

**Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität des Saarlandes
Klinik für Innere Medizin III
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Michael Böhm**

Einfluss des AT₁-Rezeptorantagonismus auf die Hypercholesterinämie-induzierte endotheliale Dysfunktion

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2005

vorgelegt von Stefan Hilgers
geboren am 12.05.1975 in Gerolstein

Universitätsdekan: Prof. Dr. Montenarh

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Nickenig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Menger

Für Anne und Noah

Inhaltsverzeichnis:

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	4
2.1.	Koronare Herzkrankheit, Atherosklerose und endotheliale Dysfunktion	4
2.2.	Hypercholesterinämie	8
2.3.	Das Renin-Angiotensin-System	10
2.3.1.	Renin-Angiotensin-System	10
2.3.2.	AT ₁ -Rezeptorantagonisten	13
2.4.	Hypercholesterinämie und AT₁-Rezeptorexpression	14
2.5.	Fragestellung der Arbeit	16
3.	Material und Methodik	17
3.1	Materialien	17
3.1.1	Reagenzien	17
3.1.2	Medikamente	17
3.1.2.1.	Candesartan	18
3.1.2.2.	Felodipin	19
3.1.3	Geräte	20
3.2	Methodik	21
3.2.1.	Studiendesign	21
3.2.2.	Unterarmblutflussmessung mittels Venenverschluss-Plethysmographie	22
3.2.3.	Patientenuntersuchung	22
3.2.4.	ELISA	24
3.2.5.	Blutabnahme zur tPA/PAI-1 – Bestimmung	24
3.2.6.	Analyse der Plasmaparameter	24
3.2.6.1.	Bestimmung der Aktivität des tPA	24
3.2.6.2.	Bestimmung der Expression des tPA	25
3.2.6.3.	Bestimmung der Aktivität des PAI-1	25
3.2.6.4.	Bestimmung der Expression des PAI-1	26
3.2.6.5.	Bestimmung der Konzentration des 8-Isoprostan	26

3.2.6.6.	Bestimmung der Konzentration des MCP-1	27
3.2.6.7.	Bestimmung der Konzentration des sICAM-1	28
3.2.6.8.	Bestimmung der Konzentration des IL-6	28
3.2.6.9.	Bestimmung der Konzentration des TNF- α	29
3.2.6.10.	Bestimmung der Konzentration des hs-CRP	29
3.3.	Statistik	30
4.	Ergebnisse	31
4.1.	Validierung der Unterarmblutflussmessung	31
4.2.	Patientencharakteristik	33
4.3.	Unterarmblutfluss	36
4.4.	Entzündungsparameter und Gerinnungsfaktoren	39
4.5.	Oxidativer Stress	41
5.	Diskussion	43
5.1.	Endotheliale Dysfunktion, Hypercholesterinämie und AT ₁ - Rezeptorexpression	43
5.2.	Nutzen der Inhibition des AT ₁ -Rezeptors	48
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Publikationen / Danksagung	78
8.	Lebenslauf	80

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Konversions Enzym (Angiotensin-Converting Enzyme)
Ang	Angiotensin
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
AT ₁	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AuC	Fläche unter Konzentrations/Zeit-Kurve (Area under the curve)
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleinacid)
EDRF	endothelabhängiger relaxierender Faktor (endothelium derived relaxing factor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
eNOS	endotheliale Isoform der NO-Synthase
HDL	high-density Lipoprotein
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
hsCRP	hochsensitives C-reaktives Protein (high sensitivity C-reactive protein)
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (intercellular adhesion molecule-1)
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
KHK	koronare Herzerkrankung
LDL	low-density Lipoprotein
LOX-1 Rezeptor	Rezeptor für oxidiertes LDL (lectin-like oxidized LDL-receptor)
M	molar
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

NAD(P)H	Nikotinamidadeninnucleotidphosphat
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Superoxidradikal
oxLDL	oxidiertes LDL
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (plasminogen activator inhibitor-1)
PDGF	Thrombozyten Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor)
pg	Picogramm
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SEM	Standardfehler der Mittelwerte (standard error of mean)
sICAM-1	lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1)
SOD	Superoxid Dismutase
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α (tumor necrosis factor- α)
tPA	Gewebeplasminogen Aktivator (tissue plasminogen activator)
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (vascular-cell adhesion molecule-1)
μ l	Mikroliter

1. Zusammenfassung

Einfluss des AT₁-Rezeptorantagonismus auf die Hypercholesterinämie-induzierte endotheliale Dysfunktion

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen sind für mehr als die Hälfte aller Todesfälle in den westlichen Industrienationen verantwortlich. Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose ist die Hypercholesterinämie.

Für die Pathogenese der Atherosklerose spielt das Renin-Angiotensin-System (RAS) eine wichtige Rolle. Angiotensin II als biologischer Effektor des RAS bewirkt über die Aktivierung des Angiotensin II Typ 1 (AT₁)-Rezeptors eine vermehrte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, Vasokonstriktion und pathologische Wachstumsprozesse vaskulärer Zellen. Diese Prozesse gelten als pathogenetisch bedeutsam für die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion, einem Stadium der abnormen Gefäßbewegung, prothrombotischer und proinflammatorischer Prozesse, und der daraus entstehenden Atherosklerose.

Die Hypercholesterinämie führt zu einer vaskulären Überexpression des AT₁-Rezeptors *in vitro* und *in vivo*. Mehrere Studien zeigten, dass die Behandlung hypercholesterinämischer Tiere mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten zu einer Normalisierung der Freisetzung freier Sauerstoffradikale aus der Gefäßwand und zu einer Aufhebung der endothelialen Dysfunktion führt, ohne dass die Lipidspiegel verändert wurden.

Die vorliegende Arbeit sollte daher die Fragestellung untersuchen, ob eine pharmakologische Blockade des AT₁-Rezeptors beim Menschen zu einer Verbesserung der Hypercholesterinämie-induzierten endothelialen Dysfunktion führen kann. Dafür wurden hypercholesterinämische, normotensive Patienten mit nachgewiesener endothelialer Dysfunktion für sechs Wochen randomisiert und doppelblind entweder mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten (Candesartan 16 mg/Tag), einem Calciumantagonisten (Felodipin 5 mg/Tag) oder Placebo therapiert. Mittels Unterarmvenenverschluss-Plethysmographie wurde zum einen die Endothel-abhängige Vasodilatation im Rahmen der reaktiven Hyperämie nach Ischämie, zum anderen die Nitrat-induzierte Endothel-unabhängige Vasodilatation untersucht. Zusätzlich wurden laborchemische Parameter der Entzündung, des oxidativen Stresses und der Gerinnung vor und nach der Therapie analysiert.

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine sechswöchige Therapie mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan zu einer signifikanten Steigerung des Unterarmblutflusses während der reaktiven Hyperämie als Marker der Endothel-

abhängigen Vasodilatation und damit zu einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion führte. Sowohl in der Placebo- als auch in der Felodipingruppe als antihypertensiv behandelte Kontrollgruppe konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Die Endothel-unabhängige Vasodilatation und der basale Blutfluss wurden in keiner Behandlungsgruppe signifikant beeinflusst.

Laborchemisch kam es unter Behandlung mit Candesartan zu einer signifikanten Reduktion der Plasmakonzentrationen von 8-Isoprostan, einem Marker für oxidativen Stress. Ebenfalls wurde eine signifikante Abnahme der für die Pathogenese der Atherosklerose wichtigen Inflammationsmoleküle Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (MCP-1) und lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (sICAM-1) im Plasma nachgewiesen. In beiden Kontrollgruppen zeigten sich hier keine signifikanten Veränderungen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Therapie mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten bei hypercholesterinämischen Patienten über einen Anstieg der Endothel-abhängigen Vasodilatation zu einer signifikanten Verbesserung der endothelialen Dysfunktion sowie zu einer signifikanten Abnahme von Markern von oxidativem Stress und vaskulärer Inflammation führt, ohne dass die Lipidspiegel und Blutdruckwerte signifikant beeinflusst wurden.

Die hier vorgelegten Ergebnisse unterstreichen somit die Bedeutung des AT₁-Rezeptors für die Pathogenese der Hypercholesterinämie-induzierten endothelialen Dysfunktion und der Substanzklasse der AT₁-Rezeptorantagonisten für die Behandlung der Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen.

Effect of AT₁-receptor antagonism on hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction

Atherosclerotic diseases are responsible for more than half of all deaths in the industrialized world. One of the most important risk factors for the development of atherosclerosis is hypercholesterolemia.

The renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. Angiotensin II, the biological effector of the RAS, mediates by activation of the angiotensin II type 1 (AT₁) receptor an increased release of reactive oxygen species, vasoconstriction, and pathological growth of vascular cells. These processes are considered to be important for the development of endothelial dysfunction, a state of abnormal vasomotion, prothrombotic and proinflammatory processes, and manifested atherosclerosis.

Hypercholesterolemia leads to vascular overexpression of the AT₁-receptor in vitro and in vivo. Several studies have shown that treatment of hypercholesterolemic animals with AT₁-receptor antagonists reduces reactive oxygen species release from the vessel wall and reverses endothelial dysfunction without concurrent changes in lipid profiles.

This study was designed to investigate whether pharmacological AT₁-receptor blockade may improve hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction in humans. Hypercholesterolemic, normotensive patients with endothelial dysfunction were treated for six weeks in a randomized, double-blind fashion with either an AT₁-receptor antagonist (candesartan 16 mg/day), a calcium channel antagonist (felodipine 5 mg/day) or placebo. Venous occlusion plethysmography of the forearm was used to assess endothelium-dependent vasodilation (reactive hyperemia following ischemia) as well as endothelium-independent vasodilation (nitrate-induced forearm blood flow). In addition, plasma markers of inflammation, oxidative stress, and coagulation were analyzed. All parameters were assessed before and after therapy.

Treatment for six weeks with the AT₁-receptor antagonist candesartan significantly increased forearm blood flow during reactive hyperemia as a marker of endothelium-dependent vasodilation and therefore improved endothelial dysfunction. This effect was not observed in the control groups treated with either the antihypertensive drug felodipine or placebo. Endothelium-independent vasodilation and basal blood flow were not significantly altered in any treatment group.

In addition, significant reductions of the plasma concentrations of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, and of the inflammatory molecules monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), which are important for the pathogenesis of atherosclerosis, were observed. No significant effects were seen in both control groups.

In summary, this study shows that treatment of hypercholesterolemic patients with an AT₁-receptor antagonist results in an improvement of endothelial dysfunction by an increase of endothelium-dependent vasodilation and in reductions of markers of oxidative stress and vascular inflammation, without significant changes in lipid and blood pressure levels.

The results of this study underline the importance of the AT₁-receptor for the pathogenesis of hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction and of the class of AT₁-receptor antagonists for the treatment of atherosclerosis and its related diseases.

2. Einleitung

2.1. Koronare Herzkrankheit, Atherosklerose und endotheliale Dysfunktion

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist die Haupttodesursache in den USA, Europa und Japan (Ross 1993). Die Pathogenese der KHK ist multifaktoriell und für die Entstehung sind mehrere Risikofaktoren bekannt, die in groß angelegten epidemiologischen Studien wie der Framingham Heart Studie gesichert wurden (Castelli et al. 1986). Die Inzidenz der KHK steigt mit der Anzahl der Risikofaktoren und mit zunehmendem Lebensalter an. Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus sind Risikofaktoren erster Ordnung für beide Geschlechter. Das Vorhandensein mehrerer dieser Risikofaktoren erhöht hierbei das Risiko für die Entwicklung der KHK exponentiell und lässt sich nicht nur als die Summe der statistischen Wahrscheinlichkeiten der Einzelfaktoren darstellen (Cremer et al. 1997).

Grundlage der KHK ist die Atherosklerose der Koronararterien. Den heutigen allgemein anerkannten Erkenntnisstand zur Pathogenese stellt die von Ross 1973 entwickelte und 1986 und 1993 modifizierte „response to injury“ Hypothese dar. Demnach handelt es sich bei der Entstehung der Atherosklerose um einen komplexen, in mehreren Stadien ablaufenden inflammatorischen Vorgang, der durch eine vielgestaltige Wechselwirkung zwischen Endothel, glatten Muskelzellen der Tunica media der Arterien, Blutplättchen, Monozyten bzw. Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten sowie Wachstumsfaktoren und Zytokinen charakterisiert ist (Ross 1999).

Die frühe Phase der Atherogenese, noch vor Entstehung der atherosklerotischen Läsionen, ist gekennzeichnet durch die endotheliale Dysfunktion. Das Endothel setzt als endokrines Organ zahlreiche vasoaktive Faktoren frei (Angiotensin I, Serotonin, Bradykinin, Noradrenalin etc.). Diese führen zur endothelvermittelten Vasodilatation oder -konstriktion. Bei der endothelialen Dysfunktion kommt es durch die unterschiedlichen Risikofaktoren wie Nikotin, Hyperlipoproteinämie, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus zu einer Schädigung des Endothels, die eine Zunahme der Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und andere zirkulierende Stoffe im Plasma mit sich bringt. In der Folge werden Endothelzellen aktiviert und exprimieren vermehrt sogenannte Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche.

Die Folgen sind vermehrte Adhäsivität und Permeabilität von mononukleären Zellen am Endothel und die Freisetzung von Zytokinen. Solche Zytokine sind z.B. Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α). Selektive vermitteln die Rollen der

Monozyten entlang des Endothels, das vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) sowie das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) haben eine große Bedeutung für das feste Anhaften und die transendotheliale Migration von Monozyten. ICAM-1 und VCAM-1 spielen eine große Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Das lösliche ICAM-1 (sICAM-1) ist oft viele Jahre vor einer klinischen Manifestation der koronaren Herzkrankheit im Blut erhöht und kann daher als Marker der koronaren Atherosklerose benutzt werden (Ikata et al. 2000, Wojakowski et al. 2001).

Im weiteren Verlauf dringen vor allem Monozyten und in geringerem Ausmaß T-Lymphozyten in den subintimalen Raum ein (Libby 2002). Dies wird durch eine andere Gruppe von Molekülen, zu denen z.B. das Chemokin Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (MCP-1) gehört, vermittelt. MCP-1 wird von Endothelzellen nach Stimulation durch Interleukin-1 (IL-1) und TNF- α produziert und spielt eine wichtige Rolle in der Chemoattraktion, Migration und Aktivierung von Monozyten, T-Zellen und der Proliferation glatter Muskelzellen (Bevilacqua et al. 1985, Gamble et al. 1985). Monozyten binden an die Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche der Endothelzellen und nehmen oxidiertes LDL-Cholesterin (ox-LDL) über den Scavenger-Rezeptor auf. Es folgt eine Formierung von Schaumzellen und Einwanderung in den subintimalen Raum, die später zur Bildung der „fatty streaks“ führt (Ross 1999). Fatty streaks zeichnen sich durch eine erhöhte Akkumulation von Makrophagen, Schaumzellen und lipidbeladenen glatten Muskelzellen aus (Parthasarathy et al. 1989, Ylä-Herttuala et al. 1989).

Gleichzeitig wandern glatte Muskelzellen in die Intima ein und bilden zusammen mit Fibroblasten und extrazellulärer Matrix eine fibröse Kappe, die das zirkulierende Blut und die atherosklerotische Plaque voneinander trennt (Ross 1999). Kommt es zur verminderten Bildung von extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen oder vermehrtem Abbau von Matrix durch degradierende Enzyme, kann eine stabile Plaque instabil werden. Makrophagen und Schaumzellen schütten Matrixmetalloproteinasen aus, die extrazelluläre Matrix abbauen. Ein Ungleichgewicht zwischen verminderter Bildung und vermehrtem Abbau der extrazellulären Matrix führt zur Ausdünnung der fibrösen Kappe. Die kontinuierliche Einwanderung dieser Zellen und deren Proliferation unter dem Einfluss der sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren bewirkt eine Progression der Gefäßschädigung (Ross 1993). Immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass sich insbesondere Makrophagen und T-Lymphozyten vermehrt in instabilen atherosklerotischen Plaques finden.

Verschiedene inflammatorische Systeme interagieren mit der Thrombusbildung. Aktivierung z.B. des Komplementsystems, des lokalen Angiotensins, der Matrixmetalloproteinasen und eine lokale Aktivierung von mononukleären Zellen sind mit erhöhter Thrombusformation assoziiert. Zusätzlich kommt es zu einer vorwiegend Interleukin-6

vermittelten Akute-Phase-Reaktion. Dies führt zur vermehrten Synthese prothrombotischer (z.B. Fibrinogen, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1) und inflammatorischer Mediatoren bzw. Marker (z.B. C-reaktives Protein) und unterhält dadurch über Tage bis Wochen einen prokoagulatorischen Zustand. Von Bedeutung ist hierbei unter anderem der Gewebepasminogenaktivator (tPA). tPA konvertiert Plasminogen in Plasmin, welches Fibrinthromben auflöst. Der wichtigste Hemmer dieser Reaktion ist der Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1). Das Gleichgewicht zwischen tPA und PAI-1 bestimmt ob ein Thrombus gebildet oder aufgelöst wird. Erhöhte Plasmakonzentrationen von PAI-1 führen zu einem prothrombotischen Zustand (Dawson et al. 1992, Salomaa et al. 1995, Newby et al. 2001).

Unter dem Einfluss von Scherkräften kann die fibröse Kappe aufreißen. Der thrombogene Lipidkern der Plaques und Kollagen in der Gefäßwand werden freigelegt. Eine Aktivierung von Thrombozyten und des Hämostasesystems führt dann zur okkludierenden oder nicht okkludierenden Thrombusbildung (Libby 1992). Klinisch manifestiert sich die Plaqueruptur mit Thrombusformation als akutes Koronarsyndrom mit instabiler Angina pectoris oder als Myokardinfarkt.

Noch bevor sich morphologische Veränderungen zeigen, lassen sich bereits reversible Störungen der Endothelfunktion nachweisen. Die endotheliale Dysfunktion ist unter anderem charakterisiert durch eine Abnahme der Endothel-abhängigen Vasodilatation (Ross 1993). Diese Abnahme kann durch eine verminderte Stickstoffmonoxid (NO)-Bioverfügbarkeit erklärt werden (Harrison 1997a). NO wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aus der basischen Aminosäure L-Arginin gebildet und führt über eine Erhöhung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Vasorelaxation. Weitere Funktionen des NO sind die Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen und zwar sowohl endothelial produziertes NO als auch NO, das aus NO-Donatoren freigesetzt wird, sowie die antithrombogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften (Nakaki et al. 1990).

Die chemische Stabilität von NO ist gering. In Anwesenheit des freien Sauerstoffradikals Superoxid (O_2^-) entsteht mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit der toxische Metabolit Peroxynitrit. Dieser Reaktionsschritt läuft 3-5fach schneller ab als die Dismutierungsreaktion von O_2^- zu H_2O_2 und Sauerstoff durch die Superoxiddismutase (SOD) (Gryglewski et al. 1986, White et al. 1994). Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-produzierenden und ROS-abbauenden Enzymen in der Gefäßwand. Das Verhältnis zwischen der Aktivität antioxidativer (z.B. SOD) und oxidativer Enzymsysteme, wie z.B. die NAD(P)H-Oxidase,

beeinflusst den Anteil von biologisch aktivem NO. Ein Ungleichgewicht durch ein Überwiegen von ROS führt zu einer Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit.

Als ein gemeinsamer Pathomechanismus dieses multifaktoriellen Geschehens wird die vermehrte Produktion freier Sauerstoffradikale, der sogenannte oxidative Stress, in der Gefäßwand angesehen. Oxidativer Stress ist ein häufig verwendeter Begriff, der grundsätzlich das Ungleichgewicht zwischen der Rate mit welcher der intra- und extrazelluläre Gehalt von freien Sauerstoffradikalen ansteigt relativ zur Kapazität der Zellen freie Sauerstoffradikale zu eliminieren, beschreibt. Die resultierende vermehrte Inaktivierung von NO ist eine pathogenetisch essentielle Folge von oxidativem Stress (Hua et al. 2000). Eine Zunahme von ROS und eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und manifesten Atherosklerose. Messbare Oxidationsparameter sind z.B. 8-Isoprostane, die nichtenzymatisch durch freie Sauerstoffradikale aus der in der Zellmembran verankerten Arachidonsäure gebildet werden. Durch die Phospholipase A₂ erfolgt die Abspaltung der Isoprostane von den Membranlipiden und die Freisetzung in den Blutkreislauf (Patrono et al. 1997).

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die endotheliale Dysfunktion der initial wichtigste Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose ist. Die gestörte Endothelfunktion hat zudem eine prognostische Bedeutung. Bei Patienten ohne angiographisch detektierbare stenosierende KHK wurde nachgewiesen, dass eine schwere endotheliale Dysfunktion mit einer erhöhten Rate kardiovaskulärer Ereignisse und einer gesteigerten Letalität assoziiert war (Schächinger et al. 2000, Suwaidi et al. 2000).

Wichtige messbare Marker einer endothelialen Dysfunktion bzw. Prognosemarker bei Patienten mit Atherosklerose sind unter anderem MCP-1, sICAM-1, CRP, IL-6, tPA, PAI-1 und 8-Isoprostan.

2.2. Hypercholesterinämie

Große epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hypercholesterinämie und hierbei insbesondere die Erhöhung der low-density Lipoprotein (LDL)-Plasmakonzentration ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose ist. Eine dieser Studien war die Framingham Heart Studie, in der über 5000 Einwohner der nordamerikanischen Stadt Framingham, Massachusetts über vier Jahrzehnte lang alle zwei Jahre bezüglich der Entstehung atherosklerotischer Gefäßveränderungen in Abhängigkeit von zahlreichen messbaren Faktoren medizinisch untersucht wurden (Castelli et al. 1986). Martin et al. zeigten 1986, dass die Morbidität und Mortalität der koronaren Herzerkrankung mit erhöhten Cholesterinspiegel ansteigen.

Für einen Zusammenhang zwischen der Entstehung der Atherosklerose und der Hypercholesterinämie spricht die in vitro beobachtete Oxidation von LDL. Natives LDL bindet an die klassischen LDL-Rezeptoren (Apo B- und Apo E-Rezeptor) (Krieger 1998, Beisiegel 1998). Oxidiertes LDL wird jedoch in Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen aufgenommen. Diese Aufnahme erfolgt nun über spezielle Rezeptoren, die als Scavenger-Rezeptoren bezeichnet werden und im Gegensatz zu den klassischen LDL-Rezeptoren nicht einem negativen Feedback-Mechanismus unterliegen. Den Scavenger-Rezeptoren kommt bei der Entstehung der Atherosklerose eine wichtige Rolle zu. 1997 identifizierten Sawamura et al. den endothelialen Rezeptor für oxidiertes LDL, der als LOX-1 Rezeptor (lectin-like oxidized LDL receptor) bezeichnet wird. Die LOX-1 Expression kann durch oxidiertes LDL induziert werden (Chen et al. 2000). Ebenfalls wird der Rezeptor durch Einfluss von Angiotensin II nach Stimulation des AT₁-Rezeptors vermehrt exprimiert, eine Blockade mit Losartan, einem AT₁-Rezeptorblocker, hemmt diese Hochregulation (Li et al. 1999).

Zusätzliche Effekte des oxidierten LDL sind unter anderem die Steigerung der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Ross et al. 1973, Ross 1993, Faggitto et al. 1984a, Faggitto et al. 1984b).

Eine wichtige schädigende Wirkung der Hypercholesterinämie entsteht durch die vermehrte Produktion freier Sauerstoffradikale. So wurde in Aorten von Kaninchen, die mehrere Wochen eine cholesterinreiche Ernährung erhielten, eine gesteigerte Synthese von freien Sauerstoffradikalen nachgewiesen (Ohara et al. 1993). Überschreitet die Produktion die Elimination freier Sauerstoffradikale entsteht oxidativer Stress. Hierbei wird die NO-Bioaktivität reduziert und es entsteht eine endotheliale Dysfunktion (Darley-Usmar et al. 1997). Die Verschlechterung der Endothel-abhängigen Vasodilatation konnte durch gleichzeitige Applikation von Antioxidantien vermindert werden (Keany et al. 1995). Die vermehrte Produktion freier Sauerstoffradikale gilt daher als zentraler

pathogenetischer Vorgang für die Entstehung der Hypercholesterinämie-induzierten endothelialen Dysfunktion (Harrison 1997a, Harrison 1997b).

Ergebnisse groß angelegter klinischer Studien haben in den letzten Jahren eindeutig den großen klinischen Nutzen einer cholesterinsenkenden Therapie bei Patienten mit KHK belegt. Insbesondere die Reduktion des LDL-Cholesterin geht mit einer deutlichen Senkung der Letalität und des Myokardinfarktrisikos sowie einer Regression der Koronaratherosklerose einher. In der 4S-, der WOSCOPS- und der CARE-Studie, in denen man hypercholesterinämische Patienten mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (der Substanzklasse der sogenannten Statine) behandelte, wurden signifikant weniger Infarktereignisse dokumentiert und die Letalität sank zwischen 24% und 42%. Ebenfalls waren deutlich weniger operative Myokardrevaskularisationen und Koronarangioplastien erforderlich (Sheperd et al. 1995, Scandinavian Simvastin Survival Study Group 1994, Sacks et al. 1995, Sacks et al. 1996).

Eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase bewirkte bei hypercholesterinämischen Patienten bereits innerhalb eines Monats eine Verbesserung der Endothelfunktion, wie O'Driscoll et al. 1997 mit der Unterarmvenenverschluss-Plethysmographie nachwies. Freie Sauerstoffradikale verschlechtern die endotheliale Funktion, indem sie NO direkt inaktivieren (Drummond et al. 2000, Harrison 1997b). Durch Senkung von LDL-Cholesterin reduzieren Statine zwar generell den oxidativen Stress (Cai et al. 2000), jedoch ist ein Teil der Statin-Wirkung unabhängig von der LDL-Cholesterinsenkung, da Statine direkt die vaskuläre Superoxidradikalproduktion beeinflussen (Wassmann et al. 2002a, De Caterina et al. 2002, Rikitake et al. 2001). Zusätzlich wird eine Cholesterin-unabhängige verstärkte Expression und Aktivität der endothelialen NO-Synthase beobachtet (Laufs et al. 1998). Eine positive Beeinflussung der Endothelfunktion kann durch Behandlung mit Statinen bereits nach 24 Stunden erreicht werden (Wassmann et al. 2003b).

2.3. Renin-Angiotensin-System

2.3.1. Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) beeinflusst die Regulation der Blutdruck-, Salz- und Flüssigkeitshomöostase. Eine Aktivierung des RAS erfolgt im wesentlichen durch Stimuli wie arterielle Hypotonie, Verringerung der Serumnatriumkonzentration und erhöhter Sympathikotonus. Hierdurch kommt es zu einer vermehrten Produktion und Ausschüttung von Renin, einer Peptidase, die in den juxtaglomerulären Zellen des Vas afferens der Niere gebildet wird und von dort ins Blut gelangt. Das vorwiegend in der Leber gebildete Angiotensinogen wird durch Renin in das Decapeptid Angiotensin I umgewandelt. Angiotensin I wird sowohl im Blut als auch im Gewebe durch das Angiotensin-I-Konversionsenzym (ACE) in das aktive Octapeptid Angiotensin II umgewandelt (Peach 1977). Neben dem ACE vermitteln noch weitere Enzyme die Produktion von Angiotensin II. Dazu gehört z.B. die Chymase, die vorwiegend gewebeständig und insbesondere in myokardialem Gewebe vorliegt (Urata et al. 1990, Urata et al. 1993). Angiotensin II wird über die Aminopeptidase A in Angiotensin III abgebaut, welches über die Aminopeptidase B in Angiotensin IV gewandelt wird. Endopeptidasen und Carboxypeptidasen bauen Angiotensin IV in weitere, biologisch inaktive Fragmente ab. Angiotensin II vermittelt seine biologischen Effekte über zwei bekannte Angiotensin Rezeptorsubtypen, den AT_1 - und AT_2 -Rezeptor und möglicherweise über bislang unbekannte Rezeptoren (Abbildung 1) (Griendling et al. 1993).

Die biologischen Effekte von Angiotensin II werden überwiegend über den AT_1 -Rezeptor vermittelt. Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor wird hauptsächlich in Geweben des kardiovaskulären Systems exprimiert, so z.B. auf glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten. Zu den durch diesen Rezeptor vermittelten Effekten zählen Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung, Regulation des renalen Blutflusses, myokardiale und vaskuläre Hypertrophie, Wasser- und Natriumretention sowie eine Sympathikusaktivierung mit Katecholaminfreisetzung (Timmermanns et al. 1993).

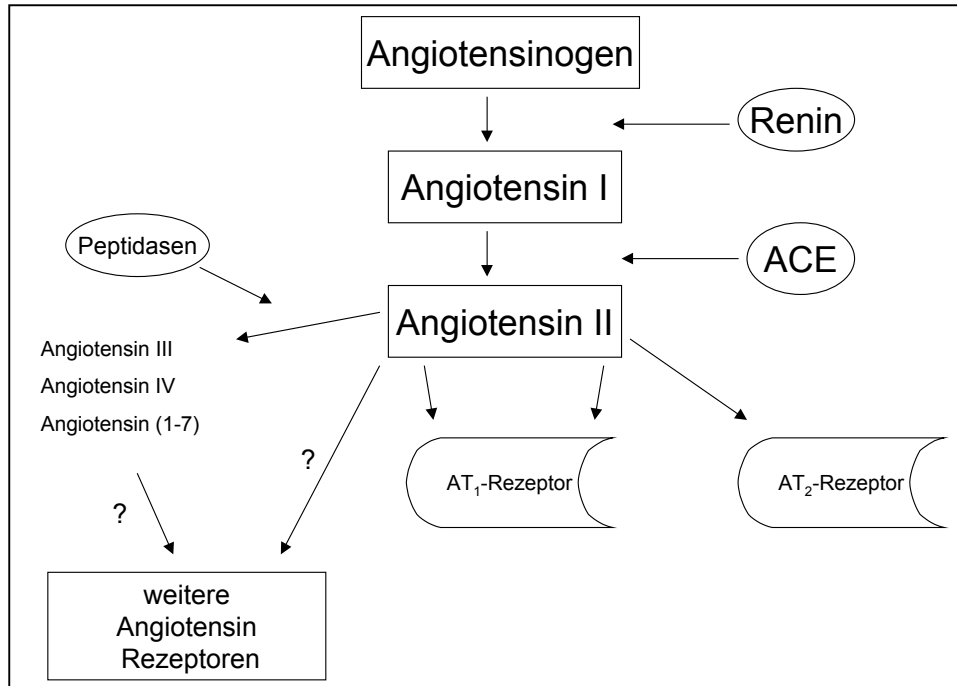


Abbildung 1: Schema des Renin-Angiotensin-Systems

Ein bedeutender Effekt des AT_1 -Rezeptors im kardiovaskulären System ist die Produktion und Freisetzung freier Sauerstoffradikale aus den Gefäßzellen (Nickenig et al. 2002b, Dzau 1998, Romero et al. 1999). Angiotensin II führt über eine Steigerung der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase zu einem Anstieg von Superoxid-Anionen, die eine NO-Inaktivierung bewirken. Dies wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Griendling et al. 1994, Rajagopalan et al. 1996).

Ebenso wie der AT_1 -Rezeptor bindet auch der AT_2 -Rezeptor Angiotensin II. Dieser Rezeptor ist im Gehirn und Nebennierenmark lokalisiert, aber auch im vaskulären System (Tabelle 1). Eine Rezeptoraktivierung führt unter anderem zu Vasodilatation und Hemmung des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen (Unger 1999).

Eine Übersicht über die physiologische Organverteilung der Angiotensin-Rezeptoren gibt Tabelle 1.

Organ	Rezeptortyp
Herz	AT ₁ , AT ₂
Glatte Gefäßmuskelzellen	AT ₁
Endothelzellen	AT ₁ , AT ₂
Fibroblasten	AT ₁ , AT ₂
Leber	> 90% AT ₁
Lunge	AT ₂
Gehirn	AT ₁ , AT ₂
Thrombozyten	AT ₁
Monozyten	AT ₁ , AT ₂
Niere	AT ₁ , AT ₂
Nebennierenrinde	AT ₁ > AT ₂
Nebennierenmark	AT ₂ > AT ₁
Uterus	AT ₂
Plazenta	> 90% AT ₁
Spermatozyt	AT ₁

Tabelle 1: Physiologische Organverteilung der Angiotensin II-Rezeptoren

2.3.2. AT₁-Rezeptorantagonisten

Eine medikamentöse Blockade des AT₁-Rezeptors kann durch AT₁-Rezeptorantagonisten, der Substanzgruppe der sogenannten Sartane erfolgen. AT₁-Rezeptorantagonisten sind Nicht-Peptid-Antagonisten ohne intrinsische Aktivität, die den AT₁-Rezeptor kompetitiv blockieren und damit eine Rezeptoraktivierung durch Angiotensin II unabhängig von Angiotensin II-freisetzenden Enzymen unterbinden (Csajka et al. 1997, Timmermanns et al. 1993). Dabei kommt es zu einer potentiell effektiveren Blockade des Renin-Angiotensin-Systems als durch ACE-Hemmer, die ausschließlich das Angiotensin-Konversions Enzym hemmen. Bei dieser Medikamentengruppe ist eine vollständige Blockade der Angiotensin II Bildungswege nicht möglich, da weitere Enzyme die Bildung von Angiotensin II vermitteln (z.B. Chymase).

Der AT₂-Rezeptor wird durch die hochselektiven AT₁-Rezeptorantagonisten nicht blockiert. Bei Blockade des AT₁-Rezeptors wird durch Angiotensin II sogar vermehrt der AT₂-Rezeptor stimuliert. Die im Rahmen der AT₁-Rezeptorblockade vermehrt gebildeten Abbauprodukte von Angiotensin II, wie z.B. Angiotensin 1-7 (Ang 1-7), können bei den Effekten der AT₁-Rezeptorblockade ebenfalls eine Rolle spielen. So wird beispielsweise über eine Ang 1-7 vermittelte cGMP-Stimulation und Koronardilatation berichtet (Brosnihan et al. 1996, Seyedi et al. 1995).

Die blutdrucksenkende Wirkung der AT₁-Rezeptorantagonisten konnte in zahlreichen Studien gut dokumentiert werden. So wurden in der LIFE Studie über 9000 Hypertoniker mit linksventrikulärer Hypertrophie eingeschlossen und entweder mit dem AT₁-Rezeptorantagonist Losartan oder dem Betablocker Atenolol therapiert. Primäre Endpunkte waren die kardiovaskuläre Mortalität sowie die Inzidenz von Schlaganfall und Myokardinfarkt. Der AT₁-Rezeptorantagonist bewirkte im Vergleich zum Betablocker eine signifikant stärkere Risikoreduktion um 13 % für den primären Endpunkt (Dahlof et al. 2002).

Ein wichtiger Effekt der AT₁-Rezeptorblocker ist die Reduktion des oxidativen Stresses. So zeigten Sato et al. 2003, dass eine 12-wöchige Therapie mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan bei 30 Patienten mit Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie zu einer signifikanten Reduktion einiger Marker des oxidativen Stresses (z.B. Malondialdehyd-modifiziertes LDL-Cholesterin) führt. Koh et al. zeigten 2003 in einer Studie bei 45 Patienten mit arterieller Hypertonie, dass eine 60-tägige Therapie mit Candesartan im Vergleich zu einem Placebopräparat eine signifikante Senkung der Plasmaspiegel von Malondialdehyd bewirkt.

2.4. Hypercholesterinämie und AT₁-Rezeptorexpression

Die Hypercholesterinämie ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose und endothelialer Dysfunktion (Castelli et al. 1986). Oxidativer Stress gilt als ein zentraler pathogenetischer Vorgang für die Entstehung der Hypercholesterinämie-induzierten endothelialen Dysfunktion (Ohara et al. 1993). Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die genauen molekularen Mechanismen jedoch nur unzureichend bekannt.

Eine wesentliche Ursache der vaskulären Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ist die Aktivierung des AT₁-Rezeptors (Griendling et al. 1994, Rajagopalan et al. 1996, Laursen et al. 1997). Die Expression des AT₁-Rezeptors wird durch unterschiedliche Agonisten beeinflusst. Die Regulation dieses Rezeptors ist für die Atherogenese von großer Bedeutung, da das Ausmaß der AT₁-Rezeptor-induzierten Vasokonstriktion, Zellproliferation, ROS-Produktion und Inflammation entscheidend vom Ausmaß der Expression dieses Rezeptors in der Gefäßwand abhängt (Abbildung 2) (Nickenig et al. 1994, Lassegue et al. 1995, Nickenig et al. 1996, Nickenig et al. 1998a, Nickenig et al. 1998b, Nickenig et al. 2002a).

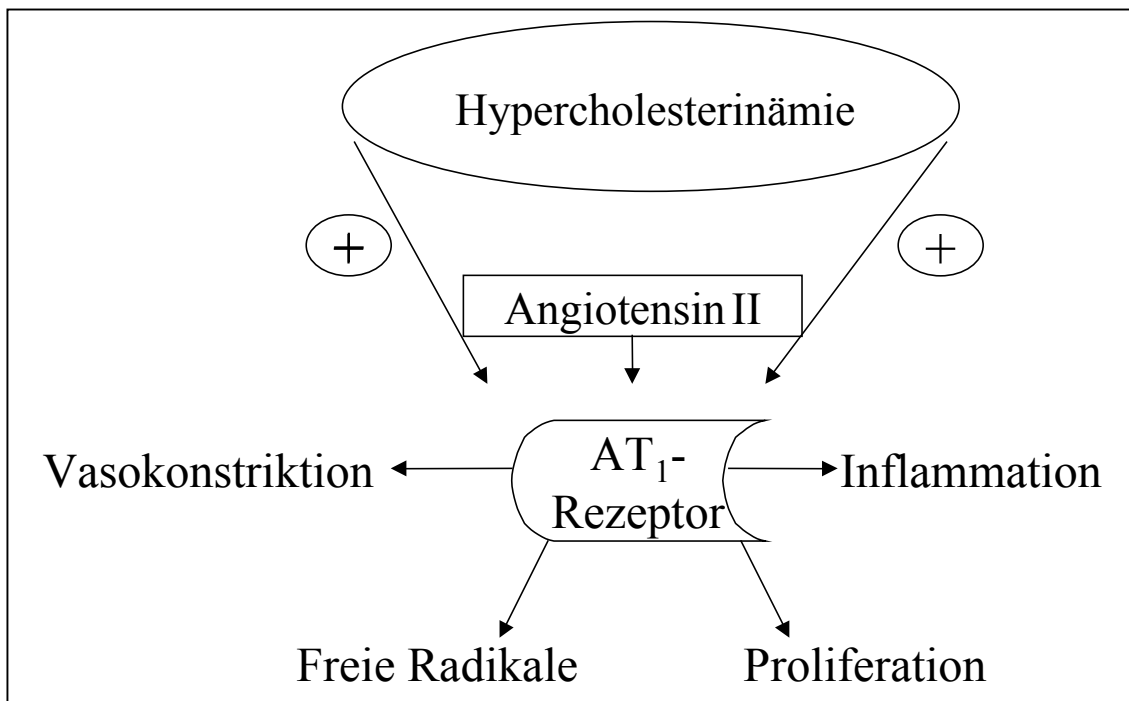


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hypercholesterinämie-induzierten AT₁-Rezeptorüberexpression.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hypercholesterinämie in vitro und in vivo zu einer vaskulären Überexpression des AT₁-Rezeptors führt. Dies wurde in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen sowie in hypercholesterinämischen Kaninchen und Menschen nachgewiesen (Nickenig et al. 1997a, Nickenig et al. 1997b, Nickenig et al. 1999). Die Hypercholesterinämie führt über eine Zunahme der Expression des AT₁-Rezeptors zu einem Anstieg der über diesen Rezeptor vermittelten Effekte auf das Gefäßsystem.

Weitere tierexperimentelle Studien konnten demonstrieren, dass die Behandlung hypercholesterinämischer Kaninchen bzw. Affen mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten - ohne die Lipidspiegel oder den Blutdruck signifikant zu verändern - zu einer Normalisierung der Freisetzung freier Sauerstoffradikale aus der Gefäßwand und zu einer Aufhebung der endothelialen Dysfunktion und Fatty streak Formationen sowie zu einer Reduktion der vaskulären Inflammation führte (Warnholtz et al. 1999, Strawn et al. 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hypercholesterinämie-induzierte vaskuläre Überexpression des AT₁-Rezeptors zu vermehrten oxidativen Stress und zu einer endothelialen Dysfunktion führt. Eine pharmakologische Blockade des AT₁-Rezeptors zeigt im tierexperimentellen Ansatz positive Effekte in Bezug auf oxidativen Stress, endotheliale Dysfunktion und Progression der Atherosklerose .

2.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Atherosklerose ist eine häufige Erkrankung, die durch mehrere Risikofaktoren beeinflusst wird. Hierzu zählt neben arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus vor allem auch die Hypercholesterinämie.

Die endotheliale Dysfunktion ist ein frühes und essentielles Stadium der Atherosklerose und ist mit abnormen Gefäßbewegungen sowie prokoagulatorischen und inflammatorischen Prozessen assoziiert. Oxidativer Stress ist ein essentieller Pathomechanismus der Hypercholesterinämie-induzierten endothelialen Dysfunktion. Die Aktivierung des AT₁-Rezeptors ist eine wichtige Quelle der Freisetzung freier Sauerstoffradikale in der Gefäßwand. Mehrere Studien haben sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt, dass die Hypercholesterinämie-induzierte Überexpression des AT₁-Rezeptors mit vermehrten oxidativem Stress, verstärkter Vasokonstriktion und Zellproliferation, endothelialer Dysfunktion und letztendlich mit einem Fortschreiten der Atherosklerose assoziiert ist. Tierexperimentelle Studien ergaben, dass die Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten bei Hypercholesterinämie ohne Veränderung des Lipidspiegels zu einer Reduktion der Freisetzung freier Sauerstoffradikale sowie der vaskulären Inflammation und zu einer Normalisierung der endothelialen Funktion führt. Die Überexpression des AT₁-Rezeptors könnte eine wesentliche Rolle in der Beziehung zwischen Hypercholesterinämie und endothelialer Dysfunktion bzw. Atherosklerose spielen.

Studienergebnisse über den Einfluss von AT₁-Rezeptorantagonisten auf die Endothelfunktion hypercholesterinämischer Patienten lagen zu Beginn dieser Arbeit nicht vor.

Diese Arbeit sollte daher die Fragestellung untersuchen, ob eine pharmakologische Blockade des AT₁-Rezeptors bei hypercholesterinämischen normotensiven Patienten zu einer Verbesserung der Hypercholesterinämie-induzierten endothelialen Dysfunktion ohne Beeinträchtigung der Lipidspiegel und des Blutdruckes führen kann.

Dafür wurden hypercholesterinämische normotensive Patienten mit nachgewiesener endothelialer Dysfunktion für sechs Wochen randomisiert, prospektiv und doppelblind entweder mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten, einem Calciumantagonisten oder Placebo therapiert. Mittels Unterarmvenenverschluss-Plethysmographie wurde die Endothel-abhängige und -unabhängige Vasodilatation als Parameter der Endothelfunktion untersucht. Zusätzlich wurden laborchemische Parameter der vaskulären Inflammation und Koagulation sowie des oxidativen Stresses vor und nach Therapie analysiert.

3. Material und Methodik

3.1. Materialien

3.1.1. Reagenzien

Ethanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

Ethylacetat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

Methanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

Natriumcitrat, E. Merck, Darmstadt, Deutschland

Hexan, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

Schwefelsäure, E. Merck, Darmstadt, Deutschland

Eisessigsäure, E. Merck, Darmstadt, Deutschland

Salzsäure, E. Merck, Darmstadt, Deutschland

Destilliertes Wasser, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland

8-Isoprostane Enzyme Immunoassay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

PAI-1 Chromolize Assay, Diagnostic International, Schriesheim

PAI-1 TintElize Assay, Diagnostic International, Schriesheim

tPA Chromolize Assay, Diagnostic International, Schriesheim

tPA TintElize Assay, Diagnostic International, Schriesheim

MCP-1 Assay, IBL, Hamburg, Deutschland

SICAM-1 Assay, IBL, Hamburg, Deutschland

TNF- α Assay, IBL, Hamburg, Deutschland

IL-6 Assay, IBL, Hamburg, Deutschland

3.1.2. Medikamente

Candesartan (Atacand®), Astra-Zeneca, Deutschland

Felodipin (Modip®), Astra-Zeneca, Deutschland

Placebo, Astra-Zeneca, Deutschland

Nitroglycerin (Nitrolingual®) Zerbeißkapseln, Pohl-Boskamp, Deutschland

Die in der Studie verwendeten Medikamente Candesartan und Felodipin sowie die Placebo-Präparate wurden freundlicherweise von der Firma Astra-Zeneca zur Verfügung gestellt. Die Präparate wurden von der Firma Astra-Zeneca zur Verblindung der

Behandlung in Kapseln mit identischem Aussehen umgefüllt und in identischen Behältnissen verpackt.

3.1.2.1. Candesartan

Der AT_1 -Rezeptorantagonist Candesartan ist ein hochselektiver AT_1 -Rezeptorantagonist, der in Europa die Zulassung zur Behandlung der arteriellen Hypertonie sowie zur Behandlung der Herzinsuffizienz besitzt.

Nach oraler Verabreichung wird Candesartan cilexetil in die aktive Substanz Candesartan umgewandelt. Die durchschnittliche absolute Bioverfügbarkeit von Candesartan beträgt nach Verabreichung 40%. Die mittlere Spitzen-Serumkonzentration wird 3 bis 4 Stunden nach Tabletteneinnahme erreicht. Die Candesartan-Serumkonzentration nimmt im therapeutischen Dosierungsbereich mit steigender Dosierung linear zu. In der Pharmakokinetik von Candesartan wurden keine geschlechtsabhängigen Unterschiede beobachtet. Die Fläche unter der Serumkonzentration versus Zeitkurve (AuC) von Candesartan wird nicht signifikant durch Nahrung beeinflusst. Candesartan wird hauptsächlich unverändert via Urin und Galle ausgeschieden und nur in geringem Maß durch hepatische Metabolisierung eliminiert. Die terminale Halbwertszeit von Candesartan beträgt 9 Stunden. Es gibt keine Kumulation nach mehrmaliger Verabreichung.

Die Dosierung liegt bei Candesartan zwischen 4 mg und 32 mg. In dieser Studie wurde der AT_1 -Rezeptorantagonist Candesartan mit 16 mg/Tag im Vergleich zu Felodipin und einem Placebopräparat verwendet.

3.1.2.3. Felodipin

Neben Placebo wurde als weitere Kontrollsubstanz ein Antihypertensivum aus der Gruppe der Calciumantagonisten eingesetzt.

Bei dieser Medikamentengruppe wird durch Kanalblockade der Calcium-Einstrom am Herzen und der glatten Gefäßmuskulatur während des Aktionspotentials gehemmt. Dies bewirkt eine Vasodilatation überwiegend an den arteriellen Gefäßen sowie eine Abnahme der Kontraktionskraft und der Herzfrequenz. Zusätzlich führt ein verminderter Muskeltonus an den Koronarien zu einer Dilatation epikardialer Gefäße.

Man unterscheidet mehrere Gruppen der Calciumantagonisten.

1. Verapamiltyp (Phenylalkylamine)
2. Nifedipintyp (1,4-Dihydropyridine)
3. Diltiazemtyp (Benzothiazepine)

Das in dieser Studie verwendete Medikament Felodipin stammt aus der Gruppe der 1,4-Dihydropyridine, die sich durch eine dilatierende Wirkung arterieller Gefäße auszeichnen. Bei Medikamenten aus der Verapamil- und Diltiazemgruppe steht hingegen die kardiale Wirkung im Vordergrund. Bei schnell wirkenden Substanzen aus der Nifedipin-Gruppe kann es zu reflektorischer Tachykardie kommen. Felodipin ist hingegen ein neueres Arzneimittel mit langsamem Wirkungseintritt und längerer Wirkdauer ohne Reflextachykardien.

Felodipin hat die europäische Zulassung zur Therapie der arteriellen Hypertonie.

Nach oraler Verabreichung wird dieses Präparat im Gastrointestinaltrakt vollständig resorbiert. Die systemische Verfügbarkeit von Felodipin liegt bei 15% und ist im therapeutischen Bereich dosisunabhängig. Therapeutische Konzentrationen bleiben während 24 Stunden erhalten. Die Plasmakonzentration ist innerhalb vom therapeutischen Dosierungsbereich von 2,5-10 mg am Tag direkt proportional zur Dosis. Das Medikament wird weitgehend in der Leber metabolisiert, die dabei gefundenen Metaboliten sind hämodynamisch inaktiv.

In dieser Studie wurde Felodipin in einer Dosierung von 5 mg/Tag verwendet.

3.1.3. Geräte

Plethysmograph EC6, D.E. Hokanson, Bellevue WA, USA

Rapid cuff inflator, D.E. Hokanson, Bellevue WA, USA

Air Source AG101, D.E. Hokanson, Bellevue WA, USA

Straight cuff SC10D, D.E. Hokanson, Bellevue WA, USA

Straigh cuff TMC7, D.E. Hokanson, Bellevue WA, USA

Mercury strain gauge forearm set, D.E. Hokanson, Bellevue WA, USA

Aneroid Sphygmomanometer S300, D.E. Hokanson, Bellevue WA, USA

ELISA-Reader, Bio-Rad, München, Deutschland

Thermomixer comfort, Eppendorf, Köln, Deutschland

Magnetrührer, IKA, Staufen, Deutschland

Zentrifugen: Laborfuge 400R, Heraeus, Osterode, Deutschland

Vakuum concentrator 5301, Eppendorf, Köln, Deutschland

Megafuge 2.0 R, Heraeus, Osterode, Deutschland

Laborzentrifuge 1K 15 (Kühlzentrifuge), Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Deisenhofen

3.2. Methodik

3.2.1. Studiendesign

Es handelt sich bei dieser Studie um eine monozentrische, prospektive, randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Therapiestudie. 47 Patienten mit einem Gesamtcholesterin > 250 mg/dl, einem LDL-Cholesterin > 160 mg/dl, einem HDL-Cholesterin < 55 mg/dl und normwertigen Triglyceriden (<250 mg/dl) wurden in diese Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren Behandlung mit Antioxidantien, ACE-Hemmern oder Calciumantagonisten, innerhalb der letzten vier Wochen neu begonnene Therapien mit HMG-CoA Reduktase-Hemmern, linksventrikuläre Funktionsstörungen (Ejektionsfraktion <60%), in den letzten acht Wochen stattgehabte Revaskularisierungen, akutes Koronarsyndrom, erhöhte Blutdruckwerte (>145/90 mmHg), bekannter Drogen- oder Alkoholmissbrauch, Leber- und Niereninsuffizienz (Kreatinin >1,5mg/dl). Zusätzliche Kriterien für Frauen waren Stillzeit und Schwangerschaft. Kontraindikationen einer Nitrattherapie wie arterielle Hypotonie, hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie, orthostatische Kreislaufdysregulation, Unverträglichkeit gegen Nitratpräparate, sowie Kontraindikationen einer Therapie mit Candesartan wie Überempfindlichkeit gegen Candesartan, biliäre Zirrhose, Gallenwegsobstruktion, Aortenklappenstenose und Nierenarterienstenose waren ebenfalls Ausschlusskriterien.

Die Studienteilnehmer wurden anhand einer Zufallszahlen-Code-Liste in eine der drei Behandlungsgruppen (16 mg/d Candesartan, 5 mg/d Felodipin oder Placebo) randomisiert. Nach 42-tägiger Behandlungsdauer wurden die Messungen analog der Erstuntersuchung wiederholt. Die Patienten erhielten zusätzlich an Tag 0 und Tag 42 ein Elektrokardiogramm und wurden körperlich untersucht.

Acht Studienteilnehmer beendeten die Studie vorzeitig (ein Teilnehmer aus der Candesartan-Gruppe, einer aus der Placebo-Gruppe und sechs aus der Felodipin-Gruppe).

Die Studienteilnehmer wurden von ärztlicher Seite aufgeklärt und erklärten sich schriftlich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Universität zu Köln und der Universität des Saarlandes genehmigt.

3.2.2. Unterarmblutflussmessung mittels Venenverschluss-Plethysmographie

Die Unterarmvenenverschluss-Plethysmographie ist eine nicht-invasive Messtechnik zur Bestimmung des Blutflusses. Hierfür wurde dem liegendem Patient eine maschinell aufblasbare Blutdruckmanschette um den rechten Oberarm, sowie eine manuell bedienbare Manschette um das Handgelenk gelegt. Fünf Zentimeter distal des Epicondylus medialis wurde eine individuell an den Armumfang angepasste dehnbare Quecksilber-haltige Messkette befestigt.

Die Handgelenks-Manschette wurde auf einen Druck von 200 mmHg gebracht. Dies war notwendig, um eine Messverfälschung aufgrund arteriovenöser Shunts im Bereich des Hohlhandbogens zu vermeiden. Die Oberarm-Manschette wurde dann jeweils in einem Messzyklus aus 15 Sekunden für insgesamt neun Sekunden durch den Rapid Cuff Inflator auf einen Wert von 50 mmHg aufgeblasen. So wurde eine venöse Stauung bei weiterhin vorhandenem arteriellen Einstrom bewirkt. Die durch den Volumenanstieg entstandene Umfangszunahme des Unterarmes führte zu einer Dehnung der Messkette, die durch den Plethysmograph EC6 registriert und durch das Programm NIVP 4.25 (Hokanson, Bellevue WA, USA) über mindestens drei Messzyklen in einem Graph dargestellt wurde. Man erkannte einen pulsatilen Anstieg der Messkurve gegen die Zeit. Durch Anlegen einer Messgeraden über mindestens drei Pulswellen konnte durch die Software direkt der Unterarmblutfluss in der Einheit ml/100ml Unterarm/min ermittelt werden.

Diese Messungen wurden mehrfach wiederholt, in den Basisbestimmungen jeweils vier Minuten, in der reaktiven Hyperämie drei Minuten, in der Nitrat-induzierten Vasodilatation jeweils fünf Minuten.

Die Messungen wurden in einem 23°C temperierten Raum durchgeführt. Plötzliche Sympathikusaktivierung, beispielsweise durch unerwartete Geräusche im Messlabor und größere Temperaturschwankungen, konnten zu Messungenauigkeiten führen und wurden von Untersuchenseite vermieden.

3.2.3. Patientenuntersuchung

Den Studienteilnehmern wurde zu Beginn der Untersuchung venöses Blut entnommen. Verwendet wurden hierfür vier Serummonovetten (10ml), zwei EDTA K-Plasmamonovetten (2,7 ml), eine Serummonovette mit Li-Heparin-Gel (4,7 ml) sowie eine Biopoolmonovette (3 ml) (Sarstedt). Nach einer 30 minütigen Ruhephase wurde zur

Bestimmung der basalen Vitalparameter dreimal der Blutdruck und die Herzfrequenz in liegender Position bestimmt. Bei arteriellen Blutdruckwerten > 145/90mmHg erfolgte hier der Ausschluss aus der Studie. Die Blutproben wurden direkt nach Entnahme auf Eis gekühlt ins Labor transportiert. Die Serummonovetten wurden dort zehn Minuten, die EDTA K-Plasmamonovetten sowie die Biopoolmonovette 15 Minuten bei 3000g zentrifugiert und das überstehende Serum bzw. Plasma bei -80° C weggefroren. Die Bestimmung der Lipidparameter (eine Monovette mit Li-Heparin-Gel/4,7 ml) erfolgte über die Zentrallaboratorien der Klinischen Chemie der Universitätsklinik zu Köln bzw. der Universitätsklinik des Saarlandes mittels üblicher klinisch-chemischer Routinemethoden.

Die dann erfolgende venöse Unterarmvenenverschluss-Plethysmographie beinhaltete initial eine Bestimmung des basalen Blutflusses (Baseline-Messung) über vier Minuten mit 16 Messungen mit einem jeweils 15-sekündigen Messzyklus. Danach wurde eine fünfminütige arterielle Ischämie durch Aufpumpen der Oberarmblutdruckmanschette (50 mmHg über dem systolischen Blutdruck) induziert. Direkt nach dem abruptem Entleeren der Manschette durch den Rapid Cuff Inflator begann eine dreiminütige Messung der Phase der reaktiven Hyperämie (zwölf Messungen mit 15-sekündigem Messzyklus).

Der Unterarmblutfluss während der reaktiven Hyperämie und hierbei vor allem der Spitzenfluss (peak-flow) gilt als ein Maß der Endothel-abhängigen Vasodilatation.

Nach einer Pause von 15 Minuten begann der zweite Teil der Untersuchung erneut mit einer vierminütigen Bestimmung des basalen Blutflusses. Nach Applikation einer Nitrolingual-Zerbeißkapsel (0.8 mg Glyceroltrinitrat) wurde in einem fünfminütigen Messintervall die Endothel-unabhängige Vasodilatation bestimmt (20 Messungen mit 15-sekündigem Messzyklus).

Bei Blutdruckwerten von systolisch über 145 mmHg bzw. unter 90 mmHg wurde die Untersuchung abgebrochen. Die Untersuchung wurde ebenfalls abgebrochen, wenn in der Erstuntersuchung der erste Wert der Hyperämie-Phase über 25ml/100ml Unterarm/min lag.

Im Anschluss an diese Untersuchung wurde ein Elektrokardiogramm angefertigt. Danach erhielten die Patienten ihre Studienmedikation (16 mg/Tag Candesartan, 5 mg/Tag Felodipin oder Placebo) für 42 Tage. Nach der 42-tägigen Behandlungsphase wurden die Messungen analog der Erstuntersuchung wiederholt.

3.2.4. ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)

Die in dieser Studie bestimmten Laborparameter Interleukin-6 (IL-6), lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (sICAM-1), Monocyten-chemotaktisches Protein-1 (MCP-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Gewebeplasminogen Aktivator (tPA), Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und 8-Isoprostan wurden mit einem Enzyme-Linked-Immunoabsorbent Assay (ELISA) bestimmt. Bei diesem Messprinzip bildet das zu untersuchende Protein einen Komplex mit dem sich auf der Mikrotiterplatte befindlichem spezifischen Antikörper. Durch Zugabe eines zweiten monoklonalen Antikörpers und Entfernung überschüssiger Antikörper und Produkte entsteht nach dem Sandwich-Prinzip ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. An diesen Komplex bindet daraufhin ein Enzym, das durch die Farbreaktion des zuletzt zugegebenen Substrats sichtbar gemacht wird. Diese Farbreaktion ist direkt proportional zur Konzentration des nachzuweisenden Proteins und wird in einem ELISA-Reader bei Wellenlängen zwischen 405 und 492 nm bestimmt. Eine Ausnahme bildet hier der Test zur Quantifizierung des 8-Isoprostans. Dieser enthält zusätzlich einen Tracer, bestehend aus mit 8-Isoprostan gekoppelter Acetylcholinesterase. Der Farbnachweis besteht nur aus der Konzentration des Tracers, der mit dem Analysat eine kovalente Bindung am Antikörper eingeht und ist daher indirekt proportional zur Konzentration des zu analysierenden Stoffes.

3.2.5. Blutabnahme zur tPA und PAI-1 Bestimmung

Die Halbwertszeit der Aktivität des tPA reicht von einer Minute bis zu vier Stunden und ist abhängig von der Aktivität des PAI-1. Daher erfolgte die Blutabnahme zur Bestimmung dieser beiden Parameter durch eine spezielle Monovette, die 0.5ml 0.5M Citratpuffer enthält. Dadurch wird der Blut pH-Wert auf 5.9 reduziert und der PAI-1/tPA-Komplex gehemmt

3.2.6. Analyse der Plasmaparameter

3.2.6.1. Bestimmung der Aktivität des tPA

100 μ l des Blutplasmas wurden als Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Ebenfalls wurden 100 μ l tPA-Standard zur Anfertigung der Standardkurve auf die Platte gebracht. Diese Platte enthielt monoklonale tPA-Antikörper, an die das tPA bindet. Nach

einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 600rpm (Thermomixer) wurde die Platte viermal mit PET-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 50µl Substrat (Plasmin-sensitives Farbsubstrat und tPA Aktivitätspromotor) sowie 50µl Plasminogen-Reagenz hinzugegeben und erneut für 90 Minuten bei 600rpm inkubiert. Durch den Aktivitätspromotor kommt es zu einer Reaktion zwischen dem tPA und dem Plasminogen, die durch die Farbreaenz sichtbar gemacht werden kann. 15 Sekunden nach Zugabe der Stopplösung (1.7M Essigsäure) wurde die Absorption im ELISA-Reader bei 405nm gemessen. Die Absorption ist direkt proportional zur tPA-Aktivität. Die tPA-Aktivität wurde in IU/ml angegeben.

3.2.6.2. Bestimmung der Expression des tPA

Auf eine Mikrotiterplatte, die mit anti tPA-Immunglobulinen beschichtet ist, wurden nacheinander 50µl PET-Puffer sowie 20µl Standard, bzw. 20µl Blutplasma hinzugegeben. Das tPA des Standards bzw. der Blutproben bindet während einer einstündigen Inkubationszeit bei 600rpm (Thermomixer) an die anti-tPA-Immunglobuline. Dann wurden jeweils 50µl Konjugat (anti-tPA Fab Fragmente) hinzugegeben, die während einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 600rpm an das tPA binden. Nach viermaligem Waschen mit PET-Puffer wurden 100µl Substrat hinzugefügt. Nach einer erneuten Inkubationsphase von 15 Minuten, wurde die Platte nach Zugabe von 100µl Stopplösung (1.5M Schwefelsäure) 10 Minuten im Dunkeln aufbewahrt. Danach wurde die Absorption bei 492nm gemessen. Die Farbintensität ist direkt proportional zur tPA-Expression.

Die tPA Expression wurde in ng/ml angegeben.

3.2.6.3. Bestimmung der Aktivität des PAI-1

25µl des PET-Puffers wurden auf der Mikrotiterplatte für zwei Minuten bei Raumtemperatur auf einem Thermomixer (600rpm) inkubiert. Diese Platte enthielt monoklonale PAI-1-Antikörper, an die das PAI-1 bindet. Anschließend wurden 25µl des Blutplasmas, bzw. des Standards zusammen mit 25µl Konjugat als Doppelbestimmung auf die Platte gegeben. Es folgte eine Inkubationsphase von 30 Minuten. Nach fünf Waschschrinen mit PET-Puffer und Zugabe von 100µl HRP-Substrat folgte eine Inkubationszeit von fünf Minuten. Die Zugabe von 100µl 1.6 M Schwefelsäure stoppte

die Reaktion und die Platte konnte bei 492nm gemessen werden. Die Absorption ist direkt proportional zur PAI-1-Aktivität, die in IU/ml angegeben wurde.

3.2.6.4. Bestimmung der Expression des PAI-1

Die Mikrotiterplatte zur Bestimmung der PAI-1 Expression besteht für jede Probe aus jeweils einem A-well, das monoklonale gebundene Antikörper sowie lösliche Antikörper gegen PAI-1 enthält und einem N-well, das ebenfalls monoklonal gebundene Antikörper gegen PAI-1 sowie non-immune Antikörper enthält. Initial wurde jeder Slot mit 100µl PET-Puffer beladen, anschließend wurde die Platte eine Minute geschüttelt. Dann wurden jeweils 20µl PAI-Standard (0,10,20,40 ng/ml) bzw. 20µl Probe und anschließend 50µl Konjugat zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 600rpm (Thermomixer) und Raumtemperatur wurde die Platte vier mal mit PET-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 200µl Substrat hinzugefügt und die Platte inkubierte erneut 15 Minuten bei Raumtemperatur und 600rpm. In der gleichen Geschwindigkeit und Reihenfolge wie das Substrat wurden nun 50µl Stopplösung (1.5M Schwefelsäure) hinzugegeben, die Platte 10 Minuten im Dunkeln aufbewahrt und anschließend bei 492nm im ELISA-Reader gemessen.

Die PAI-1 Expression wurde in ng/ml angegeben.

3.2.6.5. Bestimmung der Konzentration des 8-Isoprostan

1ml Blutplasma wurde mit 2ml Ethanol versetzt und fünf Minuten bei 4°C gelagert. Dieser Ansatz wurde dann 10 Minuten mit 1500g bei 4°C zentrifugiert. Der hierbei gewonnene Überstand wurde unter Hinzugabe von 1M Salzsäure auf einen pH-Wert von <4,0 eingestellt und mit 8 ml Wasser versetzt. Parallel hierzu wurden die für den 8-Isoprostane Enzyme Immunoassay Kit notwendigen Säulen zuerst mit 5ml Methanol und dann mit 5ml Wasser aufgereinigt. Anschließend wurden die Säulen mit dem oben beschriebenen Ansatz und dann mit 5ml Wasser und 5ml Hexan aufgefüllt. Die hieraus gewonnenen Filtrate wurden verworfen. Danach wurden jeder Säule 4ml einer Lösung, bestehend aus 1%Methanol und 99% Ethylacetat, hinzugegeben. Das hierbei gewonnene Filtrat wurde in zwei Behälter aliquotiert und in einer Vakuumzentrifuge 30 Minuten bei 60°C zentrifugiert. Die hieraus resultierende Probe wurde mit jeweils 0,225ml EIA-Puffer versetzt und auf eine Inkubationsplatte, welche mit murinen monoklonalen Antikörpern beschichtet war, übertragen. Neben den oben beschriebenen

Proben enthielt die Platte außerdem einen Tracer, bestehend aus mit 8-Isoprostan gekoppelter Acetylcholinesterase und einem Antiserum gegen 8-Isoprostan. Die Platte mit dem Ansatz wurde 17 Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert und anschließend fünfmal mit Wasch-Puffer gespült. Nach Hinzugabe von Ellmans Reagenz, welches durch Acetylcholinesterase seine Absorption verändert, wurden die Werte von 8-Isoprostan photometrisch bestimmt. Die photometrischen Ergebnisse beinhalteten eine Standardkurve, den Wert der unspezifischen Bindung, die Werte der maximalen Bindung des Tracers an die Platte bei Abwesenheit von freiem Analysat sowie die Werte der Totalaktivität der an 8-Isoprostan gekoppelten Acetylcholinesterase. Photometrisch direkt erfasst wurde die Menge an Acetylcholinesterase gekoppeltem 8-Isoprostan. Daher ist die Absorption proportional zu der Konzentration des Tracer und umgekehrt proportional zu der Konzentration von 8-Isoprostan im Plasma.

$$\text{Absorptionsrate} = [\text{Tracer}_{\text{Ansatz}}] = 1 / [\text{8-Isoprostan}_{\text{Plasma}}]$$

Nach Abzug der Werte der unspezifischen Bindung konnte aus den übrigen Parametern eine Standardkurve erstellt werden. Aus dieser konnte eine Formel zur Berechnung der Konzentration von 8-Isoprostan im Plasma ermittelt werden.

Die 8-Isoprostan-Konzentration wurde in pg/ml angegeben.

3.2.6.6. Bestimmung der Konzentration des MCP-1

Auf eine mit spezifischen MCP-1 Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte wurden nacheinander 100µl Standard Verdünnungspuffer und 100µl Standard, bzw. 50µl Standard Verdünnungspuffer und 50µl Probe gegeben. Nach Zugabe von 50µl anti-MCP-1 (Biotin Konjugat mit 15mM Natriumazid) inkubierte die abgedeckte Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur. Zur Entfernung der ungebundenen Probe wurde die Platte sechsmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden 100µl Streptavidin-HRP Arbeitslösung hinzugefügt und die Platte erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden 100µl Stabilized Chromogen als Farbsubstrat zugegeben. Durch Zugabe von 100µl Stoplösung (1.5M Schwefelsäure) wurde im Anschluss an eine 30-minütige Inkubationszeit die Reaktion beendet.

Die Bestimmung des Leerwertes erfolgte durch eine Absorptionsanalyse von 100µl Stabilized Chromogen und 100µl Stoplösung ohne Probe.

Die Mikrotiterplatte wurde innerhalb von zwei Stunden im ELISA-Reader bei einer Absorption von 450 nm gemessen, die Probenergebnisse anschließend zur Aufhebung der Verdünnung mit dem Faktor zwei multipliziert.

Die MCP-1-Konzentration wurde in pg/ml angegeben.

3.2.6.7. Bestimmung der Konzentration des sICAM-1

Auf eine mit spezifischen sICAM-1 Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte wurden nacheinander 100µl Standard Verdünnungspuffer und 100µl Standard bzw. 100µl Probe (1:10 verdünnt) gegeben. Nach Zugabe von 50µl anti-sICAM-1 (Biotin Konjugat mit 15mM Natriumazid) inkubierte die abgedeckte Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur. Zur Entfernung ungebundener Probe wurde die Platte viermal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden 100µl Streptavidin-HRP Arbeitslösung hinzugefügt und die Platte erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden 100µl Stabilized Chromogen als Farbsubstrat zugegeben. Durch Zugabe von 100µl Stoplösung (1.5M Schwefelsäure) wurde im Anschluss an eine 30-minütige Inkubationszeit die Reaktion beendet.

Die Bestimmung des Leerwertes erfolgte durch eine Absorptionsanalyse von 100µl Stabilized Chromogen und 100µl Stoplösung ohne Probe.

Die Mikrotiterplatte wurde innerhalb von zwei Stunden im ELISA-Reader bei einer Absorption von 450 nm gemessen, die Probenergebnisse anschließend zur Aufhebung der Verdünnung mit dem Faktor zehn multipliziert.

Die sICAM-1 Konzentration wurde in ng/ml angegeben.

3.2.6.8. Bestimmung der Konzentration des IL-6

Auf eine mit spezifischen IL-6 Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte wurden nacheinander 100µl Standard Verdünnungspuffer und 100µl Standard bzw. 100µl Probe gegeben. Nach Zugabe von 50µl anti-IL-6 (Biotin Konjugat mit 15mM Natriumazid) inkubierte die abgedeckte Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur. Zur Entfernung ungebundener Probe wurde die Platte viermal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde 100µl Streptavidin-HRP Arbeitslösung hinzugefügt und die Platte erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden 100µl Stabilized Chromogen als Farbsubstrat zugegeben. Durch Zugabe von 100µl Stoplösung (1.5M Schwefelsäure) wurde im Anschluss an eine 30-minütige

Inkubationszeit die Reaktion beendet. Die Bestimmung des Leerwertes erfolgte durch eine Absorptionsanalyse von 100µl Stabilized Chromogen und 100µl Stopplösung ohne Probe. Die Mikrotiterplatte wurde innerhalb von zwei Stunden im ELISA-Reader bei einer Absorption von 450 nm gemessen.

Die IL-6-Konzentration wurde in pg/ml angegeben.

3.2.6.9. Bestimmung der Konzentration des TNF- α

Auf eine mit spezifischen TNF- α Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte wurden nacheinander 100µl Standard Verdünnungspuffer, 100µl Standard bzw. 100µl Probe und 100µl Inkubationspuffer gegeben. Anschließend wurde die abgedeckte Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und zur Entfernung ungebundener Probe viermal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Zugabe von 100µl anti-TNF- α (Biotin Konjugat mit 15mM Natriumazid) inkubierte die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Platte sechsmal gewaschen. Anschließend wurde 100µl Streptavidin-HRP Arbeitslösung hinzugefügt und die Platte erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden 100µl Stabilized Chromogen als Farbsubstrat zugegeben. Durch Zugabe von 100µl Stopplösung (1.5M Schwefelsäure) wurde im Anschluss an eine 30-minütige Inkubationszeit die Reaktion beendet.

Die Bestimmung des Leerwertes erfolgte durch eine Absorptionsanalyse von 100µl Stabilized Chromogen und 100µl Stopplösung ohne Probe.

Die Mikrotiterplatte wurde innerhalb von zwei Stunden im ELISA-Reader bei einer Absorption von 450 nm gemessen.

Die TNF- α -Konzentration wurde in pg/ml angegeben.

3.2.6.10. Bestimmung der Konzentration des hoch-sensitiven CRP

Die Analyse dieses Plasmaparameters erfolgte durch einen immunologischen Latex-sensitiven Trübungstest. Hierbei reagieren an Latex-Mikropartikel gebundenen CRP-Antikörper mit dem Antigen der Probe unter Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Dieser wird nach Agglutination turbidimetrisch gemessen. Die Analyse dieses Serumparameters erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie der Universität zu Köln und der Universität des Saarlandes.

Die hs-CRP Konzentration wurde in mg/l angegeben.

3.3. Statistik

Für die Analyse der Untersuchungsergebnisse der Unterarmvenenverschluss-Plethysmographie wurden die Baseline-Messungen sowie die Messungen der Endothel-unabhängigen Vasodilatation gemittelt. Für die Analyse der Endothel-abhängigen Vasodilatation wurde der Spitzenfluss-Wert in der Phase der reaktiven Hyperämie verglichen.

Alle erhobenen Ergebnisse wurden als Absolutwerte angegeben oder vor und nach der Therapie verglichen und als Veränderung in Prozent ausgedrückt. Sämtliche Angaben erfolgten als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA Test durchgeführt. (Graph Pad Prism, Version 3.0). Die post-hoc Analyse wurde mit dem Newman-Keuls Multiple Comparison Test durchgeführt. Zur Validierung eines eventuellen Einflusses des Blutdruckes und des Lipidstatus auf den Blutfluss wurde eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt (SPSS, Version 10.0). Differenzen mit einem p-Wert von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Validierung der Unterarmblutflussmessung

Zum Nachweis der endothelialen Dysfunktion bei hypercholesterinämischen Patienten wurde die reaktive Hyperämie bei einem Normalkollektiv bestimmt (n=7; LDL-Cholesterin < 130 mg/dl) und diese Ergebnisse mit einem hypercholesterinämischen Kollektiv verglichen (n=6; LDL-Cholesterin > 160 mg/dl). Hierbei wurde bei Probanden mit normwertigen Cholesterinwerten ein durchschnittlicher Spitzenflusswert der reaktiven Hyperämie von 25.4 ± 2 ml/100ml Unterarm/min ermittelt. Das Ergebnis der Hypercholesterinämie-Gruppe war mit einem Wert von 17.0 ± 1 ml/100ml Unterarm/min signifikant erniedrigt (Abbildung 3). Es zeigt sich somit eine eingeschränkte Endothelfunktion bei hypercholesterinämischen Patienten im Vergleich zu einem normocholesterinämischen Kollektiv.

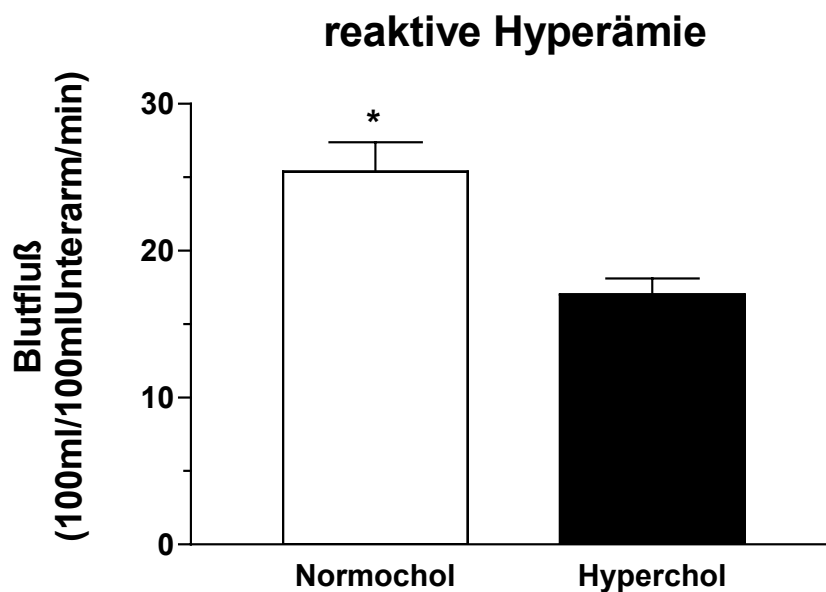


Abbildung 3: Vergleich der plethysmographischen Unterarmblutflussmessung (reaktive Hyperämie) hypercholesterinämischer Patienten (n=6) und normocholesterinämischer Probanden (n=7) (* = $p < 0.05$ = statistisch signifikant)

Zur Validierung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurden bei 13 Probanden an drei aufeinanderfolgenden Tagen die reaktive Hyperämie und der basale Blutfluss bestimmt (Abbildung 4). Zwischen den Messwerten der einzelnen Tage gab es sowohl

bei der reaktiven Hyperämie als auch im basalen Blutfluss keine signifikanten Unterschiede. Somit zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Parameter des Unterarmblutflusses.

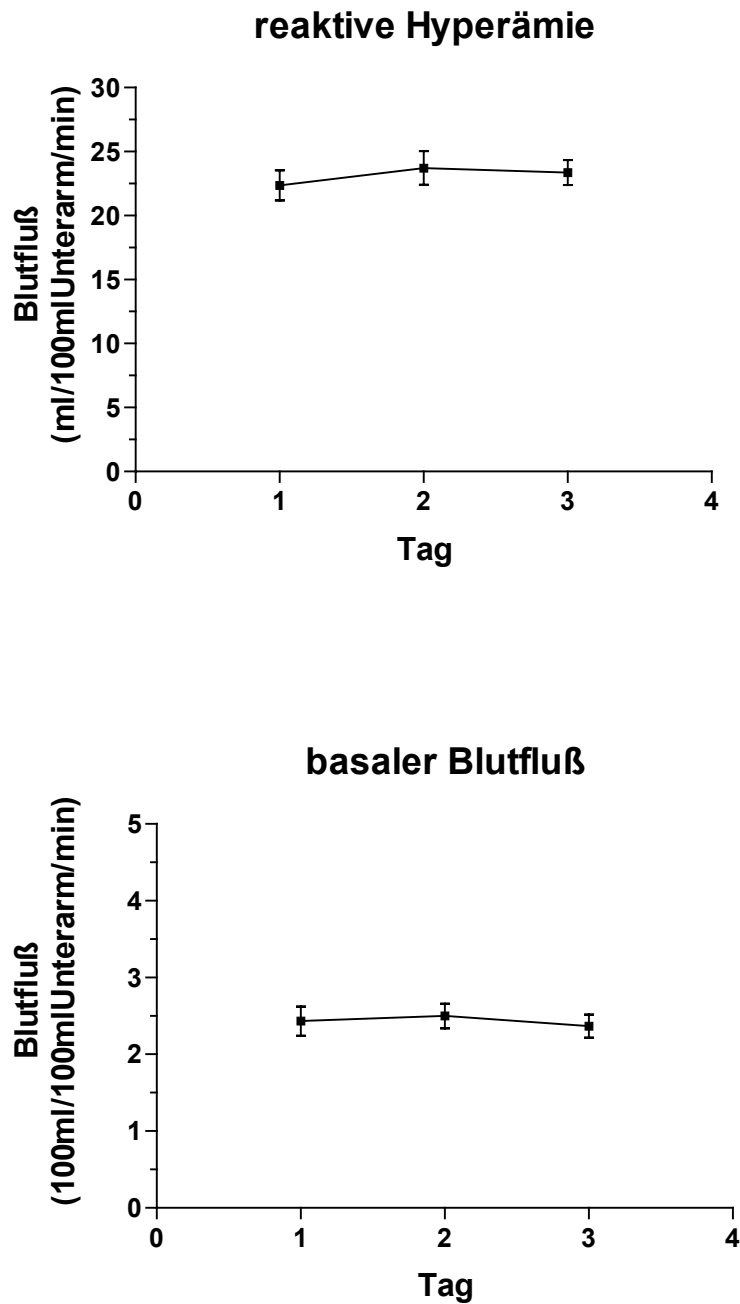


Abbildung 4: Reproduzierbarkeit der reaktiven Hyperämie und der basalen Blutflussmessung in der plethysmographischen Unterarmblutflussmessung bei 13 Probanden an drei aufeinanderfolgenden Tagen

4.2. Patientencharakteristik

Insgesamt wurden 47 Patienten in diese Studie eingeschlossen (17 Placebo, 13 Felodipin, 17 Candesartan). Eine exakt gleiche Verteilung in die einzelnen Randomisierungsgruppen konnte aufgrund einer erhöhten Abbruchrate im Felodipin Kollektiv nicht erzielt werden. Bezüglich des Alters, der Geschlechtsverteilung, der Anzahl an Diabetikern und Rauchern sowie der Ausgangsblutdruckwerte gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Tabelle 2). Wichtig zu erwähnen ist, dass die Patienten entweder nicht unter einer arteriellen Hypertonie litten oder durch medikamentöse antihypertensive Therapie normotensiv eingestellt waren.

	Placebo (n=17)	Felodipin (n=13)	Candesartan (n=17)	p
Alter (Jahre)	55.2±1.8	58.4±1.7	58.1±1.8	NS
Männlich	16	12	16	
Weiblich	1	1	1	
Diabetes	1	0	1	
Raucher	4	2	2	
Blutdruck (mmHg)				
Systolisch	130.0±2.9	131.7±3.9	138.1±3.8	NS
Diastolisch	77.2±2.1	80.8±2.0	80.0±2.4	NS

Tabelle 2: Patientencharakteristik der Ausgangswerte des Alters, des Geschlechtes, der Anzahl der Diabetiker und Raucher sowie des Blutdruckes (NS = statistisch nicht signifikant)

Der Unterarmblutfluss, die Lipidparameter sowie die zu analysierenden Serummarker zeigten ebenfalls zwischen den Behandlungsgruppen am Tag 0 der Untersuchung keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3).

	Placebo (n=17)	Felodipin (n=13)	Candesartan (n=17)	p
Lipidwerte (mg/dl)				
Cholesterin	261.1±7.1	259.6±7.0	256.7±4.4	NS
LDL-Cholesterin	48.8±3.3	47.8±1.8	45.4±2.0	NS
HDL-Cholesterin	186.8±7.0	181.6±6.6	183.9±3.8	NS
Triglyceride	168.7±17.2	196.0±14.5	181.8±17.9	NS
Serummarker				
8-Isoprostan (pg/ml)	199.5±42.6	256.1±50.2	237.3±48.3	NS
MCP-1 (pg/ml)	126.4±23.4	142.8±29.2	168.7±35.0	NS
sICAM-1 (ng/ml)	108.6±18.9	137.8±26.5	138.7±25.2	NS
hs-CRP (mg/l)	7.3±2.6	3.8±1.7	7.6±2.7	NS
IL-6 (pg/ml)	8.0±2.6	6.9±1.8	7.0±1.7	NS
TNF-α (pg/ml)	16.3±1.4	16.9±1.8	15.9±1.6	NS
tPA (ng/ml)	9.4±1.1	10.2±1.1	10.1±1.3	NS
PAI-1 (ng/ml)	11.9±1.7	14.9±4.7	15.3±3.2	NS
Blutfluss (ml/100 ml Unterarm/min)				
Basaler Blutfluss	2.1±0.2	2.1±0.1	2.3±0.2	NS
Reaktive Hyperämie	20.5±1.3	22.7±1.8	20.4±0.9	NS

Tabelle 3: Patientencharakteristik der Ausgangswerte des Lipidstatus, der Serummarker und des Blutflusses (NS = statistisch nicht signifikant)

Ebenfalls zeigten sich hinsichtlich der kardiovaskulären Vorerkrankungen und der eingenommenen Begleitmedikation keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Behandlungsgruppen (Tabelle 4).

	Placebo (n=17)	Felodipin (n=13)	Candesartan (n=17)
Vorerkrankungen			
Koronare Herzerkrankung	11	6	11
Arterielle Hypertonie	10	6	11
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	1	1	0
Schlaganfall	1	1	0
Medikamente			
Thrombozyten- aggregationshemmer	13	7	12
Betarezeptorenblocker	11	6	12
Diuretika	0	4	1
Nitrate	0	0	1
Alpharezeptorenblocker	0	3	1
Schilddrüsenhormone	1	1	1
Vit.K-Antagonisten	0	0	1
Antidiabetika	1	0	1

Tabelle 4: Patientencharakteristik der Vorerkrankungen und der eingenommenen Begleitmedikation

Insgesamt zeigt sich daher ein Patientenkollektiv ohne signifikante Unterschiede in den drei Behandlungsgruppen hinsichtlich der Vorerkrankungen, der Begleitmedikation, der Ausgangswerte für die Lipide, des arteriellen Blutdruckes, der zu analysierenden Serummarker und des Blutflusses.

4.3. Unterarmblutfluss

Abbildung 5 zeigt die prozentuale Veränderung der Ischämie induzierten Endothel-abhängigen Vasodilatation. Im Vergleich zur Kontroll- und zur Felodipin-Gruppe wurde die reaktive Hyperämie als Maß der Endothel-abhängigen Vasodilatation unter Therapie mit Candesartan signifikant verbessert. Es kam hier zu einem prozentualen Anstieg der reaktiven Hyperämie (Spitzenfluss) von $31.0 \pm 9.3\%$, in den Kontrollgruppen lediglich zu einem Anstieg von $8.3 \pm 4.5\%$ in der Felodipin-Gruppe und $5.3 \pm 5.1\%$ in der Placebo-Gruppe. Die basalen Blutflusswerte sowie die Nitroglycerin-induzierte Endothel-unabhängige Vasodilatation wurden durch keine Behandlung beeinflusst (Tabelle 5).

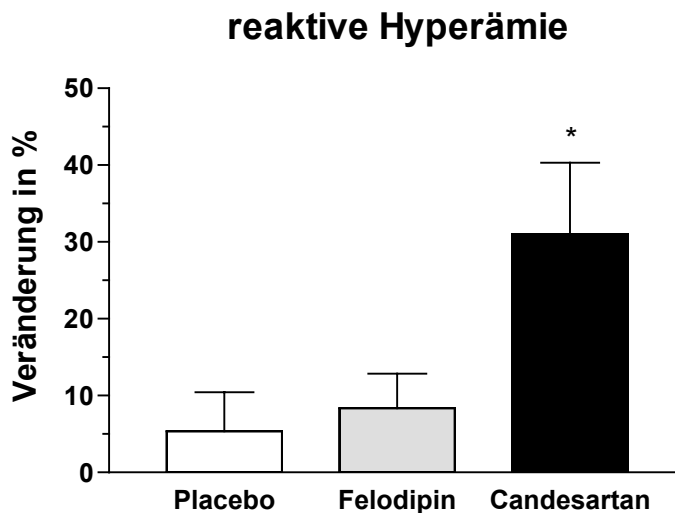


Abbildung 5: Prozentuale Veränderung der reaktiven Hyperämie (Spitzenfluss) in den drei Behandlungsgruppen (* = $p < 0.05$ = statistisch signifikant)

	Placebo (n=17)	Felodipin (n=13)	Candesartan (n=17)	p
	Veränderung in %			
Blutfluss (ml/100 ml Unterarm/min)				
Basaler Blutfluss	+10.8±5.3	+7.1±7.1	+15.8±8.1	NS
Reaktive Hyperämie	+5.3±5.1	+8.3±4.5	+31.0±9.3	p<0.05
Nitroglycerin	+5.0±3.1	+6.9±3.6	-2.5±4.1	NS

Tabelle 5: Prozentuale Veränderung des Blutflusses in den drei Behandlungsgruppen, (NS = statistisch nicht signifikant, p<0.05 = statistisch signifikant)

Es zeigte sich eine selektive Verbesserung der Endothel-abhängigen Vasodilatation durch Candesartan, nicht jedoch durch Placebo oder Felodipin. Die anderen Messparameter des basalen Blutflusses und der Nitrat-induzierten Endothel-unabhängigen Vasodilatation wurden durch keine Substanzgruppe beeinflusst.

Der Blutdruck sowie die Lipidparameter wurden durch die Medikation nicht alteriert (Tabelle 6). Eine multivariate Regressionsanalyse zeigte, dass Veränderungen im Blutdruck und im Lipidstatus keinen Einfluss auf die Endothel-abhängige Vasodilatation hatten.

	Placebo (n=17)	Felodipin (n=13)	Candesartan (n=17)	p
Veränderung in %				
Blutdruck (mmHg)				
Systolisch	+4.0±3.1	-1.0±3.0	-4.3±3.2	NS
Diastolisch	+5.8±3.6	+1.0±3.5	-3.4±2.8	NS
Lipidwerte (mg/dl)				
Cholesterin	-1.2±3.8	-3.5±2.6	-1.3±1.3	NS
LDL-Cholesterin	-4.3±4.4	-4.3±2.7	-4.9±1.9	NS
HDL-Cholesterin	-2.2±3.5	+1.3±4.9	-0.7±2.4	NS
Triglyceride	+15.3±10.1	+0.3±9.2	+14.8±10.6	NS

Tabelle 6: Prozentuale Veränderung des Blutdruckes und der Lipidwerte in den drei Behandlungsgruppen (NS= statistisch nicht signifikant)

4.4. Entzündungsparameter und Gerinnungsfaktoren

Unter der Therapie mit Candesartan kam es zu einer signifikanten Reduktion der Plasmakonzentrationen von sICAM-1 (Abbildung 6) und MCP-1 (Abbildung 7). IL-6, hs-CRP, TNF- α , PAI-1 sowie tPA wurden durch die Studienmedikation nicht signifikant verändert (Tabelle 7 und 8).

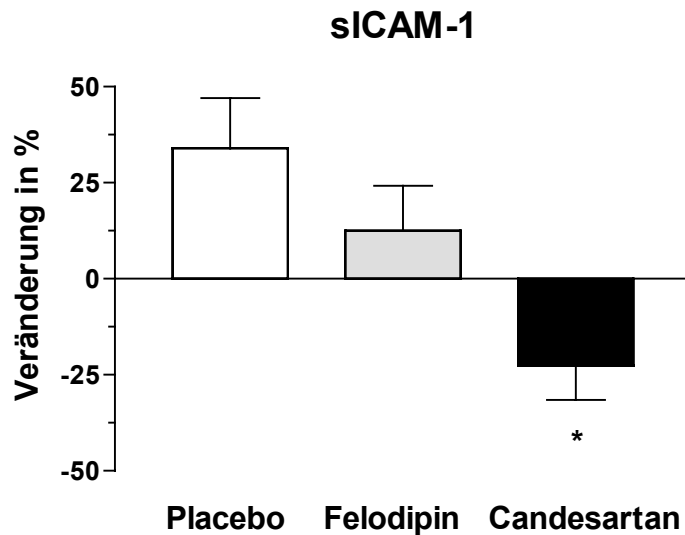


Abbildung 6: Prozentuale Veränderung der Plasmakonzentration von sICAM-1 in den drei Behandlungsgruppen (* = $p < 0.05$ = statistisch signifikant)

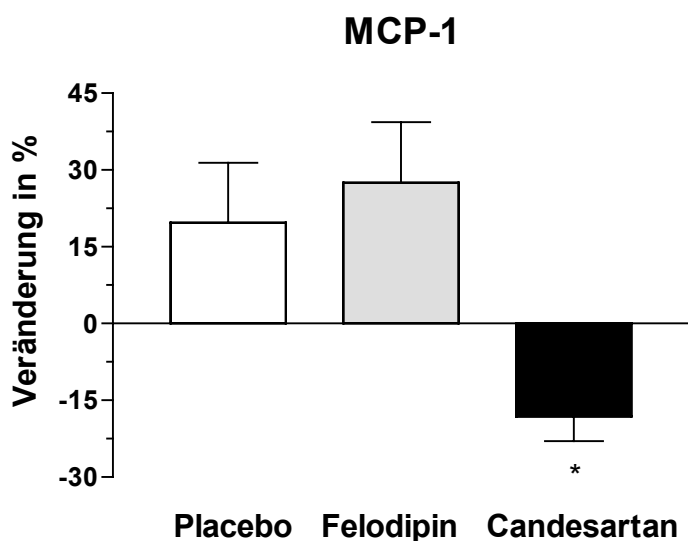


Abbildung 7: Prozentuale Veränderung der Plasmakonzentration von MCP-1 in den drei Behandlungsgruppen (* = $p < 0.05$ = statistisch signifikant)

	Placebo (n=17)	Felodipin (n=13)	Candesartan (n=17)	p
	Veränderung in %			
Serummarker				
MCP-1	+19.7±11.7	+27.5±11.8	-18.1±4.8	$p < 0.05$
sICAM-1	+33.9±13.1	+12.5±11.7	-22.6±8.9	$p < 0.05$
hs-CRP	-7.5±20.3	+7.6±25.9	-24.0±17.5	NS
IL-6	-39.6±15.1	-48.1±11.1	-25.2±18.8	NS
TNF- α	+8.1±6.2	+1.3±6.4	+6.8±5.2	NS

Tabelle 7: Prozentuale Veränderungen der Inflammationsmarker in den drei Behandlungsgruppen ($p < 0.05$ = statistisch signifikant, NS = statistisch nicht signifikant)

	Placebo (n=17)	Felodipin (n=13)	Candesartan (n=17)	p
	Veränderung in %			
Serummarker				
tPA Expression	+17.7±11.0	+30.6±13.5	+36.7±14.4	NS
PAI-1 Expression	+134.3±47.7	+102.4±45.0	+161.7±38.5	NS

Tabelle 8: Prozentuale Veränderungen der Gerinnungsmarker in den drei Behandlungsgruppen (NS = statistisch nicht signifikant)

4.5. Oxidativer Stress

Zur Analyse des oxidativen Stresses wurde der Serummarker 8-Isoprostan analysiert. Dieser wurde unter der AT₁-Rezeptorantagonisten-Therapie um 12,7±5,8% im Vergleich zum Ausgangswert reduziert. In der Kontroll-Gruppe zeigte sich ein Anstieg um 12,9±5,7%, in der Felodipin-Gruppe ein Anstieg von 15,9±6,5% (Abbildung 8).

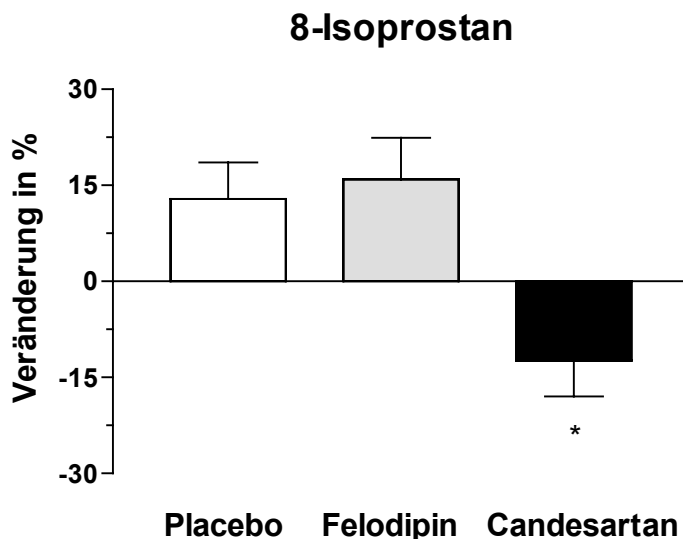


Abbildung 8: Prozentuale Veränderung der Plasmakonzentration von 8-Isoprostan in den drei Behandlungsgruppen (* = p<0.05 = statistisch signifikant)

Zusammenfassend zeigte sich unter der Therapie mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten eine signifikante Steigerung der Endothel-abhängigen Vasodilatation sowie eine signifikante Reduktion der Inflammationsparameter sICAM-1 und MCP-1. Ebenfalls kam es zu einer signifikanten Abnahme des oxidativen Stresses, gemessen am Parameter 8-Isoprostan.

5. Diskussion

5.1. Endotheliale Dysfunktion, Hypercholesterinämie und AT₁-Rezeptorexpression

Grundlage der koronaren Herzerkrankung ist die Atherosklerose der Koronararterien. Die Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung und wird durch Entzündungsmediatoren in ihrem Ausmaß bestimmt (Ross 1999). Ein initiales Ereignis in der Entwicklung der Atherosklerose ist die Monozyteninfiltration, die unter anderem durch MCP-1 vermittelt wird (Gerrity 1981, Ross 1993). MCP-1 lässt sich in atherosklerotischen Läsionen nachweisen und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose (Nelken et al. 1991).

Ein weiterer Entzündungsmarker ist das Adhäsionsmolekül ICAM-1. Es vermittelt sowohl die Leukozyten-Leukozyten-Interaktionen als auch die Leukozyten-Endothel-Interaktionen. Weitere Komponenten des Immunsystems wie die Zytokine IL-6 und TNF- α spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Zytokine sind eine Gruppe nicht-enzymatischer, löslicher Proteine, die als Mediatoren fungieren und vor allem von Makrophagen, Endothelzellen und natürlichen Killer-Zellen gebildet werden (Tedgui 2005, Ogiwara et al. 2004, Witkowska et al. 2004, Ikata et al. 2000).

Das Gerinnungssystem hat gleichfalls einen wesentlichen Effekt auf die Atherosklerose. TPA hemmt die ROS-Produktion in Entzündungszellen und senkt somit den oxidativen Stress (Stringer 2000). TPA-Konzentrationen korrelieren positiv mit zukünftigen koronaren Ereignissen (Thompson et al. 1995, Hamsten et al. 1985, Ridker et al. 1993). Dies wird durch die gleichzeitige Zunahme des PAI-1 erklärt. PAI-1 bildet mit tPA einen Komplex und verringert dadurch die Aktivität des freien und physiologisch aktiven tPA (Jansson et al. 1993).

In einer Vielzahl von prospektiven Studien während der letzten Jahre konnte ein Zusammenhang zwischen systemisch messbaren Inflammationsmarkern wie den Zytokinen IL-6 und TNF- α , Adhäsionsmolekülen wie sICAM-1 und verschiedenen Akute-Phase-Proteinen, wie zum Beispiel dem mittels eines hochsensitiven Assays bestimmten C-reaktiven Protein, und konsekutiven kardiovaskulären Endpunkten gezeigt werden. Diese erwähnten Proteine können daher als Prognoseparameter für die Atherosklerose und das kardiovaskuläre Risiko angesehen werden. So zeigten Danesh et al. 2002 in einer Metaanalyse, dass Personen, deren hs-CRP-Konzentrationen sich in der obersten Tertile der Verteilung (> 3 mg/l) befanden, ein mehr als doppelt so hohes Risiko für ein zukünftiges koronares Ereignis besitzen als diejenigen, deren hsCRP-

Konzentrationen in der untersten Tertile lagen ($< 1\text{mg/l}$). Diese Assoziation liegt in derselben Größenordnung wie diejenige für die klassischen Risikofaktoren Nikotin, Hyperlipoproteinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und körperliche Inaktivität und war statistisch unabhängig von diesen Faktoren. HsCRP ist möglicherweise auch ein Marker für ein erhöhtes Risiko am plötzlichen Herztod zu versterben (Albert et al 1999).

sICAM-1 korreliert signifikant mit der Intima-Media-Dicke, einem frühzeitigen Marker der Atherosklerose, sowie mit etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Nikotin, Hypertonus und niedrigem HDL-Cholesterin (Rohde et al. 1998, Rohde et al. 1999). Ikata et al. (2000) bezeichneten sICAM-1 als eigenständigen Risikomarker der Atherosklerose.

MCP-1 kann ebenfalls als ein Risikomarker der KHK angesehen werden. In atherosklerotischen Läsionen konnte im Vergleich zu normalen arteriellen Gefäßen eine Überexpression von MCP-1 nachgewiesen werden (Nelken et al. 1991). Die Bedeutung von MCP-1 zeigt sich nicht nur in chronischen Gefäßveränderungen, sondern auch bei Restenosierung dilatierter Koronargefäße. Cipollone et al. zeigten 2001, dass die MCP-1-Plasmakonzentrationen nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie bei Patienten, bei denen es zu einer Restenosierung des Gefäßes kam, signifikant höher waren. Patienten die einen cerebralen Insult oder einen akuten Myokardinfarkt erlitten hatten, zeigten in einer weiteren Untersuchung durch Arakelyan et al. 2005 erhöhte Werte für MCP-1.

Desweiteren kann IL-6 als Prognosemarker der KHK angesehen werden. So zeigten sich bei Patienten mit instabiler Angina pectoris höhere IL-6-Konzentrationen als bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (Biasucci et al. 1996).

Die endotheliale Dysfunktion spielt in der Atherogenese eine wichtige Rolle (Vogel 1997). Die endotheliale Dysfunktion ist der erste und essentielle Schritt in der Atheroskleroseentwicklung (Ross 1999) und ein unabhängiger prognostischer Risikomarker der koronaren Herzerkrankung. Sie ist gekennzeichnet durch proinflammatorische und prokoagulatorische Prozesse sowie eine verminderte Endothel-abhängige Vasodilatation. Patienten, die während eines Beobachtungszeitraumes ein kardiales Ereignis erlitten, hatten im Vorfeld bereits eine signifikant erhöhte vasokonstriktorische Antwort auf Acetylcholin und somit eine schwere endotheliale Dysfunktion (Schächinger et al. 2000). Bei normaler Endothelfunktion bewirkt Acetylcholin über muskarinerge cholinerge Rezeptoren eine Vasodilatation (Vogel 1997). Eine schwere endotheliale Dysfunktion in leichtgradig veränderten oder normalen Koronararterien führt zu vermehrtem Auftreten kardialer Ereignisse wie Infarkt, Revaskularisation oder Tod (Suwaidi et al. 2000).

Der entscheidende Mechanismus der endothelialen Dysfunktion ist die verminderte NO-Bioverfügbarkeit. Dieser Verlust resultiert durch eine verminderte NO-Produktion oder aus einer Inaktivierung von NO durch freie Sauerstoffradikale wie O_2^- (Harrison 1997b). Oxidativer Stress beschreibt eine Stoffwechsellage, bei der es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von Sauerstoffradikalen und antioxidativen Substanzen zugunsten der Sauerstoffradikale kommt. Eine vermehrte Produktion von ROS sowie eine abgeschwächte endogene Synthese von Antioxidantien oder verminderter Funktion antioxidativer Enzyme führt zur Oxidation biologischer Makromoleküle wie DNA, Proteine und Lipide, die dadurch in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. ROS entstehen durch Reduktion von molekularem Sauerstoff. Eine der wichtigsten Quellen der ROS-Produktion in den Gefäßzellen sind die NAD(P)H-Oxidase und die Xanthinoxidase (Griendling et al. 2000, Cai et al. 2000).

Unter physiologischen Bedingungen produziert die endotheliale NO-Synthase (eNOS) in Endothelzellen aus L-Arginin unter Entstehung des Nebenproduktes L-Citrullin NO (Palmer et al. 1988, Bredt et al. 1991, Pollock et al. 1991). Eine Verschiebung des Gleichgewichtes von NO und ROS in Richtung NO bewirkt eine gestiegene NO-Bioverfügbarkeit. Hierfür benötigt die eNOS den Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4). Im Tierversuch mit transgenen Mäusen, bei denen die BH_4 -Konzentration um 60% reduziert war, wurde eine verminderte NO-Freisetzung zugunsten einer Erhöhung der Superoxid-Produktion durch die eNOS nachgewiesen (van Hinsbergh 2001). Der Mangel an BH_4 führt folglich zu einer Dysfunktion der eNOS verbunden mit der Bildung von ROS und verminderter NO-Bioverfügbarkeit (Cai et al. 2000, Harrison et al. 2003).

Neben diesen beschriebenen Entstehungswegen gibt es noch weitere Quellen der ROS-Produktion, wie z.B. die Cytochrom P450-Isoenzyme, die mitochondriale Atmungskette, die Autooxidation von reduzierten Verbindungen wie Oxy-Hämoglobin oder Thiolen und die peroxisomale Oxidation von Fettsäuren (Souza et al. 2003).

Zu den Antioxidantien zählen die exogenen Substanzen wie Vitamin E, Vitamin C, Beta-Carotin und N-Acetylcystein. In der Gruppe der antioxidativen Enzyme befinden sich neben der Katalase, der Thioredoxin Reduktase, der Glutathion-Peroxidase vor allem die Superoxid Dismutasen (SOD) (Mates et al. 1999). Superoxid Radikale werden normalerweise durch SOD inaktiviert. Diese Enzyme katalysieren die Oxidation eines Superoxid-Anions zu molekularem Sauerstoff und die Reaktion eines zweiten Superoxid-Anions zu Wasserstoffperoxid. Über eine Radikal/Radikal-Reaktion kann unter Entstehung des toxischen Peroxynitrits Superoxid aber schneller eine Bindung mit NO eingehen und dieses inaktivieren. Die Radikalfreisetzung innerhalb und außerhalb der Zellen führt sowohl zur Aktivierung bestimmter Signalwege als auch zur Induktion Redox-sensitiver Gene wie MCP-1, ICAM-1 und IL-6. ROS bewirken verschiedene

Veränderungen im Gewebe von Blutgefäßen, die mit Wachstum der glatten Muskulatur, Koagulation, Inflammationsreaktionen und Beeinträchtigung der Endothel-vermittelten Vasorelaxation einhergehen können (Griendling et al. 2000).

Ein wichtiger Regulator der vaskulären ROS-Produktion ist Angiotensin II. Die Wirkung dieses Haupteffektors des Renin-Angiotensin-Systems wird durch spezifische Rezeptoren vermittelt, hierbei vor allem über die Aktivierung des AT₁-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen. Dieser Rezeptor ist verantwortlich für alle wesentlichen bekannten pathologischen Effekte von Angiotensin II wie Vasokonstriktion, Ablagerung von extrazellulären Matrixmolekülen, vaskuläre Inflammation durch vermehrte Expression von MCP-1, Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Zytokinen, Zellproliferation und -migration. Angiotensin II stimuliert über den AT₁-Rezeptor die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase, die für den Hauptteil der in Gefäßwänden produzierten ROS verantwortlich ist (Griendling et al. 1994). Die Aktivierung des Enzyms erfolgt biphasisch, der initiale Schritt ist die Stimulation des AT₁-Rezeptors durch Angiotensin II, der zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und dadurch zu einer raschen Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und zur Superoxid-Produktion führt. In der zweiten Phase stimulieren die Superoxid Radikale die SRC-Tyrosinkinase, gefolgt von der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und der Stimulierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase, die schließlich die GTPase rac 1 und den gesamten NAD(P)H-Oxidase Komplex aktiviert (Seshiah et al. 2002). Eine gesteigerte NAD(P)H-Oxidase Aktivität ist mit abgeschwächter NO-vermittelter Vasorelaxation assoziiert, entsprechend einer endothelialen Dysfunktion (Guzik et al. 2000). Eine Angiotensin II-induzierte Hypertonie führt zu einer gesteigerten NAD(P)H-Oxidase-Aktivität, einer verdoppelten vaskulären O₂⁻-Produktion und zu einer endothelialen Dysfunktion (Rajagopalan et al. 1996).

Die AT₁-Rezeptor-Aktivierung führt zu weiteren Effekten auf oxidative Enzymsysteme wie die eNOS und die Xanthinoxidase. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Applikation von Angiotensin II zu einer oxidativen Inaktivierung von BH₄ und damit zu einer dysfunktionellen eNOS mit vermehrter ROS Produktion führte (Chalupsky et al. 2005). Gleichfalls bewirkt Angiotensin II eine vermehrte Aktivierung der Xanthinoxidase (Harrison et al. 2003).

Die Expression des AT₁-Rezeptors wird durch unterschiedliche Agonisten beeinflusst. Die Regulation dieses Rezeptors ist für die Pathogenese der Atherosklerose von großer Bedeutung, da das Ausmaß der AT₁-Rezeptor-induzierten Vasokonstriktion, Zellproliferation und ROS-Produktion entscheidend von dem Ausmaß der Expression dieses Rezeptors in der Gefäßwand abhängt. Eine gesteigerte Expression des AT₁-Rezeptors vermittelt vermehrt die biologischen Effekte des Angiotensin II (Lassegue et

al. 1995, Nickenig et al. 1996, Nickenig et al. 1997b Nickenig et al. 1998a, Nickenig et al. 1998b).

Die Hypercholesterinämie zählt zu den wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren, und ist mit vaskulärem oxidativen Stress und endothelialer Dysfunktion assoziiert (Vogel 1997). Neuere Studien haben ergeben, dass die Hypercholesterinämie sowohl in vitro (glatte Gefäßmuskelzellen) als auch in vivo (Kaninchen, hypercholesterinämische Patienten) zu einer Überexpression des AT₁-Rezeptors und zu den damit verbundenen Konsequenzen wie vermehrte Vasokonstriktion, Zellproliferation und ROS-Produktion führt (Nickenig et al. 1997b, Nickenig et al. 1999). Hier ergibt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen Hypercholesterinämie, AT₁-Rezeptor-Expression, oxidativem Stress und Induktion der endothelialen Dysfunktion als pathogenetisches Konzept.

5.2. Nutzen der Inhibition des AT₁-Rezeptors

In großen klinischen Studien wie der Scandinavian Simvastatin Survival Studie, der WOSCOP-Studie und der CARE-Studie konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass die Cholesterin-senkende Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (sogenannten Statinen) bei Patienten mit Hypercholesterinämie und/oder koronarer Herzkrankheit zu weniger Myokardinfarkten und Schlaganfällen sowie zu einer Reduktion der Mortalität führt (Tonkin 2001). Anderson et al. (1995a) zeigten, dass die Therapie mit einem Statin eine Absenkung des LDL-Cholesterinspiegels und eine deutliche Verbesserung der endothelialen Funktion (Acetylcholin-induzierte koronare Endothel-abhängige Vasodilatation) bewirkte. In einer weiteren Studie wurde mittels intraarterieller Acetylcholin-Infusion und Unterarmvenenverschluss-Plethysmographie nachgewiesen, dass durch eine Statin-Therapie eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion bei Hypercholesterinämie erzielt werden kann (O'Driscoll et al. 1997). Dieser Effekt stellte sich nach einer vierwöchigen Therapie ein. Andere Ergebnisse zeigten jedoch auch einen wesentlich schneller einsetzenden Effekt der Statine auf die Gefäßfunktion. So konnte in einer weiteren Studie an hypercholesterinämischen Patienten bereits nach drei Tagen eine Verbesserung der Endothelfunktion erzielt werden (John et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse wiesen Tsunekawa et al. 2001 in einer Studie an 27 Diabetikern mit leichter Hypercholesterinämie nach. Hier konnte nach dreitägiger Therapie mit Cerivastatin ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Endothel-abhängigen Vasodilatation gezeigt werden. Diese Effekte schienen sogar rascher aufzutreten als der begleitende Abfall des LDL-Cholesterinspiegels. Wassmann et al. (2003b) wiesen nach, dass Statine bereits nach 24 Stunden zu einer Verbesserung der koronaren endothelialen Funktion führen können, ohne dass die messbaren Cholesterinspiegel beeinflusst waren. Subgruppenanalysen aus der WOSCOP- und CARE-Studie zeigten, dass trotz ähnlicher Cholesterinspiegel statinbehandelte Individuen ein niedrigeres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse haben als vergleichbare placebobehandelte Individuen. Diese Analysen legen nahe, dass der protektive Effekt von Statinen über den Cholesterin-senkenden Effekt hinaus durch direkte Wirkungen auf die Gefäßwand, die sogenannten pleiotropen Effekte der Statine, unterstützt wird.

Neuere experimentelle Studien zeigen, dass Statine cholesterinunabhängig direkt eine vermehrte Expression der eNOS bewirken (Wassmann et al. 2002a, Wassmann et al. 2002b, Laufs et al. 1998).

In Tieruntersuchungen führte eine Statinbehandlung zu einer Reduktion inflammatorischer Zellen in der Gefäßwand (Shimizu 2003). Statine verringern in Leukozyten die Synthese von MCP-1 (Kiener 2001). Ähnliche Befunde zeigten sich auch

in kultivierten glatten Muskelzellen (Knapp et al. 2000). In einer klinischen Studie an 74 hypercholesterinämischen Patienten bewirkte sowohl eine hoch- als auch eine niedrigdosierte Statin-Therapie eine signifikante Reduktion von IL-6 und sICAM-1 (Nawai et al. 2003). Ähnliche Ergebnisse mit einer signifikanten Abnahme von IL-6, sICAM-1, CRP und TNF- α unter Therapie mit Atorvastatin zeigten Ascer et al. 2004 bei 68 Patienten mit einer Hypercholesterinämie.

Ein weiterer wichtiger Nutzen der Statin-Therapie ist der antioxidative Effekt. Eine Behandlung mit Statinen führte zu einer signifikanten Reduktion des oxidativen Stresses mit verminderter ROS-Produktion (Wassmann et al. 2002b, Wassmann et al. 2003a). Die verminderte ROS-Produktion entsteht unter anderem durch eine Inhibition der NAD(P)H-Oxidase und eine darüber vermittelte verringerte Produktion von Superoxid (Takayama et al. 2004). Zudem konnte eine erhöhte Expression des antioxidativen Enzyms Katalase nachgewiesen werden (Wassmann et al. 2002a). Ein wichtiger Effekt ist eine Hemmung der Rac-1 GTPase, die für die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase benötigt wird (Wassmann et al. 2001b). Die erwähnten positiven Effekte der Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern lassen sich jedoch nicht nur bei Hypercholesterinämie, sondern auch bei normwertigen Lipidspiegeln nachweisen (De Caterina et al. 2002, Rikitake et al. 2001). Bei normocholesterinämischen hypertensiven Ratten wurde unter Statin-Therapie eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion erzielt. Hier konnte ebenfalls eine verminderte ROS-Produktion nachgewiesen werden (Wassmann et al. 2001a). Interessanterweise bewirkt eine Statin-Therapie in vitro und in vivo eine deutliche Verminderung der Genexpression des AT₁-Rezeptors (Wassmann et al. 2001a, Wassmann et al. 2001b).

Die Hypercholesterinämie führt zu vermehrtem oxidativen Stress und endothelialer Dysfunktion. In diesem Zusammenhang spielt der AT₁-Rezeptor eine wichtige Rolle, da er bei der Hypercholesterinämie überexprimiert ist und oxidativen Stress und eine vermehrte Inflammation bewirkt (Nickenig et al. 1997a, Nickenig et al. 1997b, Nickenig et al. 1999). Statine bewirken nicht nur eine Senkung der Lipidspiegel bei Hypercholesterinämie, sondern vermindern direkt den oxidativen Stress und die Expression des AT₁-Rezeptors und verbessern die Endothelfunktion. Hierbei handelt es sich um einen wesentlichen Therapieeffekt der Statine. Möglicherweise ist der AT₁-Rezeptor ein molekularer Schlüsselmechanismus der Hypercholesterinämie-assoziierten endothelialen Dysfunktion.

Die Überprüfung dieser Hypothese sollte in Form der vorliegenden klinischen Studie bei hypercholesterinämischen Patienten mit endothelialer Dysfunktion erfolgen. Es wurden 47 normotensive hypercholesterinämische Patienten mit verminderter Endothel-abhängiger Vasodilatation in der plethysmographischen Erstuntersuchung randomisiert

und doppelblind mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten, einem Calciumantagonisten oder Placebo für 6 Wochen behandelt. Danach wurde erneut plethysmographisch die Endothel-abhängige und die Endothel-unabhängige Vasodilatation untersucht. Zusätzlich wurden Marker der Inflammation, des oxidativen Stresses und der Blutgerinnung bestimmt.

In dieser Studie bewirkte die 42-tägige Behandlung hypercholesterinämischer Patienten mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan eine Verbesserung der Endothel-abhängigen Vasodilatation. Dies zeigte sich in einem Anstieg der Ischämie-induzierten reaktiven Hyperämie. In der Placebo-Gruppe und der Felodipingruppe zeigten sich keine signifikanten Effekte. Der basale Blutfluss und die Nitroglycerin-induzierte Endothel-unabhängige Vasodilatation wurden durch die medikamentöse Therapie nicht signifikant beeinflusst. Ein wichtiger Punkt ist, dass das Patientenkollektiv normotensiv war und der Lipidstatus und die Blutdruckwerte durch die Medikation nicht signifikant verändert wurden. Die signifikante Verbesserung der Endothel-abhängigen Vasodilatation zeigt daher einen selektiven Effekt der AT₁-Rezeptorblockade unabhängig von einer Beeinflussung des Lipidprofils und des Blutdrucks.

Die Messung der Endothel-abhängigen Vasodilatation kann auf invasivem oder nicht-invasivem Wege erfolgen. Im Koronarsystem wird sie meist mittels Acetylcholin-Infusion untersucht. Acetylcholin wird dabei in steigender Dosierung selektiv intrakoronar infundiert und Änderungen des Lumendiameters mit quantitativer Angiographie gemessen (Ludmer et al. 1986). Die Reaktionen reichen von geringer Dilatation oder keiner Kaliberänderung bis zur ausgeprägten Vasokonstriktion. Die Acetylcholin-Methode ist invasiv, aufwendig und nur bei solchen Patienten möglich, bei denen eine Indikation zur Koronarangiographie besteht. Die periphere Endothelfunktion der Brachialarterie kann nicht-invasiv mit hochauflösendem Ultraschall untersucht werden. Hierbei werden Diametermessungen von einer Intima-Media-Grenze zur anderen enddiastolisch durchgeführt (Celermajer et al. 1992). Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer Nicht-Invasivität, der Nachteil darin, dass eine systemische Arterie stellvertretend für das Koronarsystem untersucht wird. Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Fluss-vermittelte Dilatation der Brachialarterie gut mit funktionellen Veränderungen der Koronararterien korreliert (Anderson et al. 1995b, Neunteufel et al. 1997). Die in der vorliegenden Studie benutzte Messmethode der Venenverschluss-Plethysmographie analysiert den Unterarmblutfluss als Surrogatparameter für die Endothelfunktion. Diese Methode ist eine in klinischen Untersuchungen häufig benutzte Messtechnik zur Bestimmung der Endothelfunktion, vor allem wegen der Nicht-Invasivität und der einfach zu beherrschenden Messtechnik (Cortella et al. 2000, Higashi et al. 2001a, Higashi et al. 2003).

Die als Goldstandard angesehene Referenzmethode zur Bestimmung der Endothel-abhängigen Vasodilatation ist die intraarterielle Acetylcholin-Infusion. Acetylcholin hat eine duale Wirkung auf die Gefäßwand, die aus einer Endothel-abhängigen vasodilatatorischen Komponente durch Freisetzung von NO und aus einer direkten vasokonstriktorisches Komponente auf die glatte Gefäßmuskulatur besteht. Untersuchungen zeigten, dass die Störung der endothelialen Vasodilatation nicht nur atherosklerotische Gefäße betrifft, sondern auch in völlig glattwandigen Koronarsegmenten von Patienten mit Atherosklerose in anderen Gefäßgebieten und bei Patienten mit atypischer Angina und normalem Koronarangiogramm auftreten kann (Werns et al. 1989, Vrints et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde die reaktive Hyperämie nach fünfminütiger Ischämie als wichtigster Parameter zur Bestimmung der Endothel-abhängigen Vasodilatation eingesetzt. Diese Methode weist Einschränkungen im Vergleich zu der intraarteriellen Acetylcholin-Infusion auf. Der Hyperämie-induzierte Blutfluss ist nicht ausschließlich abhängig vom Endothel, da zusätzlich zu den Endothel-abhängigen vasoaktiven Substanzen noch andere lokale metabolische Faktoren zur Vasodilatation nach Ischämie beitragen können. Weiterhin könnte die Platzierung der Messeinheit, das Alter der in die Studie eingeschlossenen Patienten sowie Einflussfaktoren wie Nikotin oder Stress die Beziehung zwischen hyperämischen Unterarmblutfluss und Endothel-vermittelter Vasorelaxation beeinflussen. Trotzdem wird diese Messmethode als eine valide und reproduzierbare nicht-invasive Untersuchungstechnik und als ein verlässlicher Parameter für die Endothelfunktion angesehen. Zudem bedeutet sie wegen der fehlenden intraarteriellen Injektion eine geringere Belastung für den Probanden und ist weniger zeitaufwendig. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Voruntersuchung zur Validierung der Messmethode wurde bei hypercholesterinämischen Patienten und normocholesterinämischen Probanden der Blutfluss in der reaktiven Hyperämie bestimmt. Hier zeigte die Hypercholesterinämie-Gruppe einen signifikant erniedrigten Wert im Vergleich zum normocholesterinämischen Kollektiv. Die gute Reproduzierbarkeit der Methode ließ sich bei 13 Probanden mit Messungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen unter gleichen Untersuchungsbedingungen nachweisen. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede in den Basalmessungen und den Messungen der reaktiven Hyperämie nachgewiesen werden.

Die Resultate dieser Arbeit stimmen mit bereits veröffentlichten Forschungsergebnissen überein. Tierexperimentelle Studien bei hypercholesterinämischen Kaninchen zeigten, dass eine Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten - ohne die Lipidspiegel oder den Blutdruck zu verändern - zu einer Normalisierung der Freisetzung freier Sauerstoffradikale aus der Gefäßwand, zu einer Aufhebung der endothelialen

Dysfunktion und zu einer verminderten atherosklerotischen Plaquebildung führt (Warnholtz et al. 1999). Bei hypercholesterinämischen Affen führte eine AT₁-Rezeptorblockade durch Losartan zu einer signifikanten Reduktion des Ausmaßes der „fatty-streak“-Läsionen in der Aorta, den Koronararterien und den Carotiden sowie zu einer Reduktion der Inflammation ohne Veränderungen des Plasma-Cholesterinspiegels und des Blutdruckes (Strawn et al. 2000). Wassmann et al. zeigten 2004, dass eine pharmakologische AT₁-Rezeptorblockade bzw. eine genetische Disruption des AT₁-Rezeptors eine signifikante Reduktion atherosklerotischer Läsionen bei hypercholesterinämischen Mäusen bewirkte. Bei hypercholesterinämischen Schweinen bewirkte eine AT₁-Rezeptorblockade mit Losartan eine signifikante Verbesserung des koronaren Blutflusses. In der gleichen experimentellen Studie konnte Enalapril aus der Gruppe der ACE-Hemmer ebenfalls eine Fluss-Verbesserung erzielen, allerdings in geringerem Ausmaß als Losartan (Schwemmer et al. 2000).

Weitere Studien mit ACE-Hemmern zeigten ähnliche Ergebnisse. Eine medikamentöse Therapie mit dem ACE-Hemmer Delapril zeigte ebenfalls eine verminderte Progression der Atherosklerose und eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion bei hypercholesterinämischen Ratten (Hernandez et al. 1998). Ähnliche Ergebnisse zeigten Weckler et al. 2003 für die Substanz Ramipril.

Klinische Patientenstudien zeigten bisher eine Verbesserung der Endothelfunktion durch AT₁-Rezeptorantagonisten bei endothelialer Dysfunktion anderer Genese, wie z.B. bei arterieller Hypertonie oder bei manifester KHK. So zeigten Prasad et al. 2000, dass eine AT₁-Rezeptorblockade sowohl kurz- als auch langfristig durch eine Steigerung der NO Bioverfügbarkeit eine verstärkte Endothel-abhängige Vasodilatation bei normocholesterinämischen, atherosklerotischen Patienten bewirkt. Auch in dieser Studie hatte die AT₁-Rezeptorblockade keinen Einfluss auf die Endothel-unabhängige Vasorelaxation. In einer weiteren klinischen Studie bei Patienten mit essentieller arterieller Hypertonie verbesserte der AT₁-Rezeptorantagonist Losartan die endotheliale Dysfunktion, wohingegen der β -Blocker Atenolol keinen Effekt bewirkte (Schiffrin et al. 2000).

Klinische Studien mit ACE-Hemmern zeigten ebenfalls eine Verbesserung der Endothelfunktion bei hypercholesterinämischen Patienten durch Therapie mit Lisinopril (Lee et al. 1999). Bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung konnten Mancini et al. 1996 in der TREND-Studie (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) eine verbesserte endotheliale Dysfunktion unter Therapie mit Quinapril nachweisen.

In der Pharmakologie der ACE-Hemmer und der AT₁-Rezeptorantagonisten finden sich mehrere Unterschiede. Durch die direkte Blockade am AT₁-Rezeptor haben AT₁-Rezeptorantagonisten den Vorteil, dass die Wirkung von Angiotensin II unabhängig vom

Syntheseort mit höherer Effektivität unterbunden wird als durch ACE-Hemmer. Als potentiell wichtig erweist sich die Selektivität der AT₁-Rezeptorantagonisten. Die potentiell günstigen Wirkungen des AT₂-Rezeptors wie Vasodilatation und Hemmung des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen werden nicht gehemmt, bzw. sogar verstärkt. Ein weiterer Nachteil der ACE-Hemmer besteht im sogenannten Escape-Phänomen. Hierunter versteht man bei langfristiger medikamentöser Therapie mit einem ACE-Hemmer die stärkere Nutzung alternativer Stoffwechselwege zur Produktion von Angiotensin II.

Für andere antihypertensive Medikamente wurde gleichfalls gezeigt, dass bei hypertensiven Patienten die endotheliale Funktion positiv beeinflusst werden kann. In einer Studie, die den Einfluss von Irbesartan und Atenolol bei Patienten mit nicht behandelter Hypertonie untersuchte, zeigten beide Medikamente eine Verbesserung des Endothel-abhängigen Unterarmblutflusses (Von zur Mühlen et al. 2001). In einer weiteren Studie zeigte sich bei der Therapie von unbehandelten Hypertonikern mit Amlodipin ein Trend zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion von Widerstandsgefäßen, wohingegen Atenolol keinen Effekt zeigte (Schiffrin et al. 2002). In mehreren weiteren Arbeiten zeigten Calciumantagonisten im Vergleich zu ACE-Hemmern und AT₁-Rezeptorantagonisten keine positiven Effekte auf die Endothelfunktion (Higashi et al. 1998, Higashi et al. 2001b, Clarkson et al. 2001). In den meisten Studien wurden Patienten mit einer unbehandelten arteriellen Hypertonie eingeschlossen, die hier vorgelegte Studie hingegen untersuchte normotensive Patienten (Patienten ohne bzw. mit suffizient medikamentös eingestellter arterieller Hypertonie). Eine Senkung erhöhter Blutdruckwerte kann per se schon zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion führen. Dies wurde in der vorgelegten Arbeit jedoch ausgeschlossen, da die Blutdruckwerte durch die Behandlung nicht signifikant verändert wurden.

Die Blockade des AT₁-Rezeptors bewirkte in der vorgelegten Studie eine signifikante Reduktion des oxidativen Stresses. In dieser Studie wurden 8-Isoprostane als Marker der Lipidperoxidation in vivo bestimmt. 8-Isoprostane werden nichtenzymatisch durch freie Sauerstoffradikale aus der in der Zellmembran verankerten Arachidonsäure gebildet und durch die Phospholipase A₂ von den Membranlipiden abgespalten und in den Blutkreislauf freigesetzt (Morrow 2005). Durch die vermehrte Expression und Aktivierung des AT₁-Rezeptors im Rahmen der Hypercholesterinämie und der damit verbundenen vermehrten Stimulation der NAD(P)H-Oxidase kommt es zu einer gesteigerten Produktion freier Sauerstoffradikale, was durch AT₁-Rezeptorblockade unterbunden werden kann.

Die Reduktion der 8-Isoprostane war in dieser Studie bei hypercholesterinämischen Patienten selektiv für den AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan nachweisbar, unter Therapie mit der Vergleichsmedikation mit Felodipin oder Placebo zeigte sich kein Effekt auf den oxidativen Stress. Warnholtz et al. zeigten 1999 im Tierexperiment, dass die Hypercholesterinämie mit einer gesteigerten NAD(P)H-Oxidase vermittelten Superoxid-Produktion einhergeht und dass die Behandlung hypercholesterinämischer Tiere mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase und die Produktion von Superoxid normalisiert. Desweiteren zeigten Mervaala et al. 2001 eine signifikante Abnahme des 8-Isoprostans durch Therapie mit Losartan bei hypertensiven doppelt transgenen Ratten mit humanen Renin und humanen Angiotensinogen-Genen im Tierexperiment. Eine Behandlung mit Superoxid Dismutase oder einem Inhibitor der Xanthin-Oxidase verbesserte signifikant die Angiotensin II induzierte vaskuläre Dysfunktion.

Patientenstudien, die den Einfluss eines AT₁-Rezeptorantagonisten auf die Hypercholesterinämie-induzierte Induktion von oxidativem Stress untersuchen, wurden bisher nicht durchgeführt. Lediglich die Effekte einer AT₁-Rezeptorblockade bei hypertensiven, normocholesterinämischen Patienten wurden genauer analysiert. So zeigten Koh et al. 2003, dass eine Blockade des AT₁-Rezeptors die endotheliale Dysfunktion verbessert und zu einer Reduktion des oxidativen Stresses und inflammatorischer Zytokine führt. Hingegen wurden die Effekte von ACE-Hemmern auf den oxidativen Stress bei Hypercholesterinämie näher betrachtet. So führte bei Patienten mit einem metabolischem Syndrom die vierwöchige Behandlung mit dem ACE-Hemmer Quinapril zu einer signifikanten Reduktion von 8-Isoprostanen (Khan et al. 2004).

Die frühe Atherosklerose ist gekennzeichnet durch die MCP-1 vermittelte Monozyten-Chemotaxis in der Gefäßwand. Die Monozyten-Adhäsion wird vermittelt durch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (Ross 1999). Die AT₁-Rezeptor-bedingte Freisetzung freier Sauerstoffradikale induziert MCP-1 und ICAM-1 (William et al. 1999, Sato et al. 1999). Erhöhte Konzentrationen dieser Serumparameter sind assoziiert mit dem Voranschreiten der Atherosklerose (Ridker 2000a). In der vorgelegten Studie wurden die Serumkonzentrationen beider Inflammationsparameter signifikant durch die Therapie mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan gesenkt, nicht aber durch Felodipin oder Placebo. Diese Resultate zeigen antiinflammatorische Effekte durch den AT₁-Rezeptorantagonismus und bestätigen bereits veröffentlichte Ergebnisse im Tierexperiment. So bewirkte die AT₁-Rezeptorblockade in hypercholesterinämischen Affen – ohne Reduktion des Plasmacholesterins – einen signifikanten Abfall der MCP-1-Konzentrationen (Strawn et al. 2000). In normocholesterinämischen Ratten führte

Angiotensin II zu einem Anstieg der MCP-1-Genexpression, der durch die Therapie mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan wieder aufgehoben wurde (Chen et al. 1998). Eine durch manuelle Manipulation an Gefäßwänden von Mäusen hervorgerufene Steigerung der MCP-1-Expression konnte durch Behandlung mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Olmesartan wieder rückgängig gemacht werden (Li et al. 2004). Proudfoot et al. zeigten 2003 einen durch AT₁-Rezeptorantagonisten induzierten Rückgang der MCP-1-Produktion in frisch isolierten menschlichen Monozyten. Eine klinische Studie mit hypertensiven Patienten zeigte nach zweimonatiger Therapie mit Candesartan eine signifikante Reduktion des Plasmaspiegels für MCP-1 (Koh et al. 2003).

In einer tierexperimentellen Studie an normotensiven Ratten führte die 28-tägige Behandlung mit Candesartan zu einer signifikanten Reduktion des sICAM-1 (Ando et al. 2004). Eine Studie mit Patienten, die unter einer moderaten arteriellen Hypertonie litten und die mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan therapiert wurden, zeigten im Vergleich zur Placebo-Gruppe eine signifikante Reduktion der sICAM-1-Konzentration (Sardo et al. 2004). Desweiteren konnten Tsutamoto et al. 2000 in einer klinischen Studie den Nachweis erbringen, dass eine zweiwöchige Therapie mit dem AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan bei herzinsuffizienten Patienten zu einer signifikanten Abnahme des Serumspiegels von sICAM-1 führte.

AT₁-Rezeptorantagonisten bewirken demnach eine reduzierte Freisetzung der Inflamationsparameter MCP-1 und sICAM-1, die eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie und Prognose der Atherosklerose spielen.

Andere Serumparameter der Entzündung (hs-CRP, TNF- α , IL-6) wurden in der vorgelegten Studie durch die Behandlung mit einem der Studienmedikamente nicht signifikant verändert. Die Produktion von CRP wird durch TNF- α und IL-6 induziert. Diese sind ebenfalls Marker für die Progression der Atherosklerose. (Albert et al. 1999, Ridker et al. 2000b). Momentan existieren keine Studien in vivo, die eine klare und eindeutige Beziehung zwischen der AT₁-Rezeptoraktivierung und Serumspiegeln von TNF- α , IL-6 oder CRP beschreiben. Bezüglich des Effektes einer AT₁-Rezeptorblockade auf die Inflamationsmarker TNF- α , IL-6 und hsCRP liegen kontroverse Daten in der Literatur vor. Schieffer et al. zeigten 2004, dass der AT₁-Rezeptorantagonist Irbesartan eine Reduktion von hsCRP und IL-6 bewirken kann. Sardo et al. (2004) konnten zwar nach zwölfwöchiger AT₁-Rezeptorblockade mit Losartan einen signifikanten Abfall von sICAM-1 nachweisen, die Serumspiegel von TNF- α wurden unter der Behandlung jedoch nicht signifikant verändert. Hingegen ergab eine 24wöchige Therapie mit Irbesartan bei normotensiven Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine signifikante Reduktion der TNF- α Serumkonzentrationen (Navalkar et al. 2001). Eine zweimonatige

Therapie mit Candesartan zeigte in einer weiteren Studie an arteriellen Hypertonikern keinen Effekt auf die CRP-Serumkonzentrationen, wohingegen MCP-1 signifikant reduziert wurde (Koh et al. 2003). Prasad et al. zeigten 2001 ebenfalls, dass eine achtwöchige Therapie mit Losartan keinen Einfluss auf die Serumkonzentrationen von CRP hat. Yasunari et al. (2004) erbrachten hingegen den Nachweis, dass eine längerfristige Therapie (acht Monate) mit einem AT₁-Rezeptorblocker bei hypertensiven Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie zu einem signifikanten Abfall der CRP-Konzentration führen kann.

Die sechswöchige Behandlungsphase in der hier vorliegenden Studie mit Candesartan könnte zu kurz gewesen sein, um signifikante Beeinflussungen von hsCRP, IL-6 und TNF- α zu bewirken. Desweiteren könnten signifikante Veränderungen wegen interindividueller und intraindividuelle Messschwankungen nicht erkannt worden sein.

Die in der vorliegenden klinischen Studie untersuchten Messparameter der Blutgerinnung tPA und PAI-1 wurden hinsichtlich ihrer Aktivität und Expression durch kein Studienmedikament signifikant beeinflusst. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den differierenden Resultaten aktueller Studien überein. So hatten Angiotensin-Infusionen bei gesunden Probanden mit oder ohne Vorbehandlung durch einen AT₁-Rezeptorantagonisten keine Auswirkung auf die gemessene Plasmakonzentration und Aktivität von PAI-1 (Lottermoser et al. 2004). Nagata et al. zeigten 2001, dass eine Therapie mit dem ACE-Hemmer Captopril zu einer Abnahme der PAI-1 Synthese in menschlichen Monozyten führte, wohingegen der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan keinen Effekt bewirkte. Ein ähnliches Ergebnis erbrachten die Versuche von Katoh et al. 2000. Hierbei konnten im Tierversuch die durch Vorbehandlung mit einem NO-Synthase-Inhibitor erhöhten PAI-1 Konzentrationen selektiv nur durch den ACE-Hemmer Imidapril gesenkt werden, die Behandlung mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan zeigte hier ebenfalls keinen Effekt. In einer Studie mit hypertensiven Patienten erbrachte die Therapie mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten zwar eine Reduktion des PAI-1-Plasmaspiegels, diese war jedoch im Vergleich zur Abnahme der PAI-1-Konzentration unter ACE-Hemmer-Gabe von deutlich geringerer Dauer (Brown et al. 2002). Hingegen zeigte eine weitere Studie mit hypertensiven Patienten, die für einen Zeitraum von zwei Monaten mit Candesartan behandelt wurden, eine signifikante Reduktion von PAI-1 (Koh et al. 2003). Eine durch die Gabe von Furosemid ausgelöste Steigerung der PAI-1-Konzentration konnte in einer anderen Studie durch die gleichzeitige Gabe eines AT₁-Rezeptorantagonisten vermieden werden (Sawathiparnich et al. 2003). Es liegen hier also kontroverse Daten aus klinischen Studien mit AT₁-Rezeptorantagonisten vor.

Ähnlich sieht die Datenlage für den Einfluss einer AT₁-Rezeptorblockade auf tPA aus. Eine sechswöchige Therapie mit dem ACE-Hemmer Benazepril bewirkte keinen Effekt auf die Aktivität von tPA (Fogari et al. 2003). Infusionen von Angiotensin (1-7) zeigten in einer Studie von Wilsdorf et al. keine Auswirkungen auf die Freisetzung von tPA (2001). Ebenfalls konnte im Tierexperiment durch Angiotensin II-Behandlung keine Veränderung der tPA-Expression erzielt werden (Nishimura et al. 1997). Eine weitere Studie zeigte hingegen, dass die Therapie mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan zu einem Anstieg von tPA in menschlichen glatten Gefäßmuskelzellen führte (Papakonstantinou et al. 2001).

Ähnlich wie bei den durch die Medikation der vorliegenden Studie nicht alterierten Entzündungsparameter hsCRP, IL-6 und TNF- α könnten auch bei diesen Gerinnungsparametern die kurze Behandlungsdauer oder intra- bzw. interindividuelle Variabilitäten für das Studienergebnis verantwortlich sein. Desweiteren stellt sich auch die grundsätzliche Frage, inwiefern der AT₁-Rezeptor überhaupt in Zusammenhang mit der Expression und Aktivität von tPA und PAI-1 steht.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende klinische Studie bei Patienten mit Hypercholesterinämie-induzierter endothelialer Dysfunktion, dass die selektive Blockade des AT₁-Rezeptors mit Candesartan im Gegensatz zu einer Behandlung mit Felodipin oder Placebo die Endothelfunktion verbessert und eine Reduktion des oxidativen Stresses und der vaskulären Inflammation unabhängig von Blutdruck und Lipidstatus bewirkt.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen neue Erkenntnisse zur Bedeutung der AT₁-Rezeptoraktivierung bei Hypercholesterinämie-induzierter endothelialer Dysfunktion. Die Überexpression des AT₁-Rezeptors bei verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Östrogendefizienz ist ein wichtiger pathogenetischer Mechanismus der endothelialen Dysfunktion und der Entwicklung der Atherosklerose. Über die vermehrte Vasokonstriktion, die verschlechterte Endothelfunktion, den erhöhten oxidativen Stress, die vermehrte Inflammation und Zellproliferation wirkt sich die gesteigerte Expression und Aktivierung des AT₁-Rezeptors ungünstig auf die Entwicklung der Atherosklerose aus (Nickenig et al. 1997a, Nickenig et al. 1997b, Nickenig et al. 1998a, Prasad et al. 2000, Schiffrin et al. 2000).

Der AT₁-Rezeptorantagonismus verbessert die endotheliale Dysfunktion unabhängig von Blutdrucksenkung und Beeinflussung des Lipidprofils bei Patienten mit

Hypercholesterinämie. Die hier gewonnenen Ergebnisse könnten die Grundlage für neue Therapiekonzepte zur Behandlung der vaskulären Dysfunktion und evtl. auch der Atherosklerose darstellen. In großen klinischen Studien wie der HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) - Studie (1996) und der EUROPA (EUropean trial on Reduction Of cardiac events with Perindopril in stable Artery coronary disease) - Studie (2003) konnte eine signifikante Verbesserung der Prognose bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risikoprofil oder manifester koronarer Herzerkrankung durch die medikamentöse Therapie mit ACE-Hemmern erzielt werden (Fox et al. 2003, The Hope Study Investigators 1996). Ähnliche Ergebnisse sind möglicherweise auch für die AT₁-Rezeptorantagonisten zu erwarten. Endpunktstudien in Bezug auf Morbidität und Mortalität stehen noch aus, sind jedoch schon initiiert - wie beispielsweise die ONTARGET (ONgoing Telmisartan Alone and in combination with Ramipril Global Endpoint Trial)-Studie. Diese Studie mit etwa 28.000 Patienten ist eine der größten klinischen Studien zur Erforschung der Rolle eines AT₁-Rezeptorantagonisten zum Schutz vor Schlaganfall, Herzinfarkt und kardiovaskulären Todesursachen. Die ONTARGET-Studie, die auf der HOPE -Studie basiert, wird seit Herbst 2001 an in ca. 700 verschiedenen Studienorten weltweit über fünf Jahre lang durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Studie werden den Stellenwert der AT₁-Rezeptorantagonisten für die Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen maßgeblich festlegen.

6. Literaturverzeichnis

1. Albert MA, Ridker PM (1999) The role of C-reactive protein in cardiovascular disease risk. *Curr Cardiol Rep* 1:99-104
2. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P (1995a) The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 332:488-493
3. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangre D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC et al. (1995b) Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 26:1235-1241
4. Ando H, Zhou J, Macova M, Imboden H, Saavedra JM (2004) Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 35:1726-1731
5. Arakelyan A, Petrkova J, Hermanova Z, Boyajyan A, Lukl J, Petrek M (2005) Serum Levels of the MCP-1 Chemokine in Patients With Ischemic Stroke and Myocardial Infarction. *Mediators Inflamm* 2005:175-179
6. Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC, Ramires JA, Serrano CV Jr (2004) Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 177:161-166
7. Beisiegel U (1998) Lipoprotein metabolism. *Eur Heart J* 19:20-23
8. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA (1985) Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *Clin Invest* 76:2003-2011
9. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuszi AG, Ciliberto G, Maseri A (1996) Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 94:874-877

10. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718
11. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM (1996) Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 27:523-528
12. Brown NJ, Kumar S, Painter CA, Vaughan DE (2002) ACE inhibition versus angiotensin type 1 receptor antagonism: differential effects on PAI-1 over time. *Hypertension*. 40:859-865
13. Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844
14. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. (1986) Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 256:2835-2838
15. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE (1992) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340:1111-1115
16. Chalupsky K, Cai H (2005) Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9056-9061
17. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1998) Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83:952-959
18. Chen M, Kakutani M, Minami M, Kataoka H, Kume N, Narumiya S, Kita T, Masaki T, Sawamura T (2000) Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1107-1115
19. Cipollone F, Marini M, Fazio M, Pini B, Iezzi A, Reale M, Paloscia L, Materazzo G, D'Annunzio E, Conti P, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A (2001) Elevated circulating

levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:327-334

20. Clarkson P, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Thomson H, Thorne SA, Bull T, Deanfield JE (2001) The effect of amlodipine on endothelial function in young adults with a strong family history of premature coronary artery disease: a randomised double blind study. *Atherosclerosis*. 154:171-177
21. Cortella A, Zambon S, Sartore G, Piarulli F, Calabro A, Manzato E, Crepaldi G (2000) Calf and forearm blood flow in hypercholesterolemic patients. *Angiology* 51:309-318
22. Cremer P, Nagel D, Mann H, Labrot B, Muller-Berninger R, Elster H, Seidel D (1997) Ten-year follow-up results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIPS). I. Risk factors for myocardial infarction in a cohort of 5790 men. *Atherosclerosis* 129:221-230
23. Csajka C, Buclin T, Brunner HR, Biollaz J (1997) Pharmacokinetic – pharmacodynamic profile of angiotensin II receptor antagonists. *Clin Pharmacokinet* 32:1-29
24. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group (2002) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359:995-1003
25. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB (2002) Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 321:187-188
26. Darley-Usmar VM, McAndrew J, Patel R, Moellering D, Lincoln TM, Jo H, Cornwell T, Digerness S, White CR (1997) Nitric oxide, free radicals and cell signalling in cardiovascular disease. *Biochem Soc Trans* 25:925-929
27. Dawson S, Henney A. (1992) The status of PAI-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review. *Atherosclerosis* 95:105-117

28. De Caterina R, Cipollone F, Filardo FP et al. (2002) Low-density lipoprotein level reduction by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A inhibitor simvastatin is accompanied by a related reduction of F2-isoprostane formation in hypercholesterolemic subjects: no further effect of vitamin E. *Circulation* 106:2543–2549
29. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG (2000) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 86:347–354
30. Dzau VJ (1998) Mechanism of protective effects of ACE inhibition on coronary artery disease. *Eur Heart J* 19:2-6
31. Faggiotto A, Ross R, Harker L (1984a) Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streaks formation. *Arteriosclerosis* 4:323-340
32. Faggiotto A, Ross R (1984b) Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 4:341-356
33. Fogari R, Preti P, Lazzari P, Corradi L, Zoppi A, Fogari E, Mugellini A (2003) Effect of benazepril amlodipine combination on fibrinolysis in hypertensive diabetic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 59:271-275
34. Fox KM; EUROpean trial (2003) On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 362:782-788
35. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA (1985) Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8667-8671
36. Gerrity RG (1981) The role of monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 103:191-200

37. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW (1993) Molecular biology of the Renin-Angiotensin System. *Circulation* 87:1816-1828
38. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148
39. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501
40. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320:454-456
41. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM (2000) Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86:85-90
42. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blomback M (1985) Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 313:1557-1563
43. Harrison DG (1997a) Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100:2153-2157
44. Harrison DG (1997b) Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 20:II-11-7
45. Harrison DG, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91:7A-11A
46. Hernandez A, Barberi L, Ballerio R, Testini A, Ferioli R, Bolla M, Natali M, Folco G, Catapano AL (1998) Delapril slows the progression of atherosclerosis and maintains endothelial function in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 137:71-76
47. Higashi Y, Oshima T, Sasaki S, Nakano Y, Kambe M, Matsuura H, Kajiyama G (1998) Angiotensin-converting enzyme inhibition, but not calcium antagonism, improves a response of the renal vasculature to L-arginine in patients with essential hypertension. *Hypertension* 32:16-24

48. Higashi Y, Sanada M, Sasaki S, Nakagawa K, Goto C, Matsuura H, Ohama K, Chayama K, Oshima T (2001a) Effect of estrogen replacement therapy on endothelial function in peripheral resistance arteries in normotensive and hypertensive postmenopausal women. *Hypertension* 37:651-657
49. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T (2001b) Effect of the angiotensin-converting enzyme inhibitor imidapril on reactive hyperemia in patients with essential hypertension: relationship between treatment periods and resistance artery endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 37:863-870
50. Higashi Y, Yoshizumi M (2003) New methods to evaluate endothelial function: method for assessing endothelial function in humans using a strain-gauge plethysmography: nitric oxide-dependent and -independent vasodilation. *J Pharmacol Sci* 93:399-404
51. Hua L, Li C, Xia D, Qu P, Li Z, Zhang W, Feng X (2000) Relationship between hypertensive left ventricular hypertrophy and levels of endothelin and nitric oxide. *Hypertens Res* 23:377-380
52. Ikata J, Wakatsuki T, Oishi Y, Oki T, Ito S (2000) Leukocyte counts and concentrations of soluble adhesion molecules as predictors of coronary atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 11:445-449
53. Jansson JH, Olofsson BO, Nilsson TK (1993) Predictive value of tissue plasminogen activator mass concentration on long-term mortality in patients with coronary artery disease. A 7-year follow-up. *Circulation* 88:2030-2034
54. John S, Schneider MP, Delles C, Jacobi J, Schmieder RE (2005) Lipid-independent effects of statins on endothelial function and bioavailability of nitric oxide in hypercholesterolemic patients. *Am Heart J* 149:473
55. Katoh M, Egashira K, Mitsui T, Takeshita A, Narita H (2000) Differential effects of imidapril and candesartan cilexetil on plasminogen activator inhibitor-1 expression induced by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 35:932-936

56. Keany J.F.J., Xu A., Cunningham D., Jackson T., Frei B., Vita JA (1995) Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J Clin Invest* 5:2520-2529
57. Khan BV, Sola S, Lauten WB, Natarajan R, Hooper WC, Menon RG, Lerakis S, Helmy T (2004) Quinapril, an ACE Inhibitor, Reduces Markers of Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 27:1712-1715
58. Kiener PA, Davis PM, Murray JL, Youssef S, Rankin BM, Kowala M (2001) Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *Int Immunopharmacol* 1:105-118
59. Knapp AC, Huang J, Starling G, Kiener PA (2000) Inhibitors of HMG-CoA reductase sensitize human smooth muscle cells to Fas-ligand and cytokine-induced cell death. *Atherosclerosis* 152:217-227
60. Krieger, M (1998) The „best“ of cholesterol, the „worst“ of cholesterol: a tale of two receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4077-4080
61. Koh KK, Ahn JY, Han SH, Kim DS, Jin DK, Kim HS, Shin MS, Ahn TH, Choi IS, Shin EK (2003) Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 42:905-910
62. Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK (1995) Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and posttranscriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation *Mol Pharmacol* 48:601-609
63. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 31:1129-1135
64. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG (1997) Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95:588-593
65. Lee AF, Dick JB, Bonnar CE, Struthers AD (1999) Lisinopril improves arterial function in hyperlipidaemia. *Clin Sci (Lond)* 96:441-448

66. Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Mehta JL. (1999) Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res* 84:1043-1049
67. Li Z, Chen XD, Ni SK, Li JW, Lin MS (2004) Olmesartan inhibits the expression of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha and improves vascular remodeling after vascular injury in mouse. *Chin J Traumatol* 7:56-61
68. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK (1992) A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 86:47-52
69. Libby, P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 42:868–874
70. Lottermoser K, Hertfelder HJ, Gohlke P, Vetter H, Dusing R (2004) Short-term effects of exogenous angiotensin II on plasma fibrinolytic balance in normal subjects. *Clin Exp Hypertens* Jan 26:13-26
71. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P (1986) Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315:1046-1051
72. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ, Pitt B (1996) Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 94:258-265
73. Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D (1986) Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361662 men. *Lancet* 2:933-936
74. Mates JM, Sanchez-Jimenez F (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 4:339-345

75. Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, Muller DN, Fiebeler A, Ganten U, Ganten D, Luft FC (2001) Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 37:414-418
76. Morrow JD (2005) Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:279-286
77. Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T, Nakazato K, Seino Y, Yokoyama K, Ohkawara H, Teramoto T, Maruyama Y (2001) Effects of blockade of the renin-angiotensin system on tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in human cultured monocytes. *J Hypertens* 19:775-783
78. Nakaki T, Nakayama M, Kato R (1990) Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 189:347-353
79. Navalkar S, Parthasarathy S, Santanam N, Khan BV (2001) Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 37:440-444
80. Nawawi H, Osman NS, Yusoff K, Khalid BA (2003) Reduction in serum levels of adhesion molecules, interleukin-6 and C-reactive protein following short-term low-dose atorvastatin treatment in patients with non-familial hypercholesterolemia. *Horm Metab Res* 35:479-485
81. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN (1991) Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88:1121-1127
82. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F (1997) Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 129:111-118
83. Newby DE, McLeod AL, Uren NG, Flint L, Ludlam CA, Webb DJ, Fox KA, Boon NA (2001) Impaired coronary tissue plasminogen activator release is associated with coronary atherosclerosis and cigarette smoking: direct link between endothelial dysfunction and atherothrombosis. *Circulation* 103:1936-1941

84. Nickenig G, Murphy TJ (1994) Down-regulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 46:653-659
85. Nickenig G, Murphy TJ (1996) Enhanced AT1 receptor mRNA degradation and induction of polyribosomal mRNA binding proteins by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 50:743-751
86. Nickenig G, Jung O, Strehlow K, Zolk O, Linz W, Schölkens BA, Böhm M (1997a) Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1 Receptor expression. *Am J Physiol* 272:2701-2707
87. Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F, Böhm M, Seewald S, Vetter H (1997b) Up-regulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 95:473-478
88. Nickenig G, Bäumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits JFM, Daemen MJAP, Vetter H, Böhm M (1998a) Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 97:2197-2201
89. Nickenig G, Röling J, Strehlow K, Schnabel K, Böhm M (1998b) Insulin induces up-regulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 2453-2460
90. Nickenig G, Bäumer AT, Temur Y, Kebben D, Jockenhövel F, Böhm M (1999) Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation* 100:2131-2134
91. Nickenig G, Harrison DG (2002a) The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 105:393-396
92. Nickenig G, Harrison DG (2002b) The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part II: AT(1) receptor regulation. *Circulation* 105:530-536

93. Nishimura H, Tsuji H, Masuda H, Nakagawa K, Nakahara Y, Kitamura H, Kasahara T, Sugano T, Yoshizumi M, Sawada S, Nakagawa M (1997) Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor pathway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost* 77:1189-1195
94. Ogiwara F, Takahashi M, Ikeda U (2004) Inflammatory markers and cytokines in cardiovascular disease. *Rinsho Byori* 52:686-692
95. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91:2546-2551
96. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR (1997) Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 95:1126-1131
97. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666
98. Papakonstantinou E, Roth M, Kokkas B, Papadopoulos C, Karakiulakis G (2001) Losartan inhibits the angiotensin II-induced modifications on fibrinolysis and matrix deposition by primary human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:715-728
99. Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D (1989) A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1046-1050
100. Patrono C, FitzGerald G (1997) Isoprostanes: Potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2309-2315
101. Peach MJ (1977) Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol Rev* 57:313-370
102. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10480-10484

103. Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH, Mincemoyer R, Panza JA, Waclawin MA, Ellahham S, Quyyumi AA (2000) Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 101:2349-2354
104. Prasad A, Koh KK, Schenke WH, Mincemoyer R, Csako G, Fleischer TA, Brown M, Selvaggi TA, Quyyumi AA (2001) Role of angiotensin II type 1 receptor in the regulation of cellular adhesion molecules in atherosclerosis. *Am Heart J* 142:248-253
105. Proudfoot JM, Croft KD, Puddey IB, Beilin LJ (2003) Angiotensin II type 1 receptor antagonists inhibit basal as well as low-density lipoprotein and platelet-activating factor-stimulated human monocyte chemoattractant protein-1. *J Pharmacol Exp Ther* 305:846-853
106. Rajagopalan S, Kurz S, Muenzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* 97:1916-1923
107. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH (1993) Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. *Lancet* 341:1165-1168
108. Ridker PM (2000a) Novel risk factors and markers for coronary disease. *Adv Intern Med* 45:391-418
109. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH (2000b) Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 101:1767-1772
110. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S et al. (2001) Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 154:87-96
111. Rohde LE, Lee RT, Rivero J, Jamacochian M, Arroyo LH, Briggs W, Rifai N, Libby P, Creager MA, Ridker PM (1998) Circulating cell adhesion molecules are correlated

- with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1765-1770
112. Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM (1999) Cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1595-1599
 113. Romero JC, Reckelhoff JF (1999) State-of-the-art lecture: role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 34:943-949
 114. Ross R, Glomset JA (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180:1332-1339
 115. Ross R (1986) The pathogenesis of atherosclerosis-an update *N Engl J Med*. 314:488-500
 116. Ross, R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809
 117. Ross R (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-213
 118. Sacks FM, Rouleau JL, Moye LA, Pfeffer MA, Warnica JW, Arnold JM, Nash DT, Brown LE, Sestier F, Rutherford J, et al (1995) Baseline characteristics in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial of secondary prevention in patients with average serum cholesterol levels. *Am J Cardiol* 75:621-613
 119. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JL, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JMOA, Wun C, Davis BR, Braunwald E (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Eng J Med* 335:1001-1009
 120. Salomaa V, Stinson V, Kark JD, Folsom AR, Davis CE, Wu KK (1995) Association of fibrinolytic parameters with early atherosclerosis. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* 91:284-290

121. Sardo MA, Castaldo M, Cinquegrani M, Bonaiuto M, Fontana L, Campo S, Campo GM, Altavilla D, Saitta A (2004) Effects of AT1 receptor antagonist losartan on sICAM-1 and TNF-alpha levels in uncomplicated hypertensive patients. *Angiology* 55:195-203
122. Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins R (1999) Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on MCP-1 induced monocyte chemotactic activity in vitro. *Am J Physiol* 277:543-549
123. Sato N, Kase H, Kato T, Kasai K (2003) Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on oxidative stress markers in type 2 diabetic patients with hypertension. *Nippon Rinsho* 61:1245-1249
124. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386:73-77
125. Sawathiparnich P, Murphey LJ, Kumar S, Vaughan DE, Brown NJ (2003) Effect of combined AT1 receptor and aldosterone receptor antagonism on plasminogen activator inhibitor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3867-3873
126. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344:1383-1389
127. Schächinger V, Zeiher AM (2000) Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol* 89:70-74
128. Schieffer B, Bunte C, Witte J, Hoepfer K, Boger RH, Schwedhelm E, Drexler H (2004) Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 44:362-368
129. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM (2000) Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* 101:1653-1659

130. Schiffrin EL, Pu Q, Park JB (2002) Effect of amlodipine compared to atenolol on small arteries of previously untreated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens* 15:105-110
131. Schwemmer M, Sommer O, Bassenge E (2000) Blockade of angiotensin signaling improves myocardial function in hypercholesterolemia independent of changes in eicosanoid release. *Cardiovasc Drugs Ther* 14:317-327
132. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 91:406-413
133. Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH (1995) Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension* 26:164-170
134. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Eng J Med* 333:1301-1307
135. Shimizu K, Aikawa M, Takayama K, Libby P, Mitchell RN (2003) Direct anti-inflammatory mechanisms contribute to attenuation of experimental allograft arteriosclerosis by statins. *Circulation* 108:2113-2120
136. Souza HP, Cardounel AJ, Zweier JL (2003) Mechanisms of free radical production in the vascular wall. *Coron Artery Dis* 2003 14:101-107
137. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM (2000) Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 101:1586-1593
138. Stringer KA (2000) Tissue plasminogen activator inhibits reactive oxygen species production by macrophages. *Pharmacotherapy* 20:375-379
139. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A (2000) Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101:948-954

140. Takayama T, Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Fujii M, Isono T, Horie M (2004) Contribution of vascular NAD(P)H oxidase to endothelial dysfunction in heart failure and the therapeutic effects of HMG-CoA reductase inhibitor. *Circ J* 68:1067-1175
141. Tedgui A (2005) The role of inflammation in atherothrombosis: implications for clinical practice. *Vasc Med* 10:45-53
142. The HOPE study investigators (1996) The HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) Study: the design of a large, simple randomized trial of an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ramipril) and vitamin E in patients at high risk of cardiovascular events. *Can J Cardiol*. Feb 12:127-137
143. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. (1995) Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 332:635-641
144. Timmermanns PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45:205-251
145. Tonkin AM (2001) Clinical relevance of statins: their role in secondary prevention. *Atheroscler Suppl* 2:21-25
146. Tsunekawa T, Hayashi T, Kano H, Sumi D, Matsui-Hirai H, Thakur NK, Egashira K, Iguchi A (2001) Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days. *Circulation* 104:376-379
147. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Kinoshita M (2000) Angiotensin II type 1 receptor antagonist decreases plasma levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and soluble adhesion molecules in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 35:714-721

148. Unger T (1999) The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens* 17:1775-1786
149. Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A (1990) Angiotensin II forming pathways in normal and failure hearts. *Circ Res* 66:883-890
150. Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A (1993) Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II forming chymase in heart. *J Clin Invest* 91:1269-1281
151. van Hinsbergh VW (2001) NO or H₂O₂ for endothelium-dependent vasorelaxation: Tetrahydrobiopterin makes the difference. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:719-721
152. Von zur Mühlen B, Kahan T, Hagg A, Millgard J, Lind L (2001) Treatment with irbesartan or atenolol improves endothelial function in essential hypertension. *J Hypertens* 19:1813-1818
153. Vogel RA (1997) Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol* 20:426-432
154. Vrints CJ, Bult H, Hitter E, Herman AG, Snoeck JP (1992) Impaired endothelium-dependent cholinergic coronary vasodilation in patients with angina and normal coronary arteriograms. *J Am Coll Cardiol* 19:21-31
155. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T (1999) Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis. Evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99:2027-2033
156. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rosen R, Böhm M, Nickenig G (2001a) HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 37:1450-1457

157. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G (2001b) Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 59:646–654
158. Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G (2002a) Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:300-305
159. Wassmann S, Nickenig G (2002b) Improvement of Endothelial Function by HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Drug News Perspect* 15:85-92
160. Wassmann S, Nickenig G (2003a) Interrelationship of free oxygen radicals and endothelial dysfunction—modulation by statins. *Endothelium* 10:23-33
161. Wassmann S, Faul A, Hennen B, Scheller B, Böhm M, Nickenig G (2003b) Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ Res* 93:98-103
162. Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Böhm M, Nickenig G (2004) Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation* 110:3062-3067
163. Weckler N, Leitzbach D, Kalinowski L, Malinski T, Busch AE, Linz W (2003) Effect of chronic treatment with the vasopeptidase inhibitor AVE 7688 and ramipril on endothelial function in atherogenic diet rabbits. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 4:191-196
164. Werns SW, Walton JA, Hsia HH, Nabel EG, Sanz ML, Pitt B (1989) Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation* 79:287-291
165. White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, et al. (1994) Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1044-1048

166. Willam C, Schindler R, Frei U, Eckardt KU (1999) Increases in oxygen tension stimulate expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells. *Am J Physiol* 276:2044-2052
167. Wilsdorf T, Gainer JV, Murphey LJ, Vaughan DE, Brown NJ (2001) Angiotensin (1-7) does not affect vasodilator or TPA responses to bradykinin in human forearm. *Hypertension* 37:1136-1140
168. Witkowska AM, Borawska MH (2004) Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw* 15:91-98
169. Wojakowski W, Gminski J (2001) Soluble ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in children from families with high risk of atherosclerosis. *Int J Mol Med* 7:181-185
170. WOSCOP-Study (1995) *N Engl J Med* 333:1301-1307
171. Yasunari K, Maeda K, Watanabe T, Nakamura M, Yoshikawa J, Asada A (2004) Comparative effects of valsartan versus amlodipine on left ventricular mass and reactive oxygen species formation by monocytes in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 43:2116-2123
172. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D (1989) Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *Journal of Clinical Investigation* 84:1086-1095

7. Publikationen

Originalarbeiten:

1. Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaudo N, Böhm M, Nickenig G (2001) Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *Am J Cardiol* 88:1306-1307
2. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Böhm M, Nickenig G (2002) Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1208-1212

Kongressbeiträge (Vortrag/Poster):

1. Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaudo N, Böhm M, Nickenig G (2001) Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of statin treatment. *Eur Heart J* 22:12
2. Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaudo N, Böhm M, Nickenig G (2001) Statins prevent myocardial hypertrophic phenotype by inhibition of rac-1 and rho-A-GTPase. *Circulation* 104:111
3. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Böhm M, Nickenig G (2001) Candesartan improves endothelial dysfunction associated with hypercholesterolemia. *Dtsch Med Wochenschr* 126:160
4. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Böhm M, Nickenig G (2002) AT1-Rezeptor-Blockade verbessert die Hypercholesterinämie-assoziierte endotheliale Dysfunktion. *Z Kardiol* 91:83
5. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Böhm M, Nickenig G (2002). AT1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Eur Heart J* 23:54

Danksagung:

Herrn Professor Dr. Erdmann und Herrn Professor Dr. Böhm, die mich hervorragend wissenschaftlich unterstützt haben, danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation in den Labors der Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln bzw. der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes erstellen zu können.

Ich danke Herrn Professor Dr. Nickenig für die Überlassung des Themas, seine motivierenden Kommentare und hilfreichen Ideen sowie für seine ständige Bereitschaft, mir beratend zur Seite zu stehen.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Privatdozent Dr. Laufs, der mich vor allem bei der Durchführung der Laborexperimente mit Rat und Tat unterstützte.

Mein größter und besonderer Dank gilt Herrn Dr. Waßmann, der mich in allen Abschnitten der Arbeit jederzeit hervorragend unterstützte und so entscheidend zum Gelingen dieser Studie beitrug.

Weiterhin gilt mein Dank allen Doktoranden, Ärzten und technischen Assistenten des Labors und der Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln und der Universität des Saarlandes für die Möglichkeit, mit ihnen in einem hervorragenden Team arbeiten zu dürfen. Ich bedanke mich recht herzlich bei allen Patienten, die ich in dieser Studie untersuchen durfte und ohne deren Mithilfe diese wissenschaftliche Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

8. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Stefan Hilgers
Wohnort: Stettiner Str. 4
54634 Bitburg

Geburtstag: 12. Mai 1975
Geburtsort: Gerolstein
Familienstand: verheiratet, 1 Sohn

Schulbildung

1981-1985 Grundschole Hillesheim
1985-1994 St. Matthias Gymnasium Gerolstein
1994 Allgemeine Hochschulreife

Berufsbildung

Juli 1994-Sept. 1995 Ausbildung zum Rettungssanitäter im Rahmen des 15monatigen Zivildienstes beim Deutschen Roten Kreuz, Rettungsdienst GmbH Eifel/Mosel/Hunsrück

Okt. 1995-Dez. 1995 Dreimonatiger Zeitvertrag als Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz, Rettungsdienst GmbH Eifel/Mosel/Hunsrück

Studium

Studium der Humanmedizin an der Universität zu Köln

April 1996-April 1998 Vorklinisches Studium

24.03.1998 Physikum

April 1998-April 2002 Klinisches Studium

23.03.1999 1. Staatsexamen

25.03.2002 2. Staatsexamen

29. April 2002-28.März 2003 Praktisches Jahr im Städt. Krankenhaus Holweide

Fächer:

Anästhesie (PD Dr. J. Lynch)

Innere Med. (Prof. Dr. F. Saborowski)

Chirurgie (Dr. M. Weber, Spital

Schwyz/Schweiz)

04.Juni 2003

3. Staatsexamen

Seit 01.10.2003

Arzt im Praktikum Krankenhaus Bitburg

Innere Abteilung (Chefarzt: Dr. Allerödter)

Seit 01.10.2004

Assistenzarzt Krankenhaus Bitburg

Innere Abteilung (Chefarzt: Dr. Allerödter)

Bitburg, den 29. November 2006

Stefan Hilgers