

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

In jüngster Zeit wurde die pathophysiologische Bedeutung aktiver Sauerstoffspezies in der Entwicklung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen vermehrt belegt (ROESEN *et al.* (2001)), so dass unter therapeutischen Gesichtspunkten wachsendes Interesse an antioxidativen Eigenschaften von Arzneistoffen besteht, d.h. der Fähigkeit, die reaktiven Sauerstoffspezies chemisch zu neutralisieren bzw. ihren Entstehungsprozess zu verhindern.

Unter diesem Gesichtspunkt können auch die Wirkungen der Kalziumkanal- Antagonisten vom Dihydropyridintyp betrachtet werden. Sie stellen eine Gruppe von gefäßwirksamen Medikamenten dar, die eine bedeutende Rolle bei der Behandlung der Hypertonie und der Atherosklerose spielen. Dabei führen sie durch spezifische Hemmung spannungsabhängiger Kalziumkanäle zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (FLECKENSTEIN (1969)). Obwohl dieser Wirkmechanismus bekannt und mechanistisch erforscht ist, zeigen sie weitere, davon unabhängige Effekte z.B. an Thrombozyten und endothelialen Zellen, die nicht über den Subtyp der Kalziumkanäle verfügen (sog. L-Typ), an denen die Pharmaka interagieren (BERKELS (2000)). Somit werden Signalwege und Mechanismen gesucht, um diese zusätzlichen Wirkungen zu erklären, die im Gesamtwirkprofil ebenfalls große Relevanz besitzen können:

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Dihydropyridine über einen Bradykinin vermittelten Mechanismus in Endothelzellen die Produktion des gefäßdilatierenden ‚endothelial derived relaxing factor‘ (EDRF = Stickstoffmonoxid (NO)) anregen können (ZHANG (2000)). Darüber hinaus kann in Zellkulturen gezeigt werden, dass nach Applikation von Kalziumkanalblockern die Expression der Kalzium- abhängigen ‚Nitric Oxide Synthase‘ (NOS) signifikant erhöht wird (DING (1998)).

Für Superoxid- Anionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ist von den DHP in anderen Modellen sowohl eine Hemmung der Bildung wie in isolierten glatten Muskelzellen (BROKOVICH (2001)) als auch eine direkte abfangende (‚scavenging‘) Wirkung z.B. in Endothelzellen nachgewiesen worden (HISHIKAWA und LUSCHER (1998)).

Demgegenüber konnten in ‚*in vitro*‘ Testsystemen die unmittelbaren antioxidativen Eigenschaften nur in therapeutisch nicht relevanten, hohen millimolaren Konzentrationsbereichen nachgewiesen werden (LUPO (1994), HERRLITZ (1998), BARTELS (2000)). Diese Effekte könnten in Lipidstrukturen biologischer Membranen therapeutisch bedeutsam sein, da sich amphiphile Pharmaka wie die DHP durch polare Molekülgruppen bedingt speziell orientiert in synthetische Bi-

layer einlagern und entsprechend ihrer Lipophilie stark anreichern (HERBETTE *et al.* (1989), HERBETTE *et al.* (1991)).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass in Gegenwart von definierten Phospholipidmembranen multilamellarer Vesikel die antioxidativ wirksame Grenzkonzentration der Dihydropyridine um bis zu 3 bis 5 Zehnerpotenzen im Vergleich zu rein wässrigen Systemen erniedrigt werden kann, so dass im therapeutischen, submikromolaren Konzentrationsbereich radikalabfangende Wirkungen auftreten. In diesen Experimenten ist eine Korrelation zwischen Lipophilie (Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient, $\log p_{o/w}$) und antioxidativem Potential erkennbar (BARTELS (2000), BREITENBACH (2001)).

Liposomen oder lamellar aufgebaute Vesikel dienen im zunehmenden Maße als relativ einfaches Modell zur Überprüfung von Theorien über Zellmembranen, ihr Verhalten und ihre Beständigkeit. Mit Hilfe der differentiellen kalorimetrischen Analyse können Phasenübergangstemperaturen bzw. –enthalpien und damit Aussagen über die Integrität verschiedener Bilayer-Systeme erhalten werden. Im Verteilungssystem von Alkoholen (verschiedene Kettenlänge) in DPPC- Vesikel bestimmten LOBBECKE und CEVC (1995) über die Bildungsenthalpien eine relative Stabilität der Mischsysteme. Diese Ergebnisse stimmen z.B. mit molekulardynamischen Monte Carlo Simulationen überein, die in diesen Systemen durchgeführt wurden (CHIU (1995), TENCHOV (1996)). Ebenso gelang es, die Eigenschaften von Cholesterol/ DMPC- Bilayersystemen in Gegenwart eines anästhetisch wirkenden Steroid mittels DSC und Röntgenbeugung zu charakterisieren, wobei eine Stabilitätserhöhung des Systems postuliert wurde (MAVROMOUSTAKOS *et al.* (1994)). Analog konnte durch Röntgenbeugungs- und Lichtstreuexperimente die Orientierung und Einlagerung ausgewählter Kalzium-Antagonisten in synthetischen Bilayern (DMPC) analysiert werden und eine Korrelation der Affinität zu den Membranen mit steigendem Molverhältnis Cholesterol/ Lipid belegt werden (HERBETTE *et al.* (1991)).

Biologische Membranen enthalten ca. 20 – 30% Cholesterol (PIKE (2003)) und darüber hinaus eine Vielzahl an Proteinen, die nicht homogen in der Membran verteilt sind. Zur Beeinflussung der physiologischen und pathophysiologischen Signaltransduktion über die Cholesterolkonzentrationen wird immer wieder die Modulation von Enzym-, Protein- und Rezeptorsystemen durch sog. ‚Lipid-Rafts‘ diskutiert, die cholesterolreiche Mikrodomänen in Zellmembranen von höherem Ordnungsgrad („liquid ordered“) darstellen. So ist ihre Rolle in der Genese der Atherosklerose und in der Aktivitätserhöhung von Superoxidanionen- produzierender NADPH-Oxidase, aber auch ihr inhibierender Effekt auf die endotheliale Stickstoffmonoxid- Synthase (eNOS) beschrieben und z.T. auch quantifiziert worden (GOLIGORSKY *et al.* (2002), MASON und JACOB (2003)).

Wenn sich folglich Arzneimittel in hohen Konzentrationen in die Phospholipidmembranen einlagern, ist gleichzeitig mit einer starken Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der Bilayer wie Phasenübergänge, Bindungsenthalpien, Ordnungszustände etc. zu rechnen. Diese Beeinflussung scheint jedoch nicht immer eine zuverlässige Aussage über die effektive Stabilität gegenüber mechanisch wirkenden Kräften zu geben.

So wurde die relativ starre Zellmembrane von roten Blutkörperchen unter Einfluss verschiedener Detergentien (kurzkettige Alkohole, membranaktive Pharmaka) gegenüber Ansaugdruck oder elektrisch deformierenden Kräften weiter verfestigt (HEINRICH *et al.* (2001), SVETINA *et al.* (2001)). Diese Technik der sog. ‚Pipette Aspiration‘ (Pipetten- Ansaug Technik) wurden auch bei großen Lipidvesikeln eingesetzt und führte zur Charakterisierung der Wasserpermeabilität (OLBRICH *et al.* (2000)) sowie zu Aussagen über den Einfluss der Kettenlänge der Lecithine oder auch zusätzlicher Detergentien auf physikalischen Parameter der vesikulären Membranen wie Biegeelastizität oder Flächenkompressionsmodul (EVANS *et al.* (2003), RAWICZ *et al.* (2000)). Dennoch existieren bisher keine Daten, die die membranären Interaktionen der antihypertensiv wirksamen Pharmaka in Bezug zu ihren stabilitätsverändernden Wirkungen auf die Bilayerstrukturen stellen. Ferner ist noch nicht untersucht worden, ob ein Effekt der DHP auf Zellmembranen existiert oder die Einlagerungen der Pharmaka im Vergleich zu den vielfältigen Einflüssen des Multikomponentensystems der biologischen Membran eine Relevanz besitzt. Ebenso wenig ist bekannt, ob sich pathophysiologische Zustände auf die Stabilität von Zellmembranen auswirken und welcher Einfluss der antihypertensiven Pharmaka in solch einem vorgeschädigten System entsteht.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen daher zwei Hauptaspekte bearbeitet werden:

Einerseits sollen antioxidative, also radikalabfangende Wirkungen der Substanzen charakterisiert werden, andererseits sollen die Effekte auf physikochemische Parameter von synthetischen Bilayermembranen bestimmt werden, die durch Interaktion mit den Pharmaka resultieren. Abschließend soll dann eine Untersuchung der Membranstabilitäten im biologischen Modell erfolgen, die die Bewertung der unterschiedlichen Ausprägung der antioxidativen und physikochemischen membranären Komponenten in dem biologischen System ermöglicht.

Dazu sind folgende Schritte geplant:

1. Die radikalabfangende Wirkung der Dihydropyridin- Kalzium-Antagonisten soll in Gegenwart von membranären Strukturen (Lipidvesikel) im Vergleich zu anderen antihypertensiv

wirkenden Substanzen (ACE- Hemmer: ‚Angiotensin conversion- enzyme’- Inhibitoren) systematisch überprüft und quantifiziert werden.

Da als Maß für eine Zellmembranschädigung vielfach Malondialdehyd angesehen wird, das ein Endprodukt der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren darstellt, soll deren Oxidationsbeständigkeit in radikalgenerierenden Systemen unter dem Einfluss ausgewählter Pharmaka im Vergleich zu Referenzsubstanzen beurteilt werden, wobei der Gegenwart von Membranen besondere Beachtung finden.

Dazu ist die Etablierung eines analytischen Protokolls nötig, um die Pharmaka resp. die ungesättigten Fettsäuren und ihrer Einlagerung nachzuweisen sowie die Edukte und Produkte zu quantifizieren.

2. Mittels kalorimetrischer Methoden erfolgt für die synthetischen Bilayerschichten eine Bewertung der Beeinflussung physikochemischer Parameter (Temperaturen der Phasenübergänge, Umwandlungsenthalpien, Affinitätsenthalpien) in Anwesenheit der ausgewählten Substanzen.

An geeigneten unilamellaren Vesikeln soll ermittelt werden, ob Veränderungen der mechanischen Eigenschaften (Stabilität, Rigidität etc.) durch die Anwesenheit der amphiphilen Pharmaka hervorgerufen werden, hierzu sind für die Methode entsprechend modifizierte Vesikel herzustellen.

3. Diese Ergebnisse sind an biologischen Membranen bzw. auf Ebene von intakten Zellen zu verifizieren. An einem geeigneten pathologisch analogen Zellmodell ist zu prüfen, ob sich auf Ebene der Zellmembran den Ergebnissen des synthetischen Bilayermodells entsprechende Veränderungen ergeben und inwieweit diese durch die Gegenwart der Pharmaka beeinflusst werden. Als Modell soll dazu die Inkubation von endothelialen Zellen mit hohen D-Glucose Konzentrationen verwendet werden, wie sie bei schlecht eingestelltem Diabetes Mellitus vorliegt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Gefäßendothel und seine Funktionsstörung (endotheliale Dysfunktion)

2.1.1 Grundlagen zur Funktion des Gefäßendothels

In den letzten zwei Dekaden wurde erkannt, dass das Gefäßendothel, die dem Blut zugewandte Auskleidung der Gefäße, eine zentrale Rolle sowohl bei der Regulation des Gefäßtonus als auch bei der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen spielt. Es wird inzwischen als eines der ‚größten Organe‘ des Körpers mit vielfältigen auto- und parakrinen Funktionen angesehen (HINK *et al.* (2001)).

In diesem Zusammenhang war die Entdeckung einer speziell von diesem Gewebe ausgeschütteten Substanz wichtig, der ‚endothelium derived relaxing factor‘ (EDRF, FURCHGOTT und ZAWADZKI (1980)). Der später als Stickstoffmonoxid (NO) identifizierte Faktor (IGNARRO *et al.* (1987)) ist maßgeblich verantwortlich für die Endothel- vermittelten Funktionen. Die wichtigsten Aufgaben bestehen darin, dass die Thrombozytenaggregation an den Gefäßwänden verhindert wird und somit der stetige Blutfluss garantiert ist, weiterhin stellt das Endothel eine effektive und selektive Barriere dar, die aktiv zu Transportprozessen beiträgt. Seine Zellen erkennen z.B. verschiedene Faktoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone) und können dies in eine Reizantwort umsetzen, gleichzeitig ist das Endothel ein Signalgeber der durch Ausschüttung von Substanzen wie Stickstoffmonoxid, Endothelin, Angiotensin etc. selbst in die Gefäßregulation eingreifen kann. Das Endothel kann somit einige der potentesten vasodilatatorisch wirkenden Verbindungen wie Stickstoffmonoxid und Prostazyklin freisetzen, andererseits stellen Endothelin-1 und das auf der Oberfläche des Endothels gebildete Angiotensin II sowie das PDGF starke Vasokonstriktoren dar (CAI und HARRISON (2000)).

Normalerweise proliferieren die Zellen der Gefäßwand nicht, es kommt jedoch nach einer Verletzung oder einer Entfernung von Teilen des Endothels zu einem Proliferationsschub vor allem bei den anliegenden glatten Muskelzellen. Hierbei unterscheiden sich die in der Folge ablaufenden Vorgänge nicht sehr von den Stadien, die in späten atherosklerotischen Plaques vorliegen (ROSS und GLOMSET (1976), TOUYZ (2004)).

2.1.2 Endotheliale Dysfunktion: Ursachen und Folgen

In den 70er Jahren gingen ROSS *et al.* (1976) von einer ‚Response-to-Injury‘-Hypothese aus, nach der die auch heute noch anerkannten Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hochdruck,

2.1 Gefäßendothel und seine Funktionsstörung (endotheliale Dysfunktion)

Rauchen oder Diabetes eine chronische Endothelschädigung durch Absterben von Endothelzellen verursachen, die zur Aktivierung von Blutplättchen und zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, später auch zur Lipidakkumulation und Plaquebildung führt. Zusammen mit anderen Befunden wurde jedoch später deutlich, dass der funktionelle Zustand der Endothelschicht für die Entwicklung von Gefäßerkrankungen von entscheidender Bedeutung ist (ROSS (1999)).

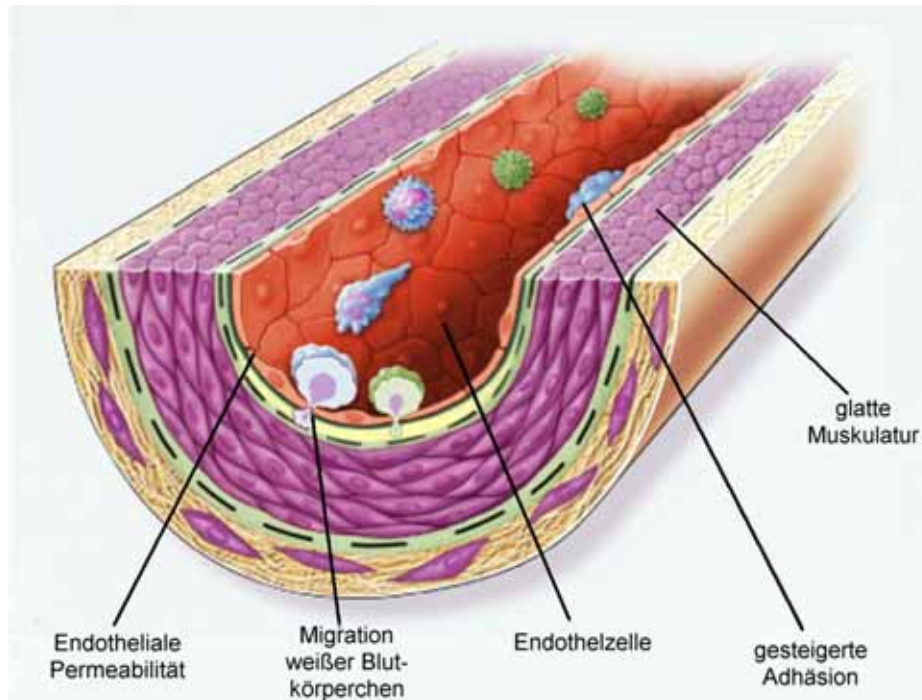


Abb. 1: Frühes Stadium einer nur mikroskopisch noch nicht auffallenden Endothelialen Dysfunktion: Durch eine Permeabilitätssteigerung erhöht sich die Leukozyten-Adhäsion und der Eintritt von Makrophagen in den interstitiellen Raum wird möglich (ROSS (1999)).

In Abb. 1 sind die Frühstadien dieser Veränderung skizziert, diese sind zunächst nur phänomenologisch bemerkbar und mikroskopisch nicht sichtbar. Die Endothelzellen zeigen eine veränderte Permeabilität für Plasmaproteine. Sie reagieren nur mit Einschränkung auf Reize zur endothelabhängigen Relaxation und zeigen eine erhöhte Adhäsivität für Leukozyten und infolgedessen eine vermehrte Leukozytenmigration.

In der Folge bilden sich sog. ‚fatty-streaks‘, die durch eingewanderte Leukozyten zwischen Endothelschicht und glatten Muskelzellen (Intima) entstehen, die durch Stimulation mittels oxidiertem LDL zu Fresszellen und nach Aufnahme der Lipoproteine dort zu Schaumzellen differenzieren. Dies und eine Proliferation bzw. Migration von glatten Muskelzellen bedingt ein Anschwellen der Intima Schicht, gleichzeitig ist die Thrombozytenaggregation am darüber liegenden Endothel erhöht. Stirbt Gewebe unterhalb der Endothelzellschicht ab, bildet sich ein nekrotischer Kern aus und der Plaque schwillt weiter an. Als Gegenreaktion formt sich eine Kappe aus fibrinösem Gerüst aus, die die eigentliche Funktion hat, das darunter liegende Gewebe zu stützen. Da aber weiter Makrophagen einwandern und die fibrinöse Kappe proteolytisch zersetzen, kann es

zum Aufbrechen des Plaques kommen (Ruptur, Abb. 2), in der Folge kann das Gefäß verstopfen oder sich aber an der Stelle der Ruptur Blutpfropfen (Thromben) bilden (ROSS (1999), TOUYZ (2004)).

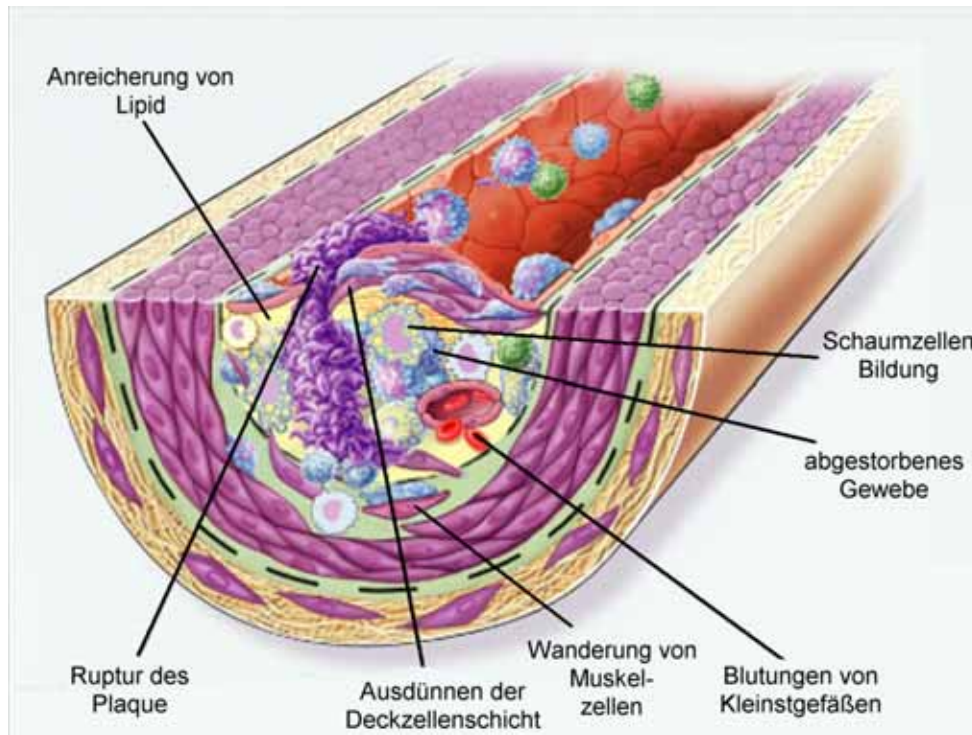


Abb. 2: Endstadium einer Endothelialen Dysfunktion (Artherosklerose): Nach Lipideinlagerung wandern Makrophagen unter die Endothelschicht, werden zu Schaumzellen, die akkumulieren. Gleichzeitig wandern glattmuskuläre Zellen in den Zwischenraum ein. Nach Absterben von Gewebe ist schließlich ein arteriosklerotischer Plaque entstanden, der nach Ausdünnen der Deckschicht aus Endothelzellen reißen kann (Ruptur, ROSS (1999)).

2.1.2.1 Ursachen der Endothelialen Dysfunktion

Die wichtigsten Ursachen für diese schleichende Entwicklung sind z.B. Bluthochdruck (Hypertonie) mit Werten über 90 mmHg diastolisch bzw. 140-160 mmHg systolisch (Normwerte 80/ 120) oder auch ein veränderter Lipidstoffwechsel, der zu einer Hypercholesterol- oder -lipidämie führen kann. Dabei sind die oben genannten Risikofaktoren relevant: Die Krankheit und ihre Progression wird durch chronisches Rauchen, mangelnde Bewegung, Übergewicht und schlechte Ernährung wesentlich initiiert bzw. beschleunigt. Aber auch bei Personen schlecht eingestellter Diabetes mellitus ist der chronisch erhöhte Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie, Spitzenwerte ≥ 15 mmol/l D-Glucose) ein Hauptrisikofaktor (COSENTINO und LUSCHER (1998)).

Die Gemeinsamkeit der Risikofaktoren ist die Stimulation der Bildung ‚freier Radikale‘, also reaktiver Sauerstoffspezies.

2.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Die reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) stellen Radikale dar, die sich durch hohe Reaktivität auszeichnen. Ihre häufigsten Vertreter sind:

Superoxidanionen:	$\bullet\text{O}_2^-$
Hydroxylradikale:	$\bullet\text{OH}^-$
Peroxynitrit:	$\bullet\text{ONOO}^-$
organische Spezies	$\text{RO}\bullet$; $\text{ROO}\bullet$

Sie liegen im Singulett- Zustand vor können daher mit den meisten organischen Molekülen, die mit gepaarten Elektronen vorliegen direkt reagieren, während die Reaktion mit atmosphärisch vorkommenden Sauerstoff (Triplet Zustand) spinverboten ist (FOOTE (1976)).

Die freien Radikale sind z.B. beteiligt an Entzündungs- und Alterungs-Prozessen, Kanzerogenese oder Lipidperoxidationen. Hauptsächlich entstehen sie in den Mitochondrien (Sauerstoffmetabolismus), andererseits existieren auch enzymatische Quellen wie Xanthinoxidase, NADPH-Oxidase, entkoppelte Stickstoffmonoxidsynthase (COSENTINO *et al.* (1998), LUSCHER und COSENTINO (1998)), ebenso stellen der Arzneimittelmetabolismus oder auch Photooxidationen mögliche Ressourcen für die ROS dar (MÜLLER (1992)).

Physiologisch gibt es eine große Anzahl an antioxidativ wirkenden Mechanismen, dazu gehören z.B. Substanzen wie Vitamin E, Vitamin C, Carotinoide oder Enzyme (Superoxid-Dismutase oder Catalase). Exogene Stoffe können ebenso antioxidative Wirkungen entfalten, z.B. Flavonoide und Phenole aus Wein oder hochwertigen Speiseölen (TAUBERT (2000)).

Neueren Erkenntnissen zufolge stellen die ROS jedoch nicht nur zellschädigende Komponenten dar, sondern werden physiologisch im niedrigen Konzentrationsbereich als Signalmoleküle verwendet (AFRI *et al.* (2002)). Phagozyten schädigen im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr durch hohe Konzentrationen von $\bullet\text{O}_2^-$ eingeschlossene Bakterien (CAI *et al.* (2003)).

2.1.4 Hyperglykämie und die Folgen für die Gefäße

Vaskuläres Gewebe unterliegt einem hyperglykämischer Stresszustand, wenn die Konzentration des Blutzucker im Plasma mehr als $\sim 6 \cdot 10^{-3}$ mol/l beträgt, wobei dies kurzzeitig keine Belastung darstellt, da mit Hilfe von Insulin dieser Spiegel schnell gesenkt werden kann. Liegen jedoch chronisch Werte über $6 - 7 \cdot 10^{-3}$ mol/l im Vollblut vor (entsprechend $7 - 8 \cdot 10^{-3}$ mol/l Plasma), wird dies als hyperglykämischer Zustand bezeichnet.

Chronisch führt dies zu Schädigungen im mikrovaskulären Bereich und bestimmt die Progression der gesamtvasculären Arteriosklerose. Unter diesen Umständen sind die Belastungen durch ROS erhöht, da in der Elektronentransportkette der Mitochondrien vermehrt Sauerstoffradikale

gebildet werden. Durch die erhöhte Glukose- Konzentration wird die Glykolyse stimuliert und in der Folge wird die Kapazität von antioxidativen Enzymsystemen (Superoxid-Dismutase) angereizt (NISHIKAWA *et al.* (2000)).

Im Endothel ist im Anschluss vor allem die Aktivierung der Proteinkinase C von Bedeutung, da diese die NADPH-Oxidase aktiviert und die Expression der eNos erhöht. Letztere entkoppelt aufgrund von Substratmangel (Tetrahydrobiopterin und BH₄) und somit werden durch beide Enzyme vermehrt Radikale produziert, die direkt Zellbestandteile schädigen können (HINK *et al.* (2001))

2.2 Blutdrucksenkende Pharmaka

2.2.1 Kalziumkanalblockierende Pharmaka

Chemisch und vom Wirkprofil unterscheidet man drei Stoffgruppen:

- Dihydropyridine (DHP): Prototyp Nifedipin sowie Nicardipin, Nisoldipin, Nitrendipin, Nivadipin, Amlodipin, Felodipin, Isradipin u.a.; Beispielstrukturen siehe Abb. 3
- Phenylalkylamine: Verapamil, Gallopamil
- Benzothiazepine: Diltiazem

Daneben gibt es noch ältere, wenig spezifische Substanzen verschiedener Stoffgruppen.

Allen Wirkstoffen ist gemeinsam, dass sie an unterschiedlichen Domänen des L-Typ Kalziumkanals binden. Die Rezeptorstruktur der Phenylalkylamine liegt auf der intrazellulären Seite des Kanalproteins, während die Dihydropyridine an den inaktiven geschlossenen Kanal binden und die spannungsabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals modulieren (MASON (2003)).

Die Phenylalkylamine und Benzothiazepine sind potente Dilatatoren der arteriellen Gefäßmuskulatur, wirken darüber hinaus aber auch kardial negativ (chronotrop, dromotrop und inotrop) über Beeinflussung des Kalziumionenhaushaltes im Sinusknoten, AV-Knoten und am Arbeitsmyokard respektive.

2.2.2 Endotheliale Funktionen der Dihydropyridin- Kalziumantagonisten

Trotz des gleichartigen kanalblockenden Wirkprinzips weisen die Dihydropyridine im Vergleich zu den anderen Substanzen eine vergrößerte Selektivität zur vaskulären Muskulatur auf, statt speziell auf die Herzmuskulatur zu wirken.