Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung voraktivierter Monozyten bei ihrer Adhäsion an humane Aorten-, Saphenavenen-, Umbilikalarterien- und Umbilikalvenenendothelzellen und die Untersuchung der Superoxidausschüttung von Endothel und Monozyten bei Patienten mit arterieller Hypertonie und gesunden Kontrollpersonen im Vergleich

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Gesa Neumann
aus Berlin

Dekane: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:
1. Prof. Dr. med. Hermann Haller
2. Prof. Dr. med. Ralph Kettritz
3. PD Dr. med. Yvonne Dörffel

Datum der Promotion: 12. August 2004

Meinen Eltern in Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis 9

Abkürzungsverzeichnis 11

1 Einleitung 17

1.1 Arterielle Hypertonie als Risikofaktor 17

1.1.1 Definition 17

1.1.2 Epidemiologie 17

1.1.3 Ursachen 17

1.1.4 Diagnostik 18

1.1.5 Kardiovaskuläres Gesamtrisiko und Risikostratifikation 19

1.1.6 Therapiegrundsätze und Therapieziele 21

1.1.7 Der AT_1–Rezeptorantagonist Eprosartan 23

1.2 Arteriosklerose 24

1.2.1 Induktion und Promotion der atherosklerotischen Entzündung / Faktoren, die die Entzündung oder Atherogenese vorantreiben 25

1.2.2 Hypertonie als Risikofaktor der Atherogenese 26

1.2.3 Interaktionen von Endothelzellen, Monozyten und T-Zellen 27

1.2.4 Monozyten und Immunsystem bei Arteriosklerose 30

2 Fragestellung dieser Arbeit 33

2.1 Wissensstand 33

2.2 Hypothese 33

2.3 Vorhaben zur Verifikation der Hypothese 34

3 Material und Methoden 35

3.1	Studienteilnehmer/ Stichprobe	35
3.2	Hilfsmittel und Chemikalien	40
3.2.1	Substanzen und Zubehör zur Monozytenisolation und -stimulation sowie Adhäsion an humane Endothelzellen	40
3.2.2	Substanzen und Zubehör, die bei der Isolation und Kultur von Endothelzellen benötigt werden	41
3.2.3	Substanzen zur Adhäsionsmolekülbestimmung	42
3.2.4	Substanzen, die zur Bestimmung der Chemilumineszenz – Aktivität von Monozyten und Endothelzellen benötigt werden	42
3.3	Methoden der Isolation, Prüfung und Stimulation von humanen Monozyten aus dem peripheren Blut	43
3.3.1	Isolation von Monozyten aus dem peripheren Venenblut	43
3.3.2	Die Identifikation der humanen Monozyten	44
3.3.3	Stimulation, der aus dem peripheren Venenblut, isolierten humanen Monozyten	44
3.4	Humane Endothelzellen	45
3.4.1	Kultur von humanen Endothelzellen aus der Aorta (HAEC)	45
3.4.2	Humane Vena saphena Endothelzellen (HSVEC)	45
3.4.3	Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus Umbilikalarterien (HUAEC)	46
3.4.4	Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC)	47
3.4.5	Identifikation der Endothelzellen	47
3.5	Durchführung der Monozyten-Adhäsions-Versuche	48
3.5.1	Modifizierte Methode nach Hahn et al 1994 - mikroskopische Auszählung der Monozyten	48

3.5.2 Modifizierte Methode nach McCarron et al 1994 - Zählung radioaktiv markierter Monozyten 48

3.6 Bestimmung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, sVCAM-1 und sE-Selectin 49

3.7 Chemilumineszenz-Versuch und Zellstimulantien 50

3.7.1 Chemilumineszenz der Endothelzellen 50

3.7.2 Chemilumineszenz von Monozyten 51

3.8 Methoden der Datenanalyse 52

4 Ergebnisse 53

4.1 Ergebnisse der Adhäsionsversuche mit humanen Monozyten aus dem peripheren Venenblut an humane Endothelzellen 53

4.1.1 Ergebnisse der Adhäsion von Monozyten an humane Aortenendothelzellen (HAEC) 53

4.1.2 Ergebnisse der Adhäsion von Monozyten an humane Saphenavenen-endothelzellen (HSVEC) 57

4.1.3 Ergebnisse der Adhäsion von Monozyten an humane Umbilikalvenen-endothelzellen (HUVEC) 60

4.1.4 Ergebnisse der Adhäsion von Monozyten an humane Umbilikalarterien- Endothelzellen (HUAEC) 62

4.2 Ergebnisse der Bestimmung zirkulierender Adhäsionsmoleküle 62

4.3 Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen 65

4.3.1 Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen an Endothelzellen 65

4.3.2 Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen an Monozyten 65

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse 71

5 Diskussion 73

5.1 Die Rolle der erhöhten Superoxidfreisetzung von Monozyten bei der Atherogenese 74

5.2 Die Rolle der Superoxidfreisetzung von Endothelzellen nach Stimulation mit Angiotensin II 80

5.3 Erhöhte Mengen an zirkulierendem ICAM und VCAM bei Patienten durch Aktivierung der Monozyten in einem frühen Stadium der arteriellen Hypertonie 81

5.4 Erhöhte Adhäsion humaner Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie an Endothelzellen aus Aorta, Vena saphena, Umbilikalvene und -arterie 84

Zusammenfassung 87

Abstract 90

Literaturverzeichnis 93

Wissenschaftliche Publikationen 112

Eidesstattliche Erklärung 113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spontanadhäsion humaner Monozyten an humane Aorten-endothelzellen 53

Abbildung 2: Adhäsion an HAEC: unstimuliert und nach Stimulation mit LPS 54

Abbildung 3: Adhäsion an HAEC nach Stimulation mit Angiotensin II und Stimulation mit Angiotensin II nach Vorinkubation mit Eprosartan 55

Abbildung 4: Adhäsion von Monozyten von Hypertonikern an humane Aortenendothelzellen (HAEC) spontan (unstim) und nach Stimulation mit LPS im Vergleich 56

Abbildung 5: Adhäsion an HAEC: Korrelation zwischen Alter und Spontanadhäsion 57

Abbildung 6: Adhäsion von humanen Monozyten an HSVEC unstimuliert und nach Stimulation mit LPS 58

Abbildung 7: Adhäsion von Monozyten an HSVEC nach Stimulation mit Angiotensin II oder Vorinkubation mit Eprosartan und anschließender Angiotensinexposition 59

Abbildung 8: Adhäsion von Monozyten an HUVEC spontan und nach Stimulation mit LPS 60

Abbildung 9: Adhäsion von Monozyten an HUVEC nach Stimulation mit Angiotensin II oder nach Vorinkubation mit Eprosartan und anschließender Angiotensinexposition 61

Abbildung 10: hsICAM-1 bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen 63

Abbildung 11: hsVCAM-1 bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen 64

Abbildung 12: hsE-Selektin bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen 64

Abbildung 13: Chemilumineszenzaktivität der Monozyten spontan und nach Stimulation mit Angiotensin II 66

Abbildung 14: Chemilumineszenzaktivität von Monozyten nach Stimulation mit PMA oder PMA+LPS 67

Abbildung 15: Chemilumineszenzaktivität der Monozyten nach Stimulation mit Angiotensin II oder Vorinkubation mit Eprosartan und anschließender Angiotensinexposition 68

Abbildung 16: Chemilumineszenzaktivität der Monozyten nach Stimulation mit PMA im Zeitverlauf 69

Abbildung 17: Korrelation zwischen Alter und Chemilumineszenzaktivität unstimulierter Monozyten von Hochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen 70

Abbildung 18: Chemische Darstellung der Entstehung und des Verbleibs von Sauerstoffradikalen 74

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzg.	Erklärung der Abkürzung
ABDM	Ambulantes Blutdruckmonitoring
ALT	Alanin - Amino - Transferase
Ang II	Angiotensin II
AP	Angina Pectoris
Aa	Arteriae
AST	Aspartat - Amino - Transferase, Leberenzym
AT1	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor
ec SOD	Extracellular superoxide dismutase / extrazelluläre Superoxiddismutase
ESR	Erythrozytensedimentationsrate
bzw	beziehungsweise
Ca	Calcium
CABG	Coronary Arterial Bypass Graft / Koronararterieller Bypass
CD	Cluster of differentiation (Bezeichnung von Leukozytenantigenen)
Ck	Creatinkinase
Chol	Cholesterin
CL	Chemiluminescence / Chemilumineszenz
^{51}Cr	$^{51}Chrom$
CRP	C - reaktives Protein
CT	Computertomographie
Cu/Zn SOD	Kupfer/Zink - Superoxiddismutase

Abkürzg.	Erklärung der Abkürzung
d	dies / Tag
DHG	Deutsche Hypertonie Gesellschaft
dl	Deziliter, 10^{-1} l
DLBB	Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes
DSA	digital subtraction angiography / Digitale Subtraktionsangiographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunoassay
Epro	Eprosartan
ESR	Erythrozytensedimentationsrate
et al	et alteri / und andere
FACS	Fluorescence - Activated Cell Sorter / Fluoreszenz - aktivierter Zellsortierer
ECGM	Endothelial cell growth medium / Endothelzellwachstumsmedium
Endoth	Endothel
Ery	Erythrozyten
FCS	Fetal calf serum / fötales Kälberserum (auch FKS)
g	gravity / Schwerkraft, universelle Konstante, repräsentiert die Erdanziehungskraft. Die relative Zentrifugalkraft (RCF / relative centrifugal force / g-force) wird oft als Vielfaches von g angegeben (xg). RCF = 0,00001118 x radius of rotation (Rotationsradius einer Zentrifuge) [cm] x RPM^2 (revolutions per minute / Umdrehungen einer Zentrifuge pro Minute)
g	Gramm, 10^{-3} kg
Glc	Glucose im Plasma

Abkürzg.	Erklärung der Abkürzung
HAEC	Humane Aortenendothelzellen
Hb	Hämoglobin
HBSS	Hank´s balanced salt solution
HDL	High density lipoprotein
HEPES	4 (2 Hydroxyethyl) piperazine- 1 ethanesulfonic acid buffer
Hk	Hämatokrit
HLA-DR	human leucocyte antigen - D-related / Humanes Leukozytenantigen – D-verwandt
Hrs	Harnsäure
HSA	Human serum albumine / Humanes Serum Albumin
hsE-Selectin	Human soluble E-Selectin / humanes lösliches E-Selektin
hsICAM-1	Human soluble intercellular adhesion molecule-1
Hsp60	Hitzeschockprotein-60
hsVCAM-1	Human soluble vascular adhesion molecule-1
HSVEC	humane Saphenavenenendothelzellen
Hst	Harnstoff
HUAEC	humane Umbilikalarterienendothelzellen
HUVEC	humane Umbilikalvenenendothelzellen
ICAM	intercellular adhesion molecule/ interzelluläres Adhäsionsmolekül
IE	Internationale Einheit
IF-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin

Abkürzg.	Erklärung der Abkürzung
IL-1β	Interleukin-1ß
INR	International Normalized Ratio
K	Kalium
kDa	Kilo-Dalton, 10^3 Dalton [Einheit der molekularen Masse]
KG	Kommanditgesellschaft
kg	Kilogramm
kg/m^2	Einheit des Body Mass Index [Kilogramm / Quadratmeter]
KHK	Koronare Herzerkrankung
Krea	Kreatinin
LDL	Low Density Lipoprotein
Leuko	Leukozyten
LPS	Lipopolysaccharide
LFA-1	Lymphozyten-funktionsverwandtes Antigen-1
µl	Mikroliter, 10^{-6} l
MA	Massachusetts
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase / Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDC	Metalloproteinase- ähnliche, Disintegrin-ähnliche und Cystein-reiche Proteine
mg	Milligramm, 10^{-6} kg
MI	Missouri
MN	Minnesota
ml	Milliliter, 10^{-3} l

Abkürzg.	Erklärung der Abkürzung
Mn SOD	Mangan-Superoxiddismutase
MR	Magnetresonanz
n	Zahl der untersuchten Personen
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm, 10^{-12} kg
oB	ohne pathologischen Befund
OD	optical density / optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p42/44-MAP-Kinase	MAP-Proteinkinasen mit einem Molekulargewicht von 42/44 kDa
paVK	periphere arterielle Verschlußkrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMA	Phorbol-12-Myristate-13Azetat
PRIND	prolonged reversible ischaemic neurological deficit
Prot	Protein
PTCA	percutane transluminal coronary angiography / perkutane transluminale Koronarangiographie
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
rcf	relative centrifugal force / relative Zentrifugalkraft
RF	Risikofaktor
RLU/s	relative light units/ second / relative Lichteinheiten/ Sekunde

Abkürzg.	Erklärung der Abkürzung
RNA	ribo nucleic acid / Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Wachstumsmedium
rs	Korrelationskoeffizient nach Spearman
SD	Standard Deviation / Standardabweichung
Sed	Sediment
SEM	Standard Error of the mean / Standardfehler des Mittelwertes
sE-Selectin	lösliches E - Selektin
sICAM-1	lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül - 1
SOD	Superoxiddismutase
Spiral - CT	Spiral - Computertomographie
sVCAM-	lösliches vaskuläres Zelladhäsionsmolekül - 1
Throm	Thrombozyten
TIA	transitory ischemic attack / transitorische ischämische Attacke
TNF-*α*	Tumornekrosefaktor - *α*
TSH	thyroid stimulating hormone
U	unit, Einheit
UK	United Kingdom
unstim	unstimuliert
VLA-4	Very-Late-Antigen-4
VCAM	vascular cell adhesion molecule / vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
WHO	World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Arterielle Hypertonie als Risikofaktor

1.1.1 Definition

Unabhängig von klinischen, pathophysiologischen und anderen Klassifikationen gilt nach internationaler Übereinkunft [Chalmers et al, WHO-ISH 1999] ein reproduzierbarer Blutdruckwert nach Messungen an mindestens 3 verschiedenen Tagen von 140 mmHg systolisch und/oder 90 mmHg diastolisch sowie höher, bei korrekter Messung des Gelegenheitsblutdrucks, als hyperton. Dieser Grenze entspricht in der ambulanten 24-Stunden-Blutdruckmessung (ABDM) 135/85 mmHg als Tagesdurchschnittswert.

Als Sonderform wird die isolierte systolische Hypertonie mit einer Erhöhung des systolischen Wertes auf ≥ 140 mmHg bei einem normalen diastolischen Druckanteil (< 90 mmHg) definiert.

1.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie der Erwachsenenpopulation in Industrieländern der westlichen Welt beträgt circa 15 - 25 %. Die Prävalenz von Bluthochdruck schwankt stark in Abhängigkeit von Alter (jenseits des 65. Lebensjahres beträgt die Prävalenz > 50 %), Geschlecht, Rasse, hormonellen und sozio-ökonomischen Einflüssen [Chalmers et al, WHO-ISH 1999; DLBB eV - DHG 1999; Mensah 2002].

1.1.3 Ursachen

Primäre oder essentielle Hypertonie:

Bei 95 % aller Hypertonien ist kein konkreter funktioneller oder morphologisch pathologischer Organbefund diagnostizierbar. Die Entstehung wird poly-genetisch determiniert und durch Umweltfaktoren modifiziert. Nicht beeinflussbare Risikofaktoren sind genetische Prädisposition, Alter und Geschlecht. Als beeinflussbare Risikofaktoren gelten Übergewicht, Bewegungs-mangel, erhöhter Kochsalz- und Alkoholkonsum.

Als sekundäre Hypertonie wird eine Blutdruckerhöhung infolge einer renalen, endokrinen oder kardiovaskulären Grunderkrankung mit sekundärer

Blutdruckerhöhung bezeichnet.

Wenn die Grundkrankheit geheilt wird (z. B. chirurgisch, interventionell oder medikamentös bei Conn-Syndrom, Phäochromozytom, Schilddrüsenfunktionsstörungen, Nierenarterienstenose u.a.), kann Normotonie resultieren; sekundär manifestierte Gefäßveränderungen können aber auch die Hypertonie weiter unterhalten.

1.1.4 Diagnostik

Diagnostische Maßnahmen bei arterieller Hypertonie zielen darauf ab, erstens die Diagnose "Hochdruck" zu sichern, zweitens hochdruckbedingte Organschäden, Begleiterkrankungen und Risikofaktoren, die sich auf den Blutdruck, Krankheitsverlauf sowie Prognose auswirken können, zu erfassen und drittens Anhaltspunkte für eine sekundäre Hypertonie, d.h. organisch begründbare Hochdruckursachen, zu erhalten [Scholze 1999, DLBB eV - DHG 1999, Chalmers et al, WHO-ISH 1999].

Die Diagnose einer arteriellen Hypertonie ist durch eine standardisierte Blutdruckmessung im Sitzen an beiden Oberarmen, nach einer Ruhepause von 3 bis 5 Minuten, an drei verschiedenen Tagen und zu möglichst unterschiedlichen Tageszeiten zu stellen.
Aufgrund einer beträchtlichen Anzahl fälschlicherweise zu hoch bzw. zu niedrig gemessener Blutdruckwerte und damit fehlender Klassifikation (z.B. Weißkitteleffekte) sind gegebenenfalls diese Messungen durch das ambulante 24-Stunden-Blutdruckmonitoring (ABDM), Ergometrie oder Selbstmessungen von Patienten zu ergänzen.
Eine Basisdiagnostik, inklusive Herz-Kreislauf-Risikoprofil (Anamnese, körperlicher Befund, Serum-Elektrolyte (K^+, Na^+), Kreatinin, Glukose, Cholesterin, Urinstatus gegebenenfalls mit Mikroalbuminbestimmung, Elektrokardiogramm, Nierensonographie) ist bei jedem Patienten mit mehrfach gemessenen Werten von 140/90 mm Hg und darüber angezeigt [Chalmers et al, WHO-ISH 1999; DLBB eV - DHG 1999; Scholze 1999; Peters 2002; Blumenfeld 2001; Klose 1996; Levine et al 1995; Shepherd et al 1995; SSSS Group 1994; Heinonen et al 1994; Frick et al 1987; Bartha 1978].
Weiterführende diagnostische Maßnahmen können beinhalten:

Laborwerte: Blutbild, Ca^{++} im Serum, TSH, HDL, LDL, Harnsäure, Fibrinogen, Mikroalbumin, Sammelharn auf: Eiweiß, Glukose, Katecholamine,
Funktionsdiagnostik: Ergometrie, Echokardiographie, Doppler-(Farbduplex)-Sonographie arterieller Gefäße (Carotiden, Aa. renales, Extremitätenarterien etc.), spezielle Szintigraphie, Angiographie (intraarterielle digitale Substraktions-angiographie, Spiral-CT, MR-Angiographie). Die einzelnen Maßnahmen sind gezielt aufgrund konkreter Hinweise aus der Basisdiagnostik in Abhängigkeit von Blutdruckhöhe, Alter bzw. bei Verdacht auf Begleitkrankheiten oder Endorganschäden auszuwählen.

1.1.5 Kardiovaskuläres Gesamtrisiko und Risikostratifikation

Die WHO-Empfehlungen des Jahres 1999 zur Risikowertung einer arteriellen Hypertonie orientieren sich nicht mehr nur an der Blutdruckhöhe, sondern beachten auch das Gesamtrisikoprofil des Patienten [Chalmers et al, WHO-ISH 1999]. Hierzu zählen weitere Herz-Kreislauf-Risikofaktoren wie z.B. gleichzeitig vorhandene Dyslipoproteinämie, Adipositas und Nikotinabusus.

Faktoren, die die Prognose des Hochdruckkranken beeinflussen [Chalmers et al, WHO-ISH 1999, DLBB eV - DHG 1999]

1. Kardiovaskuläre Risikofaktoren

1.1. Anzuwenden zur Risikostratifizierung

beinflussbar:

- Schweregrad der Hypertonie
- Rauchen
- Dyslipoproteinämie
- Diabetes mellitus

nicht beeinflussbar:

Positive Familienanamnese

- Alter

a) Männer > 55 Jahre

b) Frauen > 65 Jahre

1.2. Weitere Risikofaktoren

- Übergewicht
- Körperliche Inaktivität
- Erhöhtes Fibrinogen

2. Endorganschäden

- Linksherzhypertrophie
- Hyperalbuminurie
- sonografischer oder radiologischer Nachweis arteriosklerotischer Plaques an den großen Gefäßen
- Proteinurie oder leichte Kreatininerhöhung
- Hypertensive Retinopathie

3. Folge- und Begleiterkrankungen

- KHK mit Angina pectoris oder Myokardinfarkt, CABG oder PTCA in Vorgeschichte
- Herzinsuffizienz
- Schlaganfall oder Transitorische ischämische Attacke (TIA)
- Chronische Nierenerkrankung, Proteinurie
- periphere arterielle Verschlußkrankheit

Als besonders risikoinduzierend gelten Endorganschäden wie Linksherzhypertrophie, Albuminurie und Intima-Media-Verdickung der großen Gefäße. Ein Diabetes mellitus wird in seiner Risikowertung den Endorganschäden gleichgesetzt. Das höchste Risiko einer Blutdruckerhöhung ist gegeben, wenn der Patient schon eine Hypertonie-assoziierte Erkrankung wie Herzinfarkt, Apoplex oder Herzinsuffizienz erlitten hat. Die nächtliche Blutdruckerhöhung gilt als ein weiterer wichtiger Risikoindikator. So findet sich bei fehlender nächtlicher Blutdruckabsenkung (< 5 % des Tagesmittelwertes),

besonders aber bei nächtlichem Blutdruckanstieg, eine deutlich erhöhte kardiovaskuläre Ereignisrate. Dies gilt sowohl für Herzinfarkte als auch Apoplexe. Auch die Reinfarkt- oder Reinsult-Rate steigt bei den betroffenen Patienten, wenn die physiologische Nachtsenke des Blutdruckes (normal > 10-15% des Tagesmittelwertes), fehlt. Zur Risikowertung der Hypertonie sollte demnach auch das nächtliche Verhalten des Blutdruckes erfasst werden [DLBB eV - DHG 1999; Mancia et al1993; Middecke 1998; Schrader 1995]. Berücksichtigt man die Höhe des Blutdrucks bzw. den Hypertonieschweregrad sowie die oben erwähnten Faktoren und Erkrankungen, lässt sich das kardiovaskuläre Gesamtrisiko abschätzen. Grundlage für eine von der WHO vorgeschlagene Differenzierung in vier Klassen ist die Prognose. Die Prognose wurde basierend auf großen epidemiologischen Studien, als 10-Jahres-Risiko einen kardiovaskulär bedingten Tod, nichttödlichen Schlaganfall oder Myokardinfarkt zu erleiden, kalkuliert.

1.1.6 Therapiegrundsätze und Therapieziele

Ziel jeglicher therapeutischer Bemühungen beim Hochdruckpatienten ist die Verbesserung der Prognose, d.h. die Vermeidung und gegebenenfalls die Rückbildung von Endorganschäden und damit die Senkung der kardio-/ zerebrovaskulären Morbidität und Mortalität. Das betrifft beim Herzen die linksventrikuläre Hypertrophie, die Herzinsuffizienz, koronare Zirkulations-störungen und den Herzinfarkt. Im Bereich des ZNS sind die transitorische ischämische Attacke (TIA), das prolongierte reversible ischämische neurologische Defizit (PRIND) sowie der Schlaganfall und an den Nieren die Albumin-/Proteinurie und die Niereninsuffizienz zu berücksichtigen. An den Gefäßen sind die Entwicklung einer Intima-Media-Dickenzunahme sowie Plaques und atherothrombotische Komplikationen zu beobachten. Der anzustrebende Zielblutdruck sollte unabhängig vom Lebensalter 140/90 mmHg oder niedriger, bei begleitendem Diabetes mellitus, Nieren- und Herzinsuffizienz 130/80 mmHg oder niedriger betragen. Die Blutdrucksenkung sollte langsam über Wochen und bei älteren Patienten gegebenenfalls sogar über Monate unter Beibehaltung bzw. Verbesserung der individuellen Lebensqualität erfolgen [Chalmers et al, WHO-ISH 1999; DLBB eV - DHG 1999; Scholze 1999; Slama

et al 2002; Hansson et al 1998; Hansson et al 1999; Wiklund et al 1997; Bulpitt et al 1994].

Der erste Schritt in der Behandlung der milden essentiellen Hypertonie sollte immer das Einleiten einer nichtmedikamentösen Therapie sein, was in den meisten Fällen eine mehr oder minder eingreifende Modifikation des Lebensstiles darstellt. Da circa die Hälfte aller Hypertoniker übergewichtig sind und damit fast zwangsläufig eine Insulinresistenz aufweisen, stellt das vordergründige Ziel der nichtmedikamentösen Behandlung eine Intensivierung von körperlicher Bewegung (Ausdauertraining) plus Gewichtsreduktion mittels einer ausgewogenen, mediterran ausgerichteten leichten Kost dar.

Nichtmedikamentöse blutdrucksenkende Allgemeinmaßnahmen

A) Gewichtsnormalisierung/ -reduktion (Blutdrucksenkung pro kg Gewichtsverlust ca. 2 mmHg)

B) Ernährung:
kochsalzarm (< 6 g NaCl/d),
fettreduziert (besonders tierische Fette),
bevorzugt Gemüse, Salate, Fisch und pflanzliche Öle,
Reduktion des Alkoholkonsums auf unter 30 g/d

C) Regelmäßige sportliche Ausdauerbetätigung:
Walking, Radfahren, Jogging.
Abbau von Dysstreß (rasche, unregelmäßige Wechselschichten meiden; Entspannungsübungen).

D) Überprüfung der Indikation für eine laufende Therapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika, Steroiden, Cyclosporin A und oralen Kontrazeptiva.

E) Verzicht auf Nikotinkonsum (assoziiertes Risiko wird gesenkt).

Die nichtmedikamentösen Allgemeinmaßnahmen sollten begleitend auch unter Pharmakotherapie lebenslang durchgeführt werden.

Prinzipiell gilt der Grundsatz: Je höher das individuelle Risiko, desto früher und

konsequenter sollte der Blutdruck zu normalisiert werden. Daraus leiten sich in zeitlicher Abfolge die Indikationen zum Beginn einer Pharmakotherapie im Blutdruckbereich bis 160/100 mmHg ab, darüber gelegene Werte sollten umgehend sowohl der nichtmedikamentösen als auch der Pharmakotherapie zugeführt werden.

1.1.7 Der AT_1–Rezeptorantagonist Eprosartan

Wir wählten für unsere Versuche den AT_1-Rezeptorantagonist Eprosartan als Antagonisten der Angiotensin II – Wirkung aus. Angiotensin II Typ 1 Rezeptor-Antagonisten wird eine wachsende Aufmerksamkeit bei der Behandlung der arteriellen Hypertonie zuteil.

Die Entdeckung von Angiotensin II – Rezeptorantagonisten basiert darauf, dass das natürlich vorkommende Hormon Angiotensin II (Ang II) eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der arteriellen Hypertonie und anderen kardiovaskulären Erkrankungen spielt [Laragh 1993]. Eprosartan ist ein AT_1–Rezeptorantagonist mit einem dualen Aktionsmodus. Neben seiner direkten antagonistischen Wirkung an vaskulären AT_1–Rezeptoren in Bezug auf den Pressoreffekt von Angiotensin II fungiert es ebenfalls als Antagonist an präsynaptischen AT_1–Rezeptoren. Es inhibiert auf diese Weise die sympathisch stimulierte Noradrenalinfreisetzung [Hedner 2002]. Die Bindung von Angiotensin II an den AT_1–Rezeptor in verschiedenen Zielorganen kann zu einer extrazellulären Volumenerhöhung sowie zu einer Erhöhung des peripheren Widerstands im arteriellen System führen. Hieraus entsteht eine Blutdruckerhöhung, die beim Menschen durch Salzbelastung verstärkt und durch Salzverarmung abgeschwächt werden kann.

Als erster Angiotensin II – Rezeptorantagonist wurde in den 70er Jahren die Substanz Saralasin synthetisiert. Diese Substanz hemmt den AT_1–Rezeptor nicht spezifisch und zeigt intrinsische Wirkung. Unglücklicherweise war Saralasin oral verabreicht nicht aktiv und hatte nur eine sehr kurze Wirkdauer, sodass eine antihypertensive Langzeitbehandlung mit diesem Medikament nicht möglich war.

1988 erfolgte die Erstbeschreibung von Losartan als dem ersten nicht-

peptidischen AT_1–Rezeptorantagonisten [Carini und Duncia 1988].

Eprosartan ist ein weiterer potenter und selektiver Angiotensin II Subtyp 1 – Rezeptorantagonist. Er ist ein Imidazol-5-Acrylsäure-Derivat und besitzt im Gegensatz zu anderen AT_1–Rezeptorantagonisten keine Biphenylstruktur und keinen Tetrazolring. Eprosartan ist ein kompetitiver Antagonist ohne aktive Metaboliten [Hedner 1999]. Die Ergebnisse von großen randomisierten Doppelblind-Studien (n > 3000), an Patienten mit milder, moderater oder schwerer Hypertonie, zeigten, dass die antihypertensive Wirkung von Eprosartan (gewöhnlich 400 bis 800 mg/ d) als tägliche Einmaldosis signifikant größer als die von Placebo ist und mindestens genauso groß wie die Wirkung von Enalapril. In placebokontrollierten Studien erreichte Eprosartan eine mittlere Blutdrucksenkung von 6,3 bis 15 mmHg systolisch und 4,1 bis 9,7 mmHg diastolisch am sitzenden Patienten [Plosker und Foster 2000]. Die maximale Plasmakonzentration von 1273 ± 577 ng/ ml, bzw. 2260 ± 1465 ng/ ml wird bei oraler Gabe von 400 mg Eprosartan nach 1 bis 4 Stunden erreicht [Tenero et al 1998; Chapelsky et al 1998]. Verschiedene klinische Studien haben gezeigt, dass Angiotensin II – Rezeptorantagonisten bei der Behandlung des hohen Blutdrucks genauso effektiv sind wie Kalzium - Kanalblocker, Beta - Blocker und ACE - Inhibitoren, aber weniger Nebenwirkungen induzieren [Dina und Jafari 2000].

1.2 Arteriosklerose

Arteriosklerose ist in der westlichen Gesellschaft eine der häufigsten fatalen Erkrankungen. Heutzutage geht man davon aus, dass es sich um einen in der Kindheit beginnenden multifaktoriellen Prozess handelt, der im späteren Leben manifest wird. Obwohl atherosklerotische Veränderungen im gesamten Körper beobachtet werden können, sind bestimmte Gefäßzonen, die erhöhtem hämodynamischen Stress unterliegen besonders krankheitsgefährdet. Hierzu gehören der Aortenbogen, die Verzweigungsstellen größerer Gefäße und die Carotis- und Coronararterien. Histologisch lassen sich atherosklerotische Läsionen durch die Proliferation von Intimazellen der Arterienwand, der Akkumulation von Lipiden und Ablagerungen von Bestandteilen der extrazellulären Matrix charakterisieren. Voll entwickelte atherosklerotische

Plaques enthalten lipidbeladene Makrophagen und glatte Muskelzellen, sowie Schaumzellen und extrazelluläre Cholesterolkristalle und können ulzerieren sowie kalzifizieren.

1.2.1 Induktion und Promotion der atherosklerotischen Entzündung / Faktoren, die die Entzündung oder Atherogenese vorantreiben

Zahlreiche pathophysiologische Beobachtungen an Menschen und Tieren führten zu der Formulierung der „response-to-injury“ Hypothese der Atherosklerose [Ross et al 1973]. Diese Hypothese legte nahe, dass Ablagerungen in den Arterien der erste Schritt der Atherogenese sind. Gegenwärtig wird die Betonung eher auf eine endotheliale Dysfunktion als Teil dieser Hypothese gelegt. Mögliche Ursachen der endothelialen Dysfunktion, die zur Atherosklerose führen können, schließen –

- erhöhtes und modifiziertes LDL [Steinberg 1997; Griendling et al 1997; Diaz et al 1997; Rajavashisth et al 1990; Hajjar und Haberland 1997],
- durch Zigarettenrauchen freigesetzte Radikale,
- arterielle Hypertonie,
- Diabetes mellitus,
- genetische Veränderungen,
- erhöhte Plasma-Homozystein Konzentrationen,
- infektiöse Mikroorganismen, wie Herpesviren oder Chlamydia pneumoniae [Libby et al 1997; Jackson et al 1997],

- sowie Kombinationen dieser oder anderer Faktoren ein [Ross 1993].

Die durch die Verletzung bedingte endotheliale Dysfunktion führt zu Kompensationsmechanismen, die normale Homöostase des Gefäßes beeinträchtigen. Die verschiedenen Verletzungsformen vermitteln einen Anstieg der Adhäsionsbereitschaft des Endothels gegenüber Leukozyten und Thrombozyten sowie auch eine erhöhte Permeabilität des Endothels. Der Endothelschaden ist auch für die prokoagulatorischen Eigenschaften des sonst antikoagulatorisch wirkenden Endothels verantwortlich und induziert die Bildung vasoaktiver Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Wenn die

angreifenden Substanzen durch die Entzündungsantwort nicht effektiv neutralisiert werden, kann der Prozess unbegrenzt fortschreiten. Durch die Entzündung werden Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen stimuliert, die, im Entzündungsgebiet eingebunden, eine Intermediärlesion formen. Bei weiterem ungehindertem Fortschreiten der Entzündungsreaktion kann sie eine Verdickung der Arterienwand hervorrufen, die durch eine allmähliche Dilatation reagiert. Bis zu diesem Punkt bleibt das Gefäßlumen unverändert, oder ein Phänomen, das „remodeling“ genannt wird. Granulozyten sind nicht bei allen Stadien der Atherogenese anwesend. Stattdessen wird die Antwort durch von Monozyten abstammende Makrophagen und spezielle Subtypen von T-Lymphozyten während jedes Krankheitsstadiums vermittelt [Ross 1999].

Die fortschreitende Entzündung resultiert in einer erhöhten Anzahl von Makrophagen und Lymphozyten, die beide aus dem Blut emigrieren und sich in der Läsion vermehren. Die Aktivierung dieser Zellen führt zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, welche weiteren Schaden induzieren und schließlich zu einer fokalen Nekrose führen. Die Akkumulation mononukleärer Zellen, die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen sowie die Bildung von fibrösem Gewebe führen zu einer weiteren Vergrößerung und Restrukturierung der Läsion. Diese wird schließlich von einer fibrinösen Kappe eingehüllt, und bedeckt somit einen Lipidkern und nekrotisches Gewebe: eine sogenannte „fortgeschrittene, komplizierte Läsion“. Die Intima-Media-Dicke nimmt zu und führt zu einer Abnahme des Gefässlumendurchmessers. Dies begünstigt weitere Plaquebildung und führt zu einer weiteren Lumeneinengung.

1.2.2 Hypertonie als Risikofaktor der Atherogenese

Arterieller Bluthochdruck wird als einer der führenden Risikofaktoren in der Ätiologie der atherosklerotischen Gefäßkrankheit aufgefasst [Simon et al 1995; Violi et al 1996]. Die Mechanismen, die arterielle Hypertonie mit der erhöhten Inzidenz von Atherosklerose verbinden sind bisher jedoch nur unvollständig aufgeklärt worden [Tummala et al 1999, Frostegard et al 1998]. Einerseits wurde endotheliale Dysfunktion bei arterieller Hypertonie anhand eines

erhöhten Niveaus des Schadensmarkers von-Willebrandt-Faktor, Endothel-abhängige gestörte Relaxation aufgezeigt [Blann 1998]. Hohe Plasmakonzentrationen des von-Willebrandt-Faktor lassen sich durch eine erfolgreiche antihypertensive Therapie senken [Blann and Waite 1996]. Andererseits sind die Adhärenz und transendotheliale Migration von zirkulierenden Monozyten in die Intima wichtige Etappen der Initiation der Atherosklerose [Ross 1993].

Bei Patienten mit arterieller Hypertonie finden sich oft erhöhte Konzentrationen des potenten Vasokonstriktors Angiotensin II. Zusätzlich zu seiner Hypertonie verursachenden Wirkung kann das Angiotensin auch durch eine Wachstumsstimulation glatter Muskelzellen zur Atherogenese beitragen [Ross 1999]. Angiotensin II bindet an spezifische Rezeptoren der glatten Muskelzellen und führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C. Dies kann zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration und zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur, zur erhöhter Proteinsynthese und Hypertrophie der glatten Muskulatur führen. Außerdem erhöht Angiotensin II die Lipoxygenaseaktivität der glatten Muskulatur, was die Entzündung und die Oxidation von LDL verstärken kann. Arterielle Hypertonie weist auch proinflammatorische Effekte auf und erhöht die Bildung von Wasserstoffperoxid sowie freien Radikalen wie dem Superoxidanion oder dem Hydroxylradikal im Plasma [Griendling et al 1997; Lacy et al 1998; Swei et al 1997]. Diese Substanzen reduzieren die Formung von Nitritoxid durch das Endothel [Vanhoutte und Boulanger 1995], erhöhen die Leukozytenadhäsion [Swei et al 1997] und können den peripheren Widerstand erhöhen.

1.2.3 Interaktionen von Endothelzellen, Monozyten und T-Zellen

Bestimmte Stellen der Arterien, wie Äste, Verzweigungen und Bögen verursachen charakteristische Veränderungen des Blutflusses einschließlich gesenkten Scherkräften (shear stress) und erhöhten Turbulenzen. An diesen Orten bilden sich spezielle Moleküle auf dem Endothel, die für die Anheftung, Migration und Akkumulation von Monozyten und T-Zellen verantwortlich sind. Zu solchen Adhäsionsmolekülen, die als Rezeptoren für Glycokonjugate und Integrine an Monozyten und T-Zellen fungieren, zählt man verschiedene

Selektine, interzelluläre Adhäsionsmoleküle und Gefäßzelladhäsionsmoleküle. Moleküle, die mit der Migration von Leukozyten durch das Endothel verbunden sind, wie Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmoleküle [Muller et al 1993], arbeiten in Verbindung mit vom Endothel, glatten Muskelzellen und Monozyten sezernierten chemotaktischen Molekülen, wie zum Beispiel dem Monocyte-chemotactic-protein-1, Osteopontin [Giachelli et al 1998] und modifiziertem LDL, um Monozyten und T-Zellen in die Arterie zu locken [Rajavashisth et al 1990].

Die Art der Strömung, das heißt, ob die Scherkräfte oder die Turbulenzen hoch oder niedrig sind, scheint entscheidend dafür zu sein, ob Läsionen an einer bestimmten Stelle im Gefäß entstehen. Strömungsänderungen beeinflussen die Expression von Genen, die Elemente an ihren Promoterregionen aufweisen, die auf Scherkräfte reagieren. Die Gene für das Interzelluläre Adhäsionsmolekül-1, die Platelet-derived-growth-factor-B Kette und den Tissue Factor besitzen diese Elemente beispielsweise. Ihre Expression wird durch reduzierte Scherkräfte verstärkt. Alterationen des Blutstromes scheinen entscheidend dafür zu sein, welche Stellen der Arterien anfällig für Läsionen sind. Als Folge der Hochregulation der Adhäsionsmoleküle an Endothel und Leukozyten erfolgt die Anheftung von Monozyten und T-Zellen an diesen Stellen.

Chemokine könnten für die Chemotaxis und Akkumulation von Makrophagen in sogenannten “fatty streaks“ verantwortlich sein. Dieses sind makroskopisch zu differenzierende, kissenförmige, weiße subendotheliale Intimabezirke, die hauptsächlich aus Schaumzellen bestehen und sich entweder zurückbilden oder zu einer fortgeschritteneren Läsion weiterentwickeln. Die Aktivierung von Monozyten und T-Zellen führt zur Hochregulation von Rezeptoren an ihrer Oberfläche, wie etwa der Muzin-ähnlichen Moleküle, die an Selektine binden, oder der Integrine, die sich mit Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-superfamilie und Rezeptoren kombinieren, die chemotaktische Moleküle anziehen. Diese Liganden-Rezeptor Interaktionen aktivieren mononukleäre Zellen. Sie induzieren Zellproliferation und helfen dabei die Entzündungs-reaktion an der Stelle der Läsion zu bestimmen und zu lokalisieren.

Adhäsionsmoleküle vermitteln die Interaktionen von Zellen mit der

extrazellulären Matrix und mit anderen Zellen. Das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 ist bei Wildtypmäusen an der Endotheloberfäche anzutreffen und ist bei Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen, die eine Hypercholesterolämie haben, konstitutiv erhöht. Im Gegensatz dazu ist das Gefäßzelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) bei Kontroll-Mäusen nicht anzutreffen, zeigt sich aber an den gleichen Stellen wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 bei Apolipoprotein E defizienten Mäusen. Die Adhäsion von Monozyten an das arterielle Endothel und die Initiation der Arteriosklerose bei Mäusen sind entscheidend von der Dosierung des VCAM-1 abhängig [Dansky et al 2001]. Zur Adhäsion von Monozyten und T-Zellen kann es also nach dem Anstieg von einem oder beiden Adhäsionsmolekülen, die mit chemotaktischen Molekülen, wie dem Monocyte-chemotactic-protein-1, Interleukin-8 oder modifiziertem LDL zusammenwirken, kommen. Es stellt sich die Frage, ob die Interaktion mit nur einem der verschiedenen Adhäsionsmoleküle ausreichen würde um die Entzündung zu senken und die Atherogenese zu verlangsamen oder ihr entgegenzuwirken. Bei Mäusen, bei denen das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1, P-Selektin, CD18, oder Kombinationen dieser Moleküle komplett fehlen, führt eine Lipidverfütterung zu kleineren atherosklerotischen Läsionen.

Ein Vergleich der relativen Rolle jedes dieser Moleküle beim Entzündungsprozess in den Arterien und in der mikrovaskulären Struktur könnte Möglichkeiten zur Modifikation des Entzündungsprozesses an der jeweiligen Stelle aufzeigen und so eine Modifikation der Arteriosklerose ermöglichen.

Eine Klasse von Molekülen, die an interzellulären Aktionen beteiligt ist, bilden die Disintegrine. Sie werden manchmal auch als Metalloproteinase-ähnlich, Disintegrin-ähnlich und Cystein-reiche Proteine (MDC´s) bezeichnet und wurden im Endothel, in glatter Muskulatur und in Makrophagen identifiziert. Diese Transmembranproteine enthalten in ihrem extrazellulären Segment eine Metalloproteinase-Sequenz, die es ihnen gestattet, Moleküle wie den Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) zu aktivieren [Black et al 1997]. Sie werden nicht in normalen Arterien vorgefunden, aber MDC15, ein Vertreter dieser Proteinfamilie, ist in atherosklerotischen Läsionen anzutreffen [Herren et al

1997]. Adhäsions-moleküle, wie L-Selektin, können durch die Metalloproteinase (L-Selektin Sheddase) von der Oberfläche der Leukozyten abgespalten werden. Dies legt nahe, dass es in chronischen Entzündungssituationen möglich sein könnte, die ausgeschütteten („shed“) Moleküle, etwa die verschiedenen Adhäsionsmoleküle im Plasma als Marker einer anhaltenden Entzündungsantwort, zu messen [De Caterina et al 1997, Hwang et al 1997]. Disintegrine könnten an diesem Ausschüttungsprozeß (shedding) beteiligt sein. Wenn die Ausschüttung auftritt, könnte sie in verschiedenen Typen von Entzündungsreaktionen detektierbar sein. Patienten, für die ein Arterioskleroserisiko besteht, könnten anhand erhöhter Plasmakonzentrationen der ausgeschütteten Moleküle identifiziert werden.

1.2.4 Monozyten und Immunsystem bei Arteriosklerose

Der ubiquitäre Monozyt, der Vorläufer der Makrophagen in allen Geweben, ist in jeder Phase der Arteriosklerose zugegen. Von Monozyten abstammende Makrophagen sind Fresszellen und Antigen-präsentierende Zellen. Sie sezernieren Zytokine, Chemokine, Enzyme zur Regulation des Wachstums, Metalloproteinasen und andere hydrolytische Enzyme. Der kontinuierliche Eintritt und das Überleben sowie die Replikation von mononukleären Zellen hängen zum Teil von Faktoren, wie dem Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor für Monozyten und Interleukin-2 für Lymphozyten ab. Kontiniuerliche Exposition gegenüber dem Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor gestattet es Makrophagen *in vitro* zu überleben und sich möglicherweise innerhalb der Läsionen zu vermehren. Im Gegensatz dazu aktivieren inflammatorische Zytokine wie Interferon-γ die Makrophagen und induzieren bei ihnen unter bestimmten Umständen den programmierten Zelltod, die Apoptose. Wenn dies *in vivo* geschieht, können Makrophagen in die nekrotischen Kerne (charakteristisch für die fortgeschrittene atherosklerotische Läsion) einbezogen werden.

Die ersten Zellen von denen man annahm, dass sie während der Expansion atherosklerotischer Läsionen proliferieren, waren glatte Muskelzellen. Die Replikation, der von Monozyten abstammenden Makrophagen und T-Zellen, ist

wahrscheinlich von gleichrangiger Bedeutung [Rosenfeld and Ross 1990]. Die Fähigkeit der Makrophagen Zytokine (wie den Tumornekrosefaktor-α, Interleukin-1 und den Transformierenden-Wachstumsfaktor-β), und Wachstumsfaktoren (wie den Platelet-derived Growth Factor und Insulin-like Growth Factor-1) zu produzieren könnte entscheidend für die Rolle dieser Zellen bei Schadens- und Reparaturmechanismen sein, die für das Fortschreiten der Läsion verantwortlich sind.

Aktivierte Monozyten exprimieren Klasse-II-Histokompatibilitätsantigene, wie HLA-DR, die ihnen erlauben T-Lymphozyten zu präsentieren [Ross 1999]. So überrascht es nicht, dass zellvermittelte Immunantworten an der Atherogenese beteiligt sind, da CD4- und CD8-Zellen an den Läsionen zu jeder Zeit des Prozesses anwesend sind. Die T-Zellen werden aktiviert, wenn sie von Makrophagen prozessiertes und dargebotenes Antigen binden. T-Zellaktivierung führt zur Sekretion von Zytokinen, einschließlich Interferon-γ und Tumornekrosefaktor-α und -β, die die Entzündungsantwort amplifizieren. Glatte Muskelzellen aus den Läsionen weisen auch, wahrscheinlich durch Interferon-γ induziert, Klasse II HLA Moleküle an ihrer Oberfläche auf. Sie können auch T-Zellen Antigene präsentieren [Hansson et al 1989]. Ein mögliches Antigen könnte oxidiertes LDL sein [Stemme et al 1995], das von Makrophagen prozessiert wird [Folcik et al 1997]. Hitzeschockprotein 60 könnte ebenfalls zur Autoimmunität beitragen. Dieses Hitzeschockprotein dient, wie andere Hitzeschockproteine auch, dem Zusammensetzen, intrazellulären Transport und Abbau von Proteinen und der Verhinderung der Proteindenaturierung. Diese Proteine könnten an Endothelzellen vermehrt sein und an der Immunantwort teilhaben [Wick et al 1997].

Ein immunregulatorisches Protein, der CD40 Ligand [Hollenbaugh et al 1995], kann von Makrophagen, T-Zellen, Endothel und glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Läsionen *in vivo* exprimiert werden. Sein Rezeptor, CD40, wird von denselben Zellen exprimiert. Beide sind in atherosklerotischen Läsionen hochreguliert und liefern einen weiteren Hinweis auf eine Aktivierung des Immunsystems in den Läsionen [Mach et al 1997; Schönbeck et al 1997a]. Desweiteren induziert der CD40 Ligand die Freisetzung von Interleukin-1β

durch Gefäßzellen und verstärkt damit potenziell die Entzündungsantwort [Schönbeck et al 1997b]. Die Inhibition des CD40 durch blockierende Antikörper reduziert die Läsionsformation bei Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen [Mach et al 1998].

Die mögliche Rolle der Leukozyten in der Pathologie der Atherosklerose bei arterieller Hypertonie ist ein Gegenstand von großem wissenschaftlichen Interesse [Shen et al 1995]. Die verfügbaren Informationen zu humanen Monozyten sind infolge der schwierigen Isolation von Monozyten aus dem peripheren Blut gering im Vergleich zu den vorhandenen Informationen über die neutrophilen Granulozyten.

Immunpathogenetische Mechanismen könnten an der Pathogenese der Atherosklerose und des hohen Blutdruckes beteiligt sein. McCarron wies 1994 [McCarron et al 1994] einen signifikanten Anstieg der Monozytenadhäsion an Endothelzellen von spontan hypertonen Ratten (SHR) gegenüber normotonen Wistar-Kyoto Ratten nach. Sie stimulierten die Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS) oder proinflammatorischen Zytokinen (Interferon-γ [IF-γ], Interleukin-1β [IL-1β] oder Tumor Nekrose Faktor-α [TNF-α]).

2 Fragestellung dieser Arbeit

2.1 Wissensstand

Periphere Blutmonozyten spielen eine Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose. Liu et al 1996 beschrieben signifikant erhöhte Zahlen aktivierter Monozyten bei spontan hypertensiven Ratten im Vergleich zu normotonen Wistar-Kyoto-Ratten. Auch das Renin-Angiotensin-System ist an der Entwicklung der Arteriosklerose beteiligt, wie von Okamura et al (1999) beschrieben [Okamura et al 1999]. Strawn et al publizierten, dass die Blockade von Angiotensin II Subtyp1 (AT_1) -Rezeptoren bei hypertensiven Ratten zu einer signifikant verminderten Zahl zirkulierender und endotheladhärenter Monozyten führt [Strawn et al 1999].

Aus unserer Arbeitsgruppe wurde berichtet, dass Monozyten von Patienten mit arterieller Hypertonie nach Stimulation mit Angiotensin II (Ang II) oder Lipopolysacchariden (LPS) signifikant höhere Mengen an proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin-1β (IL-1β) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)) verglichen mit normotonen Personen sezernieren. Eine Hochregulation der IL-1β und TNF-α Expression wurde auch auf RNA-Ebene festgestellt [Dörffel et al 1999]. Unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen verändern Endothelzellen ihre Expression jener Adhäsionsmoleküle, die die Adhäsion der Monozyten an die Intimaoberfläche vermitteln [Swerlick et al 1992].

Die erhöhte Sekretion dieser Zytokine wird als ein Marker für aktivierte zirkulierende Monozyten angesehen [Fiotti et al 1999; Jelinek et al 1987]. Fukai et al (1999) zeigten, dass Angiotensin II und Bluthochdruck mit dem vaskulären Oxidationsstress ansteigen. Dieser kann zur Monozyten-Makrophagen-Infiltration beitragen.

2.2 Hypothese

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Adhäsion von humanen Monozyten aus humanem Venenblut an menschliches Endothel zu charakterisieren. Wir wollten herausfinden, ob das Adhäsionsverhalten der Monozyten bei Hochdruckerkrankung mit der Sauerstoffradikalfreisetzung durch Endothelzellen oder mit den aktivierten Monozyten zusammenhängt. Desweiteren sollte analysiert

werden, ob ein erhöhter Angiotensin-II-Spiegel im menschlichen Blut zirkulierende Monozyten voraktiviert.

Es wird allgemein angenommen, dass mit größter Wahrscheinlichkeit die Sekretion von Endothelzellfaktoren die Monozytenaktivierung verursacht. Unserer Meinung nach könnten die voraktivierten Monozyten in Patienten mit arterieller Hypertonie zu subendothelialer Infiltration führen und in der Folge das Risiko von atherosklerotischen Komplikationen auch im intakten Endothel erhöhen.

2.3 Vorhaben zur Verifikation der Hypothese

Monozyten aus peripherem Blut von Patienten mit essentieller Hypertonie und von gesunden Probanden, bei denen *in vitro* eine erhöhte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden konnte, sollten hinsichtlich weiterer möglicher Unterschiede des Aktivierungszustands analysiert werden. Dazu sollte das Adhäsionsverhalten der Monozyten, an von uns kultivierte humane Aortenendothelzellen (HAEC), an von uns isolierte und kultivierte Saphenavenenendothelzellen (HSVEC), sowie an Umbilikalvenen- (HUVEC) und Umbilikalarterienendothelzellen (HUAEC) untersucht werden.

Außerdem sollten die zirkulierenden Mengen der Adhäsionsmoleküle: Humanes lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und E-Selektin als Marker für den Endothelschaden bestimmt werden.

Desweiteren sollte die spontane Superoxidfreisetzung von humanem Endothel und humanen Monozyten von Patienten mit arterieller Hypertonie und gesunden Kontrollpersonen analysiert werden. Durch das Messen der Chemilumineszenzaktivität nach Stimulation mit Angiotensin II sollte geklärt werden, ob der arterielle Hypertonus und Angiotensin II eine erhöhte Adhärenz von Monozyten an Endothelzellen verursachen.

3 Material und Methoden

Zur Untersuchung der Adhäsion von Monozyten an humane Endothelzellen und zum Studium der Superoxidfreisetzung von Endothelzellen und Monozyten bei Patienten mit arterieller Hypertonie und im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen haben wir Methoden zur -

- Isolation und Stimulation von humanen Monozyten aus dem peripheren Venenblut,
- Isolation humaner Endothelzellen aus Vena saphena, Umbilikalarterien und Umbilikalvenen,
- Kultur humaner Endothelzellen aus Aorta, Vena saphena und Umbilikalarterien und Umbilikalvenen,
- Messung der Adhäsion von Monozyten an humane Endothelzellen aus Aorta, Vena saphena und Umbilikalarterien und -venen,
- Bestimmung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM und E-Selectin
- Bestimmung der Superoxidfreisetzung von humanen Umbilikalvenen-endothelzellen und Monozyten

gesucht und weiterentwickelt. Wir haben Stichproben von Hypertoniepatienten und gesunden Kontrollpersonen zusammengestellt und geeignete Verfahren zur Auswertung der Daten herangezogen.

3.1 Studienteilnehmer/ Stichprobe

Zur Evaluation des Adhäsionsverhaltens humaner Monozyten aus peripherem Blut wurden Versuche an humanen Aortenzellen, selbst isolierten Endothelzellen aus humaner Vena saphena, aus Umbilikalarterie und aus Umbilikalvene durchgeführt. Die Superoxidfreisetzung humaner Monozyten aus dem peripheren Blut wurde durch Messung der Chemilumineszenzaktivität untersucht.

Periphere Blut - Monozyten erhielten wir von 11 weiblichen und 11 männlichen

Patienten im Alter zwischen 18 und 64 Jahren mit essentieller Hypertonie ohne antihypertensive Therapie, oder nach kompletter mindestens zehntägiger Therapiepause. Der Anteil der noch nie behandelten Hypertoniker lag bei 41 %. Alle Patienten unterlagen im Rahmen der klinischen Evaluation einer ambulanten 24-Stundenblutdruckmessung (ABDM). Es nahmen nur Patienten mit diastolischen Blutdruckwerten zwischen 90 und 110 mmHg an der Studie teil. Das mittlere Alter betrug 37 Jahre, der mittlere Blutdruck lag bei 158/95 mmHg. Das mittlere Körpergewicht betrug 73 ± 1,4 kg (SEM) und der mittlere Body Mass Index der Patienten lag bei 24,5 ± 0,51 kg/m^2 (SEM).

Dazu in Alter und Geschlecht passend, suchten wir 12 weibliche und 15 männliche normotone, gesunde Studienteilnehmer im Alter zwischen 19 und 64 Jahren für die Teilnahme an der Studie aus. Das mittlere Alter der Kontrollgruppe lag bei 36 Jahren. Das mittlere Körpergewicht der Kontrollgruppe betrug 71 ± 1,93 kg /SEM) und der mittlere Body Mass Index der Kontrollpersonen lag bei 24,2 ± 0,7 kg/m^2 (SEM).

Tabelle 1: Referenzwerte des Labors der Universitätspoliklinik der Charité

Laborparameter	Einheit	Bereich	Laborparameter	Einheit	Bereich
ALT	U/l	... - 19	**Hsr**	mg/dl	3,00 -
BSG		... - 20	**Hst**	mg/dl	14 - 42
Chol	mg/dl	… - 200	**K**	mmol/l	3,6 - 4,8
CRP	mg/dl	...- 0,8	**Kreatinin**	mg/dl	…- 1,10
Erythrozyten	/pl	4,20 -	**LDL**	mg/dl	…- 180
Glucose	mg/dl	60 - 117	**Prot**	g/dl	6,60 -
Hb	g/dl	12 - 16	**TG**	mg/dl	... - 200
Hk	l/l	0,37 -	**Thrombozyten**	/nl	130 - 340

Ausschlusskriterien von der Studie stellten alle anderen Krankheiten einschließlich sekundärer arterieller Hypertonie dar. Patienten und Kontrollen wurden auch aus der Studie ausgeschlossen, wenn sich bei den Laboruntersuchungen (Tabelle) pathologische Befunde zeigten. Es wurden die Serumkonzentrationen von Kalium (K^+), Kreatinin (Krea), Leberenzymen (AST und ALT), die Erythrozytensedimentationsrate (BSG), C-reaktives Protein

Tabelle 2: Labordaten der Patienten (P) und Kontrollpersonen (C): Hämoglobin [g/dl], Leukozyten [/nl], Thrombozyten [/nl], Kreatinin [mg/dl], Harnsäure [mg/dl], Protein/ Sediment/ Glucose im Urin. Die Abkürzung n. z. bezeichnet “nicht zutreffend“; o.B. – ohne pathologischen Befund.

P/C Code	Hb [g/dl]	Leuko [/nl]	Throm [/nl]	Krea [mg/dl]	Hrs [mg/dl]	Prot, Sed, Glc Urin	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	Glc [mg/dl]	Chol [mg/dl]	LDL [mg/dl]	ESR	CRP [mg/l]	Prot [g/dl]	ALT [U/l]	INR	Hypertonie-dauer
P1	14,6	7,74	267	0,60	5,70	oB	141,7	3,87	90,0	162	91	12/19	0,29	7,54	8	0,93	0,3
P2	14,7	8,49	208	0,99	5,06	oB	144,1	4,01	91,7	187	114	8/19	0,4	7,74	7	1,03	4,0
P3	13,3	8,34	196	0,70	4,10	oB	141,0	3,74	91,0	188	93	7/14	<0,1	7,12	8	1,02	8,0
P4	12,6	4,87	295	0,75	4,37	oB	142,3	4,28	72,0	174	149	9/19	0,21	7,30	11	1,04	15,0
P5	13,8	6,6	165	0,65	4,67	oB	138,9	3,78	78,0	173	143	8/15	0,23	7,48	10	0,98	5,0
P6	13,7	8,2	206	0,67	4,42	oB	139,5	4,43	84,0	182	124	7/14	0,26	7,32	12	1,02	0,8
P7	14,6	8,2	306	0,57	4,80	oB	142,7	3,87	76,0	164	136	8/15	0,20	7,68	8	1,01	0,9
P8	13,0	7,64	168	0,61	5,02	oB	141,8	3,94	78,0	178	129	6/12	0,32	7,23	10	0,99	1,5
P9	14,6	9,70	165	0,72	4,07	oB	143,4	4,37	86,0	172	154	7/15	0,27	7,80	7	1,02	0,0
P10	13	5,90	280	0,73	4,78	oB	141,8	4,29	73,0	164	136	6/12	0,18	7,77	13	1,04	0,2
P11	14,8	8,55	274	0,65	4,83	oB	143,0	4,16	93,0	167	164	9/18	0,25	7,65	7	1,02	12,0
P12	15,7	5,58	193	1,08	5,03	oB	144,0	4,46	102,0	194	115	7/13	0,32	7,96	18	0,98	10,0
P13	13,6	4,82	172	0,81	3,66	oB	141,0	4,03	66,0	187	132	9/22	0,40	7,54	13	1,07	3,5
P14	13,8	6,04	186	0,9	5,53	oB	142,7	4,10	100,3	187	149	12/16	0,19	7,61	11	1,02	5,0
P15	14,4	5,07	247	0,74	5,66	oB	144,0	4,42	111,8	166	162	6/19	<0,1	7,45	17	1,03	0,0
P16	13,8	6,24	230	0,80	4,67	oB	142,2	4,38	87,0	174	154	8/13	0,21	7,76	10	1,02	7,0
P17	13,5	9,41	188	0,76	4,87	oB	143,1	4,35	75,0	168	148	6/14	0,10	7,32	8	0,98	9,0
P18	13,3	7,22	197	0,67	4,36	oB	142,5	4,28	77,0	174	156	7/13	0,28	7,86	8	1,04	1,8
P19	13,9	6,32	263	0,68	4,38	oB	141,8	4,34	87,0	180	139	6/14	0,21	7,21	7	1,02	11,0
P20	13,5	8,58	206	0,76	3,89	oB	141,5	4,28	85,0	182	153	7/15	0,33	7,43	10	1,02	8,0
P21	12,8	6,46	321	0,67	4,45	oB	142,3	4,37	78,0	166	132	8/12	0,20	7,34	9	1,01	0,6
P22	13,4	7,93	222	0,64	4,53	oB	144,2	4,33	76,0	175	147	9/15	0,18	7,45	12	1,05	3,0
C1	13,4	8,00	264	0,63	4,83	oB	144,2	4,40	88,0	172	130	5/12	0,10	7,47	11	0,98	n. z.
C2	13,7	6,30	165	0,67	4,28	oB	140,5	4,29	97,0	182	122	6/14	0,24	7,38	11	1,03	n. z.

P/C Code	Hb [g/dl]	Leuko [/nl]	Throm [/nl]	Krea [mg/dl]	Hrs [mg/dl]	Prot, Sed, Glc Urin	Na [mmol/l]	K [mmol/l]	Glc [mg/dl]	Chol [mg/dl]	LDL [mg/dl]	ESR	CRP [mg/l]	Prot [g/dl]	ALT [U/l]	INR	Hypertonie-dauer
C3	13,8	6,03	180	0,77	4,23	oB	143,6	4,25	77,0	174	134	8/13	0,34	7,42	13	1,01	n. z.
C4	14	8,8	287	0,62	4,77	oB	142,9	4,20	86,0	165	129	7/14	0,29	7,55	8	1,04	n. z.
C5	13,5	5,3	190	0,70	4,32	oB	141,4	4,34	84,0	176	142	6/11	0,17	7,64	15	1,02	n. z.
C6	13,3	6	206	0,64	4,16	oB	140,7	4,47	75,0	180	153	7/15	0,25	7,59	9	1,01	n. z.
C7	14,5	6,5	254	0,71	4,78	oB	141,3	4,40	79,0	173	146	6/13	0,26	7,41	10	1,05	n. z.
C8	15,6	6,6	209	0,80	4,63	oB	143,8	4,22	80,0	167	137	7/13	0,38	7,36	7	1,03	n. z.
C9	14,2	6,37	181	0,88	4,01	oB	142,4	4,13	89,0	148	130	5/14	0,16	7,74	17	1,07	n. z.
C10	13,7	5,2	199	0,77	4,96	oB	143,6	4,42	78,0	170	124	8/14	0,10	7,34	10	1,04	n. z.
C11	14,9	7,1	201	0,64	4,29	oB	142,2	4,38	88,0	171	132	7/12	0,15	7,23	9	1,01	n. z.
C12	14,9	7,8	233	0,65	4,67	oB	140,4	4,12	92,0	173	143	7/13	0,22	8,40	12	1,02	n. z.
C13	14,1	7,84	253	0,65	5,07	oB	141,5	3,87	88,0	187	114	9/18	0,39	7,45	11	1,03	n. z.
C14	13,8	5,2	284	0,62	4,39	oB	141,7	4,32	76,0	172	118	6/12	0,17	7,27	10	1,02	n. z.
C15	13,5	5,8	276	0,67	4,35	oB	140,8	3,87	95,0	179	123	8/15	0,24	7,36	9	1,04	n. z.
C16	14,6	4,9	244	0,68	4,52	oB	142,5	4,45	84,0	167	148	7/14	0,22	7,41	13	1,01	n. z.
C17	14,5	4,9	225	0,78	4,43	oB	143,4	4,24	87,0	194	134	5/12	0,31	7,53	7	1,03	n. z.
C18	13,3	8,7	298	0,65	4,08	oB	138,0	4,40	99,0	193	155	8/18	0,41	7,98	10	0,96	n. z.
C19	14,6	7,19	285	0,92	4,33	oB	140,0	4,22	117,0	182	140	9/16	0,19	7,61	11	1,08	n. z.
C20	13,2	6,74	275	0,64	4,03	oB	143,6	4,15	86,0	166	135	7/13	0,19	7,57	8	1,02	n. z.
C21	14,1	5,69	253	0,70	4,45	oB	142,5	4,43	79,0	168	132	7/12	0,17	7,21	14	1,03	n. z.
C22	13,7	6,54	262	0,72	4,73	oB	142,6	4,22	78,0	152	141	8/14	0,37	7,52	10	1,04	n. z.
C23	13,5	6,36	204	0,65	4,37	oB	141,1	4,43	83,0	163	121	6/13	0,25	7,56	11	1,02	n. z.
C24	14,7	7,56	334	0,84	4,23	oB	141,7	4,16	87,0	175	139	7/14	0,10	7,28	8	1.01	n. z.
C25	14,4	6,45	248	0,63	4,29	oB	142,5	4,08	78,0	168	144	7/12	0,14	7,36	8	0,98	n. z.
C26	13,6	5,78	250	0,62	4,34	oB	143,4	4,36	81,0	156	136	8/13	0,29	7,46	9	1,02	n. z.
C27	14,2	7,14	178	0,64	4,83	oB	142,0	4,18	86,0	174	129	7/14	0,12	7,63	12	1,02	n. z.

(CRP), Leuko-, Thrombo- und Erythrozytenzahlen und LDL-Werte erfasst. Tabakraucher wurden von der Studie ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien stellten pathologisch veränderte Werte der ultrasonographisch gemessenen Intima-Media-Dicke der Arteria carotis, A. femoralis oder Aorta und vorhandene atherosklerotische Läsionen der Gefäße dar.

Tabelle 3: Labordaten der Patienten und gesunden Kontrollpersonen: Mittelwerte ± Standardabweichung (SD)

Parameter	**Patienten**			**Kontrollen**		
	Mittelwert		SD	Mittelwert		SD
Hb [g/dl]	13.84	±	0.77	14.05	±	0.60
Leuko [/nl]	7.18	±	1.46	6.55	±	1.08
Throm [/nl]	225.23	±	48.62	238.44	±	43.21
Krea [mg/dl]	0.73	±	0.12	0.70	±	0.08
Hrs [mg/dl]	4.68	±	0.53	4.46	±	0.29
Prot, Sed, Glc, Urin	nicht zutreffend			nicht zutreffend		
Na [mmol/l]	142.25	±	1.38	142.01	±	1.41
K [mmol/l]	4.19	±	0.23	4.26	±	0.16
Glc [mg/dl]	84.45	±	11.04	85.81	±	8.90
Chol [mg/dl]	175.64	±	9.22	172.11	±	10.71
LDL [mg/dl]	137.27	±	20.06	134.48	±	10.35
ESR	8/ 15	±	2/ 2	7/ 14	±	1/ 2
CRP [mg/l]	0.25	±	0.08	0.23	±	0.09
Prot [g/dl]	7.53	±	0.23	7.51	±	0.24
ALT [U/l]	10.18	±	3.06	10.48	±	2.42
INR	1.02	±	0.03	1.02	±	0.02
Hypertoniedauer (Jahre)	4.80	±	4.50	nicht zutreffend		

Die Patienten wurden über unsere Studien ausführlich im Gespräch informiert und hatten sich mit der Untersuchung einverstanden erklärt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Charité genehmigt und unter Beachtung der Helsinki-Deklaration durchgeführt.

3.2 Hilfsmittel und Chemikalien

Sämtliche Versuche fanden unter sterilen Bedingungen im Labor statt.

Alle Lösungen und Chemikalien, die wir für die Isolations- und Aktivierungsprozeduren benutzt haben, waren endotoxinfrei. Das heißt, der Endotoxingehalt lag <0.01 ng/ml.

3.2.1 Substanzen und Zubehör zur Monozytenisolation und -stimulation sowie Adhäsion an humane Endothelzellen

Substanz/ Hilfsmittel	**Hersteller/ Anbieter**
Angiotensin II Acetate, low endotoxin, 250 mg	Sigma Chemical Co., München, Deutschland/ St. Louis, MI, USA
AT1 Rezeptor-Antagonist Eprosartan	Hoechst Marion Roussel, Bad Soden/ Taunus
Cell Scraper	Falcon, BD Biosciences, Bedford, MA,USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Deutschland
Endotoxinfreies fetales Kälberserum (FCS) mit einem Endotoxingehalt <0.002 ng/ml, Charge 181S	Biochrom KG/ Seromed, Berlin
Liquemin N 25000 (100 U Heparin/ ml)	Roche AG, Grenzach - Wyhlen
Ficoll – Paque mit einer spezifischen Dichte von 1.077	Pharmacia AB, Uppsala, Schweden
Human - Albumin N 20% Bayer, 1%ig	Bayer AG, Pharma Deutschland, Leverkusen
Leukosep-tubes	Greiner GmbH, Frickenhausen
LPS, E. coli Serotype 026:B6	Sigma Chemical Co., München, Deutschland/ St. Louis, MI, USA
PBS (without Ca^{2+} or Mg^{2+}) PBS -	Biochrom KG/ Seromed, Berlin

Substanz/ Hilfsmittel	Hersteller/ Anbieter
Dulbecco	
RPMI 1640 ohne Phenolrot	Sigma Chemical Co., München, Deutschland/ St. Louis, MI, USA
Very Low Endotoxin (VLE) RPMI 1640 Medium mit Phenolrot	Biochrom KG/ Seromed, Berlin

3.2.2 Substanzen und Zubehör, die bei der Isolation und Kultur von Endothelzellen benötigt werden

Humane Aortenendothelzellen bezogen wir von der Firma CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen, Deutschland.

Substanz/ Zubehör	Hersteller/ Anbieter
Collagenase 2	Worthington Biochemical Corporation; Lakewood, New Jersey; USA
Collagenase P	Boehringer Mannheim
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	Promocell, Heidelberg
Endothelial Growth Medium (EGM) 2	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen, Deutschland/ Clonetics/ Bio Whittaker, USA
Factor VIII -related Antigen Staining Kit	Worthington Biochemical Corporation; Lakewood, New Jersey; USA
Fötales Kälberserum, Lot 75H 3391	Sigma Chemical Co., München, Deutschland/ St. Louis, MI, USA
Kanülen - Luer Lock, gerade, Knopfform A, 60 mm lang, Durchmesser 2 mm	Falk Medizintechnik, Berlin
M 199, Medium 199 in Earle´s Balanced Salt Solution (BSS)	Bio - Whittaker, Verviers, Belgium

Substanz/ Zubehör	Hersteller/ Anbieter
Nahtmaterial für Gefäßligaturen: 4 - 0 Prolene	Ethicon, Norderstedt
Natriumchlorid	Merck, Berlin
Schlauchverbinder - Female Luer Lock Connector	Sherwood Medical, Schwalbach/ Tullamore, Irland
Trypsin - EDTA, Solution 10x	Sigma Chemical Co., München, Deutschland/ St. Louis, MI, USA
Universalbinder/ Kabelbinder 98 mm x 2,5 mm	neoLab Laborbedarf, Heidelberg
Zellkulturflaschen T25	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

3.2.3 Substanzen zur Adhäsionsmolekülbestimmung

Substanz/ Zubehör	Hersteller/ Anbieter
human soluble ICAM - 1 Parameterkit	R & D Systems GmbH, Wiesbaden, Minneapolis, MN, USA
soluble E-Selektin Parameterkit	
human sVCAM - 1 Parameterkit	

3.2.4 Substanzen, die zur Bestimmung der Chemilumineszenz – Aktivität von Monozyten und Endothelzellen benötigt werden

Substanz	Hersteller/ Anbieter
AT1 Rezeptor Antagonist Eprosartan	Hoechst Marion Roussel (Bad Soden/ Taunus, Germany)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Boehringer Ingelheim GmbH (Ingelheim, Germany)
Lucigenin: N - Methylacredinium - Nitrate	Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Phorbol-Myristate-Acetate (PMA)	Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Röhrchen zur Chemilumineszenz,	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Substanz	Hersteller/ Anbieter
5 ml, Durchmesser 75 x 12, # 55.476	

3.3 Methoden der Isolation, Prüfung und Stimulation von humanen Monozyten aus dem peripheren Blut

3.3.1 Isolation von Monozyten aus dem peripheren Venenblut

Die Monozyten wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (Megafuge, Heraeus) und Plastikadhärenz isoliert, wie von Rückert – Dörffel et al beschrieben [Rückert-Dörffel et al 1996; Dörffel et al 1999; Dörffel et al 2001]. Peripheres Venenblut wurde mit physiologischer Kochsalzlösung, die 100 U Heparin/ml enthielt, verdünnt. Dann wurde die Lösung über Ficoll-Paque (mit einer spezifischen Dichte von 1.077, hergestellt von Pharmacia AB, Uppsala, Schweden) in spezielle Reagenzgefäße (Falcon, 50 ml) zur Leukozytenabtrennung geschichtet. Die Röhrchen wurden für 30 Minuten bei 400x g zentrifugiert. Die aus der Interphase geernteten Zellen wurden in Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen und in RPMI 1640-Medium (ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 Internationalen Einheiten (IE bzw. U)/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, und 50 µg/ml Gentamycin) resuspendiert. Die Zellen wurden in Petrischalen (Greiner GmbH, Nürtingen) angesiedelt und für eine Stunde bei 37°C mit 5% CO_2 Begasung im Brutschrank inkubiert. Nichtadhärente Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit auf 37°C vorgewärmtem RPMI 1640 von den Petrischalen verworfen. Mehr als 99% der adhärenten Zellen konnten durch das Spülen mit 4°C kaltem RPMI 1640 und durch vorsichtiges mechanisches Schaben abgelöst werden. Die adhärenten Zellen wurden in PBS gewaschen und für experimentelle Vorhaben in RPMI 1640 überführt, das mit 1% humanem Serumalbumin N 20% (Bayer, Leverkusen) ergänzt wurde; die Zellzahl wurde auf 1 x 10^6 Zellen/ ml eingestellt.

Die Vitalität der Monozyten lag bei über 98%, wie durch Trypanblau-Ausschluß-Färbung nach der Isolation bestimmt wurde.

3.3.2 Die Identifikation der humanen Monozyten

Die Identifikation der peripheren Blutmonozyten erfolgte mittels Fluoreszenz - aktiviertem Zellsortierer (FACS). Mittels Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächenantigene wurden die Monozyten isoliert, wie bereits von Dörffel et al beschrieben [Dörffel et al 1999]. Monoklonale, für humane T-Zellen (CD 3; Clone UCHT1, code: F0818), humane B-Zellen (CD19; Clone HD37, code: F0768) und humane Monozyten (CD 14, CloneTÜK4, code: R0864) spezifische Mäuseantikörper wurden von DAKO A/S (Dänemark) bezogen. Eine angemessene Kontrolle durch Antikörper mit irrelevanter Spezifität wurde durchgeführt, um unspezifische Färbungen zu erkennen. Die mit den Antikörpern gefärbten Zellen wurden hinsichtlich ihrer Fluoreszenz mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACScalibur, Becton Dickinson Immunometry Systems, San Jose, CA, USA) untersucht. Die relative Häufigkeit der Zellen, die verschiedenen Zelloberflächenantigene zu exprimieren, wurde nach der Substraktion der Kontrollzellen von den experimentellen Fluoreszenzprofilen am Computer berechnet. Die Zellsuspension enthielt 94% Monozyten.

3.3.3 Stimulation, der aus dem peripheren Venenblut, isolierten humanen Monozyten

Die optimalen Bedingungen und Konzentrationen für die Stimulation der peripheren Blutmonzyten mit Angiotensin II und LPS wurden durch Zeit- und Konzentrationskinetiken bestimmt wie von Dörffel et al beschrieben [Dörffel et al 2001].

Die Monozyten aus dem peripheren Blut wurden bei 37°C und 5% CO_2 über 14 Stunden bei einer Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ ml in RPMI 1640 (ergänzt mit 1% Humanserumalbumin) mit oder ohne LPS (10 ng/ml) inkubiert. Außerdem wurden Monozyten, in einer physiologisch relevanten Konzentration von Angiotensin II (10^{-10} mol/l) [Kahan et al 1997] mit oder ohne Vorinkubation über 30 Minuten mit dem AT1-Rezeptorantagonist Eprosartan (10^{-3} mol/l), in Kultur gegeben.

3.4 Humane Endothelzellen

3.4.1 Kultur von humanen Endothelzellen aus der Aorta (HAEC)

Die Zellen trafen tiefgefroren in Endothelzellwachstumsmedium (EGM 2, CellSystems, St. Katharinen) mit 10 % fetalem Kälberserum bei uns ein. Die Zellen wurden aufgetaut und in T25 - Kulturflaschen ausgesät, - 2500 Zellen/cm^2 - bei 37°C und bei 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag mit EGM 2 gefüttert. 48 Stunden vor dem Adhäsionsversuch wurden die Zellen bei 90 % Konfluenz durch Trypsinieren subkultiviert. 10 000 bis 50 000 Zellen wurden in einem halben ml EGM 2 resuspendiert und in 24-Loch-Platten überführt.

3.4.2 Humane Vena saphena Endothelzellen (HSVEC)

Zur Entwicklung einer Methode zur Isolierung humaner Endothelzellen aus der Vena saphena haben wir das Protokoll von Jaffe et al zur Isolierung von Endothelzellen aus Umbilikalvenen abgewandelt [Jaffe et al 1973].

Die Endothelzellen aus der Vena saphena wurden durch Kollagenase-verdauung der inneren Gefäßwand gewonnen und in einem Medium (ECGM, Promocell, Heidelberg, Deutschland) mit niedrigem Serumanteil (2% FCS) unter endotoxinfreien Bedingungen gezüchtet.

Die Saphenavenen wurden intraoperativ unmittelbar nach erfolgter Saphenektomie in sterile Behälter mit einer Pufferlösung, die sich aus 0,14 mol/l NaCl, 0,004 mol/l KCl, 0,001 mol/l HEPES Puffer (pH von 7,4) und 0,011 mol/l Glucose zusammensetzte, überführt und bei 4°C bis zur Verarbeitung innerhalb von 24 Stunden gelagert. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden die sichtbaren Gefäßabzweigungen der Vene mit chirurgischem Nahtmaterial ligiert. Die Vena saphena wurde dann mit female Luer Lock Konnektoren (Firma Sherwood Medical, Tullamore, Irland) bei einem Gefäßdurchmesser > 5mm, mit Knopfkanülen (Firma Falk Medizintechnik Berlin) bei einem Gefäßdurchmesser > 3 mm oder mit von uns stumpf geschliffenen Sterican Kanülen (B/Braun, Melsungen) bei einem noch kleineren Gefäßdurchmesser kanüliert. Die Kanülen wurden mittels steriler Nylonfäden fixiert. Nacheinander wurde mit einer 10 ml Spritze (B/Braun, Melsungen) je eine Kanüle geblockt. Durch die

nicht geblockte Kanüle am anderen Gefäßende wurde das Gefäß mit der Pufferlösung gespült. Die nun durch austretenden Puffer sich bemerkbar machenden weiteren Gefäßabgänge der Vena Saphena wurden mit chirurgischem Nahtmaterial (4-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) ligiert. Nachdem das Gefäß mit insgesamt 100 ml Pufferlösung gespült worden war, wurde auf eine der beiden Kanülen ein 4 cm langer Silikonschlauch (Durchmesser von 0,8 cm) aufgesetzt und befestigt. 10 ml 0,2% Kollagenase (Collagenase 2, Worthington, CellSystems Biotechnologie Vertriebs GmbH) in Pufferlösung wurde mit einer Spritze in die Vene injiziert. Der Silikonschlauch wurde an einem Ende mit einer Klemme verschlossen, während die Spritze am anderen Ende im Konnektor fixiert war. Die Kollagenase - Verdauung fand während einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2, statt. Dann wurde die Einwirkung des Enzyms durch Spülen der Vene mit 50 ml Pufferlösung beendet und die gesamte Lösung mit den Endothelzellen in ein steriles 50 ml Röhrchen (Falcon®) überführt, das 10 ml des Mediums 199 (M-199, Bio Whittaker, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg) mit 20% FCS (fötales Kälberserum) enthielt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert, in ECGM (Promocell, Heidelberg) resuspendiert und schließlich in 24-Lochplatten der Firma Nunc (Roskilde, Dänemark) mit einer Konzentration von 10000 - 50000 Zellen pro 0,5 ml ECGM pro Vertiefung der Lochplatte ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 dampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch Austauschen des verbrauchten Wachstumsmediums alle zwei bis drei Tage gefüttert. Die humanen Saphenavenenendothelzellen wurden etwa 48 Stunden vor dem geplanten Monozytenadhäsionsversuch durch Trypsinieren subkultiviert. Damit wurde sicher gestellt, dass nur frische Zellen benutzt wurden.

3.4.3 Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus Umbilikalarterien (HUAEC)

Zur Isolation der Endothelzellen aus humanen Umbilikalarterien kam das Protokoll von Jaffe et al mit leichten Abwandlungen, wie von Dörffel et al 2001 in der Zeitschrift „Atherosclerosis“ beschrieben, zur Anwendung [Jaffe et al 1973]. Zur Kanülierung der Arterie wurden von uns stumpf geschliffene Kanülen

der Firma B/Braun (Melsungen) verwendet. Die Zellen wurden in serumarmem Medium (ECGM, Promocell, Heidelberg) endotoxinfrei gezüchtet.

3.4.4 Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC)

Die Isolation und Kultur der humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen richtete sich nach dem Protokoll von Dörffel et al basierend auf der Anleitung von Jaffe et al [Dörffel et al 2001; Jaffe et al 1973].

Die Endothelzellen wurden durch Kollagenaseverdauung aus dem Inneren der Vene herausgelöst. 10 ml 0,2% Kollagenase (Collagenase P, Boehriner Mannheim GmbH) kamen zur Anwendung. Die Kollagenase - Verdauung fand während einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur statt. Mit 30 ml Pufferlösung wurde die Enzymwirkung nach abgelaufener Zeit gestoppt.

Die Zellen wurden in serumarmem Medium (ECGM, Promocell, Heidelberg) endotoxinfrei gezüchtet.

3.4.5 Identifikation der Endothelzellen

Die HAEC wurden immunhistochemisch mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung auf von-Willebrandt-Faktor identifiziert. Dazu wurde Anti-Human - vWF-FITC Conjugate (Factor VIII-related Antigenfärbekit von Worthington Biochemical Corporation; Lakewood, New Jersey; USA) verwandt. Methanolfixierte mikrovaskuläre Endothelzellen und Fibroblasten dienten als positive bzw. negative Kontrollen. Die Prüfung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Diaphot, Nikon, Japan) zeigte eine Färbung der Zellmatrix aller Zellen sowohl bei mikrovaskulären Endothelzellen als auch bei den getesteten humanen Aortenendothelzellen, Endothelzellen der Vena saphena, sowie der Umbilikalarterien und -venen. Die Fibroblasten blieben hingegen ungefärbt.

3.5 Durchführung der Monozyten-Adhäsions-Versuche

3.5.1 Modifizierte Methode nach Hahn et al 1994 - mikroskopische Auszählung der Monozyten

Die Monozytenadhäsion an Endothelzellen wurde wie von Hahn et al beschrieben mit kleineren Änderungen durchgeführt [Hahn et al 1994]. Konfluente HAEC Monolayer wurden mindestens 2 Stunden vor Versuchsbeginn in serumfreies Medium überführt. Dazu wurde das Wachstumsmedium ECGM mit niedrigem Serumgehalt durch RPMI 1640 mit 1% Humanserumalbumin ergänzt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Monozyten einmal mit RPMI 1640 (inklusive 1% HSA) gewaschen, unter dem Mikroskop gezählt, resuspendiert und anschließend jeweils 1 x 10^6 Zellen in ein Loch einer 24-Lochplatte auf die konfluenten Endothelzellen gesät. Die nicht adhärenten Monozyten wurden 2 Stunden später eingesammelt und unter einem Mikroskop mit Phasenkontrast (inverses Labormikroskop Leica DM IL HC, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) gezählt. Die Monozytenadhäsion wird als Prozent der initial gesäten Zellen angegeben.

3.5.2 Modifizierte Methode nach McCarron et al 1994 - Zählung radioaktiv markierter Monozyten

Die obige Methode wurde in unserer Arbeitsgruppe durch einen zweiten Adhäsionsversuch überprüft, der wie von McCarron et al beschrieben mit kleineren Abweichungen durchgeführt wurde [McCarron et al 1994]. Die Monozyten habe ich bereit gestellt, die Messungen mit dem radioaktiven Material wurden durch unsere Arbeitsgruppe in einem Speziallabor vorgenommen.

Um die Zellen radioaktiv zu markieren, wurden 100 µCi Sodiumchromat (^{51}Cr)/ml (Nycomed, Amersham, Großbritannien) zugegeben. Die Monozyten wurden über eine Stunde bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und zweimal mit warmem HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, der Firma Sigma Aldrich gewaschen, das 4% fötales Kälberserum (FCS) enthielt. Die Monozyten (10^5/ml) wurden in die Vertiefungen der Platte gegeben und die Platten bei 37°C und 5% CO_2 für eine

Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurden die nichtadhärenten Zellen aspiriert. Das einschichtige Endothel (Monolayer) wurde vorsichtig zwei Mal mit warmem M-199 gewaschen. Die adhärenten Zellen wurden durch die Inkubation mit 2% (vol/vol) Triton-X (0,2 ml/ Vertiefung) über eine Nacht lysiert. Die Radioaktivität in allen Fraktionen wurde mit einem Packard Gamma-5650 Counter gemessen. Die prozentuale Adhäsion wurde ermittelt aus dem Quotienten des Betrags der Radioaktivität, der mit den adhärenten Zellen pro Minute assoziiert ist und der Gesamtzahl der Zerfälle („Counts“), die im Zusammenhang mit den Monozyten pro Minute stehen.

3.6 Bestimmung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, sVCAM-1 und sE-Selectin

Es wurden Blutproben zur Bestimmung der zirkulierenden Menge an löslichem humanem ICAM 1 (löslichem Interzellulärem Adhäsionsmolekül-1), löslichem humanem VCAM-1 (Gefäßzell-Adhäsionsmolekül-1) und löslichem humanem E-Selectin (Endothel - Leukozyten-Adhäsionsmolekül-1) gesammelt. Die Seren wurden jeweils doppelt mit dem kommerziellen, auf monoklonalen Antikörpern basierenden ELISA von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) analysiert. Wir benutzten Parameterkits für sICAM-1, sVCAM-1 und sE-Selektin.

Die Serumproben wurden mit einer Verdünnungslösung durchmischt: Es wurden 15 µl Serumprobe mit 285 µl Verdünnungslösung im Ansatz zur Bestimmung von ICAM-1 ergänzt, sowie 10 µl Probe mit 490 µl (20fach) Verdünnungslösung zur Bestimmung von VCAM-1 (50fach) und 25µl Probe mit 475 µl (20fach) Verdünnungslösung zur Bestimmung von E-Selektin verwendet. Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur (20° C) erwärmt. 100 µl verdünntes Konjugat wurden in jede Vertiefung einer Microlochplatte gegeben. Damit wurden 100 µl Standard, Kontrolle oder Probe durchmischt. Die Platte wurde abgedeckt und mit einem Plattensiegel 90 Minuten zur Inkubation stehen gelassen. Anschließend wurde der Inhalt jeder Vertiefung aspiriert und die Platte insgesamt sechsmal gewaschen und dekantiert. Dazu wurde jede Vertiefung der Platte mittels einer Multikanalpipette mit 300 µl Waschpuffer gefüllt und anschließend die Flüssigkeit vollständig entfernt. Nach dem letzten Waschdurchgang wurde die Platte mit den Öffnungen der Vertiefungen nach

unten gerichtet auf einem Papierhandtuch ausgeklopft. Sofort wurden 100 µl Substrat (vor Licht geschützt) in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde mit der Plattenversiegelungsfolie verschlossen und für 30 Minuten (ICAM-1 und E-Selektin) beziehungsweise 20 Minuten (VCAM-1) ruhen gelassen. In der gleichen Reihenfolge wie das Substrat wurden nun 100 µl Stoplösung in jede Vertiefung gegeben. Die optische Dichte jeder Vertiefung wurde nun innerhalb von 30 Minuten mittels eines ELISA Readers bestimmt und die Konzentration in ng/ml ermittelt. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient für sICAM-1 und sE-Selectin betrug 4,8%, und für sVCAM-1 5,9%.

3.7 Chemilumineszenz-Versuch und Zellstimulantien

Chemilumineszenz Aktivität ist ein Maß der Superoxidproduktion. Als Chemilumineszenz bezeichnet man von Zellen produziertes Licht chemischen Ursprungs. Es ist eine Funktion der Sauerstoff-Aktivität von Monozyten. [phagocytic oxygenating activity]. Die von Phagozyten freigesetzten Sauerstoffradikale sind hochaktiv und reagieren mit empfänglichen biologischen oder organischen Substraten zur Formierung erregter Komponenten. Diese Komponenten fallen in ihren Grundzustand zurück. Dabei werden Photonen emittiert. Diese Energiefreisetzung erfolgt in der Form von Licht, das durch Lucigenin (N, N'-Dimethyl-9,9'-biacridinium Nitrate) verstärkt wird und in einem Luminometer gemessen werden kann. Chemilumineszenz - Bestimmung ist eine gut etablierte Methode zur Überwachung der Sauerstoffradikalfreisetzung [Kricka 1993; Kitahora et al 1988; Pueyo et al 1998; Laursen et al 1997; Pagano et al 1998].

Für HAEC und Monozyten wurde die Sauerstoffradikalfreisetzung mittels Chemilumineszenz ermittelt.

3.7.1 Chemilumineszenz der Endothelzellen

Konfluente Humane Aortenendothelzellen in 20 cm^2 Petri - Schalen wurden dreimal mit einem modifizierten Krebspuffer gewaschen [Pueyo et al 1998]. Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen von humanen Aortenendothelzellen (HAEC) wurde als Antwort auf Stimulation mit Angiotensin II (10^{-10} mol/l) gemessen. Bei dem Versuch mit Eprosartan wurde diese Substanz (10^{-3} mol/l)

30 Minuten vor dem Experiment hinzugefügt. HAEC (10^5 Zellen) wurden dann abgeschabt und in einem Luminometerröhrchen plaziert. Als chemiluminogenes Substrat wurden 10 ml Lucigenin (2.5×10^{-4} mol/l) hinzugefügt und das Endvolumen auf 1 ml eingestellt. Nach Inkubation über 5 Minuten bei 37°C wurde das Teströhrchen im Chemilumineszenz-Analysator plaziert (Biolumat, LB 9501, Berthold, Deutschland). Messungen wurden alle 30 Sekunden über 2 Stunden bis zu 72 Stunden durchgeführt. Als Differenz zwischen stimulierten und unstimulierten CL - Signalen wurde der Spitzenwert ermittelt, gemessen zum Zeitpunk, an dem das Spitzensignal erreicht wurde. Jede Messung wurde zweimal vorgenommen und der Durchschnitt zweier CL-Signale wurde für die statistische Auswertung verwendet.

3.7.2 Chemilumineszenz von Monozyten

Die Monozyten wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation und Plastikanheftung isoliert, wie von Rückert – Dörffel et al und in Abschnitt 3.1 bereits beschrieben [Rückert-Dörffel et al 1996; Dörffel et al 1999; Dörffel et al 2001]. Die Vitalität der Monozyten lag bei über 98%, wie durch Trypan-Blau-Ausschluß-Färbung nach der Isolation bestimmt wurde. Identifiziert wurden die Monozyten mittels Immunfluoreszenz - Färbung auf Antigene der Zelloberfläche, wie bereits beschrieben wurde [Dörffel et al 2001]. Die Zellsuspension im RPMI 1640 Medium enthielt zu 94% Monozyten.

Die Monozyten wurden in RPMI 1640 (bei 10^6 Zellen/ml) resuspendiert und in ein Eisbad gestellt.

Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen wurde mit PMA induziert. PMA (in einer Konzentration von 8×10^{-5} mol/l) wurde in DMSO aufgelöst und bei -70°C aufbewahrt. Teile der Probe (jeweils 10^5 Monozyten) wurden mit Angiotensin II (10^{-6} mol/l), oder Angiotensin II nach Vorinkubation mit einem AT - 1 Rezeptor - Antagonisten (10^{-3} mol/l), oder LPS (10 ng/ml) und PMA vorinkubiert bzw. ohne Stimulans belassen.

Als chemiluminogenes Substrat wurden 10 ml Lucigenin (2.5×10^{-4} mol/l) hinzugefügt und das Endvolumen von 1 ml eingestellt. Nach Inkubation über 5 Minuten bei 37°C wurde das Teströhrchen im Chemilumineszenz Analysator

Biolumat (hergestellt von Berthold, Deutschland) plaziert. Messungen wurden alle 30 Sekunden über 2 Stunden bis zu 24 Stunden durchgeführt. Als Differenz zwischen stimulierten und unstimulierten CL-Signalen wurde der Spitzenwert ermittelt, gemessen zum Zeitpunkt, an dem das Spitzensignal erreicht wurde. Eine kinetische Studie der PMA-induzierten Monozytenantworten wurde durchgeführt. Jede Messung wurde zweimal vorgenommen und der Durchschnitt zweier Chemilumineszenzsignale wurde für die statistische Auswertung verwendet.

3.8 Methoden der Datenanalyse

Die Ergebnisse werden, falls nicht anders notiert, als Mediane ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Signifikanz der Differenzen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test für nichtnormalverteilte Stichproben getestet. Die Differenzen innerhalb der Gruppen wurden mit den Tests nach Friedman und Wilcoxon evaluiert und eine Alpha-Bonferoni-Abgleichung vorgenommen. Ein P Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

Aufgrund der Größe der Stichproben kann von Nichtnormalverteilung der Stichprobe ausgegangen werden. Die Verteilung der Stichprobe wurde auch mit dem Nichtnormalverteilungstest nach Kolmogorov-Smirnov evaluiert.

Die Korrelation wurde nach Spearman (RS) und Pearson (R) bestimmt.

Die gesamte Statistik wurde mit dem Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 9.0 1999 (Chicago, USA) berechnet. Die deskriptive Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch Boxplots und Säulendiagramme. Der im Inneren des Blocks gelegene schwarze Balken zeigt den Median an. 50% aller Werte einer Gruppe liegen innerhalb des Blocks (25. bis 75. Perzentile), die restlichen sind durch Antennen gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Adhäsionsversuche mit humanen Monozyten aus dem peripheren Venenblut an humane Endothelzellen

Die Aktivierung der peripheren Blutmonozyten wurde durch die Messung ihrer Adhäsion an humanes einschichtiges Endothel bewertet und als Prozentzahl der initial ausgesäten Zellen angegeben.

4.1.1 Ergebnisse der Adhäsion von Monozyten an humane Aortenendothelzellen (HAEC)

Wir haben die Adhäsion von humanen Monozyten aus dem peripheren Blut an eine Schicht humaner Aortenendothelzellen *in vitro* bestimmt (Abbildung 1).

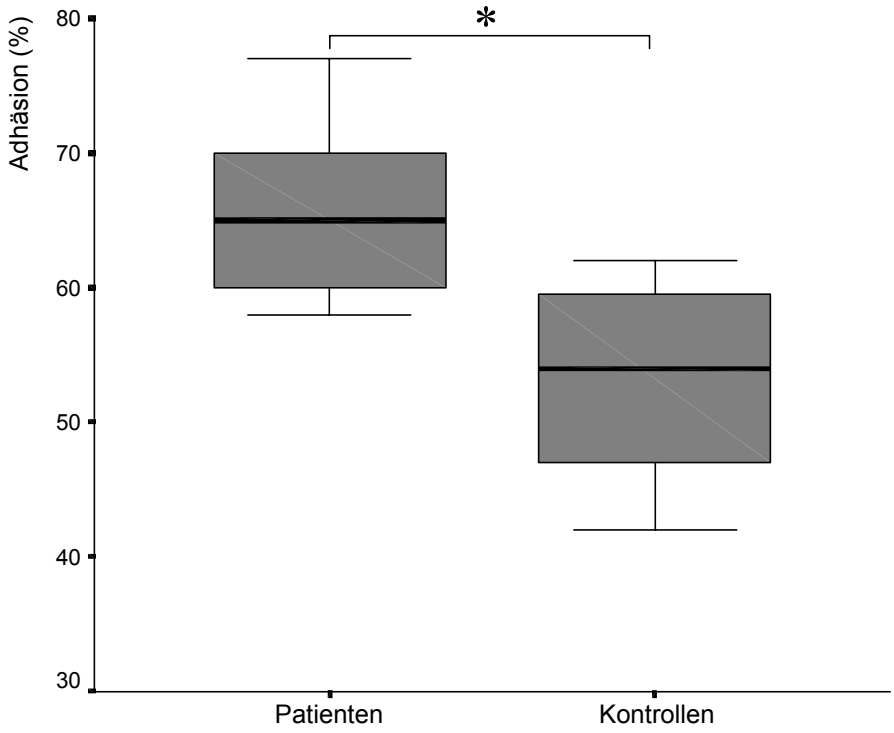

Abbildung 1: Spontanadhäsion humaner Monozyten an humane Aortenendothelzellen

Die Spontanadhäsion von Monozyten von Patienten mit arterieller Hypertonie an humane Aortenendothelzellen (HAEC) war signifikant (*) erhöht im Vergleich mit normotonen Individuen (* P = 0,001). Darstellung von Kontrollen (n = 11) und Patienten (n = 10) nebeneinander. Die Balken repräsentieren den Median.

Die Spontanadhäsion unstimulierter Monozyten von Patienten mit essentieller

Hypertonie an humane Aortenendothelzellen war signifikant erhöht im Vergleich mit normotensiven Kontrollen (Patienten – 65 ± 6,52, Kontrollen - 54 ± 7,45, % ± SD, P = 0,001), (Abbildung 1 auf der vorangehenden Seite).

Die Adhäsion von Monozyten, die mit Angiotensin II stimuliert wurden, war signifikant höher bei Hypertonikern im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollpersonen (Patienten – 69 ± 5,67, Kontrollen – 60 ± 4,43, % ± SD, P < 0,001). In der Patienten- und Kontrollgruppe unterschied sich die Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II signifikant von der Spontanadhäsion (Patienten: Spontanadhäsion - 65 ± 6,52, Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II - 69 ± 5,67; Kontrollen: Spontanadhäsion - 54 ± 7,45, Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II - 60 ± 4,43, % ± SD, P = 0,005), (Abbildung 2)

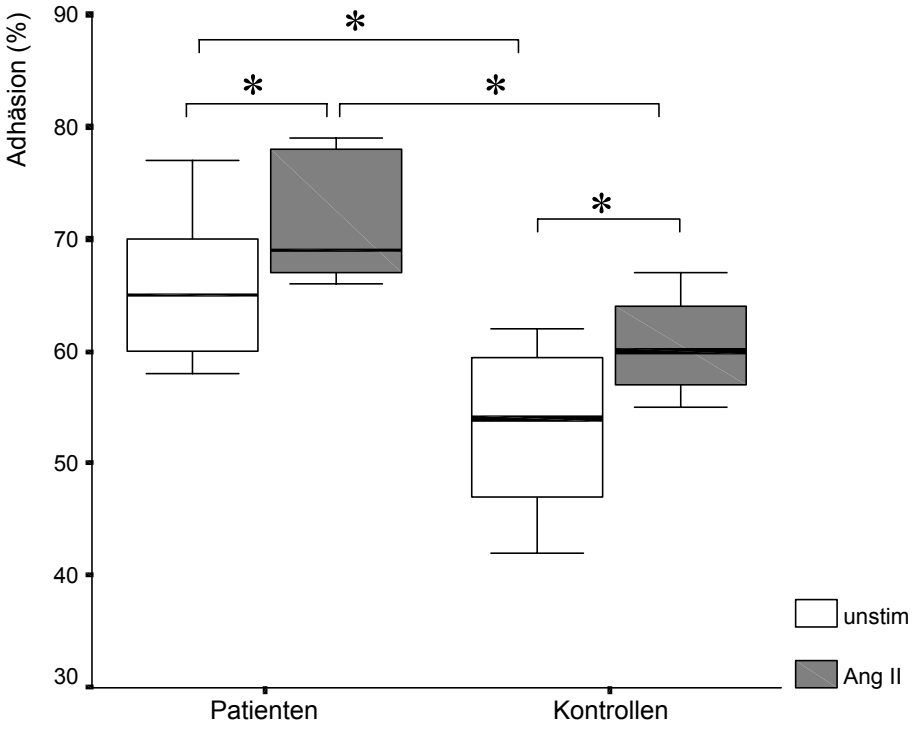

Abbildung 2: Adhäsion an HAEC: unstimuliert und nach Stimulation mit LPS

Die Adhäsion von Monozyten an humane Aortenendothelzellen (HAEC) unterschied sich in Patienten- (n = 10) und Kontrollgruppe (n = 11) nach Inkubation mit Angiotensin II (ng II) signifikant (*) von der Spontanadhäsion (unstim). Es fand sich eine signifikant (*) höhere Adhäsion bei Hochdruckpatienten im Vergleich zu Gesunden.

Vorinkubation mit dem Angiotensin II Typ I Rezeptor - Antagonisten Eprosartan mit anschließender Angiotensin II Exposition verminderte die Adhäsion der Monozyten in beiden Gruppen auf ein vergleichbares Niveau ohne statistischen Unterschied (Patienten – 62,5 ± 6,77, Kontrollen – 51 ± 12,36, % ± SD, P > 0,05), (Abbildung 3).

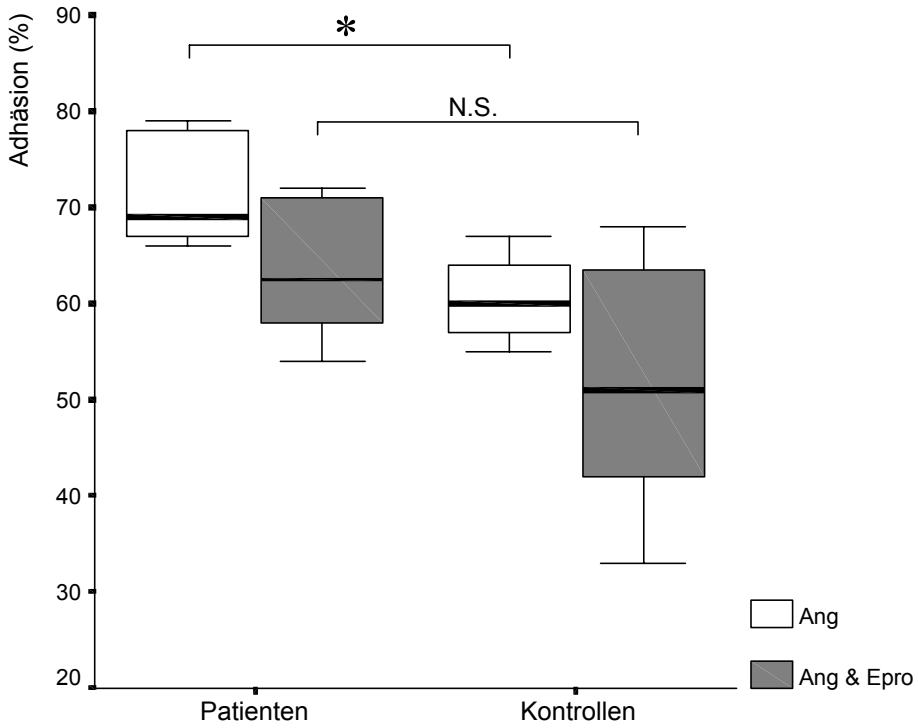

Abbildung 3: Adhäsion an HAEC nach Stimulation mit Angiotensin II und Stimulation mit Angiotensin II nach Vorinkubation mit Eprosartan

Effekt von Angiotensin II bei der Spontanadhäsion von Monozyten von Patienten mit arterieller Hypertonie (n = 10) und gesunden Kontrollpersonen (n = 11) an humane Aortenendothelzell - Monolayer. Die Monozyten wurden 24 Stunden in Anwesenheit (Ang & Epro) oder Abwesenheit (Ang) von Eprosartan (10^{-3} mol/l) für 30 Minuten inkubiert. Die Adhäsion von durch Angiotensin II (Ang) stimulierten Monozyten unterschied sich signifikant (*) zwischen Patienten und Kontrollen, wohingegen kein signifikanter Unterschied (N.S.) nach Präinkubation mit Eprosartan (Ang & Epro) nachgewiesen wurde.

Sowohl bei Hochdruckpatienten als auch bei Normalkontrollen war die Adhäsion von Monozyten nach Stimulation mit LPS signifikant erhöht im Vergleich zur Spontanadhäsion (Patienten: Spontanadhäsion 65 ± 6,52, Adhäsion nach Stimulation mit LPS 69,5 ± 7,67, % ± SD, P = 0,015; Kontrollen:

Spontanadhäsion 54 ± 7,45, Adhäsion nach Stimulation mit LPS 64 ± 8,5, % ± SD, P = 0,01). Die Adhäsion der Monozyten nach LPS Stimulation hat sich zwischen Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterschieden (Patienten - 69,5 ± 7,67, Kontrollen 64 ± 8,5, % ± SD, P = 0,132), (Abbildung 4).

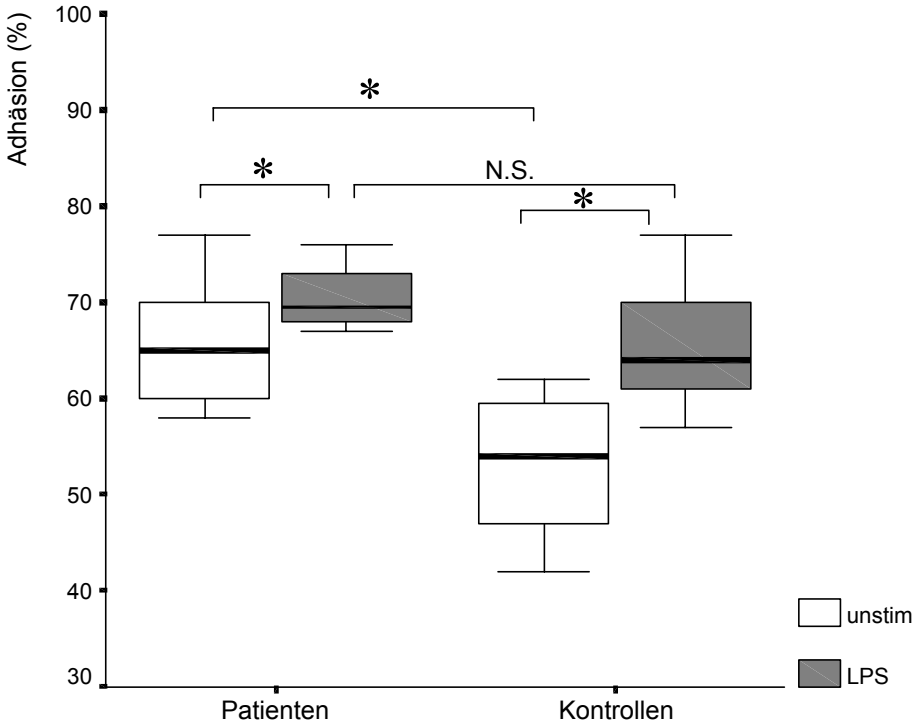

Abbildung 4: Adhäsion von Monozyten von Hypertonikern an humane Aortenendothelzellen (HAEC) spontan (unstim) und nach Stimulation mit LPS im Vergleich

4.1.1.1 Korrelationsanalyse der Adhäsion von Monozyten an humane Aortenendothelzellen

Wir wollten einschätzen, ob Alter, Geschlecht oder Blutdruck der Studienteilnehmer, die bei der Adhäsion von Monozyten aus dem peripheren Blut an HAEC bestimmten Werte, beeinflussen. Dazu korrelierten wir Alter, Geschlecht, systolischen und diastolischen Blutdruck mit der Adhäsion von unstimulierten Monozyten der Hochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen.

Es fand sich keine statistisch signifikante Beziehung zwischen der gemessenen Adhäsion unstimulierter Monozyten an einschichtiges humanes Aortenendothel und dem Alter (nach Pearson r = 0,25, P = 0,26 (nicht signifikant); nach

Spearman rs = 0,21, P = 0,35 (nicht signifikant), Abbildung 5) und dem Geschlecht (P = 0,54). Hingegen zeigte sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen der gemessenen Adhäsion und dem systolischen (nach Pearson p = 0,42, P = 0,055; nach Spearman rs = 0,389, P = 0,082) und diastolischen Blutdruck (nach Pearson r = 0,41, P = 0,059; nach Spearman rs = 0,072, P = 0,072), (Abbildung 5).

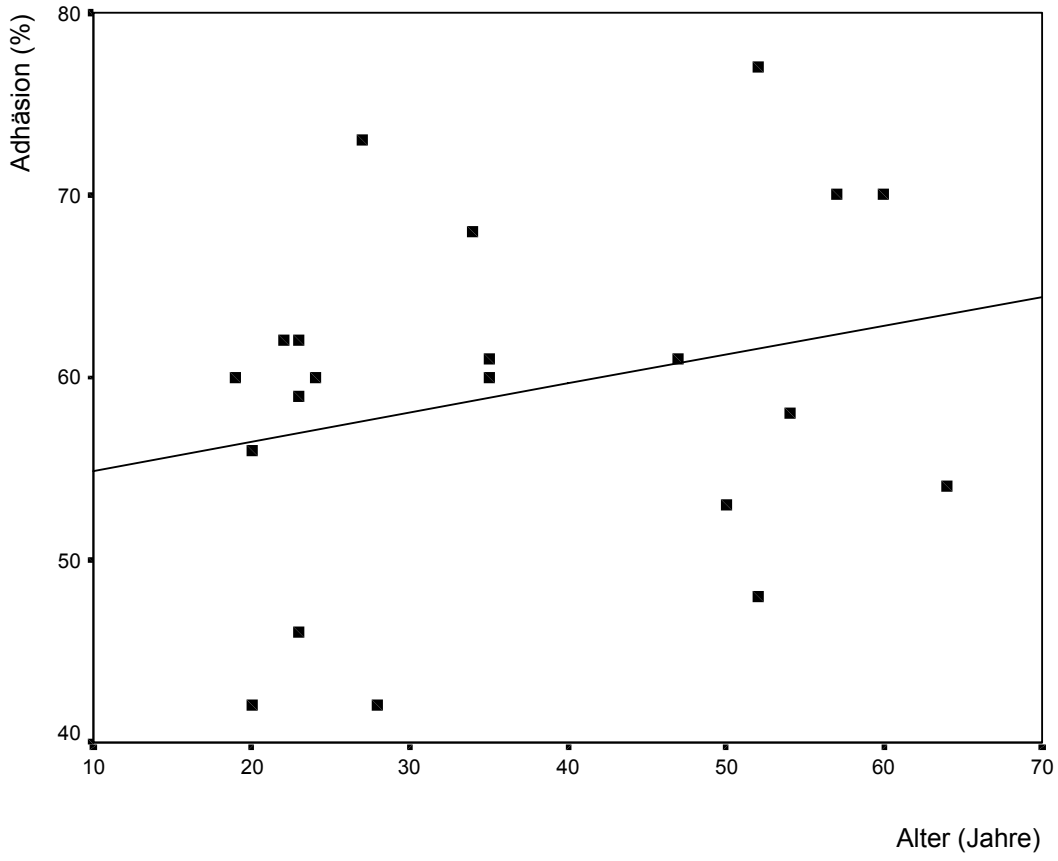

Abbildung 5: Adhäsion an HAEC: Korrelation zwischen Alter und Spontanadhäsion

Korrelation zwischen Alter und Spontanadhäsion von Monozyten von Hochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen an einschichtiges Aortenendothel (nach Pearson r = 0,25, P = 0,26 (nicht signifikant); nach Spearman rs = 0,21, P = 0,35 (nicht signifikant)).

4.1.2 Ergebnisse der Adhäsion von Monozyten an humane Saphenavenen-endothelzellen (HSVEC)

Wir haben die Adhäsion von Monozyten aus dem peripheren Blut an eine Schicht humaner Endothelzellen aus der Vena saphena *in vitro* bestimmt.

Die Spontanadhäsion unstimulierter Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie an humane Saphenavenenendothelzellen (HSVEC) war tendenziell erhöht im Vergleich mit normotensiven Kontrollen (Patienten – 73,5 ± 2,12, Kontrollen - 53 ± 8,48, % ± SD, P = 0,12), (Abbildung 6).

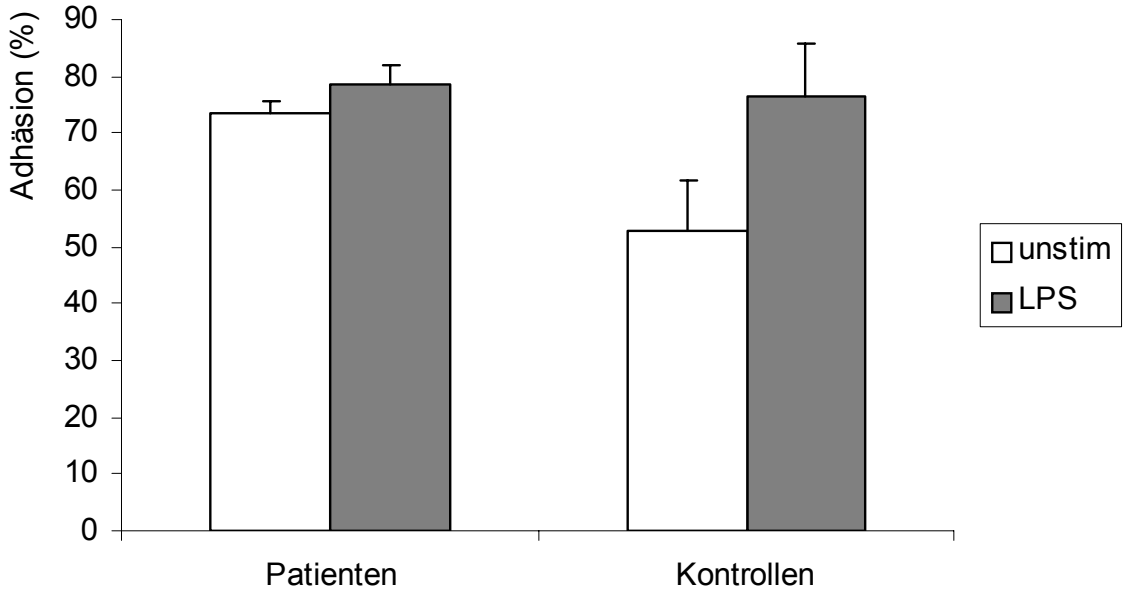

Abbildung 6: Adhäsion von humanen Monozyten an HSVEC unstimuliert und nach Stimulation mit LPS

Adhäsion von Monozyten von Hypertonikern und Kontrollpersonen an humane Saphenavenen-endothelzellen (HSVEC) spontan (unstim) und nach Stimulation mit LPS im Vergleich.

Sowohl bei Hochdruckpatienten als auch bei Normalkontrollen war die Adhäsion von Monozyten nach Stimulation mit LPS tendenziell erhöht im Vergleich zur Spontanadhäsion (Patienten: Spontanadhäsion 73,5 ± 2,12, Adhäsion nach Stimulation mit LPS 78,5 ± 3,53, % ± SD, P = 0,18; Kontrollen: Spontanadhäsion 53 ± 8,48, Adhäsion nach Stimulation mit LPS 76,5 ± 9,19, % ± SD, P = 0,18). Die Adhäsion der Monozyten nach LPS Stimulation hat sich zwischen Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterschieden (Patienten 69,5 ± 7,67, Kontrollen 64 ± 8,5, % ± SD, P = 0,18), (Abbildung 6).

Die Adhäsion von Monozyten, die mit Angiotensin II stimuliert wurden, war tendenziell, aber nicht statistisch signifikant, höher bei Hypertonikern im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollpersonen (Patienten – 80,5 ± 3,53, Kontrollen – 49,5 ± 9,19, % ± SD, P = 0,12). In beiden Gruppen unterschied

sich die Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II tendenziell von der Spontanadhäsion (Patienten: Spontanadhäsion - 73,5 ± 2,12, Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II - 80,5 ± 3,53; Kontrollen: Spontanadhäsion - 53 ± 8,48, Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II - 49,5 ± 9,19, % ± SD, P = 0,18), (Abbildung 7).

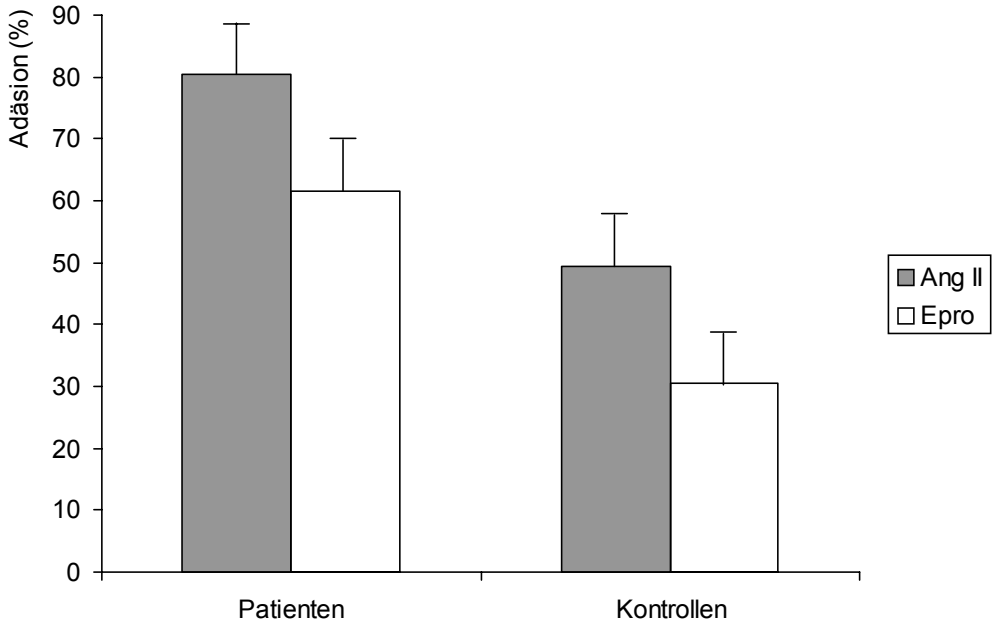

Abbildung 7: Adhäsion von Monozyten an HSVEC nach Stimulation mit Angiotensin II oder Vorinkubation mit Eprosartan und anschließender Angiotensinexposition

Die Adhäsion von Monozyten an humane Saphenavenenendothelzellen (HSVEC) von Kontrollpersonen und Patienten nach Stimulation mit Angiotensin II (Ang II) oder nach Vorinkubation mit dem AT_1 – Rezeptorantagonist Eprosartan (Epro) und anschließender Stimulation mit Angiotensin II.

Vorinkubation mit dem Angiotensin II Typ I Rezeptor - Antagonisten Eprosartan, mit anschließender Angiotensin II Exposition, verminderte die Adhäsion der Monozyten in beiden Gruppen statistisch nicht signifikant. Die Adhäsion unterschied sich ebenfalls nicht statistisch signifikant zwischen Patienten- und Kontrollgruppe (Patienten – 61,5 ± 6,36, Kontrollen – 30,5 ± 3,53, % ± SD, P > 0,18), (Abbildung 7).

4.1.3 Ergebnisse der Adhäsion von Monozyten an humane Umbilikalvenen-endothelzellen (HUVEC)

Die Bestimmung der Adhäsion von Monozyten aus dem peripheren Blut an eine Schicht humaner Endothelzellen aus Umbilikalarterie und Umbilikalvenen *in vitro* führte zu den im folgenden Text beschriebenen Ergebnissen.

Die Spontanadhäsion unstimulierter Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie an HUVEC war statistisch signifikant erhöht im Vergleich mit normotensiven Kontrollen (Patienten – 81,0 ± 5,19, Kontrollen - 36 ± 11,3 % ± SD, P = 0,021), (Abbildung 8).

Die Adhäsion der Monozyten nach LPS Stimulation hat sich zwischen Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterschieden (Patienten 77,0 ± 10,01, Kontrollen 59,0 ± 13,16, % ± SD, P = 0,2), (Abbildung 8).

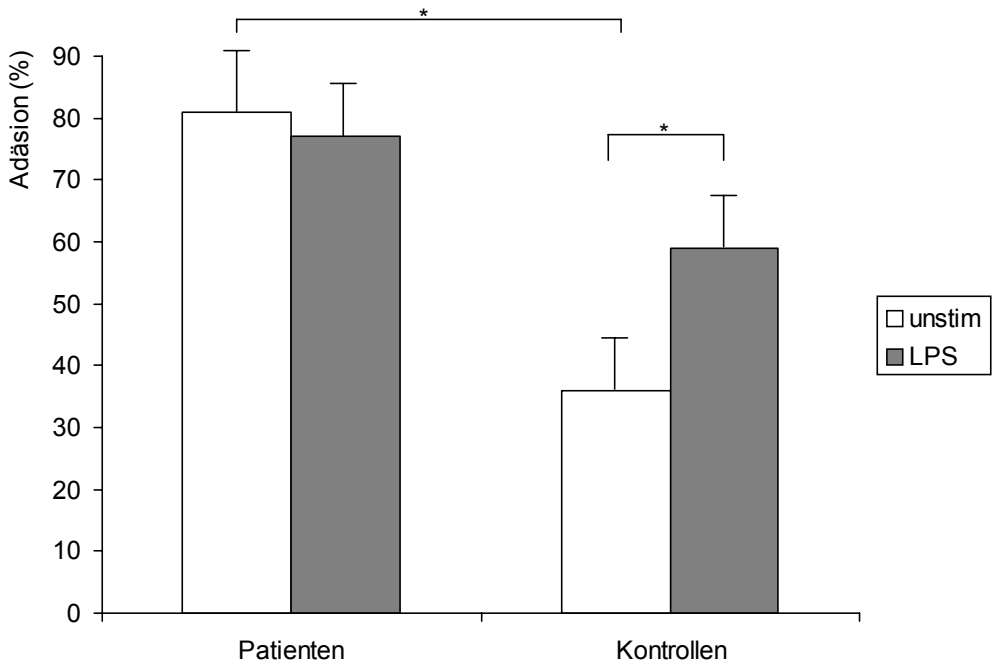

Abbildung 8: Adhäsion von Monozyten an HUVEC spontan und nach Stimulation mit LPS

Adhäsion von Monozyten von Hypertonikern und Kontrollpersonen an humane Umbilikalvenen-endothelzellen (HUVEC) spontan (unstim) und nach Stimulation mit LPS (Lipopolysacchariden) im Vergleich.

Bei den Kontrollpersonen war die Adhäsion von Monozyten nach Stimulation mit LPS statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur Spontanadhäsion (Kontrollen: Spontanadhäsion - 36 ± 11,3, Adhäsion nach Stimulation mit LPS 59,0 ± 13,16, % ± SD, P = 0,043). Bei der Gruppe der Hypertoniker konnte eine tendenziell niedrigere Adhäsion ohne statistische Signifikanz nachgewiesen werden (Patienten: Spontanadhäsion - 81,0 ± 5,19, Adhäsion nach Stimulation mit LPS 77,0 ± 10,01, % ± SD, P = 0,513), (Abbildung 8).

Die Adhäsion von Monozyten, die mit Angiotensin II stimuliert wurden, war statistisch signifikant höher bei Hypertonikern im Vergleich zur Gruppe der gesunden Kontrollpersonen (Patienten – 78,0 ± 3,51, Kontrollen – 49,0 ± 12,8, % ± SD, P = 0,02). In der Kontrollgruppe unterschied sich die Adhäsion nach

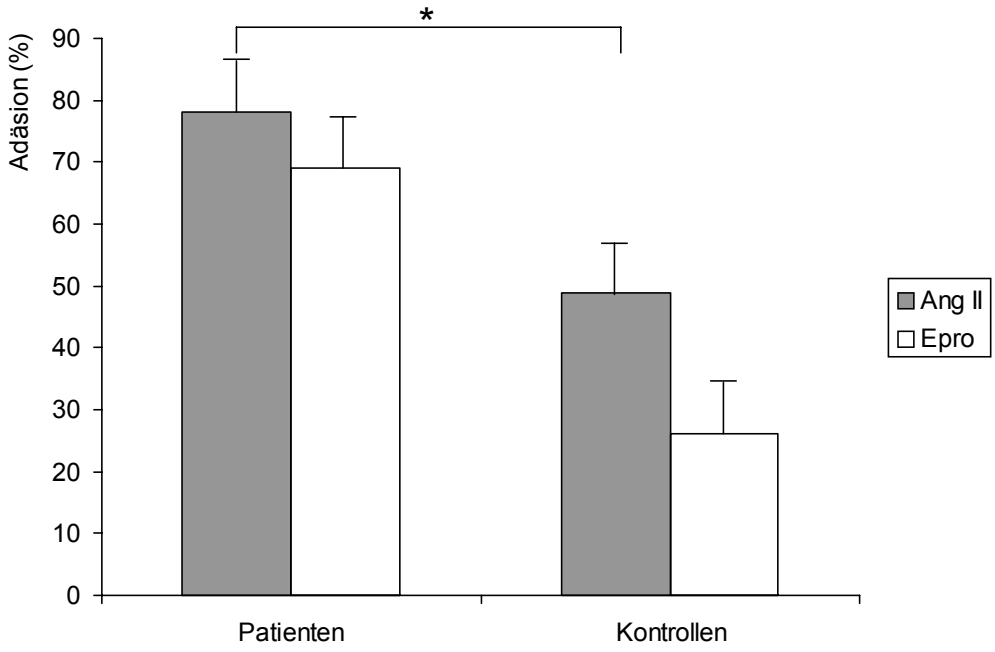

Abbildung 9: Adhäsion von Monozyten an HUVEC nach Stimulation mit Angiotensin II oder nach Vorinkubation mit Eprosartan und anschließender Angiotensinexposition

Die Adhäsion von Monozyten an humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) von Kontrollpersonen und Patienten nach Stimulation mit Angiotensin II (Ang II) oder nach Vorinkubation mit dem AT_1–Rezeptorantagonist Eprosartan (Epro) und anschließender Stimulation mit Angiotensin II.

Stimulation mit Angiotensin II tendenziell von der Spontanadhäsion (Kontrollen:

Spontanadhäsion - 36 ± 11,3, Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II - 49,0 ± 12,8, % ± SD, P = 0,684). Bei den Patienten fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Spontanadhäsion und Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II (Patienten: - Spontanadhäsion - 81,0 ± 5,19, Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II - 78,0 ± 3,51; % ± SD, P = 0,655), (Abbildung 9).

Vorinkubation mit dem Angiotensin II Typ I Rezeptor Antagonisten Eprosartan, mit anschließender Angiotensin II Exposition, verminderte die Adhäsion der Monozyten in Patienten- und Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant (Patienten: Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II – 78,0 ± 3,51, Adhäsion nach Vorinkubation mit Eprosartan – 69,0 ± 8,14, % ± SD, P = 0,109; Kontrollen: Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II – 49,0 ± 12,8, Adhäsion nach Vorinkubation mit Eprosartan – 26,0 ± 14,19, % ± SD, P = 0,273), (Abbildung 9).

4.1.4 Ergebnisse der Adhäsion von Monozyten an humane Umbilikalarterien-Endothelzellen (HUAEC)

Die Messung der Spontanadhäsion humaner Monozyten aus dem peripheren Blut an humane Umbilikalarterienendothelzellen betrug 28%. Nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) ermittelten wir eine im Vergleich dazu erhöhte Adhäsion von 53%.

Nach Stimulation mit Angiotensin II betrug die Monozytenadhäsion 27%. Vorinkubation mit Eprosartan verminderte die Adhäsion im Vergleich dazu in diesem Fall nicht (53% Adhäsion).

4.2 Ergebnisse der Bestimmung zirkulierender Adhäsionsmoleküle

Wir untersuchten die Spiegel der humanen löslichen Adhäsionsmoleküle hsICAM-1 (humanes lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1, Abbildung 10), hsVCAM-1 (humanes lösliches vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1, Abbildung 11) und hsE-Selektin (humanes lösliches E-Selektin, Abbildung 12)

im Serum.

Lösliches ICAM-1 war bei Patienten mit arterieller Hypertonie im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant erhöht (Patienten – 409,2 ± 205,01, Kontrollen – 211,00 ± 4,46, ng/ml ± SD, P = 0,017, Abbildung 10).

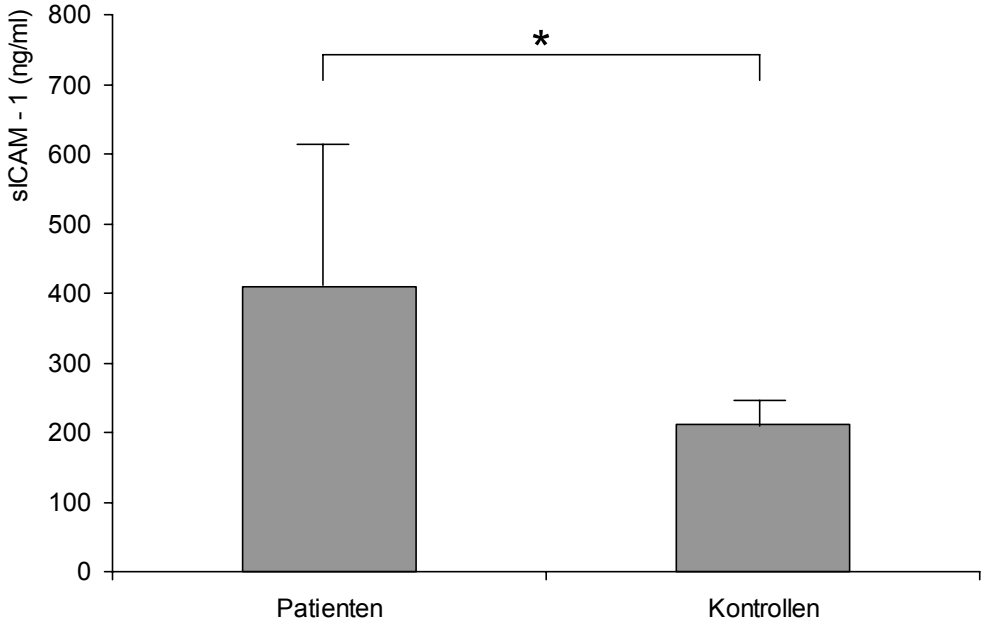

Abbildung 10: hsICAM-1 bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Humanes lösliches ICAM-1 ist bei Patienten (n = 7) im Vergleich zu Kontrollen (n = 7) signifikant erhöht (* P = 0,017).

Eine signifikante Erhöhung lies sich auch für sVCAM-1 nachweisen (Patienten – 692,9 ± 116,79, Kontrollen – 553,00 ± 16,78, ng/ml ± SD, P = 0,017, Abbildung 11).

Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei den zirkulierenden Mengen an E-Selektin (Patienten - 46,78 ± 48,23, Kontrollen – 46,25 ± 2,75 ng/ml ± SD, P = 0,4, Abbildung 12).

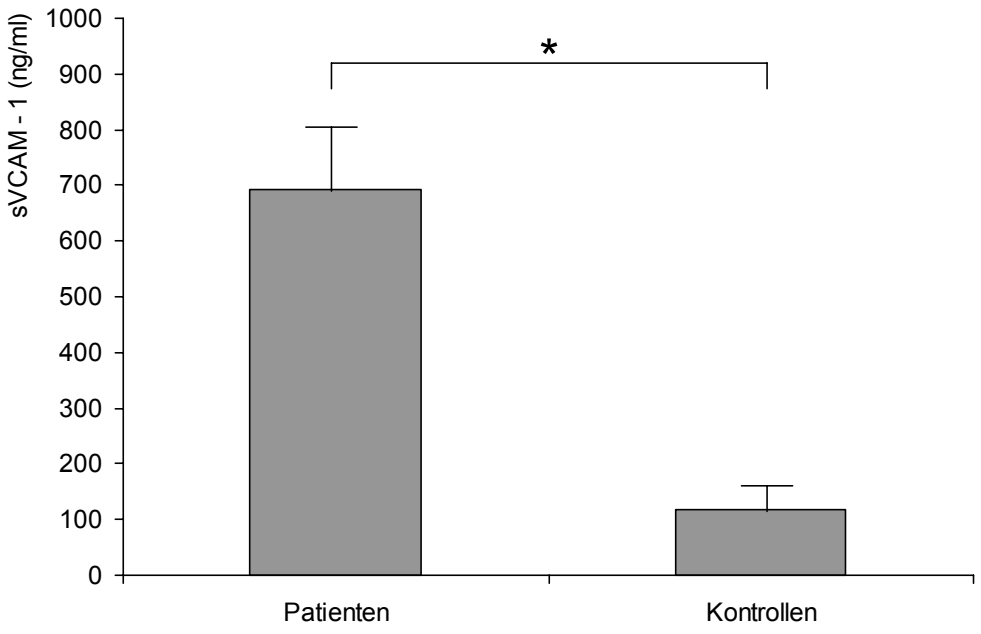

Abbildung 11: hsVCAM-1 bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Humanes lösliches VCAM - 1 ist bei Patienten (n = 7) im Vergleich zu Kontrollen (n = 7) signifikant erhöht (* P = 0,017).

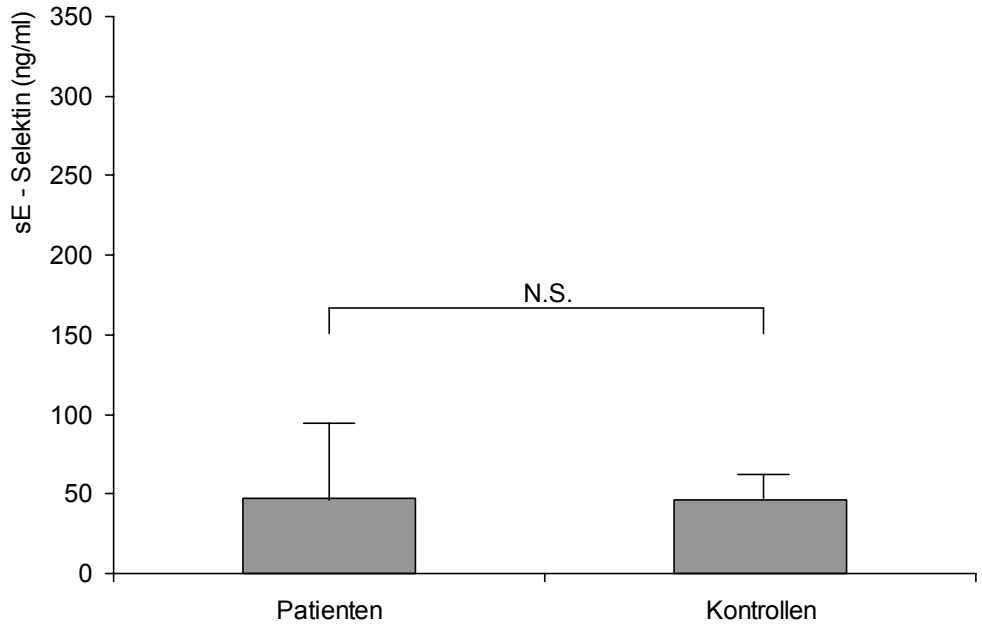

Abbildung 12: hsE-Selektin bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Humanes lösliches E-Selektin bei Patienten (n = 7) im Vergleich zu Kontrollen (n = 7) ohne signifikanten Unterschied (P = 0,4).

4.3 Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen

4.3.1 Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen an Endothelzellen

Wir analysierten die Chemilumineszenzaktivität (CL-Aktivität) von humanen Aortenendothelzellen (Tabelle 4).

Die Chemilumineszenzaktivität der postkonfluenten Endothelzellen lag bei 27,5 ± 2,96, RLU/s ± SD und erreichte den Spitzenwert nach 23,5 ± 31,81 Minuten ± SD. Nach Stimulation mit Angiotensin II stieg die Chemilumineszenzaktivität an (46,5 ± 16,09, RLU/s ± SD, P = 0,189) und erreichte den Spitzenwert nach 9 ± 31,15, Minuten ± SD.

Vorinkubation mit dem Angiotensin II Typ 1 Rezeptorantagonisten Eprosartan führte zu einer tendenziellen Verminderung der Chemilumineszenzaktivität auf 39 ± 14,1, RLU/s ± SD, P = 0,189. Der Spitzenwert wurde nach 39 ± 14,1, Minuten ± SD erreicht.

Tabelle 4: Ergebnisse der Messung der CL-Aktivität an humanen Aortenendothelzellen (HAEC) spontan (unstim), nach Stimulation mit Angiotensin II (Ang II), und nach Inkubation mit Eprosartan und anschließender Angiotensin II Exposition (Ang II & Epro). Jeder Versuch wurde mindestens doppelt ausgeführt.

Zellcode	**CL-Aktivität je Versuchsansatz, Angabe von RLU/s**			**Zeitpunkt zu dem Spitzenwert erreicht wurde, in Minuten**		
	unstim	**Ang II**	**Ang II & Epro**	**unstim**	**Ang II**	**Ang II & Epro**
HAEC1	25,40	24,70	22,40	1	15	29
HAEC2	29,60	69,30	26,30	46	1	49

4.3.2 Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen an Monozyten

Die Spitzenwerte der Chemilumineszenzaktivität von Monozyten, die vor der Stimulation mit Phorbol-Myristat-Azetat (PMA) ermittelt wurden, unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. (Patienten: 57,5 ± 60,12; Kontrollen: 45,5 ± 34,16; RLU/s ± SEM, P = 0,4), (Abbildung 13).

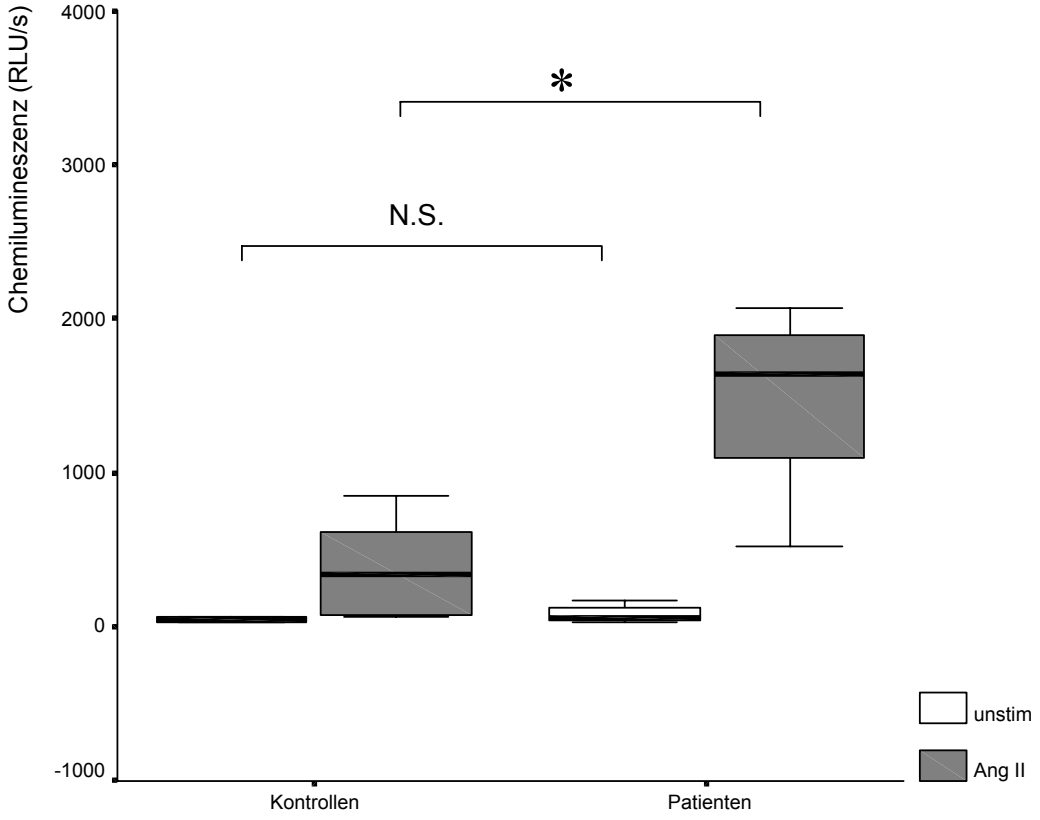

Abbildung 13: Chemilumineszenzaktivität der Monozyten spontan und nach Stimulation mit Angiotensin II

Vergleich der Spitzenwerte der Chemilumineszenzaktivität der Monozyten bei Patienten (n = 8) mit essentieller Hypertonie und Normalkontrollen (n = 7) – spontan und nach Inkubation mit Angiotensin II (* P = 0,002) gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Chemilumineszenzaktivität (CL-Aktivität) von Monozyten von Hochdruckpatienten war signifikant höher (P = 0.001), als die der gesunden Probandengruppe unter Stimulation mit PMA (Patienten - 2658,2 ± 1532,57, Kontrollen - 296,27 ± 382,5; RLU/s ± SEM, P = 0,001, Abbildung 14 auf der nächsten Seite).

Die Chemilumineszenzaktivität von Patientenmonozyten unterschied sich nicht signifikant von Normalkontrollen, wenn Monozyten mit Phorbol-Myristat-Azetat (PMA) und Lipopolysacchariden (LPS) inkubiert wurden. (Patienten - 2483 ± 1780, Kontrollen - 519 ± 533,12, RLU/s ± SEM, P = 0,094, Abbildung 14).

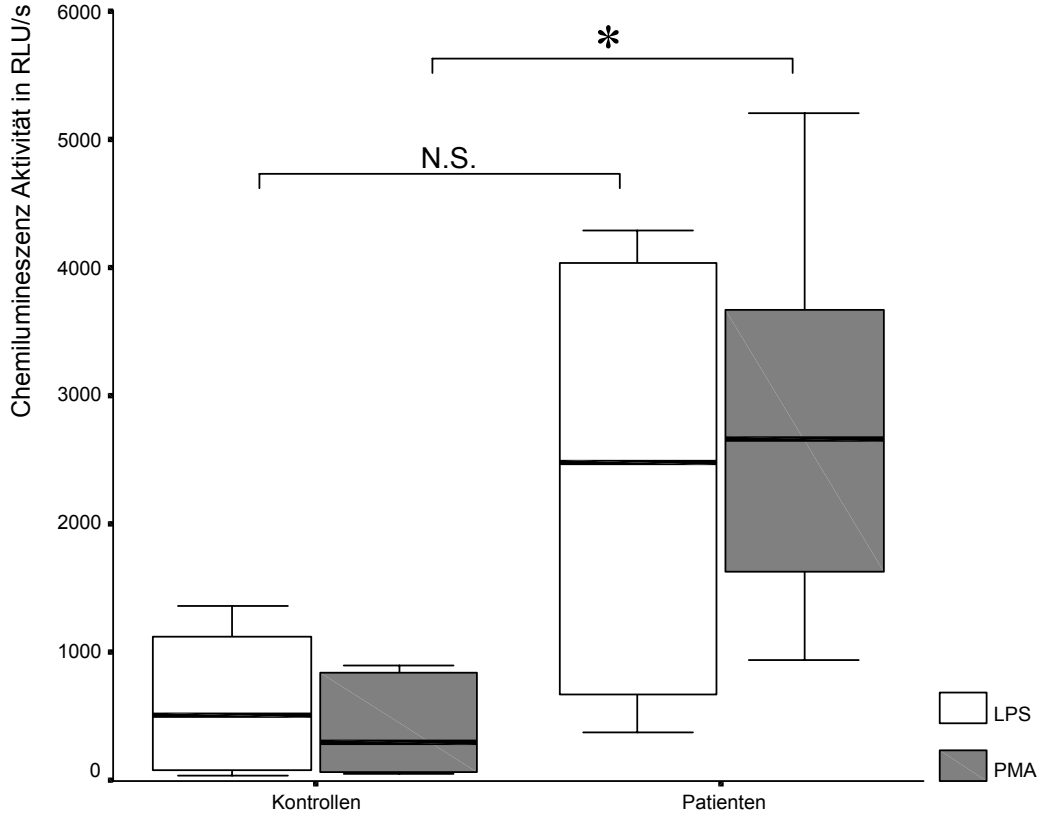

Abbildung 14: Chemilumineszenzaktivität von Monozyten nach Stimulation mit PMA oder PMA+LPS

Gipfel der durch Monozyten generierten Chemilumiszenzaktivität, nach Stimulation mit PMA (8 x 10^{-5} M) und PMA + LPS (10 ng/ml) bei Hochdruckpatienten (n = 8) und gesunden Kontrollpersonen (n = 7). Die Chemilumineszenzaktivität, nach Stimulation mit PMA, ist bei Patienten mit arterieller Hypertonie im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant (*) erhöht (P = 0,001).

Vorinkubation mit dem Angiotensin II Typ 1 Rezeptor - Antagonisten Eprosartan, mit anschließender Angiotensin II – Exposition, führte in beiden Gruppen zu einer statistisch nicht signifikanten Erhöhung der Chemilumineszenzaktivität der Monozyten (Patienten – 2725,1 ± 1959,22, RLU/s ± SEM, P = 0,31 gegenüber Stimulation mit Ang II, Kontrollen - 111,9 ± 365,63, RLU/s ± SEM, P = 0,4 gegenüber Stimulation mit Angiotensin II) auf ein nicht signifikant unterschiedliches Niveau (P = 0,072), (Abbildung 15).

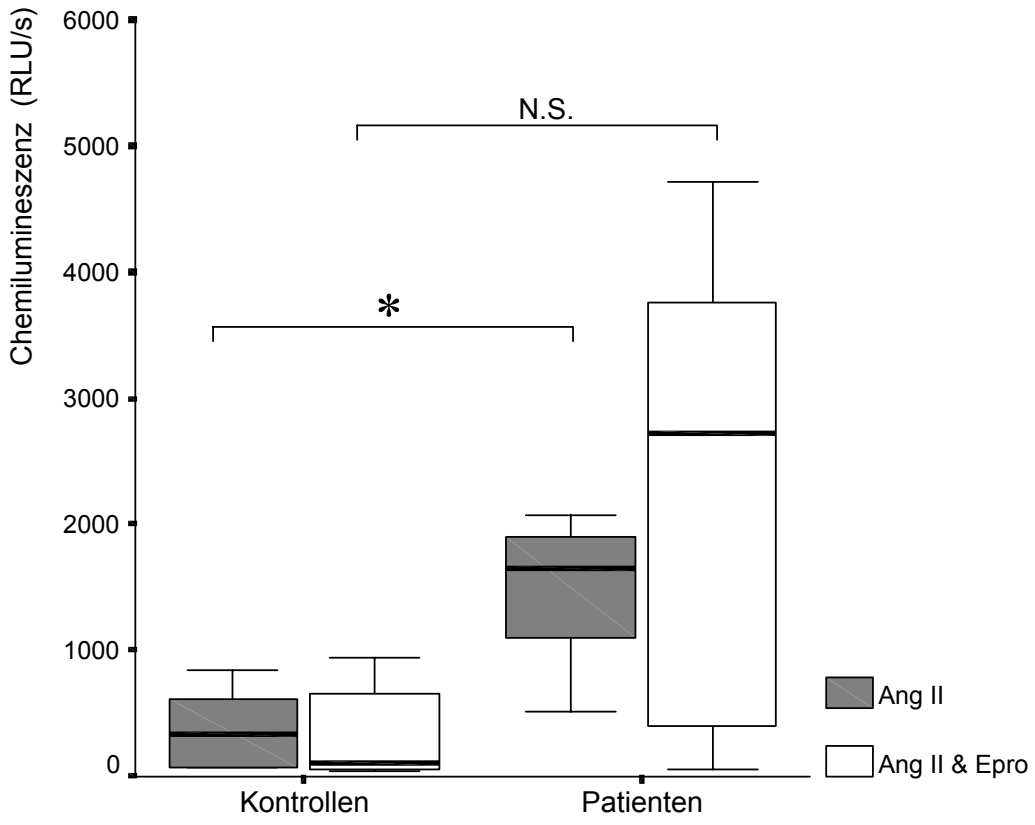

Abbildung 15: Chemilumineszenzaktivität der Monozyten nach Stimulation mit Angiotensin II oder Vorinkubation mit Eprosartan und anschließender Angiotensinexposition

Effekt des Angiotensin II Typ1 Antagonisten Eprosartan auf die Chemilumineszenzaktivität von Monozyten bei Patienten mit arterieller Hypertonie (n = 8) und gesunden Kontrollpersonen (n = 7). Die Monozyten wurden 30 Minuten in Anwesenheit (Ang II & Epro) oder Abwesenheit (Ang II) von Eprosartan (10^{-3} mol/l) inkubiert und anschließend mit Angiotensin II (10^{-10} mol/l) stimuliert. Die Adhäsion der, durch Angiotensin II (Ang) stimulierten Monozyten, unterschied sich signifikant (*) zwischen Patienten und Kontrollen, wohingegen kein signifikanter Unterschied (N.S.) nach Präinkubation mit Eprosartan (Ang & Epro) nachgewiesen wurde. In beiden Gruppen wurde eine nicht signifikante Erhöhung der Chemilumineszenzaktivität bei Präinkubation der Monozyten mit Eprosartan auf ein statistisch nicht signifikant unterschiedliches Niveau nachgewiesen.

4.3.2.1 Chemilumineszenzmessungen an Monozyten im Zeitverlauf

Der Spitzenwert der Chemilumineszenzaktivität [time peak] wurde in Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie, die mit PMA stimuliert wurden im Vergleich zu dem der gesunden Gruppe signifikant früher erreicht (Patienten - 23 ± 12,5; Kontrollen – 40,5 ± 15,03, min ± SEM; P = 0.04), (Abbildung 16).

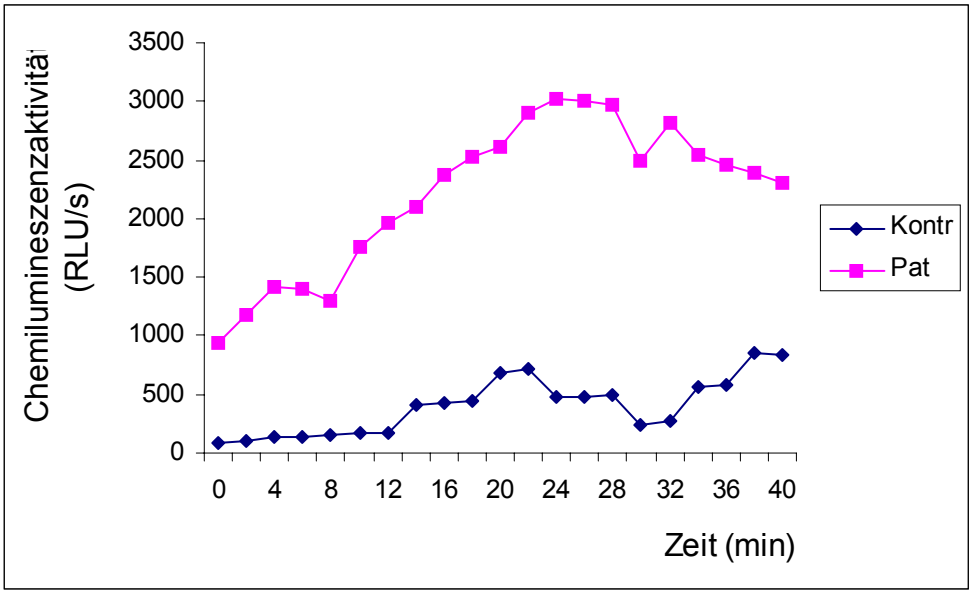

Abbildung 16: Chemilumineszenzaktivität der Monozyten nach Stimulation mit PMA im Zeitverlauf.

4.3.2.2 Korrelationsanalyse der Chemilumineszenzmessungen an Monozyten

Wir wollten wissen, ob Alter oder Geschlecht oder Blutdruck der Studienteilnehmer, die bei der Chemilumineszenzmessung von Monozyten aus dem peripheren Blut bestimmten Werte, beeinflussen. Dazu korrelierten wir Alter, Geschlecht, systolischen und diastolischen Blutdruck mit den Chemilumineszenzaktivitätswerten von unstimulierten Monozyten der Hochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen.

Zwischen den Werten der Chemilumineszenzaktivität unstimulierter Monozyten und dem Alter (r = 0,094, P = 0,74; rs = 0,08, P = 0,76, Abbildung 17), dem Geschlecht (P = 1,0), dem systolischen Blutdruck (r = 0,091, P = 0,75; rs = 0,28, P = 0,31) und dem diastolischen Blutdruck (Methode nach Pearson: r =

0,5, P = 0,058; Methode nach Spearman: rs = 0,47, P = 0,08) konnte keine statistisch signifikante Beziehung nachgewiesen werden.

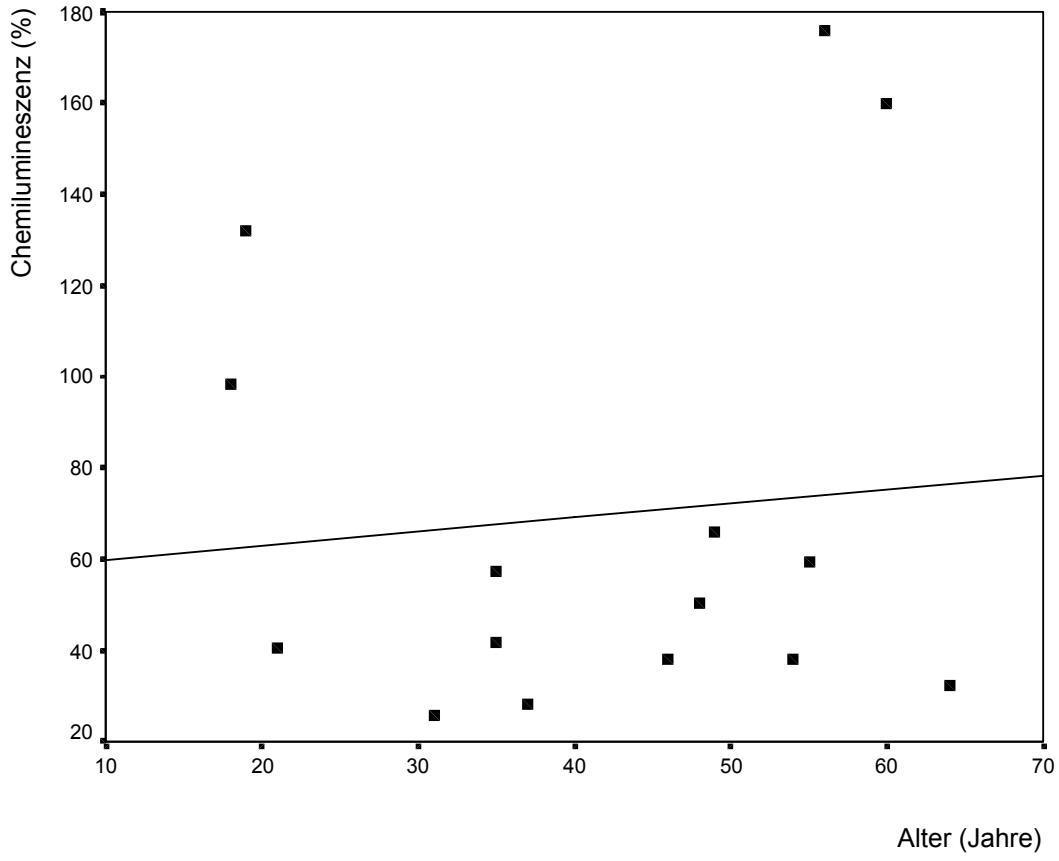

Abbildung 17: Korrelation zwischen Alter und Chemilumineszenzaktivität unstimulierter Monozyten von Hochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen

(nach Pearson r = 0,094, P = 0,74; nach Spearman rs = 0,08, P = 0,76)

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie hefteten sich im Vergleich zu gesunden Probanden spontan signifikant verstärkt an humane Aortenendothelzellen (HAEC) und humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC)–Monolayer an, tendenziell auch an humane Saphenavenen-endothelzellen (HSVEC).

Nach Stimulation mit Angiotensin II war die Adhäsion der Monozyten von Patienten an HAEC und HUVEC ebenfalls signifikant erhöht, bei HSVEC und Umbilikalarterienendothelzellen (HUAEC) im Vergleich zu den gesunden Probanden tendenziell erhöht. In der Patienten- und Kontrollgruppe unterschied sich die Adhäsion der mit Angiotensin II stimulierten Monozyten, an HAEC signifikant von der Adhäsion der unstimulierten Monozyten. Eine Blockade des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors vor der Stimulation mit Angiotensin II führt zu einer tendenziell verminderten Adhäsion der Monozyten an die genannten Endothelzellen.

Die Adhäsion von Monozyten hypertensiver Patienten an humane Aortenendothelzellen, die mit LPS (Lipopolysacchariden) stimuliert worden waren, zeigte sich in der Patienten- und Kontrollgruppe im Vergleich zur Spontanadhäsion signifikant erhöht.

Es fand sich keine statistisch relevante Beziehung zwischen Alter, Geschlecht, systolischem und diastolischem Blutdruck sowie der Adhäsion von unstimulierten Monozyten von Hypertonikern und gesunden Kontrollpersonen.

Die Spiegel der humanen löslichen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 waren bei Patienten mit arterieller Hypertonie im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe hinsichtlich zirkulierender Mengen von humanem E-Selektin.

Die Chemilumineszenzaktivität postkonfluenter Endothelzellen erhöhte sich nach Stimulation mit Angiotensin II im Vergleich zur Messung ohne vorherige Stimulierung. Inkubation mit Eprosartan vor Stimulation mit Angiotensin II führte zu einer verminderten Chemilumineszenzaktivität.

Die Spitzenwerte der vor Stimulation mit PMA spontan gemessenen Chemilumineszenzaktivität von Monozyten unterschied sich nicht signifikant zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.

Nach Stimulation mit PMA wurden bei Hypertonikern signifikant höhere Werte für die Chemilumineszenzaktivität gemessen als bei den gesunden Kontrollpersonen.

Die Chemilumineszenzaktivität von Patientenmonozyten unterschied sich nicht signifikant von den Normalkontrollen, wenn die Monozyten mit PMA und LPS inkubiert wurden.

Monozyten von Patienten mit arterieller Hypertonie generierten nach Stimulation mit Angiotensin II eine signifikant höhere Chemilumineszenz-aktivität, als die Monozyten der gesunden Kontrollpersonen.

5 Diskussion

Viele Studien, die sich auf Tiermodelle stützen, legen nahe, dass die Adhäsion von Monozyten an das Gefäßendothel der entscheidende Schritt für den Prozess der Atherogenese ist [Watanabe et al 1998; Gerszten et al 1999]. Wir untersuchten die Adhärenz von Monozyten von Hochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen an das Gefäßendothel in einem humanen *In-vitro*-System. Wir zeigten, dass die Spontanadhäsion und die Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II von Monozyten an humanes *In-vitro*-Endothel bei Patienten mit arterieller Hypertonie im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen gleichen Alters und Körperbaus signifikant höher war. Außerdem war die Sauerstoffradikalfreisetzung in Patientenmonozyten signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen.

Obwohl Angiotensin II in physiologisch relevanten Konzentrationen verwendet wurde und die Spontanadhäsion von Monozyten an Hochdruckpatienten erhöht war, ist es wichtig zu bedenken, dass es sich um *In-vitro*-Experimente handelt.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die erhöhte Adhäsion bei arterieller Hypertonie durch voraktivierte Monozyten verursacht wird. Wick et al 1995) nehmen an, dass eine Autoimmunreaktion gegen Hitzeschockprotein 60 (Hsp60), das von Endothelzellen nach der Behandlung mit bestimmten Zytokinen (TNF α, IL-1β) ausgeschüttet wird, das Initiationsereignis der Atherosklerose darstellt. Hitzeschockprotein 60 ist ein mitochondriales Protein, das leicht im Zytoplasma gestresster Zellen nachgewiesen werden kann. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte von Dörffel et al nachgewiesen werden, dass im Vergleich zu Gesunden bei Hypertonikern erhöhte Mengen an Tumornekrosefaktor α und Interleukin-1β, bei Stimulation mit Angiotensin II oder Lipopolysacchariden (LPS), aus peripheren Blutmonozyten sezerniert werden [Dörffel et al 1999]. Für unstimulierte Monozyten wurden keine Unterschiede bei der Zytokinausschüttung zwischen Patienten und Kontrollen gefunden.

Eine erhöhte Zytokinsekretion kann bei der Superoxidradikalfreisetzung, Endothelverletzung, der Ablagerung und Aktivierung von zellulären Elementen

auf der Gefäßwand und der Progression zur Atherosklerose eine Rolle spielen [Vaddi et al 1994]. Mit einer neueren Untersuchung wurde interessanterweise eine erhöhte Adhäsion von Monozyten von Hochdruckpatienten an humane Umbilikalvenenendothelzellen aufgezeigt. Daraufhin konnten wir dieses Ergebnis an humanen Aortenendothelzellen bestätigen.

5.1 Die Rolle der erhöhten Superoxidfreisetzung von Monozyten bei der Atherogenese

Aufgrund unserer Untersuchungen, die eine erhöhte Adhäsion von unstimulierten Monozyten von Patienten mit arterieller Hypertonie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen an einschichtiges humanes Endothel zeigten, analysierten wir die Freisetzung von Sauerstoffradikalen von Monozyten von Hypertonikern und gesunden Probanden. Wir analysierten die durch PMA induzierte Sauerstoffradikalfreisetzung von Monozyten und Endothelzellen von Hochdruckpatienten und Normalkontrollen durch Messung der Chemilumineszenzaktivität. PMA ist das beste Agens zur Testung der Proteinkinaseaktivität, die bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei der NADPH Oxidase Aktivierung spielt (Abbildung 18).

$$2\ NADPH + 4\ O_2 \rightarrow (2\ NADP^+) + 4\ O_2^{-}\bullet\ \ 2\ H^+ \qquad (1)$$

$$4\ O_2^{-}\bullet\ + 4\ H^+ \rightarrow 2\ O_2 + 2\ H_2O_2 \rightarrow 3\ O_2 + 2\ H_2O \qquad (2)$$

Abbildung 18: Chemische Darstellung der Entstehung und des Verbleibs von Sauerstoffradikalen

Die Oxidase zur extrazellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies - die sogenannte „Respiratory-Burst-Oxydase“ (Sauerstoffradikalfreisetzungs-Oxidase) - ist eine kurze membrangebundene Elektronentransportkette, die extrazellulären Sauerstoff zu Superoxid oxidiert. Die Elektronen-Transportkette oxidiert auch zytosolisches NADPH, welches vom Pentosephosphatzyklus generiert wird. Das NADPH fungiert als Elektronendonor [Babior 1987, Cross 1991] bei der energiefreisetzenden Redoxreaktion (Gleichung 1). Das Superoxidanion ist unstabil und dismutiert sofort zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Wasserstoffperoxid kann entweder spontan oder katalytisch in Wasser und Sauerstoff umgesetzt werden, oder als Oxidans in Peroxidase-abhängigen Reaktionen dienen [Nauseef 1990] (Gleichung 2).

Als ein weiterer Aktivierungsmarker waren die Spitzenwerte der Chemilumineszenz nach Stimulation mit PMA bei Patienten signifikant höher als bei den gesunden Freiwilligen.

Die Chemilumineszenzuntersuchung von Patienten mit Hypertonie zeigte im Vergleich zu den Kontrollpersonen nach Stimulation durch Angiotensin II eine signifikant erhöhte Chemilumineszenzaktivität. Dieses Ergebnis stimmt mit vorhergehenden Versuchen, die einen Zusammenhang zwischen Angiotensin II induzierter Hypertonie und erhöhter vaskulärer Superoxidproduktion in Mäusen nachgewiesen hatten, überein [Fukai et al 1999].

Nach Vorinkubation von humanen Monozyten mit dem Angiotensin II - Typ 1 - Rezeptorantagonisten Eprosartan und anschließender Stimulation mit Angiotensin II unterschied sich die Chemilumineszenzaktivität der Monozyten bei Patienten und Kontrollpersonen nicht von der Chemilumineszenzaktivität nach Angiotensin II - Stimulation. Unser Ergebnis könnte möglicherweise im Zusammenhang mit einer potentiell agonistischen Wirkung von Eprosartan am AT_1-Rezeptor von Monozyten stehen. Dechend et al identifizierten im Plasma prä-eklamptischer Frauen agonistische Autoantikörper, die gegen den AT_1-Rezeptor gerichtet sind und zur Aktivierung der NADPH-Oxidase mit folgender Sauerstoffradikalfreisetzung führen [Dechend et al 2003]. Außerdem wird Angiotensin II – induzierten Sauerstoffradikalen eine entscheidende Rolle bei der Hypertonie, Atherosklerose und zellulärem Remodeling zuerkannt, die eine antioxidative Wirkung von AT_1-Rezeptorantagonisten nahe legt. Diese Annahme konnte aber bisher nur eingeschränkt mit klinischen Studien belegt werden.

Nach Stimulation von Patientenmonozyten mit LPS kam es zu einem tendenziellen, jedoch nicht statistisch signifikanten Anstieg der Chemilumineszenzaktivität im Vergleich zur gemessenen Chemilumineszenz-aktivität bei der gesunden Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis besteht darin, dass LPS nicht zu einer direkten Stimulation der NADPH-Oxidase führt, wie für neutrophile Granulozyten beschrieben wurde,

sondern zur indirekten Aktivierung der Zellen (“Priming“) führt, dessen Mechanismus noch nicht genau verstanden wird [DeLeo et al 1998]. LPS interagiert mit Monozytenrezeptoren, wodurch der Transkriptionsfaktor NF-κβ aktiviert wird. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κβ führt zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine und der Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen [Legrand-Poels et al 1997].

Eine erhöhte Sauerstoffradikalfreisetzung hat ein unbestreitbar pathogenes Potential. Die Sauerstoffradikale können zu hoch atherogen oxidiertem LDL führen, welches für die Zellen der Arterienwand zytotoxisch ist und entzündliche sowie thrombotische Prozesse stimulieren kann [Aviram et al 1998; Ross 1999]. Die oxidative Situation der Makrophagen hängt von dem Gleichgewicht zwischen der zellulären NADPH-Oxidase und dem Glutathion System ab. LDL-assoziierte polyphenolische Flavonoide, die seine Oxidation verhindern, können auch die oxidative Verfassung der Monozyten senken und in Folge die zellvermittelte Oxidation von LDL. Die unter oxidativem Stress vorkommende Oxidation von Makrophagenlipiden kann zu einer zellvermittelten Oxidation von LDL auch *in vivo* führen. [Aviram et al 1998]

Wenn Low Density Lipoprotein-Partikel in einer arteriellen Gefäßwand abgelagert sind, können sie oxidiert und von Makrophagen über ihre Radikalfängerrezeptoren an der Oberfläche dieser Zellen aufgenommen werden [Steinberg 1997; Griendling et al 1997; Khoo et al 1992]. Der Grad, bis zu dem LDL verändert werden kann, variiert sehr stark [Griendling et al 1997; Diaz et al 1997]. In den Makrophagen gespeichertes LDL aktiviert die Schaumzellen. Außerdem wirkt LDL chemotaktisch auf andere Monozyten und kann die Expression von Genen für den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor [Rajavashisth et al 1990] und das von Endothelzellen abstammende “monocyte chemotactic protein“ hochregulieren [Leonard und Yoshimura 1990]. Nach der Bindung an Radikalfängerrezeptoren *in vitro* initiiert das modifizierte LDL eine Reihe intrazellulärer Ereignisse [Hajjar und Haberland 1997], einschließlich der Induktion von Urokinase [Falcone et al 1991] und inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 [Geng und Libby 1995]. Die Entzündungsreaktion selbst kann einen profunden Effekt auf die Lipoprotein-

wanderung innerhalb der Arterien haben. Insbesondere Entzündungsvermittler, wie Tumornekrosefaktor-α, Interleukin-1 und Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor verstärken die Bindung von LDL an das Endothel und die glatte Muskulatur und erhöhen die Transkription des LDL-Rezeptor Gens [Hajjar und Haberland 1997]. Studien an transgenen Mäusen haben offengelegt, dass Lp-(a)-Lipoprotein, Cholesterolestertransferprotein, Apolipoprotein-A (das Hauptapolipoprotein des High Density Lipoproteins (HDL)) und andere Moleküle einen geringen Effekt auf die Atherogenese haben, wohingegen der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor für die Regulation der Monozyten- und Makrophagenzahl sowie für die Läsionbildung bedeutsam zu sein scheint [Qiao et al 1997; de Villiers et al 1998].

Oxidiertes LDL in atherosklerotischen Läsionen beim Menschen [Ylä-Herttuala et al 1989] induziert eine proatherosklerotische NAD(P)H-Oxidase Expression [Rueckschloss et al 2001]. Mild oxidiertes LDL könnte während der Atherogenese auch zu einer Aktivierung des “platelet-derived-growth-factor“ führen [Escargueil-Blanc et al 2001]. Oxidiertes LDL kann direkt als endothelialer Stressor wirken. Es kann auch später zur Transformation von Makrophagen und von der Media abstammenden glatten Muskelzellen zu Schaumzellen führen [Frostegard et al 1992].

Bei Tieren mit Hypercholesterinämie kann die Größe der atherosklerotischen Läsionen und das Auftreten von Fettsträngen (fatty streaks) bei nichtmenschlichen Primaten durch Antioxidantien vermindert werden [Sasahara et al 1994, Chang et al 1995]. Diese Beobachtung legt nahe, dass Antioxidantien einen antiinflammatorischen Effekt haben, möglicherweise durch eine Verhinderung der Hochregulation der Adhäsionsmoleküle für Monozyten [Fruebis et al 1997]. Antioxidantien erhöhen die Resistenz von humanem LDL gegenüber einer Oxidation *ex vivo* [Reaven et al 1993] in Relation zum Vitamin E Gehalt des Plasmas. Die Aufnahme von Vitamin E ist umgekehrt proportional zur Inzidenz des Myokardinfarktes, und die zusätzliche Aufnahme von Vitamin E reduzierte koronare Ereignisse in einer vorläufigen klinischen Untersuchung [Rimm et al 1993; Stampfer et al 1993; Stephens et al 1996]. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der „Heart Outcomes Prevention Evaluation“

(HOPE) Studie. Im Rahmen der HOPE-Studie, einer Sekundärpräventions-Studie, wurde für Hochdruckpatienten unter Therapie mit Ramipril eine signifikante Mortalitätssenkung festgestellt, wohingegen sich die Therapie mit 400 IU D-Alpha-Tocopherol-Azetat (Vitamin E) als uneffektiv erwies [HOPE Investigators 2000]. Für andere Oxidantien, wie β-Caroten, wurde kein günstiger Einfluss [Hennekens et al 1996, Omenn et al 1996] beschrieben.

Obwohl der Hypercholesterolämie bei etwa 50 Prozent der Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung eine bedeutsame Rolle zufällt [Braunwald 1997], müssen auch andere Faktoren in Betracht gezogen werden. Die Arteriosklerose könnte eine Entzündungserkrankung sein und nicht einfach nur aus der Ansammlung von Lipiden resultieren [Ross 1999].

Oxidativer Stress trägt durch Förderung der Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur, der Monozyten-/ Makrophageninfiltration, Veränderung des Gefäßtons und Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen, neben anderen Effekten auf die Zellfunktion, einschließlich der Regulation der Kinaseaktivität, Lipidperoxidation und Inaktivierung von Nitritoxid, zum Unterhalt von Gefäßerkrankungen bei [Griendling et al 1994].

Hypertonie scheint insbesondere mit erhöhtem Oxidationsstress verbunden zu sein. Es wurde von Griendling et al demonstriert, dass Angiotensin die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen durch die NADPH-Oxigenase stimuliert [Griendling et al 1994]. Bei Ratten konnte der durch Angiotensin II induzierte Bluthochdruck durch eine Form der Superoxiddismutase gesenkt werden [Laursen et al 1997, Fukui et al 1997], die eines der wichtigsten Verteidigungsenzyme der Zelle gegenüber dem Superoxidanion ist [Oury et al 1997].

Drei Isoenzyme der Superoxiddismutase wurden bislang identifiziert, 1. eine Kupfer und Zink-enthaltende Form (Cu/ZnSOD), die sich vor allem im Zytosol befindet, 2. eine mitochondriale, sogenannte manganesische Form (Mn-SOD), und 3. ein extrazelluläres Isoenzym (ecSOD). Im Interstitium der Gefäße liegen speziesabhängig bis zu 50% der Gesamt-Superoxiddismutase in der extrazellulären Form vor [Stralin et al 1995]. Insbesondere unter Zytokin-

einwirkung [Marklund 1992] und an atherosklerotischen Gefäßen [Fukai et al 1998] sind erhöhte ecSOD-Spiegel zu finden.

Fukai et al stellten 1999 fest, dass Angiotensin II die Expression der extrazellulären Superoxiddismutase (ecSOD) über einen p42/44 MAP-Kinase-Weg unabhängig von der Superoxidproduktion hochreguliert. Die Gesamt-Gefäß-Superoxiddismutase war nach Angiotensin II - Infusion *in vivo* bei Fukai nicht erhöht. Trotzdem hat der durch Angiotensin II verursachte Anstieg an ecSOD einen bedeutenden Effekt auf den Radikalfang im Interstitium, wo sich das Enzym befindet.

Außerdem wird für den Kupfer und Zink enthaltenden Superoxiddismutasetyp eine Peroxidaseaktivität angenommen [Hogeson und Fridovich 1997; Yim et al 1990]. Demzufolge könnte die erhöhte Expression der extrazellulären Superoxiddismutase die Peroxidasereaktionen im Interstitium erhöhen. Dadurch könnten die Kettenreaktionen der Sauerstoffradikale und die LDL-Oxidation beeinflusst werden. Auch für Arteriosklerose wurde ein Anstieg der vaskulären extrazellulären Superoxiddismutase, anscheinend von lipidbeladenen Makrophagen, nachgewiesen [Fukai et al 1999].

In experimentellen Ansätzen scheint es, dass sowohl Arteriosklerose als auch Angiotensin II-induzierte arterielle Hypertonie den Spiegel der vaskulären extrazellulären Superoxiddismutase heben, wenn auch durch verschiedene Zelltypen.

Möglicherweise stellt die erhöhte Expression der Superoxiddismutase einen wichtigen Anpassungsmechanismus dar, der ein erhöhtes Einfangen von Superoxidanionen in den beiden Situationen, die mit einer erhöhten Produktionsrate von Superoxidanionen einhergehen, erlaubt. Das Superoxid-Anion kann den Blutdruck erhöhen, wohingegen ein erhöhter Spiegel der Superoxiddismutase im Gefäß den Blutdruck senken kann. Daher könnte die Antwort auf Angiotensin II als ein entscheidender Anpassungsmechanismus verstanden werden, der den Effekt von Angiotensin auf den Blutdruck und die vaskuläre Redoxsituation entschärft.

Die Dismutation von Superoxidanionen durch die extrazelluläre

Superoxiddismutase würde den extrazellulären Wasserstoffperoxidspiegel heben, welches wichtige proatherogene Eigenschaften hätte. Das Superoxid-Anion ist eher eine reduzierende Substanz, wohingegen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) eher ein oxidierendes Agens ist. Wasserstoffperoxid ist wesentlich stabiler als das Superoxidanion, weil es ungeladen ist und frei in die angrenzenden Zellen diffundieren kann, in denen es die Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur fördern, die Genexpression verändern, und Matrix-Metalloproteinasen aktivieren kann [Griendling et al 1997].

Transgene Mäuse, die die Kupfer- und Zink-Superoxiddismutase über-exprimieren, entwickeln eine ausgedehntere fatty-streak - Ablagerung als Kontrollmäuse, wenn sie mit einer cholesterolreichen Diät gefüttert werden [Tribble et al 1997]. Für die Gruppe von Griendling, die die Proliferation und Hypertrophie der glatten Gefäßmuskelzellen als entscheidende Veränderung bei der Entstehung der Atherosklerose ansieht, ist es vorstellbar, dass ein erhöhter vaskulärer Spiegel an extrazellulärer Superoxiddismutase einen nachteiligen Effekt haben könnte und Angiotensin II-induzierte Hypertonie mit der Gefäßkrankheit Atherosklerose verknüpft [Fukai et al 1999].

Arteriosklerose ist eine multifaktorielle, durch verschiedene Gene und Umweltfaktoren beeinflusste Krankheit. Daher könnte das Verständnis der Regulation der Genexpression und der Unterschiede im Ansprechen auf die krankheitsverursachenden Substanzen weiterhelfen. Die Genexpression variiert möglicherweise an Läsionen bei verschiedenen Personen und an verschiedenen Läsionsstellen, und eine genaue Kenntnis, könnte Aufschluss über genetische Unterschiede in der Empfindlichkeit und Ansprechbarkeit einer Therapie geben. Es könnte möglich werden, selektiv die gefährlichen Entzündungskomponenten in den Arterien zu entschärfen und dabei die protektiven Elemente intakt zu belassen.

5.2 Die Rolle der Superoxidfreisetzung von Endothelzellen nach Stimulation mit Angiotensin II

Die Chemilumineszenzaktivität von humanen Umbilikalvenenendothelzellen nach Stimulation von Angiotensin II war in unseren Experimenten, im Vergleich zur Chemilumineszenzaktivität unstimulierter Endothelzellen, erhöht. Die von

Angiotensin II induzierte Sauerstoffradikalproduktion von Endothelzellen ist maßgeblich von der NADPH-Oxidase - Untereinheit $p47^{phox}$ abhängig [Li et al 2003]. Endothelzellen exprimieren alle klassischen NADPH-Oxidase - Einheiten [Kim and Iwao 2000; Ushio-Fukai et al 1999]. Li et al haben gezeigt, dass Angiotensin II innerhalb einer Minute die Phosphorylierung der Regulationseinheit $p47^{phox}$ induziert. Parallel dazu kommt es zur Erhöhung der $p47^{phox}$-$p22^{phox}$ - Komplexformation und Superoxidanion-Bildung (O_2^-•-Bildung) [Li et al 2003]. Es wird vorgeschlagen, dass in der perinukleären Region intrazellulär gebildete Sauerstoffradikale als Signalmoleküle zur Aktivierung redox-sensibler Enzyme und Transkriptionsfaktoren dienen könnten [Kim and Iwao 2000; Griendling et al 2000], wohingegen extrazelluläre Sauerstoffradikale zur endothelialen Dysfunktion beitragen könnten [Rajagopalan 1996; Wang et al 2001; Rey et al 2001].

5.3 Erhöhte Mengen an zirkulierendem ICAM und VCAM bei Patienten durch Aktivierung der Monozyten in einem frühen Stadium der arteriellen Hypertonie

Ähnlich wie in verschiedenen Berichten von DeSouza et al fanden wir signifikant erhöhte Mengen an humanem löslichen interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (sICAM-1) und humanem löslichen vaskulären Adhäsionsmolekül-1 (sVCAM-1) bei Patienten mit arterieller Hypertonie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen [DeSouza et al 1997]. Da wir erhöhte Mengen an zirkulierendem sICAM-1 und sVCAM-1 nachwiesen, benutzen wir humane Aortenendothelzellen, um eine primäre Aktivierung der Endothelzellen in unseren Adhäsionsversuchen auszuschließen. Die Sauerstoffradikal-freisetzung der humanen Aortenendothelzellen war minimal, verglichen mit der Sauerstoffradikalfreisetzung der Monozyten von Patienten. Mit unserem Versuchsansatz konnten wir somit eine Voraktivierung der Endothelzellen durch den arteriellen Hypertonus ausschließen. Der Mechanismus des Zusammen-hangs von arterieller Hypertonie und der erhöhten Zirkulation von Adhäsions-molekülen ist unklar. Flußunterschiede verändern die Expression von Genen für das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 [Nagel et al 1994]. Lokale Strömungs-änderungen können zu Veränderungen der Scherkräfte führen. Die Erhöhung

der ICAM-1-Expression durch Scherkräfte ist von der Zeit und einwirkenden Kraft abhängig und reversibel [Watanabe et al 1998]. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die erhöhten Mengen durch voraktivierte Monozyten verursacht werden, da TNF-α und IL-1β die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 an Endothelzellen heraufzuregulieren scheinen, wie von Davies et al gezeigt wurde [Davies et al 1993].

Die Adhäsion von Leukozyten, einschließlich der Monozyten wird über Adhäsionsmoleküle vermittelt, die an der luminalen Oberfläche der Endothelzellen exprimiert werden. Die Induktion und Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen ist ein häufig, bei Entzündungsprozessen in verschiedenen Geweben, auftretender Prozess und wurde unter verschiedenen Bedingungen, wie der Allograftabstoßung, Schocklunge, systemischen Vaskulitis, Psoriasis und rheumatoiden Arthritis beobachtet [Davies et al 1993].

ICAM-1 und VCAM-1 werden überwiegend von Endothelzellen, aber auch von Monozyten, ausgeschüttet. VCAM-1 wurde beim Menschen in atherosklerotischen Läsionen vorgefunden [Davies et al 1993]. E-Selektin wird von Granulozyten und mononukleären Zellen gebunden. Im Gegensatz dazu heftet sich VCAM-1 nur an Monozyten und Lymphozyten an. ICAM-1 bindet an Lymphozyten-funktionsverwandtes Antigen-1 (LFA-1) und Mac-1, die auf allen weißen Zellen vorhanden sind. ICAM-1 wird konstitutiv vom Endothel, das beim Menschen atherosklerotische Plaques bedeckt, exprimiert [Davies et al 1993]. In besonders läsionsgefährdeten Gefäßbezirken, in der Nähe der Ostien abzweigender Gefäße wurde die verstärkte Expression, speziell entlang der Zellgrenzen, beobachtet.

Die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen wird durch inflammatorische Zytokine, einschließlich TNF-α und IL-1, IL-4 und IFN-γ sowie durch atherogene Plasmalipoproteine, wie natives und oxidiertes LDL, auf dem Trankriptionsniveau hochreguliert [Fan et al 1993; Smalley et al 1996]. Auch Interleukin-8 kann die Monozytenadhäsion an das Endothel triggern [Gerszten et al 1999]. Lösliche Formen von ICAM-1 sind im Blut detektierbar und wurden als nützlicher Aktivierungsindikator im Zusammenhang mit der klinischen Manifestation der Arteriosklerose beschrieben [Blann et al 1994].

Eine kombinierte Therapie mit anti-ICAM-1 - und LFA-1 - Antikörpern führte zu einer synergistischen, aber inkompletten Inhibition der Makrophagenadhärenz und Intimawanderung [Watanabe et al 1998]. Dies signalisiert, dass noch andere ICAM-1-unabhängige Mechanismen von funktioneller Relevanz sind.

E-Selektin, früher unter der Bezeichnung endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül-1 (ELAM-1) bekannt, das den Kontakt zwischen Endothelzellen, Neutrophilen und Monozyten sowie T-Gedächtniszellen [Davies et al 1993] vermittelt, wird nur von Endothelzellen ausgeschüttet [Bevilacqua et al 1989]. E-Selektin bindet an Leukozyten, die Sialyl-Lewis-Antikörper exprimieren. Anschließend an die Bindung erfolgt die dichte Anheftung an die Oberfläche des Endothels. Für diesen Prozess ist die Interaktion von aktivierten β2-Integrinen, wie dem Lymphozyten-funktionsverwandten Antigen-1 (LFA-1) und dem Very-late-antigen-4 (VLA-4) auf Leukozyten mit Mitgliedern der Immunglobulinsuperfamilie, wie ICAM-1 und VCAM-1 notwendig. Adhärente Zellen wandern dann durch Junktionen des Endothels.

Wir fanden die Spiegel von ICAM-1 und VCAM-1 erhöht, jedoch keine Erhöhung von E-Selektin. Daher stellten wir die Hypothese auf, dass diese Erhöhung durch eine Aktivierung von Monozyten in einem frühen Stadium der arteriellen Hypertonie, bevor Endothelschäden oder Gefäßläsionen in Erscheinung getreten sind, verursacht sein könnte.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fanden Blann et al signifikant erhöhte E-Selektin Spiegel bei Hochdruckpatienten [Blann et al 1994]. Seine Gruppe geht davon aus, dass große Mengen an E-Selektin vom Endothel ausgeschüttet werden, um eine Leukozytenadhäsion zu verhindern. Wir glauben, dass unsere Daten diese Theorie weiter unterstützen. Blann et al schlossen alle Patienten mit einer symptomatischen Gefäßerkrankung von ihren Exerimenten aus [Blann et al 1994]. Da die Patienten bereits im noch symptomlosen Zustand Gefäßveränderungen aufweisen könnten, bezogen wir nur Patienten ohne Intima-Media-Verdickung in unsere Untersuchungen ein. Unsere Arbeitsgruppe nimmt an, dass E-Selektin nur durch ein beschädigtes Endothel ausgeschüttet werden könnte. Dahingegen könnte der E-Selektin Spiegel im Frühstadium arterieller Hypertonie durchaus noch normal sein wie bei unseren Patienten, bei

denen es noch zu keinen Gefäßveränderungen gekommen ist.

5.4 Erhöhte Adhäsion humaner Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie an Endothelzellen aus Aorta, Vena saphena, Umbilikalvene und -arterie

Die Aktivierung des AT_1-Rezeptors durch Angiotensin II stimuliert die Freisetzung von freien Radikalen [Griendling et al 1994], die die Expression von Adhäsionsmolekülen induzieren.

Wir studierten die Monozytenadhäsion nach Stimulation mit physiologisch relevanten Konzentrationen von Angiotensin II [Kahan et al 1997]. Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie zeigten eine signifikant höhere Adhäsion an einschichtiges humanes Aorten- (HAEC), Saphenavenen- (HSVEC), Umbilikalvenenendothel (HUVEC), sowohl spontan (signifikant bei HAEC, HSVEC, HUVEC) als auch unter Stimulation mit Angiotensin II (signifikant bei HAEC und HUVEC, tendenziell bei HSVEC) und eine signifikant erhöhte Chemilumineszenzaktivität während der Inkubation mit Angiotensin II.

Die erhöhte Adhäsion konnte durch eine Inkubation mit dem AT_1-Antagonisten Eprosartan vor Stimulation mit Angiotensin vermindert werden (bei HAEC, HSVEC, HUVEC). Die Prävention der Angiotensin II - vermittelten Aktivierung von Monozyten durch Eprosartan bei Patienten mit arterieller Hypertonie könnte ein neuer therapeutischer Ansatz zur Vermeidung von Gefäßveränderungen bei arterieller Hypertonie sein. Die mit Angiotensin II stimulierten Zellen zeigten eine signifikant höhere Adhäsion verglichen mit unstimulierten Zellen bei Patienten als auch Kontrollen. Unsere Ergebnisse wurden durch Folgearbeiten in unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Darin wurde nachgewiesen, dass Monozyten nach Stimulation mit Angiotensin II und mit agonistischen Angiotensin-(1)-rezeptor-Autoantikkörpern Tissue-Factor exprimieren [Dörffel et al 2003]. Unsere Ergebnisse passen zu vorangehenden Studien, die einen Zusammenhang zwischen Angiotensin II induzierter Hypertonie und einer erhöhten Superoxid-Produktion bei Mäusen zeigten [Fukai et al 1999]. Die Resultate könnten ebenfalls in Beziehung zum Risiko atherosklerotischer Komplikationen bei Hochdruckpatienten und einem hohen Renin-Spiegel stehen [Aldermann et al 1991].

Die Monozytenstimulierung durch LPS ist eine lange etablierte Methode zur Testung des maximalen Aktivierungsgrades dieser Zellen. Als Antwort auf LPS wird die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Lumenseite des Gefäßendothels induziert [Luhm et al 1997]. Möglicherweise durch Überstimulierung hat sich in unseren Experimenten die Adhäsion von Monozyten, nach Stimulation mit LPS, nicht signifikant zwischen Patienten und Kontrollen unterschieden.

Es gab keine signifikante Beziehung zwischen der Monozytenadhärenz und dem Blutdruck. Daher scheint es unwahrscheinlich, dass der hohe Blutdruck selbst die peripheren Blutmonozyten voraktiviert. Es ließ sich jedoch ein gemeinsamer Trend zwischen Monozytenadhärenz und der Höhe des Blutdrucks ablesen.

Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Alter und der Monozyten-adhäsion (Abbildung 5), obwohl sogar die Monozytenadhäsion an das Gefäßendothel eines der initialen Ereignisse der Atherogenese darstellt und das Risiko für atherosklerotische Gefäßläsionen mit dem Alter ansteigt. Ein Grund für diese Befunde könnte der Ausschluss von Patienten mit erhöhten LDL-Niveaus oder erhöhter Intima-Media-Dicke der Arteria carotis und von Rauchern aus unserer Untersuchung sein. Bei der Betrachtung der Ergebnisse mit humanen Aorten- und Umbilikalgefäßendothelzellen muss jedoch berücksichtigt werden, dass Monozyten von Personen verschiedenen Alters verwendet wurden, wohingegen die Aortenendothelzellen von einer Person mittleren Alters gespendet wurden. Es wurden Umbilikalgefäße von Neugeborenen verwendet. Die Saphenagefässe wurden Patienten im Rahmen eines gefässchirurgischen Eingriffs entnommen.

Nach unserer besten Kenntnis ist dies der erste Bericht über eine tendenziell erhöhte Adhäsion von humanen zirkulierenden Monozyten, von Patienten mit arterieller Hypertonie und gesunden Kontrollpersonen, an humane Endothelzellen aus der Vena saphena.

Über die erhöhte Adhäsion von zirkulierenden Monozyten von Patienten mit arterieller Hypertonie und die verstärkte Superoxidproduktion bei Patienten und

Kontrollen wurde bereits vorab von Dörffel et al berichtet [Dörffel et al 2001].

Die von mir unternommenen Versuche wurden zum ersten Mal an humanen Monozyten und humanen Endothelzellen unternommen. Datenerhebungen anderer Arbeitsgruppen basierten bisher auf Tiermodellen.

Mit diesen Versuchen, wurde ein weiterer Beweis für die Aktivierung der Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie erbracht. Meine Ergebnisse unterstützen die Sicht einer Monozytenbeteiligung an der Pathogenese atherosklerotischer Läsionen, die mit arterieller Hypertonie in Zusammenhang stehen.

Zusammenfassung

Einführung - Periphere Blutmonozyten spielen eine Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose. Liu et al beschrieben signifikant erhöhte Zahlen aktivierter Monozyten bei spontan hypertensiven Ratten im Vergleich zu normotonen Wistar-Kyoto-Ratten [Liu et al 1996]. Auch das Renin-Angiotensin-System ist an der Entwicklung der Arteriosklerose beteiligt, wie von Okamura et al 1999 beschrieben. Strawn publizierte, dass Angiotensin II Subtyp1 (AT1) - Rezeptorblockade bei hypertensiven Ratten zu einer signifikant verminderten Zahl zirkulierender und endotheladhärenter Monozyten führt [Strawn et al 1999]. In unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu Normalkontrollen voraktiviert sind [Dörffel et al 1999].

Wir untersuchten Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie und von gesunden Probanden hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Aktivierung anhand ihrer Adhäsion an von uns kultivierte humane Aortenendothelzellen (HAEC), von uns isolierte und kultivierte Saphenavenenendothelzellen (HSVEC), Umbilikalvenen- (HUVEC) und Umbilikalarterienendothelzellen (HUAEC). Außerdem bestimmten wir die Adhäsionsmoleküle humanes lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), vaskuläres Zell-adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) sowie E-Selektin und analysierten die Superoxidfreisetzung von humanem Endothel und humanen Monozyten.

Methoden - Humane periphere Blutmonozyten wurden mittels Dichtegradienten-zentrifugation und Plastikadhärenz isoliert und *in vitro* mit Lipopolysacchariden (LPS, 10 ng/ml), Angiotensin II (10^{-10} mol/l), Angiotensin II nach Vorinkubation mit dem AT_1-Antagonisten Eprosartan (10^{-3} mol/l) stimuliert oder ohne Stimulans belassen. Nach Inkubation wurden die Monozyten auf einschichtigem Endothel ausgesät und die Adhäsion als Prozentsatz der initial gesäten Zellen erfasst. Die Superoxidfreisetzung des Endothels oder der Monozyten in Lösung wurde mittels Chemilumineszenz bestimmt. Die Sauerstoffradikalfreisetzung wurde durch Phorbol-Myristat-Azetat (PMA) induziert. Teile der Probe wurden mit Angiotensin II (10^{-10} mol/l), Angiotensin II nach Vorinkubation mit Eprosartan (10^{-3} mol/l) oder Lipopolysacchariden (LPS, 10 ng/ml) und PMA (8×10^{-5} mol/l)

stimuliert oder ohne Stimulans belassen. Als chemiluminogenes Substrat wurden 10 µl Lucigenin (2,5 x 10^{-4} mol/l) eingesetzt. Die Lichtausgabe wurde in RLU/s mit einem Luminometer gemessen. Der Spitzenwert der Chemilumeneszenzaktivität wurde als Differenz zwischen stimulierten und unstimulierten Chemilumineszenzsignalen bestimmt. Alle Messungen wurden mindestens doppelt ausgeführt und für die statistische Auswertung wurde auf die Mittelwerte zurückgegriffen.

Ergebnisse - Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie hefteten sich im Vergleich zu gesunden Probanden spontan und nach Stimulation mit Angiotensin II signifikant verstärkt an humane Aortenendothelzellen (HAEC) und humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC)-Monolayer an, tendenziell auch an humane Saphenavenenendothelzellen (HSVEC). Die Adhäsion von Monozyten hypertensiver Patienten an humane Aortenendothelzellen, die mit LPS (Lipopolysacchariden) stimuliert wurden, war in der Patienten- und Kontrollgruppe im Vergleich zur Spontanadhäsion signifikant erhöht. Es fand sich keine statistisch relevante Beziehung zwischen Alter, Geschlecht, systolischem/ diastolischem Blutdruck und der Adhäsion von unstimulierten Monozyten.

Die Spiegel der humanen löslichen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 waren bei Patienten mit arterieller Hypertonie im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe hinsichtlich zirkulierender Mengen an humanem E-Selektin.

Die Chemilumineszenzaktivität postkonfluenter Endothelzellen erhöhte sich nach Stimulation mit Angiotensin II im Vergleich zur Messung ohne vorherige Stimulierung. Die Inkubation mit dem AT_1-Antagonisten Eprosartan vor Stimulation mit Angiotensin II führte zu einer verminderten Chemilumineszenzaktivität.

Die Spitzenwerte, der vor Stimulation mit PMA spontan gemessenen Chemilumineszenzaktivität von Monozyten, unterschieden sich nicht signifikant zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Nach Stimulation mit PMA oder mit

Angiotensin II wurden bei Hypertonikern signifikant höhere Werte für die Chemilumineszenzaktivität gemessen als bei gesunden Kontrollpersonen. Nach Inkubation von Monozyten mit PMA und LPS unterschied sich die Chemilumineszenzaktivität der Patientenmonozyten nicht signifikant von der Chemilumineszenzaktivität der Monozyten von gesunden Probanden.

Schluss - Bisherige Datenerhebungen anderer Arbeitsgruppen zum Adhäsionsverhalten von Monozyten basierten auf Tiermodellen. Die von mir unternommenen Versuche wurden zum ersten Mal an humanen Monozyten und humanen Endothelzellen unternommen. Mit diesen Versuchen wurde ein weiterer Beweis für die Aktivierung der Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie erbracht. Meine Ergebnisse unterstützen die Sicht einer Monozytenbeteiligung an der Pathogenese atherosklerotischer Läsionen, die mit arterieller Hypertonie in Zusammenhang stehen.

Schlagwörter:

Humane Monozyten, Essentielle Hypertonie, Humane Aortenendothelzellen (HAEC), Humane Saphenavenenendothelzellen (HSVEC), Humane Umbilikalarterienendothelzellen (HUAEC), Humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC), Zelladhäsion, Humanes ICAM-1, Humanes VCAM, Humanes E-Selektin, Chemilumineszenz.

Abstract

Introduction – Peripheral blood monocytes are involved in the pathogenesis of atherosclerosis. Liu et al described significantly elevated numbers of activated monocytes in spontaneously hypertensive rats compared to those in normotensive Wistar-Kyoto rats [Liu et al 1996]. Furthermore, the renin-angiotensin-system participates in the development of atherosclerosis, as described by Okamura et al 1999. Strawn et al reported significantly decreased numbers of activated circulating and endothelium adherent monocytes in hypertensive rats following blockage of Angiotensin II subtype 1 (AT_1)-receptors [Strawn et al 1999]. Prior research by our group has shown that, in contrast to a control group, monocytes of patients with arterial hypertension are preactivated [Dörffel et al 1999]. This was proven by increased production of proinflammatory cytokines in the hypertensive patients as compared to controls.

This led us to investigate the adhesion behavior of human peripheral blood monocytes to human vascular endothelial cells and to see whether increased superoxide production in monocytes is present as a further activation marker. We isolated and cultivated human endothelial cells and examined monocytes from patients with arterial hypertension and healthy volunteers to identify possible differences in their adhesion behavior to human aortic endothelial cells (HAEC), saphenous vein endothelial cells (HSVEC), human umbilical veins (HUVEC) and human umbilical arteries (HUAEC). In addition, we determined the human soluble (hs) adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin, and we analyzed superoxide release by human endothelium and human monocytes.

Methods – Peripheral blood monocytes were isolated by density gradient centrifugation and plastic adherence and subsets of the samples were stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 10 ng/ml), Angiotensin II (10^{-10} mol/l), Angiotensin II following preincubation with the AT_1-antagonist eprosartan (10^{-3} mol/l) or left without a stimulant. After incubation, monocytes were seeded onto confluent monolayers of human aortic endothelial cells and the adhesion was determined as the percentage of the initially seeded cells. Oxygen species release was analyzed for endothelium and monocytes in suspension by

chemiluminescence. Reactive oxygen release was induced by phorbol-myristate-acetate (PMA). Subsets of the sample were incubated either with Angiotensin II (10^{-10} mol/l), or with Angiotensin II following preincubation with Eprosartan, or LPS (10 ng/ml) and PMA (8 x 10^{-5} mol/l), or left without a stimulant. 10 µl Lucigenin (2,5 x 10^{-4}) were used as the chemiluminogenic substrate. The resulting light output was recorded in RLU/s in a luminometer. The final peak value was taken as the difference between stimulated and unstimulated chemiluminescence signals. Each measurement was performed at least twice and the mean was used for statistical analysis.

Results – Peripheral blood monocytes of patients with essential hypertension performed a significantly increased spontaneous adhesion and adhesion following stimulation with Angiotensin II to human aortic endothelial cells (HAEC-monolayers) and umbilical vein endothelial cells (HUVEC-monolayers). There was a trend toward increased monocyte adhesion to human saphenous vein endothelial cells (HSVEC) in comparison to healthy volunteers. The adhesion of monocytes from hypertensive patients to human aortic endothelial cells that were stimulated with lipopolysaccharides (LPS) was significantly increased compared to spontaneous adhesion in the patient and control groups. There was no statistically relevant relationship found for measured adhesion of unstimulated monocytes to HUVEC monolayers as well as age, gender, systolic or diastolic blood pressure.

Levels of human soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 were significantly raised in hypertensive patients. There was no significant difference for circulating levels of human soluble E-selectin between patients and controls.

Chemiluminescence activity of post confluent endothelial cells was increased after stimulation with Angiotensin II compared to the measurement before stimulation. Incubation with the AT_1-receptor blocker eprosartan before stimulation with Angiotensin II resulted in a diminished chemiluminescence activity.

Peak values of chemiluminescence activity from monocytes obtained before stimulation with PMA did not differ significantly between the two populations.

Following stimulation with PMA or Angiotensin II, significantly higher chemiluminescence levels were measured in hypertensive patients compared to healthy volunteers. Chemiluminescence activity levels did not differ significantly between the patient and control groups if the monocytes were incubated with PMA and LPS.

Conclusion – Previous data collections of other groups focusing on monocyte adhesion were based upon animal models. Our experiments were performed on human monocytes and human endothelial cells for the first time. These data indicate that monocytes of patients with essential hypertension may be preactivated. My results support the view of a monocyte involvement in the pathogenesis of atherosclerotic lesions that are related to arterial hypertension.

Keywords:

Human monocytes, Essential hypertension, Human aortic endothelial cells (HAEC), Human saphenous vein endothelial cells (HSVEC), Human umbilical artery endothelial cells (HUAEC), Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), Cell adhesion, Human ICAM-1, Human VCAM-1, Human E-Selectin, Chemiluminescence.

Literaturverzeichnis

Aldermann et al 1991 - Aldermann MH, Madhaven S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. New Engl J Med. 1991; *324*: 1098-104.

Aviram et al 1998 - Aviram M, Fuhrman B. LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: Role of prooxidants vs. antioxidants. Mol Cell Biochem. 1998; *188*: 149-59.

Babior 1987 - Babior BM. The respiratory burst oxydase. Trend biochem Sci. 1987; *12*: 241-243.

Bartha 1978 - Bartha GW, Nugent CA. Routine chest roentgenograms and electrocardiograms. Usefulness in the hypertensive workup. Arch Intern Med. 1978; *138*: 1211-1213.

Bevilacqua et al 1989 - Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA. Seed B Endothelial leukocyte adhesion molecule-1. An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. Science. 1989; *243*: 1160-1165.

Black et al 1997 - Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor-alpha from cells. Nature. 1997; *385*: 729-33.

Blann 1998 - Blann AD. Von Willebrandt factor and the endothelium in vascular disease. Br J Biomed Sci. 1993; *50*: 125-134.

Blann and Waite 1996 - Blann AD, Waite MA. von Willebrandt factor and soluble E-selectin in hypertension: influence of treatment and value in predicting the progression of atherosclerosis. Coron-Artery-Dis. 1996; *7(2)*: 143-147.

Blann et al 1994 - Blann AD, Tse W, Maxwell SJR, Waite MA. Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in essential hypertension. J

Hypertension. 1994; *12*: 925-928.

Blumenfeld 2001 - Blumenfeld JD, Laragh JH. Management of hypertensive crises: the scientific basis for treatment decisions. Am J Hypertens. 2001; *14*: 1154-1167.

Braunwald 1997 - Braunwald E. Shattock Lecture - cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. N Engl J Med. 1997; *337*: 1360-1369.

Bulpitt et al 1994 - Bulpitt Ch J, Palmer AJ, Fletcher AE. Optimal blood pressure control in treated hypertensive patients. Report from the Department of Health Hypertension Care Computing Project (DHCCP). Circulation. 1994; *90*: 225-232.

Burt et al 1995 - Burt VL, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D, Whelton P, Brown C, Roccella EJ. Trends in the prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the adult US population. Data from the Health Examination Surveys, 1960 to 1991. Hypertension. 1995; *26*: 60-69.

Carini und Duncia 1988 - Carini DJ. Duncia JV. Angiotensin II receptor blocking imidazoles. Eur Patent Application. 1988; 0253310.

Chalmers et al, WHO-ISH 1999 - Chalmers J et al,1999 WHO-ISH Hypertension Guidelines Committee. 1999 World Health Organization - International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. J Hypertens. 1999; *17*: 151-185.

Chang et al 1995 - Chang MY, Sasahara M, Chait A, Raines EW, Ross R. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. II. Cellular composition and proliferation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995; *15*: 1631-1640.

Chapelsky et al 1998 - Chapelsky M, PharmD, Martin D, Pharm D, Tenero D, PharmD, Ilson B, Boike S, PharmD, Etheredge R, Jorkasky D. A Dose Proportionally Study of Eprosartan in Healthy Male Volunteers. J Clin Pharmacol. 1998; *38*: 34-39.

Cross 1991 - Cross AR, Jones OTG. Enzymic mechanisms of superoxide production. Biochim Biophys Acta. 1991; *1057*: 281-298.

Dansky et al 2001 - Dansky HM, Barlow CB, Lominska C, Sikes JL, Kao C, Weinsaft J, Cybulsky MI, Smith JD. Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 2001; *21(10)*: 1662-1667.

Davies et al 1993 - Davies MJ, Gordon IL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. J Pathol. 1993; *171*: 223-229.

De Caterina et al 1997 - De Caterina R, Basta G, Lazzerini G, et al. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; *17*: 2646-2654.

de Villiers et al 1998 - de Villiers WJS, Smith JD, Miyata M, Dansky HM, Darley E, Gordon S. Macrophage phenotype in mice deficient in both macrophage-colony stimulating factor (op) and apolipoprotein E. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998; *18*: 631-640.

Dechend et al 2003 - Dechend R, Viedt C, Müller D, Ugele B, Brandes R, Wallukat G, Park JK, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer H, Luft F . AT1 Receptor Agonistic Antibodies From Preeclamptic Patients Stimulate NADPH Oxidase. Circulation. 2003; *107*: 1632-1639.

DeLeo et al 1998 - DeLeo F, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss J, Nauseef W. Neutrophils Exposed to Bacterial Lipopolysaccharide Upregulate NADPH Oxidase Assembly. J Clin Invest. 1998; *101*: 455-463.

DeSouza et al 1997 - DeSouza CA, Dengel DR, Macko RF, Cox K, Seals DR. Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. Am J Hypertens. 1997; *10*: 1335-1341.

Diaz et al 1997 - Diaz Mn, Frei B, Vita JA, Keaney JFJr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. N Engl J Med. 1997; *337*: 408-416.

Dina und Jafari 2000 - Dina R, Jafari MI. Angiotensin II - receptor antagonists: an overview. Am J Health Syst Pharm. 2000; *157(13)*: 1231-1241.

DLBB eV - DHG 1999 - Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes e.V., Deutsche Hypertonie Gesellschaft. Merkblatt Empfehlungen zur Hochdruckbehandlung. Auflage 15. Heidelberg, 10.04.2001. 1-23. http://www.paritaet.org/hochdruckliga/medmerk.htm.

Dörffel et al 1999 - Dörffel Y, Lätsch C, Stuhlmüller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR, Scholze J. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. Hypertension. 1999; *34*: 113-117.

Dörffel et al 2001 - Dörffel Y, Franz S, Pruß A, Neumann G, Rohde W, Burmester GR, Scholze J. Preactivated monocytes from hypertensive patients as a factor for atherosclerosis. Atherosclerosis. 2001; *157*: 151-160.

Dörffel et al 2003 - Dörffel Y, Wallukat G, Bochnig N, Homuth V, Herberg M, Dörffel W, Pruss A, Chaoui R, Scholze J. Agonistic AT(1) receptor autoantibodies and monocyte stimulation in hypertensive patients. Am J Hypertens. 2003; 16*(19):* 827-833.

Escargueil-Blanc et al 2001 - Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Vacarese N, Jurgens G, Darblade B, Arnal JF, Parthasarathy S, Negre-Salvayre A. Mildly oxidized LDL induces activation of platelet -derived growth factor beta-receptor pathway. Circulation. 2001; *104(15)*: 1814-1821.

Falcone et al 1991 - Falcone DJ, McCaffrey TA, Vergilio JA. Stimulation of macrophage erokinase expression by polyanions is protein kinase C-dependent and requires protein and RNA synthesis. J Biol Chem. 1991; *266*: 22726-22732.

Fan et al 1993 - Fan J, Shimokama T, Haraoka S, Tokunaga O, Watanabe T. Monocyte-endothelial cell interactions in vitro, with reference to the influence of interleukin-1 and tumor necrosis factor. Biol Cell. 1993; *79*:

17-26.

Fiotti et al 1999 - Fiotti N, Giansante C, Ponte E, et al. Atherosclerosis and inflammation. Patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease. Atherosclerosis. 1999; *145*: 51-60.

Folcik et al 1997 - Folcik VA, Aamir R, Cathcart MK. Cytokine modulation of LDL oxidation by activated human monocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol . 1997; *17*: 1954-1961.

Frick et al 1987 - Frick MH, Elo O, Haapa K. Helsinki heart study: Primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. N Engl J Med. 1987; *31*: 1237-1245.

Frostegard et al 1992 - Frostegard J, Wu R, Giscombe R, Holm G, Lefvert AK, Nilsson J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. Arterioscler Thromb. 1992; *12(4)*: 461-467.

Frostegard et al 1998 - Frostegard J, Wu R, Gillis-Haegerstrand C, Lemne C, de Faire U. Antibodies to endothelial cells in borderline hypertension. Circulation. 1998; *98*: 1092-1098.

Fruebis et al 1997 - Fruebis J, Gonzales V, Silvestre M, Palinski W. Effect of probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1, and M-CSF in the aortic wall of LDL-receptor deficient rabbits during early atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; *17*: 1289-1302.

Fukai et al 1998 - Fukai T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. J Clin Invest. 1998; *101*: 2101-2111.

Fukai et al 1999 - Fukai T,Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. Circ Res. 1999; *85*: 23-28.

Fukui et al 1997 - Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q 4th, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK.

p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. Circ Res. 1997; *80*: 45-51.

Geng und Libby 1995 - Geng Y-J, Libby P. Evidence of apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin-1beta-converting enzyme. Am J Pathol. 1995; *147*: 251-266.

Gerszten et al 1999 - Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. Nature. 1999; *398*: 718-723.

Giachelli et al 1998 - Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. Am J Path. 1998; *152*: 353-358.

Griendling et al 1994 - Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured smooth muscle cells. Circ Res. 1994; *74*: 1141-1148.

Griendling et al 1997 - Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. Circulation. 1997; *96*: 3264-3265.

Griendling et al 2000 - Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res. 2000; *86*: 494-501.

Hahn et al 1994 - Hahn AWA, Jonas F, Bühler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral blood monocytes by angiotensin II. FEBS Lett. 1994; *347*: 178-180.

Hajjar und Haberland 1997 - Hajjar DP, Haberland ME. Lipoprotein trafficking in vascular cells: molecular Trojan horses and cellular saboteurs. J Biol Chem. 1997; *272*: 22975-22978.

Hansson et al 1989 - Hansson GK, Jansson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. Arteriosclerosis. 1989; *9*: 567-578.

Hansson et al 1998 - Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlof B,

Elmfeldt D, Julius S, Menard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. Lancet. 1998; *351*: 1755-1762.

Hansson et al 1999 - Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmaki K, Dahlof B, de Faire U, Morlin C, Karlberg BE, Wester PO, Bjorck JE. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. Lancet. *353*: 1999; 611-616.

Hedner 1999 - Hedner T. Management of hypertension: the advent of a new angiotensin II receptor antagonist. J Hypertens Suppl. 1999 Jun; *17 (2)*: S21-5.

Hedner 2002 - Hedner T. The clinical profile of the angiotensin II receptor blocker eprosartan. Journal of Hypertension. 2002; *20(suppl 5)*: S33-S38.

Heinonen et al 1994 - Heinonen OP, HuttunenJK, Manninen V. The Helsinki heart study: Coronary heart disease incidence during extended follow up. J Intern Med. 1994; *235*: 41-49.

Hennekens et al 1996 - Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, et al. Lack of effect of longterm supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. N Engl J Med. 1996; *334*: 1145-1149.

Herren et al 1997 - Herren B, Raines EW, Ross R. Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vitro. FASEB J. 1997; *11*: 173-180.

Hogeson und Fridovich 1997 - Hodgeson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. Biochemistry. 1975; *14*: 5294-5299.

Hollenbaugh et al 1995 - Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, et al.

Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. J Exp Med. 1995; *182*: 33-40.

HOPE Investigators 2000 - Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events inhigh risk patients. N Engl J Med. 2000; *342*: 145-153.

Hwang et al 1997 - Hwang S-J, Ballantyre CM, Sharrett AR, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-Selektin in carotid atherosclerosis and incident coronary artery disease cases: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Circulation. 1997; *96*: 4219-4225.

Jackson et al 1997 - Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, et al. Specificity of detection of Chlamydia pneumoniae in cardiovascular atheroma : evaluation of the innocent bystander hypothesis. Am J Pathol . 1997; *150*: 1785-1790.

Jaffe et al 1973 - Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J Clin Invest. 1973; *52*: 2745-2756.

Jelinek et al 1987 - Jelinek DF, Lipsky PE. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-alpha and interleucin-1. J Immunol. 1987; *139*: 2970-2976.

Jimenez et al 2001 - Jimenez A, Arriero MM, Lopez-Blaya A, Gonzalez-Fernandez F, Garcia R, Fortes J, Millas I, Velasco S, de Miguel LS, Rico L, Farre J, Cascado S, Lopez-Farre A. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in the vascular wall and in mononuclear cells from hypercholesterolemic rabbits. Circulation. 2001; *104(15)*: 1822-1830.

Kahan et al 1997 - Kahan T, Lindquist M, Nussberger J, Melcher A, Hjemdahl P. Plasma angiotensins and human forearm circulation: effects of sympatho-adrenal activation. Acta Physiol Scand. 1997; *159*: 107-111.

Khoo et al 1992 - Khoo JC, Miller E, Pio F, Steinberg D, Witzum JL. Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. Arteriolar Thromb. 1992; *12*: 1258-1266.

Kim and Iwao 2000 - Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II - mediated cardiovascular and renal diseases. Pharmacol Rev. 2000; *52*: 11-34.

Kitahora et al 1988 - Kitahora T, Suzuki K, Asakura, Yoshida T, Suematsu M, Watanabe M, Aiso S, Tsuchiya M. Active Oxygen Species Generated by Monocytes and Polymorphonuclear Cells in Crohn´s Disease. Digestive Diseases and Sciences. 1988; *8*: 951-955.

Klose 1996 - Klose G. Wirksamkeit lipidsenkender Intervention für die Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen. Klinikarzt. 1996; *5/25*: 147-150.

Kricka 1993 - Kricka L. Ultrasensitive Immunoassay Techniques. Clin Biochem. 1993; *26(5)*: 325-31.

Lacy et al 1998 - Lacy F, O´Connor DT, Schmid-Schönbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensive and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. J Hypertens. 1998; *16*: 291-303.

Laragh 1993 - Laragh JH. The renin system: a new understanding of the complications of hypertension and their treatment. Drug Res. 1993; *43*: 247-254.

Laursen et al 1997 - Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin-II induced but not catecholamine-induced hypertension. Circulation. 1997; *95*: 588-593.

Legrand-Poels et al 1997 - Legrand-Poels S, Maniglia S, Boelaert J, Piette J. Activation of the Transcription Factor NF-kB in Lipopolysaccharide-Stimulated U937 Cells . Biochem Pharmacol. 1997; *53(3)*: 339-346.

Leonard und Yoshimura 1990 - Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Immunol Today. 1990; *11*: 97-101.

Levine et al 1995 - Levine GN, Keaney JF Jr, Vita JR. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. N Engl J Med. 1995; *332(8)*: 512-521.

Li et al 2003 - Li JM, Shah A. Mechanism of Endothelial Cell NADPH Oxidase Activation by Angiotensin II. JBC. 2003; *14*: 12094-12100.

Libby et al 1997 - Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. Circulation. 1997; *96*: 4095-4103.

Liu et al 1996 - Liu Y, Liu T, McCarron R, Spatz M, Feuerstein G, Hallenbeck J, Sirén A-L. Evidence for activation of endothelium and monocytes in hypertensive rats. Am J Physiol. 1996; *270*: H2125-H2131.

LRCP 1984 - The Lipid Research Clinics Program. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results: I. Reduction in incidence of coronary heart disease. JAMA. 1984; *251*: 351-364.

Luhm et al 1997 - Luhm J, Kirchner H, Rink L. One way synergistic effect of low superantigen concentrations on lipopolysaccharide induced cytokine production. J Interferon Cytokine Res. 1997; *17*: 229-238.

Lüscher et al 1995 - Lüscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of endothelium as a target and mediator. Atherosclerosis. 1995; *118*: S81-S90.

Mach et al 1997 - Mach F, Schönbeck U, Bonnfoy J-Y, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. Circulation. 1997; *96*: 396-399.

Mach et al 1998 - Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling. Nature. 1998; *394*: 200-203.

MacMahon et al 1990 - MacMahan S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. Blood pressure, stroke,

and coronary heart disease. Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. Lancet. 1990; *335*: 765-774.

Mancia et al 1993 - Mancia G, Di Rienzo M, Parati G. Ambulatory blood pressure monitoring use in hypertension research and clinical practice. Hypertension. 1993; *21*: 510-524.

Marklund 1992 - Marklund SL. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. J Biol Chem. 1992; *267*: 6696-6701.

McCarron et al 1994 - McCarron RM, Wang L, Siren AL, Spatz M, Halenbeck JM. Monocyte adhesion to cerebmicrovascular endothelial cells. Am J Physiol. 1994; *267*: H2491-H2497.

Mensah 2002 - Mensah G. The global burden of hypertension: good news and bad news. Cardiology Clinics. 2002; *20(2)*: 181-185.

Middecke 1998 - Middecke M. Ambulante 24 - Stunden - Blutdruckmessung (ABDM). Dtsch Med Wschr. 1998; *123*: 1426-1430.

Muller et al 1993 - Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leucocytes. J Exp Med. 1993; *178*: 449-460.

Murray et al 1996 - Murray CJL, Lopez AD, eds. Hrsg.: World Health Organization: The Global Burden of Disease. A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Auflage 1. Cambridge, MA, Harvard University Press, 1996.

Nagel et al 1994 - Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr, Gimbrone MA, Jr . Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molcule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. J Clin Invest. 1994; *94*: 885-891.

Nauseef 1990 - Nauseef WM. Myeloperoxidase deficiency. Hematol Pathol.

1990; *4*: 165-178.

Okamura et al 1999 - Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagati Y, Takiuchi S, Moriguchi K, Fenessy P, Higaki J, Ogihara. Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. Journal of Hypertension. 1999; *17*: 537-545.

Omenn et al 1996 - Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. N Engl J Med. 1996; *334*: 1150-1155.

Oparil 2002 - Oparil S. Are there meaningful differences in blood pressure control with current antihypertensive agents. AJH. 2002; *15*: 14S-21S.

Oury et al 1997 - Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. Lab Invest. 1996; *271*: 23317-23321.

Pagano et al 1998 - Pagano P, Chanock S, Siwik D, Colucci W, Clark J. Angiotensin II Induces p67phox mRNA Expression and NADPH Oxidase Superoxide Generation in Rabbit Aortic Adventitial Fibroblasts. Hypertension. 1998; *32*: 331-337.

Peters 2002 - Peters H, Baldwin M, Clarke M. The utility of laboratory data in the evaluation of the asymptomatic hypertensive patient. Ann Emerg Med. 2002; *40*: S48.

Plosker und Foster 2000 - Plosker GL, Foster RH. Eprosartan: a review of its use in the management of hypertension. Drugs. 2000; *60(1)*: 177-201.

Prospective Studies Collaboration 1995 - Prospective Studies Collaboration 1995. Cholesterol diastolic blood pressure and stroke: 13 000 strokes in 45 000 people in 45 prospective cohorts. Lancet. 1995; *346*: 1647-1653.

Pueyo et al 1998 - Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel J-B. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. Am J Physiol. 1998; *274*: C214-C220.

Qiao et al 1997 - Qiao J-H, Tripathi J, Mishra NK, et al. Role of macrophage

colony stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. Am J Pathol. 1997; *150*: 1687-1699.

Rajagopalan 1996 - Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II - mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/ NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. J Clin Invest. 1996; *97*: 1916-1923.

Rajavashisth et al 1990 - Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony - stimulating factors by modified low-density lipoproteins. Nature. 1990; *344*: 254-257.

Reaven et al 1993 - Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans: protection of LDL by vitamin E but not beta-carotene. Arterioscler Thromb. 1993; *13*: 590-600.

Rey et al 2001 - Rey F, Cifuentes M, Kiarash A, Quinn M, Pagano P. Novel competitive inhibitor of NAD (P) H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice. Circ Res. 2001; *89*: 408-414.

Rimm et al 1993 - Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. N Engl J Med. 1993; *328*: 1450-1456.

Rosenfeld and Ross 1990 - Rosenfeld ME, Ross R. Macrophage and smooth muscle proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. Atherosclerosis. 1990; *10*: 680-687.

Ross 1993 - Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature. 1993; *362*: 801-809.

Ross 1999 - Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. New Engl J Med. 1999; *340*: 115-126.

Ross et al 1973 - Ross R, Glomsett JA. Atherosclerosis and the arterial smooth

muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. Science. 1973; *180*: 1332-1339.

Rückert-Dörffel et al 1996 - Rückert-Dörffel Y, Schindler U, Heinig T, Nikolaus S, Raedler A, Schreiber S. IL-4 signaling mechanisms in inflammatory bowel disease mononuclear phagocytes. Inflamm Bowel Dis. 1996; *2*: 244-252.

Rueckschloss et al 2001 - Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H. Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells - Antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy. Circulation. 2001; *104(15)*: 1767-1772.

Sasahara et al 1994 - Sasahara M, Raines EW, Chait A, et al. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation. J Clin Invest. 1994; *94*: 155-164.

Sasaki et al 1987 - Sasaki DT, Dumas SE, Engleman EG. Discrimination of viable and nonviable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. Cytometry. 1987; *8*: 413-420.

Schiffrin 2002 - Schiffrin EL, Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Multidisciplinary Research Group on Hypertension. Beyond blood pressure: The endothelium and atherosclerosis progression. AJH. 2002; *15*: 115S-122S.

Scholze 1999 - Scholze J. Hypertonie. Auflage 2. Berlin, Blackwell Wissenschaftsverlag, 1999. Seiten 3,11,37. ISBN: 3-89412-393-1.

Schönbeck et al 1997a - Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture. Circ Res. 1997; *81*: 448-454.

Schönbeck et al 1997b - Schönbeck U, Mach F, Bonnefoy J-Y, Loppnow H, Flad H-D, Libby P. Ligation of CD40 activates interleukin-1beta-

converting enzyme (caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin-1beta. J Biol Chem. 1997; *272*: 19569-19574.

Schrader 1995 - Schrader J. Prognostische Bedeutung der 24-Stunden-Langzeitblutdruckmessung. Nieren- und Hochdruckkrankheiten. 1995; *24*: 640-644.

Shen et al 1995 - Shen K, De Lano FA, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. Circulating leucocyte counts, activation, and degranulation in Dahl hypertensive rats. Circ Res. 1995; *76*: 276-283.

Shepherd et al 1995 - Shepherd J, Cobbe SM, Ford I for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group . Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. N Engl J Med. 1995; *333*: 1301-1307.

Simon et al 1995 - Simon A, Levenson J. Stratification of vascular risk in hypertension and therapeutic perspective. Am J Hypertens. 1995; *8*: 45S-48S.

Slama et al 2002 - Slama M, Susic D, Frohlich E. Prevention of hypertension. Current Opinion in Cardiology. 2002; *17*: 531-536.

Sleight P et al 2001 - Sleight P, Yusuf S, Pogue J, Tsuyuki R, Diaz R, Probstfield J, for the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. Blood-pressure reduction and cardiovascular risk in HOPE study. Lancet. 2001; *358*: 2130-2131.

Smalley et al 1996 - Smalley DM, Lin JH-C, Curtis ML, Kobari Y, Stemerman MB, Pritchard Jr KA. Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1. Arteroscler Thromb Vasc Biol. 1996; *16*: 585-590.

SSSS Group 1994 - Scandinavian Simvastatin Survival Group. Randomized Trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4 S). Lancet. 1994; *344*: 1383-1389.

Stampfer et al 1993 - Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. N Engl J Med. 1993; *328*: 1444-1449.

Staunton et al 1988 - Staunton DE, Marlin SD, Stratiwa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. Cell. 1988; *52(6)*: 925-933.

Steinberg 1997 - Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J Biol Chem. 1997; *272*: 20963-20966.

Stemme et al 1995 - Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witzum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; *92*: 3893-3897.

Stephens et al 1996 - Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study. Lancet. 1996; *347*: 781-786.

Stralin et al 1995 - Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains large amounts of extracellular superoxide dismutase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995; *15*: 2032-2036.

Strawn et al 1999 - Strawn WB, Gallagher PE, Tallant EA, Ganten D, Ferrario CM. Angiotensin II AT1-receptor blockade inhibits monocyte activation and adherence in transgenic (mRen2)27 rats. J Cardiovasc Pharmacol. 1999; *33(3)*: 341-351.

Swei et al 1997 - Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schönbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. Hypertension. 1997; *30*: 1628-1633.

Swerlick et al 1992 - Swerlick RA, Lee KH, Li L-J, Sepp NT, Caughman SW, Lawley TJ. Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human

dermal microvascular cells. J Immunol. 1992; *149(2)*: 698-705.

Tenero et al 1998 - Tenero D, Martin D, Ilson B, Boyle D, Boike S, Carr A, Lundberg D, Jorkasky D. Effect of Ranitidine on the Pharmacokinetics of Orally Administered Eprosartan, an Angiotensin II Antagonist, in Healthy Male Volunteers. Ann Pharmacother. 1998; *32*: 304-308.

Tribble et al 1997 - Tribble DL, Gong EL, Leeuwenburgh C, Heinecke JW, Carlson EL, Verstuyft JG, Epstein CJ. Fatty streak formation in fat-fed mice expressing human copper-zinc superoxide dismutase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; *17*: 1734-1740 und 3363 [erratum] .

Tummala et al 1999 - Tummala PE, Chen X - L, Sundell CL, et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature. Circulation. 1999; *100*: 1223-1229.

Ushio-Fukai et al 1999 - Ushio-Fukai M, Alexander R, Akers M, Yin Q, Fujiyo Y, Walsh K, Griendling K. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt / proteinkinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 1999; *274*: 22699-22704.

Vaddi et al 1994 - Vaddi K, Nicolini FA, Mehta P, Mehta JL. Increased Secretion of Tumor Necrosis Factor-alpha and Interferon-gamma by mononuclear Leucocytes in Patients with Ischemic Heart Disease - Relevance in Superoxide Anion Generation. Circulation. 1994; *90*: 694-699.

van de Stolpe et al 1996 - van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. J Mol Med. 1996; *74(1)*: 13-33.

Vanhoutte und Boulanger 1995 - Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium - dependent responses in hypertension. Hypertens Res. 1995; *18*: 87-98.

Violi et al 1996 - Violi F, Criqui M, Longoni A, Castiglioni C, the A.D.E.P. Group. Relation between risk factors and cardiovascular complications in patients with peripheral vascular disease. Results from the A.D.E.P. study. Atherosclerosis. 1996; *120*: 25-35.

Wang et al 2001 - Wang H, Xu S, Johns D, Du Y, Quinn M, Cayatte A, Cohen

R. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to Angiotensin II in mice. Circ Res. 2001; *88*: 88947-88953.

Watanabe et al 1998 - Watanabe T, Fan J. Atherosclerosis and inflammation mononulear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis. Int J Cardiol. 1998; *66*: 45-53.

Wick et al 1995 - Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease. Immunol Today. 1995; *16*: 27-33.

Wick et al 1997 - Wick G, Romen M, Amberger A, et al. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. FASEB J. 1997; *11*: 1199-1207.

Wiklund et al 1997 - Wiklund I, Halling K, Ryden - Bergsten T. Bessert sich durch eine Blutsrucksenkung die Befindlichkeit eines Hypertonikers? Ergebnisse der HOT - Studie (Hypertension Optimal Treatment Study) hinsichtlich der Lebensqualität. Blood Pressure. 1997; *6*: 357-364.

Yim et al 1990 - Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Copper, zinc superoxide dismutase catalyses hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; *87*: 5006-5010.

Ylä-Herttuala et al 1989 - Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. J Clin Invest. 1989; *84*: 1086-1095.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Jürgen Scholze und Frau PD Oberärztin Dr. med. Yvonne Dörffel gilt mein besonderer und herzlicher Dank, dass ich unter ihrer Betreuung diese Promotionsarbeit anfertigen konnte. Besonders danke ich für die gelungene Kombination aus gewährter Freiheit und engagierter, fachlicher und vor allem auch persönlicher Unterstützung.

Auch der Arbeitsgruppe um Professor Scholze danke ich sehr für den interessanten Austausch, Anregungen und gegenseitige Hilfe. Insbesondere gilt mein Dank Stephanie Franz für die gute Einführung in das Labor.

Dem Team der Abteilung Transfusionsmedizin gilt mein herzlicher Dank für die gute und fröhliche Zusammenarbeit und Unterstützung im Ida-Simon-Haus. Ich danke auch sehr für die großzügige Überlassung des Laborraums und verschiedener Geräte.

Herrn Oberarzt Dr. med. Ralph Rückert danke ich sehr für die kompetente Hilfe und persönliche Betreuung bei der Aufbereitung und Präparation der Saphenavenen.

Herrn Dr. med. Müller danke ich ebenfalls sehr für die Bereitstellung von Venenpräparaten.

Frau Evelin Schwarzer und Herrn Dietmar Zaiss danke ich für ihre Hinweise zur Durchführung der Chemilumineszenzmessungen.

Meinen Eltern und Freunden danke ich für ihre unermüdliche seelische Unterstützung und Motivation zur Fertigstellung dieser Promotionsarbeit.

Wissenschaftliche Publikationen

G. Neumann, N. Bochnig, U. Ungethüm, Y. Dörffel. Increased oxygen radical production in human monocytes of hypertensive patients. 10th European Students Conference Abstract Book.1999; NH09:205

Y. Dörffel, G. Neumann, N. Bochnig, A. Pruß, J. Scholze. Enhanced adhesion of monocytes from hypertensive patients to human aortic endothelial cells. Dtsch. med. Wschr.1999(124);45(Suppl3):S79

Y. Dörffel, G. Neumann, N. Bochnig, U. Ungethüm, A. Pruß, J. Scholze. Increased oxygen radical production in human monocytes of hypertensive patients. Dtsch. med. Wschr.1999(124); 45(Suppl3):S80

Y. Dörffel, S. Franz, A. Pruß, G. Neumann, W. Rohde, G. Burmester, J. Scholze. Preactivated monocytes from hypertensive patients as a factor of atherosclerosis. Atherosclerosis. 2001 Jul;157(1):151-160

G. Neumann, J. Rosato, D. Kacher, A. Splitthoff, G. Li, P. Lang. Cartilage Imaging of the Knee at Low Field Strength (0.5 T): Use of a 3-point DIXON Gradient – Echo Sequence. Radiology 2002;225(P):329

P. Lang, L. Zhao, S. Warfield, G. Neumann, A. Mewes, D. Kacher, C. Winalski, M. Liang, E. Karlson, D. Felson, J.N. Katz, F. Jolesz. Cartilage MR Imaging at 3.0 T: Comparison of 3D SPGR, 3D MFAST and 3D FSE Sequences. OMERACT meeting book of abstracts Nov 2002;3p

K. Stevens, C. Tao, S.–U.Lee, N. Salem, J. Vandevenne, C. Cheng, G. Neumann, A. Valentin - Opran, P. Lang. Detection of subchondral fractures in osteonecrosis of the femoral head: Comparison of unenhanced radiography, CT and MRI. Am J Roentgenol 2003;180:363-368

G. Neumann, M. Duran - Mendicuti, A. Splitthoff, C. Winalski, P. Lang. Imaging of the articular cartilage in the hip: Use of high resolution MR arthrography. Eur Radiol 2003 Feb;13 Suppl 1:227

A. Splitthoff, G. Neumann, C. Winalski, P. Lang. MRI Geyser sign: an indication of erosion of the acromioclavicular joint capsule in conjunction with rotator cuff tears. Eur Radiol 2003 Feb;13 Suppl 1:298

G. Neumann, L. Zhao, H. Yoshioka, S. Warfield, C. Winalski, P. Lang. Cartilage Imaging: Comparison of standard 3D SPGR, water-selective spatial spectral 3D SPGR and 3D steady state free precession techniques. Radiology 2003;229(P):396

J. Duryea, A. Finckh, P. DePablo, F. Wolfe, G. Neumann. Reproducibility of Software Measured Joint Space Width on Digital Hand Radiographs. Arthritis and Rheumatism 2003;48:S537

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Boston, den 30. Dezember 2003