

### 3.3.2.1 Konzentrationsabhängig

Inwiefern die Konzentration von Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Adodia), einem Hemmstoff der SAH-Hydrolase Einfluss auf die EDR nimmt, galt es in diesen Versuchen herauszufinden. Die Gefäßringe wurden daher vor Versuchsbeginn über einen Zeitraum von 1 Stunde mit Adodia-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  sowie 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Nach dem anschließenden Auswaschen des Adodia wurden die Aortenringe mit 0,3  $\mu\text{M}$  NA kontrahiert und die durch ACh hervorgerufene KWK aufgezeichnet.



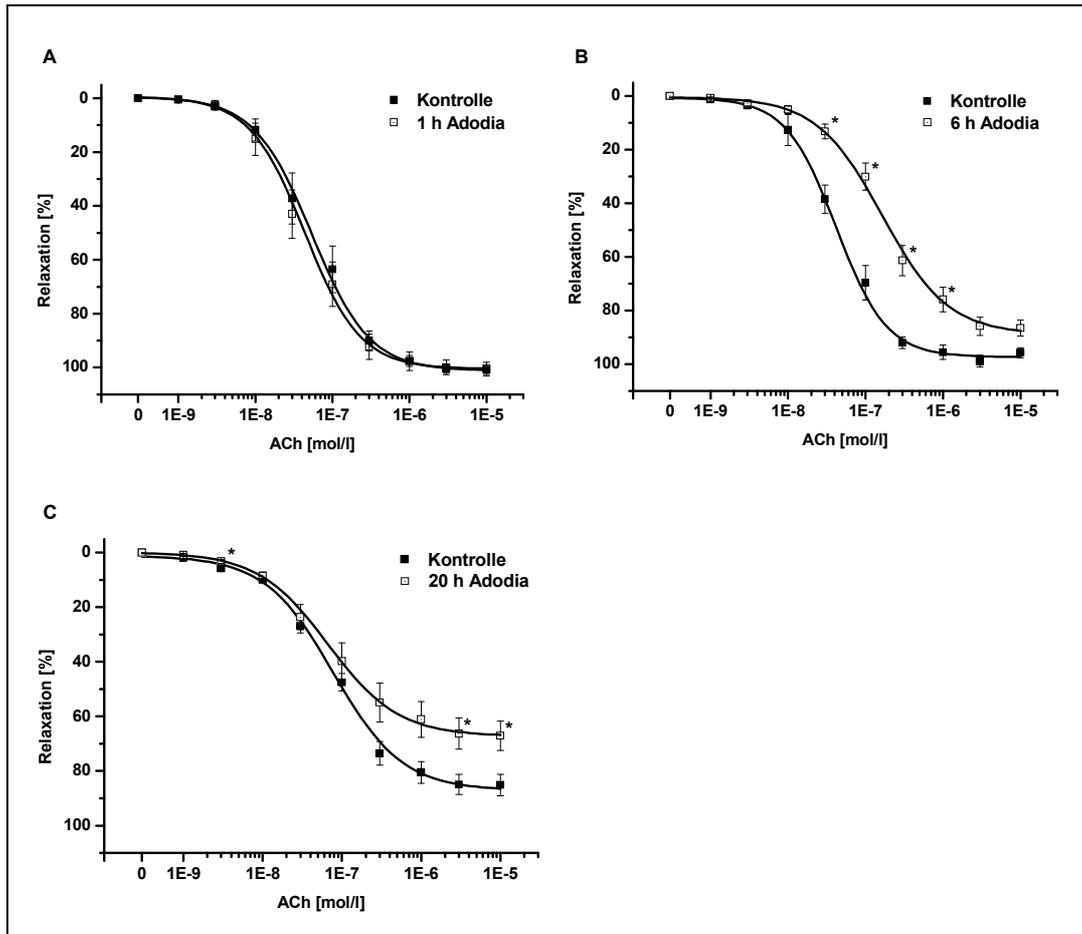
**Abbildung 8 Vasorelaxation auf ACh nach Inkubation mit Adodia (1)**

Kumulative KWK von ACh (1 nM -10  $\mu\text{M}$ ) auf mit NA (0,3  $\mu\text{M}$ ) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrolltieren (Kontrolle; n=15 Ringe) sowie Aortenringe, die zuvor eine Stunde mit 10  $\mu\text{M}$  (n=12 Ringe), 30  $\mu\text{M}$  (n=8 Ringe) bzw. 100  $\mu\text{M}$  (n=8 Ringe) Adodia inkubiert wurden. Dargestellt sind  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0,05$  Adodia 30  $\mu\text{M}$  vs. Kontrolle; ° $P < 0,05$ , °° $P < 0,001$  Adodia 100  $\mu\text{M}$  vs. Kontrolle.

Die Kontrollringe zeigten eine ACh-induzierte maximale Gefäßrelaxation  $102,2 \pm 0,9$  % bei einer Konzentration von  $3 \mu\text{M}$  ACh und einer  $EC_{50}$  von  $52,0 \pm 5,3$  nM. Die Inkubation der Aortenringe mit einer Adodia-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  führte gegenüber der Kontrolle zu keinen signifikanten Veränderungen. Bei einer Inkubations-Konzentration von  $30 \mu\text{M}$  Adodia hingegen zeigte sich eine leichte Abschwächung der Relaxationsfähigkeit im Vergleich zu der KWK der Kontrolle, die bis zu  $3 \mu\text{M}$  ACh signifikant war. Ihre maximale Ausprägung wurde bei einer ACh-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  mit  $97,1 \pm 2,5$  % erreicht. Die  $EC_{50}$  lag hier bei  $99,8 \pm 9,0$  nM. Eine noch deutlichere signifikant relaxationshemmende Wirkung wies die Behandlung der Gefäßringe mit einer Adodia-Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  auf. Die endothelabhängige Relaxation wurde hier auf  $87,2 \pm 3,0$  % reduziert, bei einer ACh-Dosis von  $10 \mu\text{M}$ . Die halbmaximale Konzentration lag hier bei  $142,1 \pm 25,7$  nM.

### 3.3.2.2 Zeitabhängig

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Hemmung der SAH-Hydrolase durch Adenosin-2',3'-Dialdehyd um einen zeitabhängigen Effekt handelt, wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Inkubationszeiten angesetzt. Vor Versuchsbeginn wurden die Aortenringe mit einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  Adodia über einen Zeitraum von 1, 6 sowie 20 Stunden behandelt, wobei die Inkubation über 20 Stunden im Kühlschrank ( $4^\circ\text{C}$ ) erfolgte. Anschließend wurden die Gefäßringe wie gewohnt mit  $0,3 \mu\text{M}$  NA kontrahiert. Nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus konnte die Aufnahme der KWK durch kumulative ACh-Zugabe durchgeführt werden.



### Abbildung 9 Vasorelaxation auf ACh nach Inkubation mit Adodia (2)

Kumulative KWK von ACh (1 nM -10 µM) auf mit NA (0,3 µM) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrolltieren (Kontrolle; n=3-10 Ringe) sowie Aortenringe die zuvor 1 Stunde (A), 6 Stunden (B) bzw. 20 Stunden (C) mit 10 µM Adodia inkubiert wurden (n=5-12 Ringe). Dargestellt sind  $MW \pm SEM$ . \* $P < 0,05$  Adodia vs. Kontrolle.

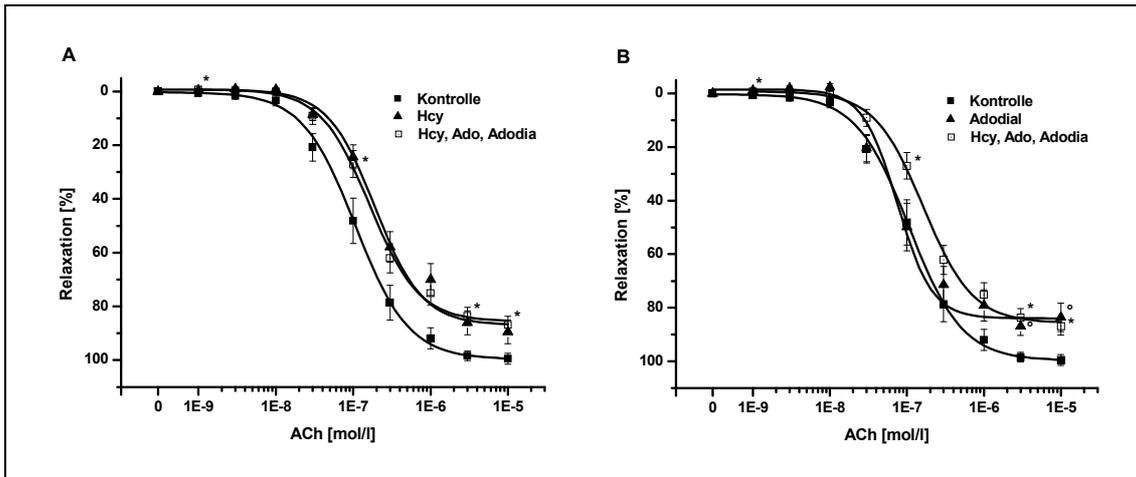
Unter Kontrollbedingungen zeigte sich in Abbildung 9A eine ACh-induzierte kumulative KWK, die ihre maximale Vasorelaxation bei 10 µM mit  $100,8 \pm 1,7\%$  erreichte. Eine mit einer Stunde kurzzeitige Inhibition der SAHH durch Adodia zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die endothelabhängige Relaxation. Im Gegensatz dazu führte eine Inhibition über 6 Stunden in einem Bereich von 30 nM – 1 µM ACh zu einer signifikant abgeschwächten endothelabhängigen Relaxation (Abb. 9B). Die maximale Relaxation von  $86,5 \pm 3,0\%$  zeigte sich bei einer ACh-Konzentration von 10 µM, die Kontrollringe erreichten eine Vasorelaxation von  $98,8 \pm 2,2\%$ . Die halbmaximale Konzentration der

inkubierten Gefäßsegmenten lag bei  $165,1 \pm 30,7$  nM, die der Kontrollen hingegen bei  $41,9 \pm 5,5$  nM. Ein deutlicher relaxationshemmender Effekt konnte ebenfalls nach Inkubation der Gefäßringe über einen Zeitraum von 20 Stunden beobachtet werden (Abb. 9C, S. 35). Zwar zeigte sich mit  $85,1 \pm 4,0$  % eine Abschwächung der maximalen Relaxationsfähigkeit der Kontrollringe, so blieb doch eine eindeutig sichtbar verminderte, ab  $3 \mu\text{M}$  Ach signifikante, Vasorelaxation der inkubierten Ringe zu erkennen. Diese erreichte ihren Maximalwert von  $67,1 \pm 5,4$  % bei einer ACh-Dosis von  $10 \mu\text{M}$ . Der  $\text{EC}_{50}$  lag in diesem Fall bei  $66,7 \pm 19,4$  nM, der Kontrollringe bei  $78,4 \pm 10,6$  nM.

Durch die Beeinflussung des Methylierungspotentials mittels Adenosin-2'3'-Dialdehyd entsteht eine Zunahme der SAH-Konzentration im Cytosol, was eine Abnahme des Methylierungspotentials zur Folge hat. In diesen Versuchen konnte eine signifikant abschwächende Wirkung des Adodia auf die EDR nachgewiesen werden. Dieser Effekt beruht sowohl auf einer konzentrationsabhängigen, als auch auf einer zeitabhängigen Wirkung.

### 3.3.3 Irreversible Hemmung der SAH-Hydrolase nach vorausgegangener Inkubation mit Homocystein und Adenosin

Ob Homocystein über eine Verringerung des Methylierungspotentials zu einer verminderten EDR führt, sollte durch folgende Versuche geklärt werden. Durch die gleichzeitige exogene Zufuhr von Adenosin und Homocystein und einer einstündigen Inkubation der Aortenringe im Organbad soll über die von der SAH-Hydrolase katalysierten Rückreaktion eine Erhöhung des SAH-Levels erreicht und somit das Methylierungspotential gesenkt werden. Nach 50-minütiger Inkubationszeit mit den beiden Substraten wurde zusätzlich für 10 min  $100 \mu\text{M}$  Adenosin-2',3'-Dialdehyd zugegeben, um zusätzlich die SAH-Hydrolase zu hemmen und einen weiteren Anstieg der SAH-Konzentration zu erreichen. Abbildung 10A ( S. 37) zeigt die nach den Auswertungen entstandenen KWK im Vergleich mit Gefäßringen die lediglich 1 Stunde mit  $100 \mu\text{M}$  Hcy behandelt wurden.



**Abbildung 10 Vasorelaxation auf ACh nach Inkubation mit Hcy, Ado, Adodia**

Kumulative KWK von ACh (1 nM -10  $\mu$ M) auf mit NA (0,3  $\mu$ M) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrolltieren (Kontrolle; n=6 Ringe), Aortenringe die zuvor eine Stunde mit 100  $\mu$ M Hcy, 100  $\mu$ M Ado und 10 min mit 100  $\mu$ M Adodia inkubiert wurden (n=16 Ringe), sowie Aortenringe die zuvor (A) 1 Stunde mit 100  $\mu$ M Hcy inkubiert wurden (n=7 Ringe) bzw. (B) 10 min mit 100  $\mu$ M Adodia inkubiert wurden (n=3 Ringe). Dargestellt sind  $MW \pm SEM$ . \* $P < 0,05$  Hcy, Ado, Adodia vs. Kontrolle; ° $P < 0,05$  Adodia vs. Kontrolle.

Durch die Behandlung der Gefäßringe mit 100  $\mu$ M Hcy, 100  $\mu$ M Ado sowie 100  $\mu$ M Adodia kam es zu einer signifikanten Abschwächung der ACh-induzierten Vasorelaxation gegenüber den derer von Kontrollringen. Während die maximale Relaxationsfähigkeit der Kontrollen bei  $99,5 \pm 2,0$  % lag konnten die mit Hcy, Ado und Adodia inkubierten Ringe nur einen Wert von  $86,9 \pm 3,3$  % erreichen. Aortenringe, die lediglich 1 Stunde mit 100  $\mu$ M Hcy behandelt wurden, zeigten im Vergleich dazu keine signifikanten Unterschiede. Die maximale endothelabhängige Relaxation lag hier bei  $89,5 \pm 4,4$  %. Dies lässt darauf schließen, dass die zusätzliche Anwesenheit von Ado und Adodia keinen Einfluss auf die endothelabhängige Vasorelaxation hat (Abb. 10A).

Um zusätzlich einen Vergleich zwischen einer alleinigen Inkubation von Gefäßringen mit 100  $\mu$ M Adodia für 10 min und der Inkubation mit Hcy, Ado und Adodia zu haben, wurden deren KWKs in Abbildung 10B (S. 37) zusammengeführt.

---

Auch in diesem Fall konnten keine signifikanten Veränderungen der KWKs von Aortenringen mit alleiniger Adodia-Inkubation gegenüber Ringen mit Inkubation mit Hcy, Ado sowie Adodia festgestellt werden. Die maximale Relaxation beider Kurven lag bei  $86,9 \pm 3,3$  %. Die  $EC_{50}$  der Adodia-Ringe war allerdings mit  $75,5 \pm 13,5$  nM im Gegensatz zu der  $EC_{50}$  der Ringe mit der Inkubation aller 3 Substraten ( $164,4 \pm 24,7$  nM) weniger als halb so hoch.

### **3.4 Einfluss von Homocystein auf die Gefäßrelaxation bei Diabetes mellitus**

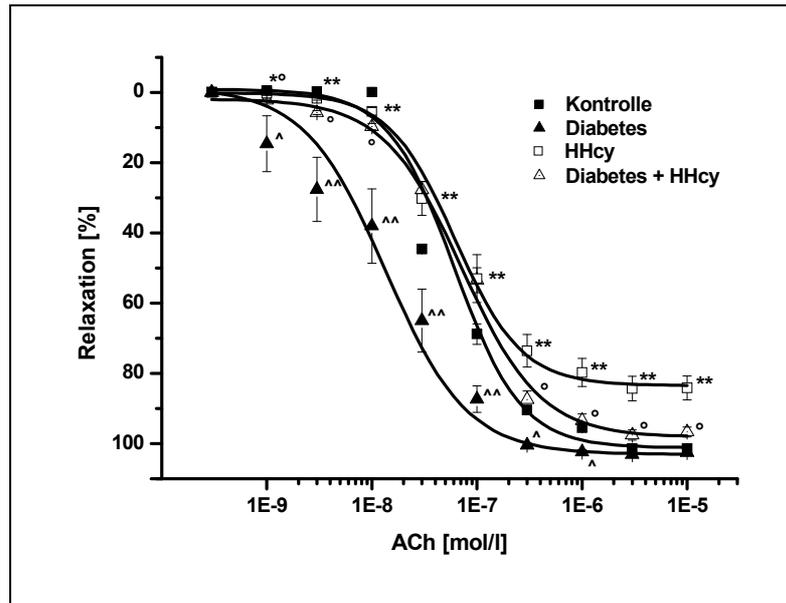
Hyperhomocysteinämie (HHcy) und Diabetes mellitus zählen zu den Risikofaktoren für die Entstehung von endothelialer Dysfunktion. Inwieweit beide Krankheitsbilder in vivo die Gefäßrelaxation beeinflussen soll in folgenden Versuchen untersucht werden

Zunächst wurden Versuchstiere beliebig in 3 Gruppen eingeteilt. Den Ratten der Gruppe 1 wurde Streptozotocin injiziert, um einen Insulin abhängigen Diabetes mellitus zu induzieren. Den Tieren der Gruppe 2 wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen homocysteinhaltiges Trinkwasser verabreicht, um eine Hyperhomocysteinämie zu induzieren. Gruppe 3 wurde sowohl Streptozotocin injiziert als auch über 4 Wochen homocysteinhaltiges Trinkwasser verabreicht. Nach diesen 4 Wochen wurden die Versuche am Schuler-Organbad durchgeführt und die entsprechenden KWK aufgezeichnet.

Die Versuchstiere der Gruppe 1 wiesen nach den 4 Wochen einen Blutzuckerspiegel von über 600 mg/dl auf. Die Ratten der Gruppe 2 entwickelten in diesem Zeitraum eine leichte Hyperhomocysteinämie. Der Hcy-Spiegel stieg von  $10,9 \pm 0,4 \mu\text{mol/l}$  auf  $13,0 \pm 0,9 \mu\text{mol/l}$  an. In Gruppe 3 stieg wie in Gruppe 1 der Blutzuckerspiegel auf über 600 mg/dl an. Der Hcy-Spiegel stieg von ursprünglich  $9,1 \pm 0,9 \mu\text{mol/l}$  auf  $12,4 \pm 0,7 \mu\text{mol/l}$  an und wies somit auf eine leichte Hyperhomocysteinämie hin.

#### **3.4.1 Endothelabhängige Relaxation bei Typ 1 Diabetes mellitus und Hyperhomocysteinämie**

Zunächst galt es, Erkenntnisse über eine mögliche Beeinflussung der endothelabhängigen Gefäßrelaxation zu bekommen. Die Versuche wurden nach gewohntem Schema durch Aufzeichnung und anschließender Auswertung von ACh-induzierten Konzentrations-Wirkungs-Kurven durchgeführt (Abb. 11, S. 40).



**Abbildung 11 Vasorelaxation auf ACh bei Diabetes und HHcy**

Kumulative KWK von ACh (1 nM -10  $\mu$ M) auf mit NA (0,3  $\mu$ M) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrollratten (Kontrolle; n=2 Ringe), STZ-induziert diabetische Ratten (Diabetes; n=8 Ringe), hyperhomocysteinämische Ratten (HHcy; n=23 Ringe) sowie Ratten mit STZ-induziertem Diabetes und Hyperhomocysteinämie (Diabetes + HHcy; n=30 Ringe). Dargestellt sind  $MW \pm SEM$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$  Hcy vs. Diabetes; ° $P < 0,001$  Hcy vs. Diabetes + Hcy; ^ $P < 0,05$ , ^^ $P < 0,001$  Diabetes vs. Diabetes + Hcy.

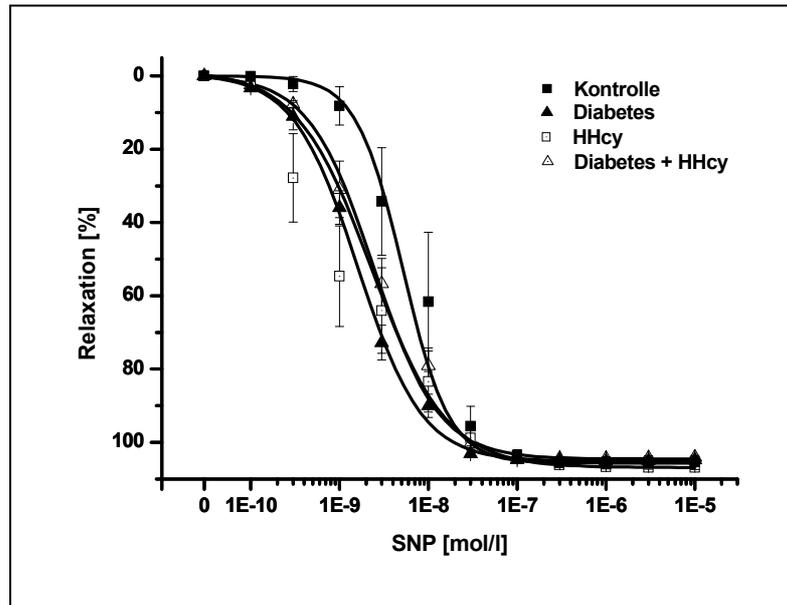
Die Aortenringe der rein diabetischen Ratten zeigten im Rahmen dieser Versuche die besten vasorelaxierenden Eigenschaften (Abb. 11). Während die maximale Relaxation der Kontrolle bei  $101,4 \pm 0,2$  % lag konnten die Ringe der diabetischen Ratten bei einer ACh-Konzentration von 3  $\mu$ M eine Relaxation von  $103,2 \pm 0,6$  % erreichen. Die  $EC_{50}$  lag in diesem Fall bei  $13,6 \pm 3,2$  nM. Eine demgegenüber signifikante Abschwächung ( $P < 0,001$ ) der endothelabhängigen Relaxation zeigten die Gefäßringe der Tiere mit leichter Hyperhomocysteinämie. Eine Zugabe von 3  $\mu$ M ACh konnte nur eine Vasorelaxation von  $84,4 \pm 3,5$  % hervorrufen, die  $EC_{50}$  lag bei  $61,8 \pm 10$  nM. Die Aortenringe der Ratten mit Diabetes wie auch leichter Hyperhomocysteinämie zeigten wie zu erwarten eine beeinträchtigte Gefäßrelaxation mit geringerer Ausprägung gegenüber der Ringe der reinen HHcy-Tiere. Der Verlauf dieser beiden letztgenannten KWK lässt zunächst einen signifikanten Unterschied

erkennen, wobei die HHcy-KWK weniger stark auf ACh reagiert. Nach einer Annäherung der beiden Kurven im Konzentrationsbereich zwischen  $0,3 \mu\text{M}$  –  $3 \mu\text{M}$  kommt es zu einer signifikanten Abschwächung ( $P < 0,001$ ) der Relaxation der HHcy-KWK um etwa 13,6 % gegenüber der Diabetes-HHcy-KWK. Die maximal erreichte Relaxation der Gefäßsegmente der Diabetes-HHcy-Tiere lag bei  $97,6 \pm 1,4$  % bei einer ACh-Dosis von  $3 \mu\text{M}$ , die  $EC_{50}$  bei  $71,7 \pm 5,6$  nM.

Aus den ermittelten Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Diabetes keinen verschlechternden Einfluss auf die EDR hat. Im Gegensatz dazu wirkte sich eine leichte Hyperhomocysteinämie ungünstig auf die EDR aus, was sich in einer Abschwächung der ACh-induzierten maximalen Relaxationsfähigkeit äußerte. Das Vorliegen einer leichten Hyperhomocysteinämie bei bestehendem IDDM scheint die EDR nicht in dem Maße negativ zu beeinflussen, wie es bei reiner Hyperhomocysteinämie ohne Diabetes der Fall war.

#### 3.4.2 Endothelunabhängige Relaxation bei Typ 1 Diabetes mellitus und Hyperhomocysteinämie

Ob es sich im Falle der beeinträchtigten Relaxationsfähigkeit von Rattenaorten bei Vorliegen von sowohl Diabetes als auch Hyperhomocysteinämie um eine rein endothelabhängige Ursache handelt, soll in diesen Versuchen überprüft werden. Die Gefäßringe von Ratten mit Diabetes, Hyperhomocysteinämie, oder beidem in Kombination wurden hierfür nach vorausgegangener Kontraktion mit  $0,3 \mu\text{M}$  NA mit SNP relaxiert.

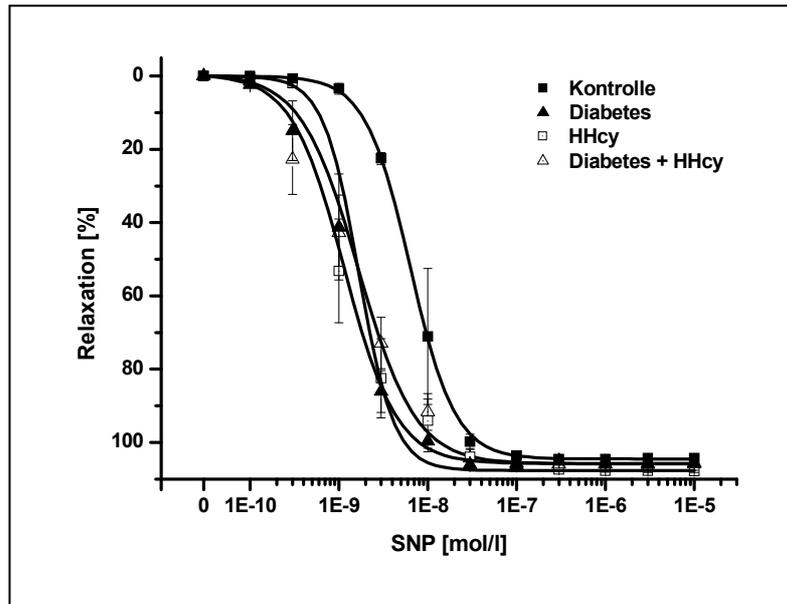


**Abbildung 12 Vasorelaxation auf SNP bei Diabetes und HHcy (1)**

Kumulative KWK von SNP (0,1 nM -10  $\mu$ M) auf mit NA (0,3  $\mu$ M) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrollratten (Kontrolle; n=2 Ringe), STZ-induziert diabetische Ratten (Diabetes; n=4 Ringe), hyperhomocysteinämische Ratten (HHcy; n=12 Ringe) sowie Ratten mit STZ-induziertem Diabetes und Hyperhomocysteinämie (Diabetes + HHcy; n=16). Dargestellt sind  $MW \pm SEM$ .

Gegenüber der EDR bleibt die endothelunabhängige Relaxation aller 3 Gruppen unbeeinflusst (Abb. 12). Die maximale Relaxationsfähigkeit lag für die Diabetes-Ringe bei  $105,2 \pm 0,5$  % sowie für die HHcy-Ringe bei  $106,9 \pm 0,5$  %. Die Relaxation der Aortensegmente von Ratten mit Diabetes und Hyperhomocysteinämie erreichte ihre maximale Ausprägung mit  $104,4 \pm 0,6$  %, während die der Kontrollen bei  $105,9 \pm 0,3$  % lag. Die halbmaximalen Konzentrationen der Kurven betragen für die Gefäßringe der Gruppe 1 (Diabetes)  $1,6 \pm 0,2$  nM SNP, der Gruppe 2 (HHcy)  $2,3 \pm 0,4$  nM SNP sowie für die Segmente der Gruppe 3 (Diabetes + HHcy)  $2,4 \pm 0,2$  nM SNP und der Kontrollen  $5,2 \pm 1,2$  nM SNP.

Um die relaxierende Wirkung des endothelialen NO komplett zu unterbinden, wurde in einer anschließenden Versuchsreihe die Aortenringe nach erfolgter Kontraktion, jedoch noch vor Einleitung der SNP-induzierten KWK mit 100  $\mu\text{M}$  LNA behandelt. Dadurch erfolgte eine Inhibition der endothelialen NO-Synthase und die endotheliale NO-Bildung konnte somit unterdrückt werden.



**Abbildung 13 Vasorelaxation auf SNP bei Diabetes und HHcy (2)**

Kumulative KWK von SNP (0,1 nM -10  $\mu\text{M}$ ) auf mit NA (0,3  $\mu\text{M}$ ) und anschließend LNA (0,1 mM) vorkontrahierte Aortenringe von Kontrollratten (Kontrolle; n=2 Ringe), STZ-induziert diabetische Ratten (Diabetes; n=4 Ringe), hyperhomocysteinämische Ratten (HHcy; n=12 Ringe) sowie Ratten mit STZ-induziertem Diabetes und Hyperhomocysteinämie (Diabetes + HHcy; n=16 Ringe). Dargestellt sind  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ .

Auch bei diesem Versuch wurde die maximale endothelunabhängige Vasorelaxation nicht negativ beeinflusst (Abb. 13). Nach einer Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  SNP relaxierte die Kontrolle maximal um  $104,5 \pm 0,0$  %. Die Diabetes-Ringe erreichten ihre maximale Relaxation von  $106,2 \pm 0,9$  % schon ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  SNP. Die Relaxationsfähigkeit der HHcy-Ringe lag bei  $107,9 \pm 0,3$  % nach Zugabe der letzten SNP-Konzentration, und die Diabetes-Hcy-Ringe relaxierten um  $105,9 \pm 0,5$  % bei 0,3  $\mu\text{M}$  SNP. Wider Erwarten lagen die  $\text{EC}_{50}$  unter denen der vorausgegangenen Versuchsreihe

---

ohne LNA, was somit auf eine leichte Linksverschiebung hindeutet. Die  $EC_{50}$  der Gruppe 1 (Diabetes) lagen bei  $1,2 \pm 0,2$  nM SNP, der Gruppe 2 (HHcy) bei  $1,7 \pm 0,3$  nM SNP, sowie der Gruppe 3 (Diabetes-HHcy) bei  $1,7 \pm 0,2$  nM SNP und die Kontrolle bei  $6,4 \pm 0,3$  nM SNP.

Die Relaxationsfähigkeit der in diesen Versuchsreihen verwendeten Aortenringe zeigte sich gegenüber den in den Vorversuchen verwendeten Kontrollringen unbeeinflusst. Die Gegenwart von LNA und somit die Unterbindung einer weiteren NO-Synthese führte durch eine Erniedrigung der benötigten  $EC_{50}$  zu einer leichten Rechtsverschiebung der KWK. Die maximale Vasorelaxation blieb aber dennoch unbeeinflusst.

## 4 Diskussion

Hyperhomocysteinämie und Diabetes mellitus zählen neben kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, Hypertonie und Herzinsuffizienz zu den Risikofaktoren für die Entstehung von endothelialer Dysfunktion [20,21]. Unter endothelialer Dysfunktion wird die Beeinträchtigung wichtiger Funktionen des Endothels verstanden. Diese kann sich in einer Abschwächung der endothelabhängigen, vaskulären Tonusregulation äußern [16].

### 4.1 Einfluss von Homocystein auf die Vasoelaxation

Zunächst wurde die direkte Wirkung einer erhöhten Homocysteinkonzentration *in vitro* auf die EDR untersucht. Die Aortenringe der Ratten wurden hierbei über den Zeitraum einer Stunde mit Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 1 mM Hcy inkubiert. Die Auswertung der KWKs zeigte, dass die EDR in konzentrationsabhängiger Weise abgeschwächt wird. Bei der Behandlung der Ringe mit 10  $\mu\text{M}$  Hcy konnten keine signifikanten Veränderungen der KWK gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Eine Inkubation der Ringe mit 100  $\mu\text{M}$  führte zu einer bezüglich der Kontrolle um 7 % abgeschwächten maximalen Relaxationsfähigkeit, die einstündige Behandlung der Gefäßsegmente mit 1 mM resultierte in einer um 56 % reduzierten EDR. Auch die  $\text{EC}_{50}$  war in beiden Fällen 3,5- bzw. 3,6-fach erhöht und somit nach rechts verschoben. In einer Studie von Lang D. et al. [98] konnte beobachtet werden, dass *in vitro* die ACh-induzierte Vasorelaxation von Aortenringen aus Kaninchen durch erhöhte Hcy-Konzentrationen von 0,1 – 10 mM abgeschwächt wird. Unsere Untersuchungen bestätigen dieses Ergebnis und veranschaulichen die Wirkung erhöhter Hcy-Konzentrationen auf die vaskuläre Funktionstüchtigkeit. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass schon Plasma-Hcy-Werte von  $>100 \mu\text{M}$  als schwere Hyperhomocysteinämie gelten. Bei einer Hcy-Konzentration von 1 mM handelt es sich um einen bereits weit erhöhten Wert, der die klinische Relevanz in den Hintergrund rücken lässt. Allerdings assoziierten schon Boushey et al.

Hcy-Werte ab 10  $\mu\text{M}$  mit einer Erhöhung des Risikos für vaskuläre Erkrankungen [32]. Eine Beeinflussung der EDR kann durch unsere *in vitro* Untersuchungen bei besagter Konzentration nicht bestätigt werden.

Die Untersuchung der Wirkung von Hcy auf die SNP-induzierte Relaxation bestätigte ebenfalls die Ergebnisse von Lang et al. [98]. Diese konnten in ihrer Studie zeigen, dass die SNP-induzierte Vasorelaxation nach Inkubation mit 1 mM Hcy unbeeinträchtigt blieb. Auch in den Versuchen zu dieser Arbeit konnte Homocystein die endothelunabhängige Vasorelaxation nicht beeinflussen. Eine zusätzliche irreversible Hemmung der NO-Synthase mittels LNA wies ebenso eine unbeeinträchtigte maximale Relaxationsfähigkeit der Aortenringe auf. Der abschwächende Effekt auf die Gefäßrelaxation scheint demnach auf einer Wirkung des Homocysteins auf einen ausschließlich NO- bzw. endothelabhängigen Prozess zu beruhen. Zu diesem Ergebnis kamen auch Wang et al. in *in vitro* Untersuchungen, die das Wachstum von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen unter Einfluss von Homocystein beobachteten [99]. Sie konnten zeigen, dass sich die Wirkung von Homocystein auf verschiedene Zelltypen unterscheidet. So zeigte Homocystein in Anwesenheit von Adenosin einen dosisabhängigen hemmenden Effekt auf die DNA-Synthese in vaskulären Endothelzellen, dieser Effekt blieb hingegen in glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten aus. Die verwendeten Hcy-Konzentrationen bewegten sich dabei in einem klinisch relevanten Bereich (10-50  $\mu\text{M}$ ). In einer höheren Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Hcy dagegen zeigte sich eine Stimulation der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen [100, 101]. Der Zelltyp-spezifische Effekt scheint sich der Literatur nach auf Hcy-Konzentrationen von 10 –15  $\mu\text{M}$  zu beschränken.

Es ist bekannt, dass hohe Konzentrationen an Homocystein vaskuläre Endothelzellen schädigen [102] und die Bioverfügbarkeit von freiem NO reduzieren [70] bzw. NO inaktivieren können [67]. Einige der Mechanismen, über die Homocystein die vaskulären Endothelzellen schädigen soll, können jedoch auch durch Cystein oder andere sulfhydrylgruppen-tragende

Substanzen erzielt werden, wie z.B. die Autooxidation von Hcy und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [102, 103]. Jedoch wurde dieser Effekt gewöhnlich in Hcy-Konzentrationen über 1 mM beobachtet.

Erhöhte Hcy-Konzentrationen können über die von der SAHH katalysierten Rückreaktion mit Adenosin zu einer Erhöhung der intrazellulären SAH-Konzentration führen, was wiederum einer Reduktion des Methylierungspotentials zur Folge hat [83, 84]. Es kommt es zu einer Hypomethylierung von DNA sowie RNA, Proteinen und Phospholipiden [25]. Daher wird vermutet, dass der endothelschädigende Effekt von Homocystein in Zusammenhang mit Veränderungen des Methylierungspotentials steht, da Homocystein Einfluss auf die zellulären SAH-Level nimmt. SAH wirkt als Produktinhibitor von SAM-abhängigen Transmethylierungsreaktionen [27]. So vermag Homocystein in chronisch erhöhten Konzentrationen über eine Erhöhung der SAH-Konzentration und damit einer Erniedrigung des Methylierungspotentials die mRNA-Spiegel im Cytosol zu vermindern und somit die DNA-Transkription und das Wachstum in Gefäßendothelzellen zu inhibieren [66, 99, 104, 105]. In einer Studie von Castro et al. [106] wurden bei Patienten mit arteriosklerotischen Veränderungen nach Apoplexie oder Myokardinfarkt gegenüber Kontrollpersonen erhöhte Konzentrationen an Homocystein und SAH beobachtet sowie ein reduziertes Methylierungspotential und ein erniedrigter Methylierungsstatus der DNA.

Des Weiteren scheint Homocystein, wie schon erwähnt, Zelltyp-spezifisch zu wirken, da es die SAH-Konzentration in den Endothelzellen der Gefäße erhöhen kann, aber nicht in glatten Gefäßmuskelzellen [66]. Diese Beobachtung konnte durch die Auswertungen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da hierbei ausschließlich die endothelabhängige Vasorelaxation von Hcy beeinflusst wurde und sich kein Effekt auf die glatten Gefäßmuskelzellen zeigte.

#### 4.2 Einfluss einer Hemmung der SAH-Hydrolase auf die Vasorelaxation

Adenosin ist ein endogener Botenstoff der unter physiologischen aber auch pathophysiologischen Zuständen und in der Lage ist, den Blutfluss durch Beeinflussung des Gefäßtonus zu regulieren. Da in dieser Arbeit der Einfluss des MP bei erhöhten Homocystein-Konzentrationen auf die EDR untersucht wurde, sollten Versuchsreihen mit zeitgleicher Inkubation der Aortenringe mit Homocystein, Adenosin und Adodia durchgeführt werden. Um den alleinigen Effekt von Adenosin auf die Vasorelaxation zu untersuchen, wurden zunächst Adenosin-induzierte kumulative KWKs aufgenommen. Adenosin zeigte erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine starke Relaxation. Dieser Effekt wird wahrscheinlich über Adenosin  $A_1$ , aber auch  $A_{2A}$  Rezeptoren auf dem Endothel bzw. glatten Muskelzellen vermittelt und steht nicht in Zusammenhang mit einer Veränderung des Methylierungspotentials [107].

Adenosin-2'3'-Dialdehyd ist ein potenter, irreversibler Inhibitor der SAHH *in vitro* und *in vivo*, der durch Oxidation aus Adenosin gebildet wird [108]. Durch die irreversible Bindung von Adodia an SAHH kommt es zu einer Konformationsänderung, durch die das Enzym inaktiviert wird [109]. Es ist bekannt, dass bei Hyperhomocysteinämie das MP erniedrigt ist [83, 84] und auch durch Hemmung der SAHH mittels Adodia das MP vermindert wird [104]. Da bisher keine Wirkungen von Adodia auf die SAM-, DNA- oder RNA-Synthese beobachtet wurden, eignete sich dieser Hemmstoff zur Untersuchung der EDR bei verändertem MP durch erhöhte SAH-Konzentrationen [110]. In Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  ist Adodia in der Lage, die SAHH zu 95% zu hemmen. Hierbei kommt es zu einem zeitabhängigen Anstieg der cytosolischen SAH-Spiegel [111].

In dieser Arbeit zeigte die Untersuchung der ACh-induzierten Vasorelaxation nach einstündiger Inkubation der Aortenringe mit 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Adodia eine konzentrationsabhängige Abschwächung der EDR. Eine Hemmung der SAHH mit 10  $\mu\text{M}$  Adodia ließ keine signifikanten Veränderungen der KWK erkennen. Dagegen führte die Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  Adodia zu einer

signifikanten Verringerung der Relaxationsfähigkeit um 5 % bezüglich der Kontrolle, die Vasorelaxation nach Hemmung der SAHH mit 100  $\mu\text{M}$  Adodia war signifikant um 14,7 % abgeschwächt.

Um zu überprüfen ob ebenfalls ein zeitabhängiger Effekt bei der Hemmung mit Adodial auf die EDR besteht wurde eine Versuchsreihe mit Inkubationszeiten der Aortenringe mit 10  $\mu\text{M}$  Adodial für 1h, 6h sowie 20h durchgeführt. Aus den Ergebnissen dieser Versuche kann ebenfalls auf eine zeitabhängige Wirkung geschlossen werden. Nachdem bei der einstündigen Hemmung der SAHH keine Veränderung gegenüber der Kontrolle sichtbar war, zeigte sich nach einer Inkubation von 6 h eine Verminderung der Relaxationsfähigkeit von 12,5 %. Nach 20 h Inkubation konnte eine weitere Hemmung der EDR beobachtet werden. Zwar zeigte sich auch die Vasorelaxation der Kontrollringe etwas vermindert, es wurde hierbei jedoch von einem aufgrund des langen versuchsbedingten Inkubationszeitraumes *in vitro* entstandenen Qualitätsverlust der pathophysiologischen Mechanismen der Gefäßabschnitte ausgegangen. Im Vergleich zu den Kontrollringen wiesen die mit Adodia behandelten Aortenringe eine um 21,2 % verminderte maximale Relaxationsfähigkeit auf.

Obwohl Adodia schon in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  nach 15-minütiger Inkubation in der Lage ist mindestens 95 % der zellulären SAHH zu hemmen, scheint eine Wirkung auf die EDR in dieser Konzentration und diesem Inkubationszeitraum auszubleiben.

Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen verminderten Methylierungsreaktionen bei erhöhten Homocystein-Konzentrationen und der Entstehung endothelialer Dysfunktion besteht.

Im folgenden Versuch sollte zunächst eine Erhöhung der SAH-Konzentration durch simultane einstündige Inkubation der Aortenringe mit 100  $\mu\text{M}$  Hcy und 100  $\mu\text{M}$  Adenosin erreicht werden. Es wurde bereits berichtet, dass Homocystein schon in Konzentrationen von 10–50  $\mu\text{M}$  das Wachstum von Gefäßendothelzellen hemmt. Diese Wirkung wurde allerdings nur in Anwesenheit von Adenosin beobachtet [99]. Um eine Verstärkung des durch erhöhte SAH-Konzentrationen Effektes zu erzielen erfolgte eine nach 50

Minuten verstrichener Inkubationszeit einsetzende 10-minütige Hemmung der SAH-Hydrolase mit 100  $\mu\text{M}$  Adodial. Die anschließend durchgeführten KWKs wiesen eine um 12,7 % verminderte endothelabhängige Relaxation gegenüber der Kontrolle auf, die bei ACh-Konzentrationen ab 3  $\mu\text{M}$  signifikant waren. Im Vergleich dazu zeigte die KWK der allein mit 100  $\mu\text{M}$  Hcy inkubierten Ringe einen nahezu identischen Verlauf. Aortenringe die lediglich für 10 Minuten mit Adodia gehemmt wurden, resultierten ebenfalls wie die mit allen drei Substraten behandelten Ringe in einer um 12,7 % reduzierten Vasorelaxation. Allerdings wurde hier keine Rechtsverschiebung der KWK beobachtet. Dieser war im Falle der mit allen 3 Substraten behandelten Ringe mehr als doppelt so hoch.

Aufgrund der nahezu identischen Verläufe der KWK der Hcy-Ringe und der mit Hcy, Ado und Adodial behandelten Ringe liegt im ersten Moment die Vermutung nahe, dass eine zusätzliche Inkubation mit Ado und Adodia keine Wirkung auf die endothelabhängige Relaxation hat, und der hemmende Effekt alleine durch die Inkubation mit Homocystein hervorgerufen wird. Zur Ergänzung dieses Versuches wurden einige Aortenringe lediglich mit 100  $\mu\text{M}$  Adodia für 10 min inkubiert und anschließend mittels kumulativer ACh-Zugabe relaxiert. Die Vasodilatation dieser Gefäßabschnitte erreichte, ebenso wie die mit allen 3 Substanzen inkubierten Ringe, einen Maximalwert von  $86,9 \pm 3,3$  %. Allerdings zeigte sich hierbei eine Linksverschiebung der KWK. Die Vasorelaxation der Ringe für 1 h mit 100  $\mu\text{M}$  Hcy, sowie für 10 Minuten mit 100  $\mu\text{M}$  Adodia, als auch die Inkubation mit den 3 Substraten erzielte demzufolge nahezu identische maximale Werte. Es stellt sich daher die Frage, weshalb bei der kombinierten Inkubation eine Verstärkung des relaxationshemmenden Effektes ausbleibt. Möglicherweise vermag schon allein die Inkubation der Aortenringe mit 100  $\mu\text{M}$  Hcy den SAH-Level auf einen ausreichend hohen Wert anzuheben, bei dem dessen inhibitorische Effekt auf die entsprechenden Transmethylierungsreaktionen eine bereits maximale Ausprägung erreicht. Aufgrund der Ergebnisse der vorausgegangenen Versuchsreihe kann diese Überlegung möglicherweise widerlegt werden. Die Inkubation von Gefäßringen mit 1  $\mu\text{M}$  Hcy führte gegenüber einer Hemmung mit 100  $\mu\text{M}$  Hcy zu einer

stärker abgeschwächten Vasorelaxation. Auch nach Inkubation der Aortenringe mit Adodia konnte in vorherigen Versuchen eine weitere Verminderung der maximalen Relaxationsfähigkeit beobachtet werden (10  $\mu$ M über 20h). Demnach ist eine Verstärkung des hemmenden Effektes auf die Vasorelaxation durchaus möglich.

### 4.3 Einfluss von Hyperhomocysteinämie auf die Vasorelaxation bei Typ 1 Diabetes mellitus

Für die Erzeugung einer leichten Hyperhomocysteinämie im Rattenmodell wurde in dieser Arbeit die orale Gabe von Homocystein-Thiolacton über das Trinkwasser gewählt. Die Versuchsratten wurden hierfür in 3 Gruppen unterteilt. Der ersten Gruppe (HHcy) wurde mit Homocystein-Thiolacton versetztes Trinkwasser verabreicht zur Erhöhung der Plasma-Homocystein-Werte, Gruppe 2 (Diabetes) injizierte man STZ um einen Typ 1 Diabetes zu induzieren. Die dritte Gruppe (Diabetes + HHcy) wurde sowohl mit Hcy-haltigem Trinkwasser als auch mit einer STZ-Injektion behandelt. Nach einem Zeitraum von 4 Wochen erfolgten die Entnahme der Aorta und die anschließende Durchführung der isometrischen Kontraktion- und Relaxationsmessungen.

Sowohl bei den allein mit Streptozotocin behandelten Ratten als auch bei den diabetischen Ratten mit induzierter Hyperhomocysteinämie wurde bis zum Tage der Durchführung der Versuche ein massiver Anstieg der Blutglukose-Werte auf über 600 mg/dl, bzw.  $593,1 \pm 6,9$  mg/dl beobachtet. Durch die Behandlung der entsprechenden Versuchstiere mit Homocystein-Thiolacton-haltigem Trinkwasser entwickelte sich unter gesunden Voraussetzungen sowie unter diabetischer Stoffwechsellage eine moderate Hyperhomocysteinämie ( $13,0 \pm 0,9$   $\mu\text{mol/l}$ , bzw.  $12,4 \pm 0,7$   $\mu\text{mol/l}$ ). Andere Gruppen konnten durch Supplementierung des Trinkwassers mit Hcy Plasmakonzentrationen von etwa  $12,5$   $\mu\text{mol/l}$  nach einem Monat erreichen [112].

Die maximale endothelabhängige Relaxationsfähigkeit der Diabetes-Ratten zeigte sich gegenüber der Kontrolle unbeeinflusst, jedoch reagierten die diabetischen Tiere mit erhöhter Sensibilität auf die ACh-induzierte Vasorelaxation. Im Gegensatz dazu konnte bei hyperhomocysteinämischen Ratten eine signifikante ( $P < 0,001$ ) Abschwächung der Relaxation beobachtet werden. Auch die mit Streptozotocin und Homocystein-Thiolacton behandelten Tiere wiesen eine verminderte maximale Vasorelaxation, jedoch von geringerer Ausprägung auf. Die maximale SNP-induzierte, endothelunabhängige

Vasorelaxation blieb bei allen drei Gruppen sowohl ohne, als auch mit vorausgegangener LNA-Applikation unbeeinträchtigt. Gegenüber den Kontrollen reagierten diese allerdings in beiden Fällen mit erhöhter Sensibilität, was sich in erniedrigten  $EC_{50}$  äußerte.

In vielen Studien wurde die endotheliale Regulation des glatten Gefäßmuskels bei experimentell induziertem Diabetes mellitus untersucht, wobei die Ergebnisse jedoch stark differieren. So wird in der Literatur sowohl von verminderter, unveränderter als auch verstärkter ACh-induzierter Vasorelaxation von Aortenringen aus diabetischen Tieren berichtet. Die Mechanismen, die einer möglichen veränderten endothelabhängigen Relaxation bei STZ-induziertem Diabetes zugrunde liegen, sind bisher nicht vollständig geklärt. Oyama et al. stellten eine signifikante Reduktion der EDR auf ACh fest, während die Relaxationsantwort auf den NO-Donor SNP unverändert blieb [94]. Sie entdeckten weiterhin mittels elektronenmikroskopischen Untersuchungen, dass die Oberflächenstruktur der Endothelzellen aus diabetischen Ratten normal war, und schlossen daher auf metabolische Veränderungen von NO als Ursache für die abgeschwächte Relaxationsfähigkeit. Zu anderen Ergebnissen kamen dagegen Glocker und Quast [95]. Sie stellten weder eine Veränderung der endothelabhängigen maximalen Relaxation noch der  $EC_{50}$ -Werte bei Aortenringen von diabetischen Ratten gegenüber den Kontrollen fest. Eine verstärkte Vasorelaxation konnte dagegen Pieper bei Aortenringen aus diabetischen Ratten [113], Shen et al. [96] bei Gefäßringen der thorakalen Aorta von Mäusen mit STZ-induziertem Diabetes beobachten. Sie führten dieses Ergebnis auf eine erhöhte Produktion von Prostaglandin  $I_2$  und dem EDHF im frühen Diabetesstadium der Mäuse zurück.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen einer unveränderten maximalen endothelabhängigen Relaxation von Glocker und Quast [95] sowie weiterer Autoren [114]. Jedoch wird in der Literatur weit häufiger von einer abgeschwächten Relaxationsantwort auf ACh berichtet [115]. Eine Erklärung für diese Diskrepanzen liegt möglicherweise in der Dauer des STZ-induzierten Diabetes der betreffenden Versuchstiere. Diese steht nach Orié et al. in Abhängigkeit

zum Ausmaß der Abschwächung der EDR [116]. Pieper [113] stellte in seiner Studie eine Abhängigkeit der Art der Beeinflussung der EDR durch ACh von der Diabetesdauer fest. 24 Stunden nach STZ-Injektion zeigte sich eine Verstärkung der endothelabhängigen Vasorelaxation der Aortenringe, während nach einem Zeitraum von 1-2 Wochen keine Veränderungen der Relaxationsfähigkeit der Gefäßsegmente aus diabetischen Ratten gegenüber Kontrolltieren zu erkennen war. Eine Diabetesdauer von 8 Wochen resultierte dagegen in einer abgeschwächten ACh-induzierten Gefäßrelaxation. Andere Untersuchungen wiesen ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen Dauer der diabetischen Erkrankung und der unterschiedlichen Auswirkungen auf die EDR hin [117], jedoch blieb hierbei die ACh-induzierte Vasorelaxation noch 12 Wochen nach STZ-Behandlung der Ratten unverändert, nach 52-wöchiger Erkrankungsdauer zeigte sich die zu erwartende Verminderung der Relaxation. Die stark differierenden Ergebnisse bezüglich der Erkrankungsdauer und der Auswirkungen auf die EDR weisen auf weitere mögliche Unterschiede in der Größe der verwendeten Gefäße, in den Versuchsvoraussetzungen oder in der Zusammensetzung von Organbadlösungen hin [97].

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Inkubation der Aortenringe mit Homocystein im Organbad konnte auch nach Induktion einer moderaten Hyperhomocysteinämie durch orale Verabreichung von Homocystein-Thiolacton-haltigem Trinkwasser eine verminderte Vasorelaxation auf ACh sowie einer unbeeinträchtigten endothelunabhängigen Relaxation auf SNP beobachtet werden. In der Literatur wurde bereits von ähnlichen Ergebnissen berichtet [112]. Die Behandlung von Ratten mit Homocystein über einen Zeitraum von einem Monat führte zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Abschwächung der ACh-induzierten Relaxation. In der vorliegenden Arbeit konnte nach 4-wöchiger Hcy-Verabreichung eine ab 3  $\mu$ M ACh signifikante Verminderung der maximalen Gefäßrelaxation gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Des Weiteren wird vermutet, dass der durch leichte Hyperhomocysteinämie hervorgerufene Schwere endothelialer Dysfunktion von der Dauer der Erkrankung abhängt. Obwohl die 1-monatige

Homocystein-Gabe in einer nichtsignifikanten Abschwächung der EDR resultierte, stellten Miao et al. [112] nach Behandlung der Ratten über zwei Monate eine signifikante reduzierte Vasorelaxation fest. Dies kann jedoch nicht allein auf die Dauer der Hcy-Verabreichung zurückgeführt werden, da ein zusätzlicher Anstieg der Plasma-Hcy-Konzentrationen von etwa 12,5 µmol/l auf etwa 15,5 µmol/l beobachtet wurde. Als Ursache für die verstärkte Beeinträchtigung der endothelialen Tonusregulation muss daher ebenfalls ein alleiniger konzentrationsabhängiger Effekt, bzw. die Kombination von Zeitfaktor und konzentrationsbedingter Auswirkung in Betracht gezogen werden. In dieser Arbeit konnte ein konzentrationsabhängiger, hemmender Effekt von Homocystein allein auf die EDR von Aortenringen im Organbad nachgewiesen werden. Lang et al. untersuchten die Konsequenzen einer Hcy-Inkubation von Aortenringen aus Kaninchen auf die ACh-induzierte Gefäßrelaxation und stellten sowohl eine konzentrationsabhängige als auch eine zeitabhängige Wirkung fest [98]. Diesen Ergebnissen zufolge hängt die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion durch Homocystein vermutlich von beiden Faktoren ab.

Das simultane Bestehen eines STZ-induziertem Typ 1 Diabetes sowie einer experimentell, durch Hcy-Thiolacton-Gabe hervorgerufenen milden Hyperhomocysteinämie führte in dieser Arbeit zu einer reduzierten endothelabhängigen Vasorelaxation. Die maximale Relaxationsfähigkeit wies jedoch gegenüber derer von allein hyperhomocysteinämischen Aortenringen eine signifikant ( $P < 0,001$ ) weniger starke Beeinträchtigung auf. Eine zeitabhängige Wirkung des Homocysteins kann ursächlich ausgeschlossen werden, da der Zeitraum der Hcy-Behandlung sowie das Alter der Ratten übereinstimmt. Ein möglicher Grund für die Differenzen in der Relaxationsantwort könnte in unterschiedlichen Plasma-Hcy-Spiegeln liegen. Mit  $12,42 \pm 0,71$  µM bei sowohl diabetischen als auch hyperhomocysteinämischen Ratten liegt dieser Wert zwar um 0,61 µM unter dem Hcy-Spiegel der rein hyperhomocysteinämischen Tieren, dieser Unterschied ist jedoch minimal und statistisch nicht signifikant und somit als

---

Erklärung als eher unwahrscheinlich. Vermutlich führte die insulinabhängige diabetische Erkrankung zu einer Abschwächung der endothelschädigenden Wirkung des Homocysteins. Da in der Literatur kein ähnliches Versuchsmodell beschrieben ist, kann kein Vergleich zu anderen Ergebnissen gezogen werden. Eine mögliche Erklärung könnte in der von Shen et al. [96] geäußerten Vermutung liegen, eine vermehrte Produktion von Prostaglandin I<sub>2</sub> und des EDHF könne Grund für eine verstärkte Vasorelaxation im frühen Diabetesstadium sein.

Wie zu erwarten zeigte sich auch bei Aortenringen von Ratten mit Typ 1 Diabetes mellitus und Hyperhomocysteinämie keine Veränderungen der SNP-induzierten Vasorelaxation, was bestätigt dass die zugrundeliegenden Mechanismen für die Entstehung vaskulärer Dysfunktion auf endothelabhängigen Vorgängen beruhen.

## 5 Zusammenfassung

Sowohl Diabetes mellitus als auch Hyperhomocysteinämie (HHcy) werden in Zusammenhang mit der Entwicklung endothelialer Dysfunktion diskutiert.

Ob die Verminderung des Methylierungspotentials bei erhöhtem Hcy-Spiegel für die Entwicklung endothelialer Schädigungen verantwortlich ist, wurde mittels Hemmung der SAHH überprüft. Des Weiteren wurde die Wirkung des simultanen Bestehens von Typ 1 Diabetes und HHcy im Tiermodell auf die EDR untersucht, wobei es zu folgenden Ergebnissen kam:

1. Homocystein wirkt in konzentrationsabhängiger Weise hemmend auf die endothelabhängige Vasorelaxation, die endothelunabhängige Relaxation bleibt unverändert.
2. Die Inkubation von Aortenringen mit Adodia resultiert in einer konzentrations- und zeitabhängigen Abschwächung der endothelabhängigen Relaxation, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen vermindertem MP und Beeinträchtigung der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit hindeutet .
3. Die simultane Inkubation der Gefäßsegmente mit Hcy und Ado für eine Stunde gefolgt von Adodia für 10 min (je 100  $\mu$ M) zeigte denselben schwächenden Effekt auf die EDR wie die alleinige Inkubation mit Homocystein (100  $\mu$ M) für eine Stunde.
4. STZ-induzierter Diabetes mellitus führte nach einem Zeitraum von vier Wochen zu einer unveränderten maximalen endothelabhängigen sowie –unabhängigen Relaxation gegenüber der Kontrolle.
5. Eine experimentell induzierte HHcy resultierte in einer abgeschwächten EDR sowie einer unbeeinträchtigten endothelunabhängigen Relaxation.
6. Das zeitgleiche Bestehen von Typ 1 Diabetes mellitus und HHcy führte nach vierwöchiger Erkrankungsdauer zu einer verminderten, jedoch weniger stark ausgeprägten EDR gegenüber der alleinigen Erkrankung an HHcy.

## 6 Summary

Diabetes mellitus as well as hyperhomocysteinemia are discussed in the development of endothelial dysfunction.

Whether the decrease of methylation potential at elevated homocysteine levels is responsible for the development of endothelial damage was tested by inhibition of the SAHH. Furthermore the effect of the simultaneous existence of type 1 diabetes and HHcy in animal models on the EDR was investigated. We got the following results.

1. Homocysteine has a concentration dependent inhibitory effect on the endothelium-dependent relaxation, the endothelium-independent relaxation remains unchanged.
2. Incubation of aortic rings with Adodia impairs the endothelium dependent relaxation in a concentration and time dependent manner, indicating a possible connection between impaired MP and reduced EDR
3. The simultaneous incubation of aortic rings with Hcy and Ado for one hour followed by Adodia for 10 min (each 100  $\mu$ M) impaires the EDR in the same manner like the sole incubation with Hcy (100  $\mu$ M) for one hour.
4. STZ-induced diabetes mellitus results in an unchanged maximum endothelium dependent and independent relaxation compared to controls.
5. Experimental induced HHcy results in attenuated EDR and unchanged endothelium independent relaxation.
6. The simultaneous existence of type 1 diabetes mellitus and HHcy leads to impaired EDR after a duration of 4 weeks, but EDR is more impaired at the sole existence of HHcy.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Homocystein als Mittelpunkt des Methionin-Stoffwechsels ..	4
Abbildung 2	Endothelabhängige Vasorelaxation.....	23
Abbildung 3	Endothelunabhängige Vasorelaxation.....	24
Abbildung 4	Vasorelaxation auf ACh nach Inkubation mit Hcy .....	26
Abbildung 5	Vasorelaxation auf SNP nach Inkubation mit Hcy (1).....	28
Abbildung 6	Vasorelaxation auf SNP nach Inkubation mit Hcy (2).....	29
Abbildung 7	Vasorelaxation auf Adenosin.....	32
Abbildung 8	Vasorelaxation auf ACh nach Inkubation mit Adodial (1) .....	33
Abbildung 9	Vasorelaxation auf ACh nach Inkubation mit Adodial (2) .....	35
Abbildung 10	Vasorelaxation auf ACh nach Inkubation mit Hcy, Ado, Adodial .....	37
Abbildung 11	Vasorelaxation auf ACh bei Diabetes und HHcy .....	40
Abbildung 12	Vasorelaxation auf SNP bei Diabetes und HHcy (1) .....	42
Abbildung 13	Vasorelaxation auf SNP bei Diabetes und HHcy (2) .....	43

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Substanzen und Bezugsquellen.....	14
Tabelle 2	Zusammensetzung Krebs-Henseleit-Lösung.....	15
Tabelle 3	Konzentrationen der Versuchslösungen .....	16
Tabelle 4	Geräte.....	16
Tabelle 5	Kumulatives Pipettierschema.....	20

---

## Literaturverzeichnis

- [1] Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323: 27-36, 1990
- [2] Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 55: 1078-1087, 1999
- [3] Town MH, Schillinger E, Speckenbach A, Prior G. Identification and characterisation of a prostacyclin-like receptor in bovine coronary arteries using a specific and stable prostacyclin analogue, ciloprost, as a radioactive ligand. *Prostaglandins* 24: 61-72, 1982
- [4] Vapaatalo H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit* 7: 1075-1085, 2001
- [5] Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666, 1988
- [6] Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 298: 249-258, 1994
- [7] Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918, 1994
- [8] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
- [9] Furchgott RF, Khan MT, Jothianandan D. Evidence supporting the proposal that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. (Abstract) *Thromb Res Suppl VII*: 5 , 1987
- [10] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993
- [11] Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 88: 756-762, 2001
- [12] Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3203-3207, 1977
- [13] MacMillan-Crow LA, Murphy-Ullrich JE, Lincoln TM. High-affinity binding and localization of the cyclic GMP-dependent protein kinase with the

- intermediate filament protein vimentin. *Biochemistry* 33: 8035-8043, 1994
- [14] Lugnier C, Komasa N. Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur Heart J* 14: 141-148, 1993
- [15] Bahnon TD, Pandol SJ, Dionne VE. Cyclic GMP modulates depletion-activated  $Ca^{2+}$  entry in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 268: 10808-10812, 1993
- [16] Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 38: 05-128, 1995
- [17] Meulemans A. Production of NA by endothelial NO-Synthase: an in vitro versus vivo study. *C R Biol* 328: 271-279, 2005
- [18] Quaschnig T, Voss F, Relle K, Kalk P, Vignon-Zellweger N, Pfab T, Bauer C, Theilig F, Bachmann S, Kraemer-Guth A, Wanner C, Theuring F, Galle J, Hocher B. Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol* Feb 7, Epub ahead of print, 2007
- [19] Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Grozmann RJ. Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G1074-1081, 2002
- [20] Sydow K, Boger RH. Homocyst(e)in, endotheliale Dysfunktion und kardiovaskuläres Risiko. *Z Kardiol* 90: 1-11, 2001
- [21] De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130: 963-974, 2000
- [22] Du Vigneaud V, Ressler C, Rachele JR. The biological synthesis of "labile methyl group". *Science* 112: 267-271, 1950
- [23] Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 41: 340-342, 1995
- [24] Cantoni GL. Biological methylation: Selected aspects. *Annu Rev Biochem* 44: 435-451, 1975

- 
- [25] Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 10: 471-480, 1996
- [26] De la Haba G, Cantoni GL. The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J Biol Chem* 234: 603-608, 1959
- [27] Ueland PM. Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Rev* 34: 223-253, 1982
- [28] Fowler B. Disorders of homocysteine metabolism. *J Inher Metab Dis* 20: 270-285, 1997
- [29] Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost* 26: 219-225, 2000
- [30] Handy DE, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis : diagnosis and treatment. *Curr Atheroscler Rep* 5: 276-283, 2003
- [31] Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor LM jr. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and corelation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem* 40: 873-881, 1994
- [32] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 274: 1049-1057, 1995
- [33] Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 15: 77-80, 2004
- [34] Stanger O, Hermann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M. Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein über den rationellen klinischen Umgang mit Homocystein, Folsäure und B-Vitaminen bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen – Richtlinien un Empfehlungen. *J Kardiol* 10: 190-199, 2003
- [35] Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 44: 1833-1843, 1998
- [36] Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 12: 279-298, 1992

- 
- [37] McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56: 111-128, 1969
- [38] Battegay E, Fowler B, Darioli R, Graf C, Miserez AR, Riesen W, Saner B, Schulthess G. Homocystein als kardiovaskulärer Risikofaktor. *Cardiovasc Med* 4: 71-76, 2004
- [39] Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *J Am Med Assoc* 277: 1775-1781, 1997
- [40] Ubbink JB, van der Merwe A, Delport R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, Vermaak WJ. The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 98: 177-184, 1996
- [41] Brattstrom L, Israelsson B, Lindgarde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Metabolism* 37: 175-178, 1988
- [42] Kang SS, Wong PW, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 36: 458-462, 1987
- [43] Rydlewicz A, Simpson JA, Taylor RJ, Bond CM, Golden MH. The effect of folic acid supplementation on plasma homocysteine in an elderly population. *QJM* 95: 27-35, 2002
- [44] Clarke R, Armitage J. Vitamin supplements and cardiovascular risk: review of the randomized trials of homocysteine-lowering vitamin supplements. *Semin Thromb Hemost*. 26: 341-348, 2000
- [45] Clarke R, Lewington S, Landray M. Homocysteine, renal function, and risk of cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* 131-133, 2003
- [46] Massy ZA. Potential strategies to normalize the levels of homocysteine in chronic renal failure patients. *Kidney Int Suppl* 134-136, 2003
- [47] Blom HJ, De Vriese AS. Why are homocysteine levels increased in kidney failure? A metabolic approach. *J Lab Clin Med* 139: 262-268, 2002
- [48] Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 73: 613-621, 2001
- [49] Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine

- loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 22: 79-87, 1992
- [50] Vermaak WJ, Ubbink JB, Barnard HC, Potgieter GM, van Jaarsveld H, Groenewald AJ. Vitamin B-6 nutrition status and cigarette smoking. *Am J Clin Nutr* 51: 1058-1061, 1990
- [51] Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE, Kvale G, Vollset SE. Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 65: 136-143, 1997
- [52] Koehler K, Baumgartner RN, Garry PJ, Allen RH, Stabler SP, Rimm EB. Association of folate intake and serum homocysteine in elderly persons according to vitamin supplementation and alcohol use. *Am J Clin Nutr* 73: 628-637, 2001
- [53] McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 2: 386-689, 1996
- [54] Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 27: 517-527, 1996
- [55] Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 51: 828-835, 1991
- [56] Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med* 114: 473-501 1989
- [57] Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PW, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 88: 1463-1469, 1993
- [58] Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10: 111-113, 1995
- [59] Rozen R. Genetic modulation of homocysteinemia. *Semin Thromb Hemost* 26: 255-261, 2000
- [60] Boers GH, Fowler B, Smals AG, Trijbels FJ, Leermakers AI, Kleijer WJ, Kloppenborg PW. Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the

- combination of methionine loading and enzyme determination in cultured fibroblasts. *Hum Genet* 69: 164-169, 1985
- [61] Murphy-Chutorian DR, Wexman MP, Grieco AJ, Heininger JA, Glassman E, Gaull GE, Ng SK, Feit F, Wexman K, Fox AC. Methionine intolerance: a possible risk factor for coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 6: 725-730, 1985
- [62] Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 88: 1906-1914, 1991
- [63] Lentz SR, Sadler JE. Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* 81: 683-689, 1993
- [64] Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Minucci A, Carlino P, Martorana GE, Giardina B, De Sole P. Is homocysteine a pro-oxidant? *Free Radic Res* 35: 499-505, 2001
- [65] Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 104: 2569-2575, 2001
- [66] Lee ME, Wang H. Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 9: 49-54, 1999
- [67] Boger RH, Bode-Boger SM. Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost* 26: 539-545, 2000
- [68] Boger RH, Bode-Boger SM, Matsuoka H, Miyazaki H, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T, Cooke JP. Is asymmetric dimethylarginine a novel marker of atherosclerosis? *Circulation* 101: E160-E161, 2000
- [69] Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 7: 227-239, 2002
- [70] Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 272: 17012-17017, 1997
- [71] Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 91: 308-318, 1993

- [72] Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trolliet M, Heydrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 106: 483-491, 2000
- [73] Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 275: 29318-29323, 2000
- [74] Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 262: 10098-10103, 1987
- [75] Fischer PA, Dominguez GN, Cuniberti LA, Martinez V, Werba JP, Ramirez AJ, Masnatta LD. Hyperhomocysteinemia induces renal hemodynamic dysfunction: is nitric oxide involved? *J Am Soc Nephrol* 14: 653-660, 2003
- [76] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624, 1990
- [77] Munzel T, Heitzer T, Harrison DG. The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. *Herz* 22: 158-172, 1997
- [78] Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98: 1842-1847, 1998
- [79] Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 95: 2068-2074, 1997
- [80] Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boger RH, Bode-Boger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Frölich JC. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 652-658, 1999
- [81] Matsuguma K, Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Kaneyuki U, Shibata R, Fujimura T, Matsuoka H, Kimoto M, Kato S, Imaizumi T, Okuda S. Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine

- and its role for hypertension in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 2176-2183, 2006
- [82] Cantoni GL, Chiang PK. The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological methylations. Cavallini D, Gaull GE, Zappia V (Hrsg.). *Natural sulfur compounds: novel biochemical and structural aspects*. Plenum Press, New York, London, 67-80, 1980
- [83] Kloor D, Delabar U, Muhlbauer B, Luippold G, Osswald H. Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney: effects of ischemia and homocysteine. *Biochem Pharmacol* 63: 809-815, 2002
- [84] Clarke S. Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* 5: 977-983, 1993
- [85] American Diabetes Association. *Clinical Practice Recommendations 1997*. *Diabetes Care* 20 Suppl1: S1-S70, 1997
- [86] Roden M. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation und Diagnose. *Acta Med Austriaca* 31: 156-157, 2004
- [87] The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive treatment on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl.J.Med.* 14: 977-986, 1993
- [88] UK prospective diabetes study (UKPDS) group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* 352: 837-853, 1998
- [89] Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 328: 1676-1685, 1993
- [90] Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, TR Harrison. *Harrisons Innere Medizin*. ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 16. Auflg., 2005
- [91] Massy ZA. Therapy of hyperhomocysteinemia in chronic kidney disease. *Semin Nephrol* 26: 24-27, 2006
- [92] Koenig W, Marx N. Atherothrombotische Komplikationen. Warum Diabetiker besonders stark gefährdet sind. *Cardiovasc* 1: 34-36, 2001
- [93] Beers MH, Berkow R. *Das MSD Manual der Diagnostik und Therapie*. Urban & Fischer Verlag, München, 6. Auflg., 2000

- 
- [94] Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 132 : 75-78, 1986
- [95] Glocker S, Quast U. Binding and effects of P1075, an opener of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, in the aorta from streptozotocin-treated diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356: 210-215, 1997
- [96] Shen B, Ye CL, Ye KH, Liu JJ. Mechanism underlying enhanced endothelium-dependent vasodilatation in thoracic aorta of early stage streptozotocin-induced diabetic mice. *Acta Pharmacol Sin* 24: 422-428, 2003
- [97] Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev.* 44: 103-150, 1992
- [98] Lang D, Kredan MB, Moat SJ, Hussain SA, Powell CA, Bellamy MF, Powers HJ, Lewis MJ. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb VascBiol* 20: 422-427, 2000
- [99] Wang H, Yoshizumi M, Lai K, Tsai JC, Perrella MA, Haber E, Lee ME. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem* 272: 25380-25385, 1997
- [100] Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6369-6373, 1994
- [101] Tsai JC, Wang H, Perrella MA, Yoshizumi M, Sibinga NE, Tan LC, Haber E, Chang TH, Schlegel R, Lee ME. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 97: 146-153, 1996
- [102] Dudman NP, Hicks C, Wang J, Wilcken DE. Human arterial endothelial cell detachment in vitro: its promotion by homocysteine and cysteine. *Atherosclerosis* 91: 77-83, 1991
- [103] Harpel PC, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10193-10197, 1992

- 
- [104] Hermes M, Osswald H, Mattar J, Kloor D. Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. *Exp Cell Res* 294: 325-334, 2004
- [105] Fux R, Kloor D, Hermes M, Rock T, Proksch B, Grenz A, Delabar U, Bucheler R, Igel S, Morike K, Gleiter CH, Osswald H. Effect of acute hyperhomocysteinemia on methylation of erythrocytes and on DNA methylation of lymphocytes in healthy volunteers. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F86-92, 2005
- [106] Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EE, Ravasco P, Camilo ME, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem* 49: 1292-1296, 2003
- [107] Ray CJ, Marshall JM. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. *J Physiol* 570: 85-96, 2006
- [108] Borchardt RT, Patel UG, Bartel RL. Adenosine dialdehyde: a potent inhibitor of S-adenosylmethionine hydrolase. Usdin E, Borchardt RT, Creveling CR (Hrsg.). *Biochemistry of S-Adenosylmethionine and related compounds*. Macmillan Press, London, 645-652, 1982
- [109] Hu Y, Komoto J, Huang Y, Gomi T, Ogawa H, Takata Y, Fujioka M, Takusagawa F. Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. *Biochemistry* 38: 8323-8333, 1999
- [110] Keller BT, Borchardt RT. Adenosine dialdehyde: a potent inhibitor of vaccinia virus multiplication in L929 cells. *Mol Pharmacol* 31: 485-492, 1987
- [111] Bartel RL, Borchardt RT. Effects of adenosine dialdehyde on S-adenosylhomocysteine hydrolase and S-adenosylmethionine-dependent transmethylation in mouse L929 cells. *Mol Pharmacol* 25: 418-424, 1984
- [112] Miao CY, Villeneuve N, Brunel-Jacquemin C, Petit C, Guillaumin JP, Gransagne D, Briant C, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Chronic mild hyperhomocysteinemia induces aortic endothelial dysfunction but does not elevate arterial pressure in rats. *J Vasc Res* 42: 148-156, 2005
- [113] Pieper GM. Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. *Diabetologia* 42: 204-213, 1999

- 
- [114] Mulhern M, Docherty JR. Effects of experimental diabetes on the responsiveness of rat aorta. *Br J Pharmacol* 97: 1007-1012, 1989
- [115] Ozturk Y, Altan VM, Yildizoglu-Ari N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev* 48: 69-112, 1996
- [116] Orié NN, Aloamaka CP, Iyawe VI. Duration-dependent attenuation of acetylcholine- but not histamine-induced relaxation of the aorta in diabetes mellitus. *Gen Pharmacol* 24: 329-332, 1993
- [117] Chang KS, Stevens WC. Endothelium-dependent increase in vascular sensitivity to phenylephrine in long-term streptozotocin diabetic rat aorta. *Br J Pharmacol* 107: 983-990, 1992

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken die mich in meinen Vorhaben unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oßwald danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Hilfe und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Timo Rieg für die gute und schnelle Einarbeitung in die Methodik und die freundschaftliche Betreuung. Während der Durchführung des experimentellen Teils meiner Arbeit stand er mir bei Problemen und Fragen stets zur Seite. Auch nach seinem Weggang nach San Diego trug er durch kritisches Korrekturlesen zur Fertigstellung der Arbeit bei.

Bei PD Dr. Doris Kloor, Marina Hermes und Renate Riehle möchte ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme im Labor und Ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Ich habe mich dort im Labor vom ersten Moment an wohlfühlt.

Julia Mattar, Sandra von Hippel und Benjamin Roll danke ich für die fröhliche Atmosphäre und Zeit im Labor.

Meinem Bruder Maik danke ich sehr für die Hilfe beim Suchen von Literatur und die Bereitstellung seiner medizinischen Fachliteratur. Er hatte stets ein offenes Ohr, vor allem bei den medizinischen Fragen meinerseits.

Bei meinem Freund Björn möchte ich mich ganz besonders für seine Unterstützung und Geduld während und nach dem Studium bedanken und für die Hilfe dabei, diese Arbeit ins richtige Format zu bringen.

Der größte Dank geht jedoch an meine Eltern, die mir durch ihre Hilfe und Unterstützung mein Studium erst ermöglichten und dabei selbst viel dafür geopfert haben. Sie haben stets an mich geglaubt und die Geduld mit mir nie verloren. Dafür sei ihnen herzlich gedankt.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Eva Natalie Häntschel  
Geburtsdatum, -ort: 08.06.1981, Nürtingen  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

09/87 - 06/91 Grundschule Neckartailfingen  
09/91 - 06/00 Allgemeine Hochschulreife Gymnasium  
Neckartenzlingen

### Hochschulstudium

10/00 – 06/06 Studium der Zahnmedizin, Eberhard Karls Universität  
Tübingen  
02.10.2001 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
02.04.2003 Zahnärztliche Vorprüfung  
07.06.2006 Zahnärztliche Prüfung / Staatsexamen  
09.06.2006 Approbation als Zahnärztin

### Publikation

Daten und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bei der 83. jährlichen Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Leipzig vorgestellt und publiziert.

Abstract-Publikation: Haentschel E, Osswald H, Rieg T. Acetylcholine (ACh) induced endothelium dependent relaxation (EDR) is attenuated by Adenosine-2',3'-dialdehyde in rat aortic rings. Pflugers Arch 447, Suppl 1: S139