

Aus der Nephrologischen Klinik,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. D. Fliser

Wirkung von Olmesartan auf die
Reendothelialisierungskapazität von endothelialen
Progenitorzellen bei Patienten mit chronischen
Nierenerkrankungen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von: Michaela Ruhnke

geb. am: 18.09.1984 in Berlin

1 Inhaltsverzeichnis

2	Zusammenfassung	4
3	Einleitung	6
3.1	Epidemiologie.....	6
3.2	Definition und Stadieneinteilung chronischer Niereninsuffizienz	6
3.3	Ursachen und Folgen chronischer Niereninsuffizienz.....	7
3.4	Ausbildung atherosklerotischer Läsionen	8
3.5	Eigenschaften von Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten.....	9
3.6	Endotheliale Progenitorzellen.....	9
3.6.1	Pharmakologische Beeinflussbarkeit endothelialer Progenitorzellen	10
3.7	Fragestellungen.....	11
4	Material und Methodik.....	12
4.1	Patientenpopulation	12
4.1.1	Einschlusskriterien	12
4.1.2	Ausschlusskriterien	12
4.2	Studiendesign.....	13
4.3	Verwendete Materialien und Geräte.....	16
4.4	Isolation endothelialer Progenitorzellen	17
4.5	Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen.....	18
4.5.1	Zellaussaat	18
4.5.2	Färbung der Zellen	18
4.5.3	Zellzählung.....	18
4.6	Bewertung der re-endothelialisierten Fläche nach Schädigung der A. carotis im Mausmodell	20
4.6.1	Operation und Schädigung der A. carotis communis.....	20
4.6.2	Injektion endothelialer Progenitorzellen aus Patientenblut.....	20
4.6.3	Entnahme und Fixierung der A. carotis communis.....	21
4.6.4	Berechnung der re-endothelialisierten Fläche	21
5	Ergebnisse	22
5.1	Klinische Daten	22
5.2	Anzahl endothelialer Progenitorzellen	24
5.3	Re-endothelialisierungskapazität anhand der re-endothelialisierten Fläche im Carotismodell	27

5.4	Effekt von Olmesartan auf Proteinurie und Albuminurie	28
6	Diskussion	30
7	Literaturverzeichnis.....	33
8	Danksagung.....	39
9	Lebenslauf	40
10	Anhang	41

2 Zusammenfassung

Chronische Niereninsuffizienz ist mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität und Morbidität verbunden. Dies ist auf die bei Niereninsuffizienz begünstigte Entstehung atherosklerotischer Läsionen und deren Folgen zurückzuführen. Endotheliale Progenitorzellen (EPCs), welche eine bedeutsame Rolle bei der Regeneration von Endothelschäden spielen, sind bei nierenkranken Patienten in Anzahl und Funktion vermindert.

Die Beeinflussung der EPCs durch den Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Olmesartan wurde in dieser prospektiven, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Studie in einem experimentellen und einem klinischen Studienteil untersucht. Das Patientenkollektiv setzte sich aus insgesamt 28 nierenkranken Patienten sowie 12 gesunden Individuen als Kontrollgruppe zusammen. Die EPCs wurden vor und nach 6-wöchiger Einnahme von 40 mg Olmesartan oder Placebo aus dem Patientenblut durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert und ihre Anzahl nach Markierung mit UEA-1 und acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL-DiI) bestimmt. Zusätzlich wurden immuninkompetenten CD1 nu/nu-Mäusen nach elektrischer Schädigung des Endothels der A. carotis communis EPCs injiziert und drei Tage nach Injektion die re-endothelialisierte Fläche gemessen. Die klinischen Effekte wurden durch Verlaufskontrollen von Proteinurie und Albuminurie untersucht.

In der Olmesartangruppe kam es zu einer Zunahme der Anzahl EPCs um 114,2 (\pm 69,4) % von 166 (\pm 77) auf 318 (\pm 178) Zellen, in der Placebogruppe nahm die Anzahl um 21,8 (\pm 39,1) % von 299 (\pm 126) auf 286 (\pm 186) ab. Die re-endothelialisierte Fläche vergrößerte sich in der Olmesartangruppe von 17,6 (\pm 10,8) % zu Studienbeginn auf 68,6 (\pm 20,7) % nach 6 Wochen, verglichen mit 11,4 (\pm 6,4) % und 27,3 (\pm 19,6) % in der Placebogruppe. In der Olmesartangruppe kam es zu einer Abnahme der zu Studienbeginn vorliegenden Albuminurie von 42,9 (\pm 63,2) mg/l auf 18,7 (\pm 35,6) mg/l. In der Placebogruppe kam es zu einem Anstieg der Albuminausscheidung von 15,0 (\pm 17,7) mg/l auf 28,8 (\pm 42,8) mg/l.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Olmesartan bei nierenkranken Patienten gegenüber Placebo sowohl die Anzahl als auch die Funktion endothelialer Progenitorzellen positiv beeinflusst und dadurch eine Verbesserung des Gefäßstatus bewirkt, welche sich in der Verringerung einer vorliegenden Albuminurie zeigt.

The effects of Olmesartan on the re-endothelialisation capacity of endothelial progenitor cells in patients with chronic kidney disease.

Chronic kidney disease is associated with an increased cardiovascular mortality and morbidity. This is attributed to the promoted development of atherosclerotic lesions and their consequences in chronic renal failure. Endothelial progenitor cells (EPCs), which play an important role in the regeneration of endothelial damage, are reduced in their number and function in patients with chronic kidney disease.

The influence of the angiotensin-II-receptor-blocker Olmesartan on EPCs has been examined in this prospective, double-blind and placebo-controlled study with an experimental and a clinical study arm. The patient population consisted of 28 patients with chronic kidney disease and 12 healthy individuals as control group. EPCs were isolated from the patients' blood by density gradient centrifugation before and after 6 weeks of taking 40 mg Olmesartan or placebo and their number was determined after staining with UEA-1 and acetylated low density lipoprotein (acLDL-DiI). Additionally, EPCs were injected into immunoincompetent CD1 nu/nu-mice after electrically inducing endothelial damage to the common carotid artery. The re-endothelialised area was quantified three days after injection. The clinical effects were assayed by repeated measurements of proteinuria and albuminuria.

In the Olmesartan-group the number of EPCS increased by 114,2 (\pm 69,4) % from 166 (\pm 77) to 318 (\pm 178) cells, in the placebo-group their number decreased by 21,8 (\pm 39,1) % from 299 (\pm 126) to 286 (\pm 186). The re-endothelialised area augmented in the Olmesartan-group from 17,6 (\pm 10,8) % at commencement of the study to 68,6 (\pm 20,7) % after 6 weeks, compared to 11,4 (\pm 6,4) % and 27,3 (\pm 19,6) % in the placebo-group. In the Olmesartan-group the albuminuria of 42,9 (\pm 63,2) mg/l at commencement was reduced to 18,7 (\pm 35,6) mg/l. In the placebo-group the urinary albumine excretion increased from 15,0 (\pm 17,7) mg/l to 28,8 (\pm 42,8) mg/l.

These results demonstrate that Olmesartan improves both number and function of EPCs in patients with chronic kidney disease compared to placebo and thereby ameliorates the vascular status which is shown by reducing a pre-existing albuminuria.

3 Einleitung

3.1 Epidemiologie

Chronische Nierenerkrankungen sind eine häufige Krankheit: Weltweit sind mehr als 50 Millionen Menschen betroffen, 1 Million von ihnen entwickelt jedes Jahr Nierenversagen im Endstadium. (Dirks, de Zeeuw et al. 2005) In den USA ist die Prävalenz von chronischem Nierenversagen seit 1995 von 1,7% auf 7,6% gestiegen, ohne dabei Patienten im Endstadium der Erkrankung (end-stage renal disease, ESRD) mit einzubeziehen. Dessen Prävalenz liegt in den USA bei 1699 Patienten pro 1 Million (Collins AJ, Foley RN, Herzog C, et al. 2011). Andere Studien schätzen die Prävalenz sogar auf 11% (Coresh, Astor et al. 2003).

3.2 Definition und Stadieneinteilung chronischer Niereninsuffizienz

Als chronische Niereninsuffizienz (chronic kidney disease, CKD) bezeichnet man entweder eine Schädigung der Niere oder eine Einschränkung ihrer Funktion länger als drei Monate. Diese kann sich in erhöhter Ausscheidung von Proteinen, insbesondere Albumin, mit dem Urin als Ausdruck einer Nierenschädigung oder einer Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) auf unter 60ml/min/1,73 m² als Zeichen einer funktionellen Einschränkung der Nieren zeigen. Anhand der GFR lässt sich die funktionelle Einschränkung der Niere in verschiedene Stadien einteilen (Tabelle 1), mit Hilfe des Ausmaßes der Albuminurie lässt sich auch die Nierenschädigung quantifizieren (Tabelle 2) (Levey, Eckardt et al. 2005; Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group 2013).

Stadium	Beschreibung	GFR (ml/min/ 1,73 m ²)
1	Nierenschädigung mit normaler oder erhöhter GFR	≥90
2	Nierenschädigung mit leicht verminderter GFR	60-89
3	Mäßig verminderte GFR	30-59
4	Stark verminderte GFR	15-29
5	Nierenversagen	≤15 oder Dialyse

Tabelle 1: Stadien chronischer Niereninsuffizienz anhand der GFR (Levey, Eckardt et al. 2005)

Kategorie	Albuminausscheidungsrate (mg/ 24h)	Beschreibung
A1	< 30	Normal bis leicht erhöht
A2	30 - 300	Mäßig erhöht
A3	> 300	Deutlich erhöht

Tabelle 2: Einteilung der Albuminurie (KDIGO 2013)

3.3 Ursachen und Folgen chronischer Niereninsuffizienz

Die Gründe für chronisches Nierenversagen sind vielfältig. Interstitielle Nephritiden, Glomerulonephritiden und hereditäre Nierenerkrankungen gehören zu den Hauptursachen. Daneben spielen aber diabetische Nephropathie und vaskuläre Nierenschädigung durch lange bestehende arterielle Hypertonie die größte Rolle bei der Entstehung chronischer Niereninsuffizienz. Sowohl Diabetes mellitus als auch die arterielle Hypertonie gehören neben der Hypercholesterinämie und Nikotinabusus zu den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, die die Entstehung von Atherosklerose mit ihren Folgeerkrankungen wie koronarer Herzkrankheit und chronischer Niereninsuffizienz begünstigen (Classen 2009).

Interessanterweise liegen diese klassischen Risikofaktoren bei niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung in höherer Prävalenz vor (Longenecker, Coresh et al. 2002; Sarnak, Coronado et al. 2002). Dies kann als ein Grund für die im Vergleich zur Normalbevölkerung stark erhöhte Mortalität und Morbidität chronisch niereninsuffizienter Patienten angesehen werden (U.S. Renal Data System 2010), die sich besonders auf kardiovaskuläre Ereignisse zurückführen lassen (Foley, Murray et al. 2005). Nicht-traditionelle Risikofaktoren wie erhöhte Lipoprotein(a)-Spiegel (Longenecker, Klag et al. 2005), Anämie (Al-Ahmad, Rand et al. 2001; Zoppini, Targher et al. 2010) sowie ein gestörter Calcium- und Phosphathaushalt (Sarnak, Levey et al. 2003), die mit dem Vorliegen einer primären Nierenerkrankung oder fortschreitender Niereninsuffizienz verknüpft sind, liegen bei niereninsuffizienten Patienten zusätzlich vor (Oh, Wunsch et al. 2002; Hruska, Mathew et al. 2011). Das erhöhte kardiovaskuläre Risiko beginnt schon in frühen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz und nimmt mit dem Fortschreiten der Erkrankung weiter zu (Henry, Kostense et al. 2002; Sarnak 2003; Anavekar, McMurray et al. 2004; Go, Chertow et

al. 2004). 45% aller Todesfälle sind bei Dialysepatienten auf kardiovaskuläre Ereignisse und Atherosklerose zurückzuführen (Shastri and Sarnak 2010).

3.4 Ausbildung atherosklerotischer Läsionen

Verschiedene Faktoren wie endotheliale Dysfunktion, Dyslipidämie sowie inflammatorische und immunologische Prozesse wirken in der Pathogenese der Atherosklerose mit (Zhao 2013). Über die bereits genannten kardiovaskulären Risikofaktoren kommt es zu Beginn des atherosklerotischen Prozesses zur Schädigung der Endothelzellen und Verlust der endothelialen Funktion. Diese besteht unter anderem aus der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, Regulation der Thrombo- und Leukozytenadhäsion sowie Hemmung der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen. Im Rahmen der endothelialen Dysfunktion vermindert sich die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO), einem potenten Vasodilatator, und vermehrt sich die Freisetzung verschiedener Chemokine, wie zum Beispiel freier Sauerstoffradikale und Angiotensin II. Daraus resultiert erhöhter oxidativer Stress. Dieser begünstigt die Leukozytenadhäsion sowie die Entstehung von oxidiertem low-density Lipoprotein (LDL), welches sich in der Gefäßwand ablagert. Außerdem wirken bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Aktivierung von T-Lymphozyten und Makrophagen mit, die nach Einwanderung in die Gefäßwand und Phagozytose von Lipidpartikeln zu Schaumzellen degenerieren (Ross 1999; Classen 2009; Zhao 2013). Angiotensin II vermittelt dabei direkt eine Entzündungsreaktion glatter Gefäßmuskelzellen (Kranzhöfer, Schmidt et al. 1999) und stimuliert die Proliferation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand (Rao and Berk 1992).

Auf Nierenebene resultiert über ähnliche Mechanismen eine Glomerulosklerose, interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie und damit der zunehmende Verlust der Nierenfunktion (Kang, Kanellis et al. 2002; Classen 2009). Bei eingeschränkter Nierenfunktion, entweder auf Grund einer Schädigung des Nierengewebes (Warren and Ferris 1970) oder bei Herzinsuffizienz und Minderperfusion der Nieren (Francis, Benedict et al. 1990; Swedberg, Eneroth et al. 1990; Cody Md 1997; Klink 2010), kommt es dann zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), welches über Angiotensin II wie bereits beschrieben eine zentrale Rolle in der Entstehung atherosklerotischer Läsionen spielt.

3.5 Eigenschaften von Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten

Hemmstoffe des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE-Hemmer) und Antagonisten des Angiotensin-II-Rezeptors Typ I (AT₁-Rezeptoren) haben sich bei niereninsuffizienten Patienten nicht nur wegen ihrer blutdrucksenkenden Eigenschaften als günstig erwiesen. Diese Substanzklassen bieten sich aufgrund der atherogenen Folgen einer Aktivierung des RAAS vor allem auch wegen ihrer kardio- und nephroprotektiven Qualitäten als Therapieansatz bei niereninsuffizienten Patienten an. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass über eine Blockade des RAAS entweder durch ACE-Hemmer oder Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten unabhängig von der Senkung des Blutdrucks das Fortschreiten der Niereninsuffizienz verlangsamt (Brenner, Cooper et al. 2001; Lewis, Hunsicker et al. 2001; Parving, Lehnert et al. 2001) und kardiovaskuläre Ereignisse reduziert werden (Investigators 1991; Yusuf 2000; Mann, Gerstein et al. 2001; Tokmakova, Skali et al. 2004; Yusuf, Teo et al. 2008). Außerdem reduzieren Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten oxidativen Stress sowie proinflammatorische Zytokine und verbessern die Endothelfunktion, haben also insgesamt antiatherogene Effekte (Hornig, Landmesser et al. 2001; Koh, Ahn et al. 2003). In diesen Wirkungen sind sie Beta-Rezeptoren-Blockern und Calciumkanalblockern überlegen (Schiffrin, Park et al. 2000; Lewis, Hunsicker et al. 2001).

3.6 Endotheliale Progenitorzellen

Bei der Beurteilung des kardiovaskulären Risikos spielt außerdem die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen (endothelial progenitor cells, EPCs) im Blut eine wichtige Rolle. EPCs können aus zirkulierenden monozytären Zellen isoliert und anhand ihrer Expression von endothelzellspezifischen Markern identifiziert werden. Sie integrieren sich an Orten im Körper, wo Angiogenese stattfindet und differenzieren sich zu reifen Endothelzellen (Asahara, Murohara et al. 1997; Peichev, Naiyer et al. 2000). Darüberhinaus fördern EPCs die Regeneration von Endothelschäden (Walter, Rittig et al. 2002; Iwakura, Luedemann et al. 2003; Werner, Junk et al. 2003) und können so die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen in frühen Stadien verhindern.

Eine Verminderung der Anzahl zirkulierender EPCs ist mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert (Hill, Zalos et al. 2003; Werner, Kosiol et al. 2005; Maruyama, Taguchi et al. 2008). Bei niereninsuffizienten Patienten ist jedoch nicht nur die Zahl vermindert, sondern

auch die Funktion der endothelialen Progenitorzellen eingeschränkt (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001; Choi, Kim et al. 2004), teilweise erklärbar durch die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber dem bei Niereninsuffizienz erhöhten oxidativen Stress (Annuk, Zilmer et al. 2001; Ghiadoni, Cupisti et al. 2004; Ingram, Krier et al. 2007; Sorrentino, Bahlmann et al. 2007).

3.6.1 Pharmakologische Beeinflussbarkeit endothelialer Progenitorzellen

Durch die Möglichkeit, Anzahl und Funktion der EPCs pharmakologisch zu beeinflussen, bietet sich eine Chance, das kardiovaskuläre Risikoprofil und das Überleben nierenkranker Patienten zu verbessern. Für Statine und Erythropoetin konnte gezeigt werden, dass sie die Anzahl der EPCs erhöhen und deren funktionelle Aktivität sowohl im Tierversuch als auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit verbessern (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001; Walter, Rittig et al. 2002; Heeschen, Aicher et al. 2003; Bahlmann, de Groot et al. 2004).

Auch der AT₁-Rezeptor-Blocker Olmesartan-Medoxomil stellt eine hervorragend geeignete Substanz zur Beeinflussung endothelialer Progenitorzellen dar. Neben den bereits beschriebenen blutdrucksenkenden und nephroprotektiven Eigenschaften von Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten mobilisiert er EPCs aus dem Knochenmark und beschleunigt ihre Ausreifung bei Patienten mit Diabetes mellitus (Bahlmann, de Groot et al. 2005) (Abbildung 1). Zusätzlich reduziert Olmesartan die vaskuläre Mikroinflammation (Fliser, Buchholz et al. 2004), die Thrombozytenaggregation (Schieffer, Bunte et al. 2004) und das Volumen großer atherosklerotischer Plaques (Stumpe, Agabiti-Rosei et al. 2007).

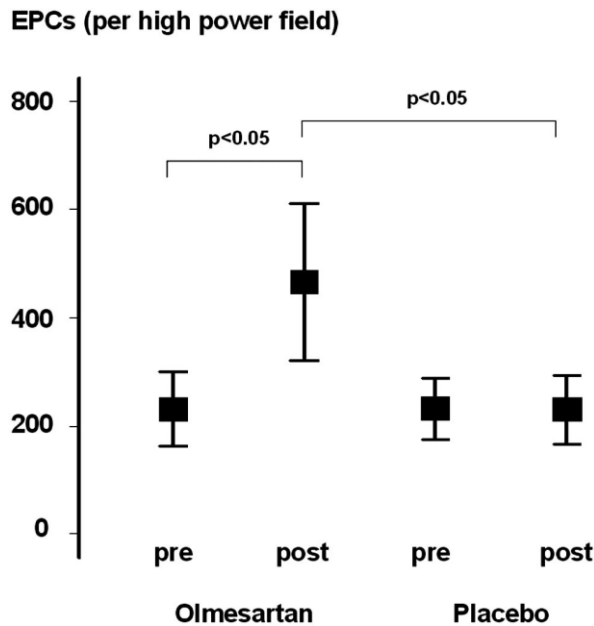


Abbildung 1: Die Wirkung von Olmesartan ($n = 9$) und Placebo ($n = 9$) auf die EPC-Zahl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. Die Behandlung mit Olmesartan führte zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der EPCs, wohingegen die Behandlung mit Placebo keine Veränderung herbeiführte (Bahlmann, de Groot et al. 2005).

3.7 Fragestellungen

Durch den Ausgleich des bei eingeschränkter Nierenfunktion vorliegenden Mangels an endothelialen Progenitorzellen kommt es zur verbesserten Regeneration von Endothelschäden und zu einem verbesserten Gefäßstatus bei niereninsuffizienten Patienten. Diese Hypothese soll in der vorliegenden Studie, welche mit dem Akronym OECD-Studie (**O**lmesartan and **E**PCs in **C**hronic **K**idney **D**isease) bezeichnet wird, anhand folgender Fragestellungen überprüft werden:

1. Verbessert Olmesartan-Medoxomil die Reendothelialisierungskapazität von endothelialen Progenitorzellen bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen?
2. Beeinflusst Olmesartan-Medoxomil die Endothelfunktion sowie Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen positiv?

4 Material und Methodik

4.1 Patientenpopulation

Das Patientenkollektiv setzt sich aus 28 chronisch nierenkranken Patienten zusammen, die die nachfolgend aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien aufweisen. Die Studienteilnehmer wurden zwischen Juni 2009 und Dezember 2011 aus den Patienten der Ambulanz der Klinik für Innere Medizin IV (Nieren- und Hochdruckkrankheiten) des Universitätsklinikums des Saarlandes sowie durch Aushänge in Apotheken des Saarlandes rekrutiert.

Die Kontrollgruppe besteht aus zwölf gesunden Probanden, die sich unter den Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Innere Medizin IV befanden.

4.1.1 Einschlusskriterien

- Schriftliche Einwilligung in die Studie.
- Alter zwischen 18 und 70 Jahren.
- chronische Nierenerkrankungen (CKD II-IV).
- endogene Kreatinin-Clearance von 15 ml/min bis 90ml/min und - soweit absehbar – keine drohende Dialysepflichtigkeit für den Zeitraum der Studie.
- HbA_{1c} bei Patienten mit Typ II Diabetes mellitus unter 8%.
- Keine Patienten mit autosomal dominanter polyzystischer Nierenerkrankung (ADPKD-Patienten).
- Keine vorbekannte Stoffwechselerkrankung mit Ausnahme von Typ II Diabetes mellitus.

4.1.2 Ausschlusskriterien

- Myelodysplastische oder –proliferative Erkrankungen.
- Innerhalb der letzten 5 Jahre diagnostizierte maligne Erkrankung.
- Höhergradige renale Anämie (Hb \leq 10 g/dl bei Frauen, \leq 10,5 g/dl bei Männern) und/oder Therapie mit rekombinantem humanem Erythropoetin oder analogen Präparaten.
- Therapie mit anderen Wachstumsfaktoren wie GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) oder VEGF (Vascular endothelial growth factor).
- Cholesterinsenkende Therapie mit einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor (Statin).

- Hb-wirksame Blutungsepisoden innerhalb der letzten 3 Monate bzw. anamnestisch bekannte gastrointestinale Blutungsquellen.
- Absehbare Dialysepflichtigkeit während der Studiendauer.
- Diastolischer Blutdruck im Sitzen über 100 mmHg unter Standardantihypertensiva (inkl. eines ACE-Hemmers oder eines AT1-Rezeptorenblockers).
- Systolischer Blutdruck im Sitzen über 160 mmHg unter Standardantihypertensiva (inkl. eines ACE-Hemmers oder eines AT1-Rezeptorenblockers).
- Bekannte Intoleranz gegenüber Angiotensin-Rezeptor-Blockern (z.B. Olmetec®, Diovan®, Lorzaar®, Atacand®, Aprovel®, Micardis®, Teveten®).
- Bekannte HIV-Infektion.
- Systemische Chemo- oder Radiotherapie.
- Chronische Infektionen und/oder C-reaktives Protein (CRP) bei Studienbeginn über 10 mg/l.
- Akute kardiovaskuläre Ereignisse.
- Organtransplantate (z.B. Nierentransplantation).
- Schwangerschaft oder Frauen im gebärfähigen Alter ohne medizinisch anerkannte Schwangerschaftsverhütung.
- Stillende Mütter.
- Psychiatrische Erkrankungen oder chronisches cerebrales Anfallsleiden.
- Non-Compliance oder Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung innerhalb der letzten 30 Tage.

4.2 Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde vom Ethikkommittee der Universität des Saarlandes genehmigt (Prüfplancode: FNH-DS001, Prüfplannummer: 6.0 (12.03.2009), EudraCT-Nummer: 2008-003249-10). Der tierexperimentelle Teil der Studie wurde außerdem vom Tierethikkommittee der Universität des Saarlandes genehmigt und stimmt mit dem "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" überein, welcher von den US National Institutes of Health (NIH Pub. No. 85-23, revised 1996) herausgegeben wurde.

Die Studie wurde prospektiv, doppelblind, randomisiert und kontrolliert durchgeführt. Sie besteht aus einem klinischen und einem experimentellen Teil. Die rekrutierten Patienten

wurden im klinischen Abschnitt zunächst über vier Wochen auf eine standardisierte antihypertensive Medikation mit Hydrochlorothiazid (bis zu 50mg pro Tag), Metoprololsuccinat (bis zu 190 mg pro Tag) und Clonidin (bis zu 0,15 mg pro Tag) eingestellt, um eine ausreichende Blutdruckkontrolle zu erreichen (systolischer Blutdruck unter 160 mmHg im Sitzen und diastolischer Blutdruck unter 100 mmHg im Sitzen). Dann wurden sie randomisiert einem von zwei Studienarmen zugeteilt: Entweder Einnahme von handelsüblichem Olmesartan-Medoxomil 40 mg (Olmotec®) oder Placebo per os einmal täglich über einen Zeitraum von sechs Wochen.

Die Effekte von Olmesartan wurden im experimentellen Studienteil anhand der folgenden Parameter untersucht, die in den folgenden Abschnitten ausführlich dargestellt werden:

- Zahl der endothelialen Progenitorzellen (EPCs) je Gesichtsfeld.
- Planimetrische Bewertung der re-endothelialisierten Fläche nach Schädigung der A. carotis communis im Mausmodell.

Zur Messung dieser Parameter erfolgte bei den Patienten jeweils zu Beginn und am Ende der Behandlungsperiode mit Olmesartan-Medoxomil nach sechs Wochen eine Blutentnahme (Abbildungen 2 und 3).

Insgesamt wurden den Patienten dazu während der gesamten Studiendauer jeweils ca. 216 ml Blut entnommen. Zusätzlich wurden bei der Screening-Visite sowie bei Beginn und Ende der Behandlungsperiode Blutbild und klinische Chemie, dabei unter anderem Kreatinin, Harnstoff und Elektrolyte, im Zentrallabor der Universitätsklinik bestimmt (siehe Anhang: Case Report Form).

In der Kontrollgruppe erfolgte nur eine Blutentnahme pro Proband.

Studiendesign der OECD-Studie

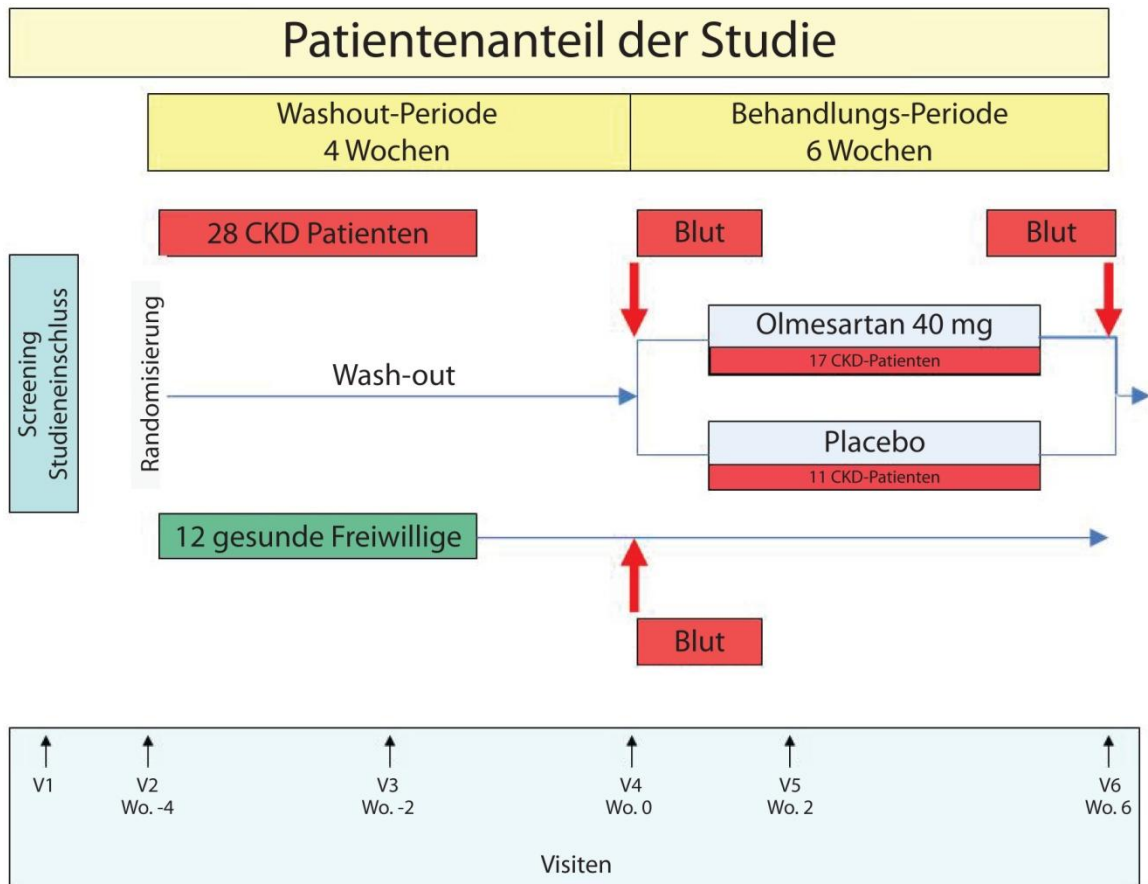


Abbildung 2: Studiendesign der OECD-Studie - klinischer Teil.

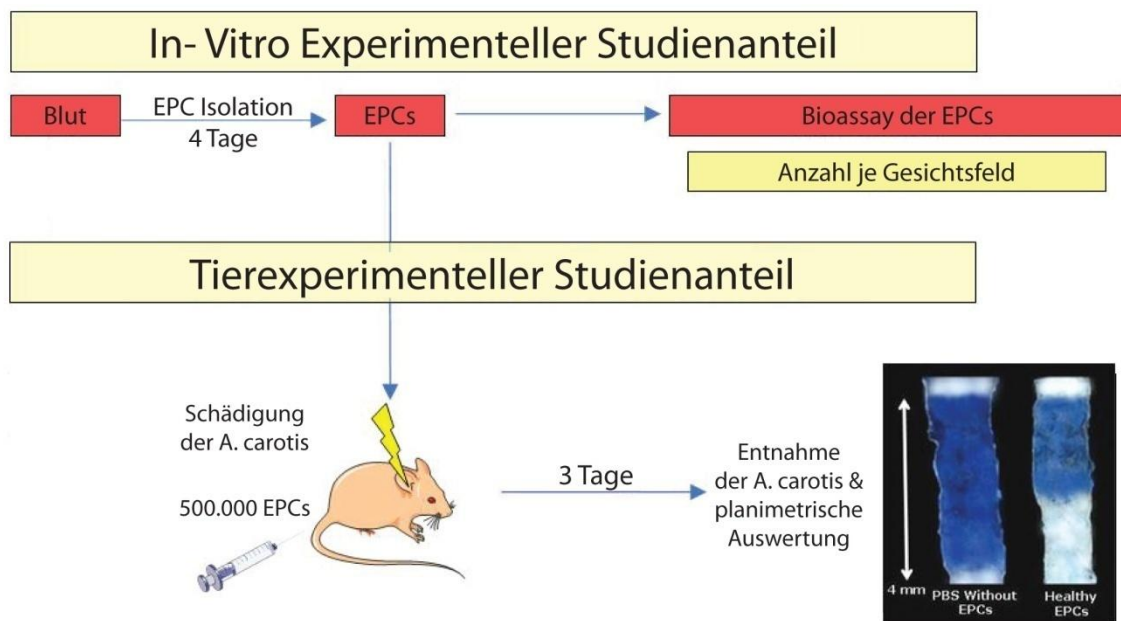


Abbildung 3: Studiendesign der OECD-Studie - experimenteller Teil.

4.3 Verwendete Materialien und Geräte

Lymphozytenseparationsmedium Biocoll (Biochrom).

Basalmedium für Endothelzellen (EBM-2, Clonetics), angereichert mit Einzelaliquoten von Wachstumsmedium für Endothelzellen (EGM-2 Single Quots, Clonetics).

PBS -/- Puffer (Phosphate Buffered Saline) mit 5mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA).

PBS+/+ Puffer.

Accutase (Sigma Aldrich).

1,19-dioctadecyl-3,3,39,39-tetramethylin-docarbocyanine-labeled acetylated low density lipoprotein (acLDL-DiI, Invitrogen).

FITC-labeled Ulex europaeus agglutinin-1 (UEA-1 Lectin, Sigma Aldrich).

bisBenzimide (Sigma Aldrich).

Farbstoff Evans Blue (Sigma Aldrich), 5%ige Lösung in 0,9%igem NaCl.

Ammoniumchlorid.

Paraformaldehyd-Lösung (PFA), 4%ig.

Entellan® (Merck Millipore).

Isofluran (Baxter).

Zellkulturplatten mit 24 Einsätzen (Sigma Aldrich) mit humanem Fibronectin beschichtet.

Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm (greiner bio-one) mit humanem Fibronectin (BD) beschichtet.

7,5 ml EDTA-Monovetten (Sarstedt).

Versuchstiere: weibliche CD1^{nu/nu} athymische Nacktmäuse im Alter von 7 bis 10 Wochen.

Bipolare elektrische Pinzette (ICC50, ERBE-Elektromedizin GmbH, Tübingen, Deutschland).

Handelsübliches Millimeterpapier.

Invertiertes Fluoreszenzmikroskop mit Plan Fluor 20x-Objektiv (Keyence).

BZ Image Analysis Software (Keyence).

4.4 Isolation endothelialer Progenitorzellen

Den Probanden werden für die Isolation endothelialer Progenitorzellen jeweils 75 ml peripherenvenöses Blut entnommen. Aus diesem Blut werden mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll-Trennlösung gewonnen.

Das in 7,5 ml-EDTA-Monovetten entnommene Blut wird gleichmäßig auf vier Falcons mit je 50 ml Inhalt verteilt. Die Monovetten werden mit je 5 ml PBS -/- + 5 mM EDTA gespült und diese Suspension ebenfalls in die Falcons überführt, um eventuell in den Monovetten verbliebenes Blut nicht zu verwerfen. Diese Suspension wird auf 15 ml Trennlösung aufgebracht. Die Falcons werden zur Separation der Lymphozyten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit 400 g (1400 rpm) ohne Bremse zentrifugiert. Der entstandene Buffy coat zwischen Separationsmedium und Blutplasma, der die mononukleären Zellen enthält, wird mit einer 20 ml-Spritze und einer 20 G-Nadel aspiriert und jeweils in ein 50 ml-Falcon überführt. Die Falcons werden zum Waschen der Zellen mit PBS -/- + 5 mM EDTA aufgefüllt und mit 400 g (1400 rpm) für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets werden mit je 2,5ml PBS -/- + 5mM EDTA resuspendiert und aus den vier Falcons in ein einziges 15 ml-Falcon überführt. Dieses wird zur Entfernung der Thrombozyten mit 300 g (1200 rpm) für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in 2 ml PBS -/- + 5 mM EDTA werden verbliebene Erythrozyten durch Zugabe von 6 ml Ammoniumchlorid und zehnmütige Inkubation bei 4°C lysiert. Das nach erneuter 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C mit 400 g (1400 rpm) gewonnene Zellpellet wird in 6 ml EGM-2-Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Aussaat der in Kulturmedium resuspendierten Zellen erfolgt auf Fibronectin-beschichteten Dishes mit einem Durchmesser von 10 cm. Pro Dish werden 25 Millionen Zellen ausgesät und vier Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nicht adhärente Zellen werden an Tag 4 durch Waschen mit PBS +/- entfernt. Die adhärenenten Zellen werden mit jeweils 5 ml vorgewärmter Accutase pro Dish abgelöst, in ein 10 ml-Falcon überführt und 10 Minuten bei Raumtemperatur und 400 g (1400 rpm) zentrifugiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach Resuspension in 5 ml EGM-2-Medium in einer Neubauer-Zählkammer. Diese Zellen werden für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

4.5 Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen

Die Bestimmung der Anzahl der EPCs wird mit den aus Patientenblut isolierten Zellen an Tag sieben der Zellkultur durchgeführt. Mit Hilfe der Anfärbarkeit für UEA-1 und der Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL-DiI) werden die Zellen auf morphologische und funktionelle Eigenschaften von Zellen der endothelialen Linie überprüft und ihre Anzahl durch manuelles Auszählen bestimmt.

4.5.1 Zellaussaat

Von den an Tag vier abgelösten und gezählten Zellen werden jeweils 190.000 in EGM-2 suspendierte Zellen (1000 Zellen pro mm²) in zwei mit Fibronectin beschichtete Wells einer 24-Well-Plate (1,9 cm² Wachstumsfläche pro Well) ausgesät und weitere drei Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

4.5.2 Färbung der Zellen

Nicht adhärenente Zellen werden an Tag sieben durch Waschen mit 1 ml PBS^{+/+} entfernt. Die adhärenente Zellen werden in 500 µl EGM-2-Medium mit 30 µl ac-LDL für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Waschen mit PBS^{+/+} werden die Zellen mit je 500 µl 4%iger PFA-Lösung fixiert. Die Supravitalfärbung erfolgt nach erneutem Waschen mit PBS^{+/+} mit 20 µl UEA-1 (1 mg/ml PBS) und 1 µl des Kernfarbstoffs Benzimide (bisBenzimide-Stammlösung) in 500 µl PBS^{+/+}. Eventuelle Reste der Farbstoffe werden nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln durch zweimaliges Waschen mit PBS^{+/+} entfernt und die Zellen mit 500 µl PBS^{+/+} bedeckt bei 4°C bis zur Auszählung aufbewahrt.

4.5.3 Zellzählung

Die gefärbten Zellen werden mit dem Fluoreszenzmikroskop in zehnfacher optischer Vergrößerung (Objektiv Plan Fluor 20x) ausgezählt (Abbildung 4). Es werden diejenigen Zellen gezählt, die sowohl mit UEA-1 als auch mit acLDL-DiI anfärbbar sind. Die entsprechenden Zellen werden von zwei geblindeten Untersuchern in mindestens vier zufällig ausgewählten High-Power Fields ausgezählt.

Gefärbte EPCs im Fluoreszenzmikroskop

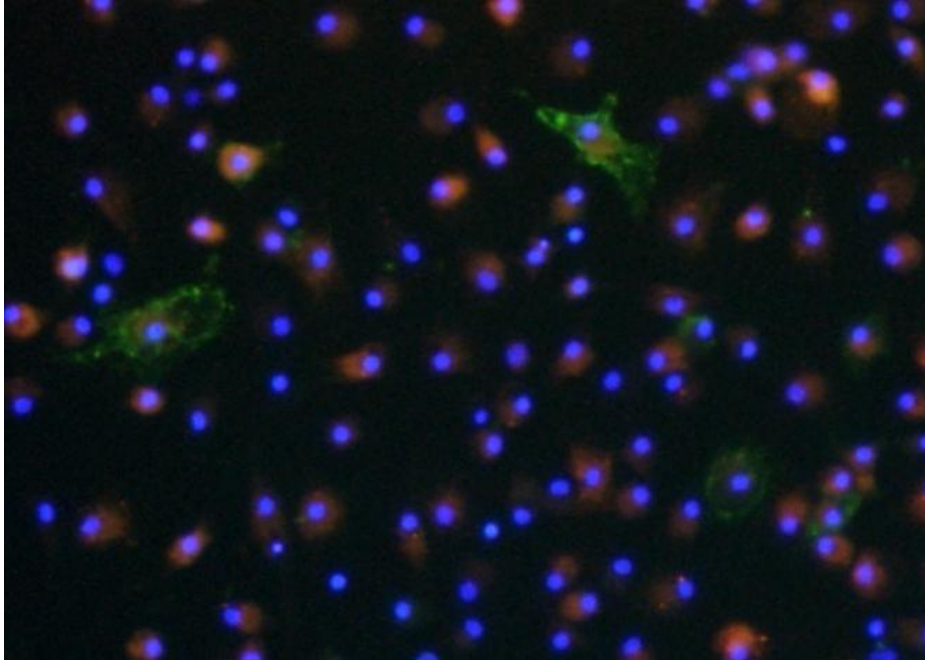


Abbildung 4: Mit ac-LDL, UEA1 und Benzimide angefärbte EPCs in zehnfacher optischer Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Objektiv Plan Fluor 20x).

4.6 Bewertung der re-endothelialisierten Fläche nach Schädigung der A. carotis im Mausmodell

Die Regeneration eines Endothelschadens durch endotheliale Progenitorzellen wird in einem Mausmodell untersucht.

Bei je drei immuninkompetenten CD1 nu/nu-Mäusen wird pro Blutentnahme in einer Operation die A. carotis communis freigelegt und mit einem Stromstoß mit einer Stärke von 2 W auf einer Länge von 4 mm geschädigt. Nach Injektion von aus Patientenblut isolierten EPCs wird die zuvor geschädigte Arterie entnommen, fixiert und die re-endothelialisierte Fläche planimetrisch bestimmt.

4.6.1 Operation und Schädigung der A. carotis communis

Die Narkose erfolgt inhalativ mit Isofluran. Die Maus wird in Rückenlage fixiert und die Augen mit Salbe geschützt. Das Operationsfeld am Hals wird desinfiziert und das Tier mit sterilen Tüchern abgedeckt. Der Hautschnitt erfolgt von knapp unterhalb des Kinns bis zum oberen Sternalrand. Die Schilddrüse und umliegendes Bindegewebe werden stumpf zur Seite präpariert, bis an der linken Halsseite der Gefäß-Nerven-Strang, bestehend aus A. carotis communis, V. jugularis interna und N. vagus, sichtbar wird. Unter Schonung der umgebenden Strukturen wird die A. carotis communis freipräpariert. Die Schädigung des Endothels erfolgt elektrisch mit einem Mikroregulator und Stromstößen der Stärke 2 W mit einer Dauer von jeweils 2 Sekunden pro Millimeter auf einer Länge von insgesamt 4 mm. Der Erfolg der Schädigung ist anhand einer sichtbar geringeren Pulsation der Arterie zu überprüfen.

Die Operationswunde wird mit einer fortlaufenden Naht und nicht-resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen.

4.6.2 Injektion endothelialer Progenitorzellen aus Patientenblut

Drei Stunden nach der Operation werden den Tieren jeweils 500.000 EPCs in 200 µl EBM-2, die wie in 3.4 beschrieben aus Patientenblut isoliert wurden, über eine Schwanzvene injiziert.

4.6.3 Entnahme und Fixierung der A. carotis communis

Am dritten Tag nach der Operation werden den Tieren zur Färbung des Präparats 50 µl einer 5%igen Evans Blue-Lösung über eine Schwanzvene appliziert. Danach erfolgt die Entnahme der geschädigten A. carotis.

Die Narkose und Operation erfolgen zunächst wie in 3.7.1 beschrieben. Der vorherige operative Zugang wird nach Entfernung des Nahtmaterials wiederverwendet. Nach Freilegung der A. carotis communis wird diese von soweit kaudal wie möglich bis oberhalb der Carotibifurkation nach kranial entnommen. Das Versuchstier wird noch in Narkose durch Genickbruch getötet.

Umgebendes Weichgewebe wird von der entnommenen Arterie abpräpariert und das Gefäß dann der Länge nach aufgeschnitten. Es wird zusammen mit einem Streifen Millimeterpapier in Entellan® auf einem Objektträger eingebettet (Abbildung 5).

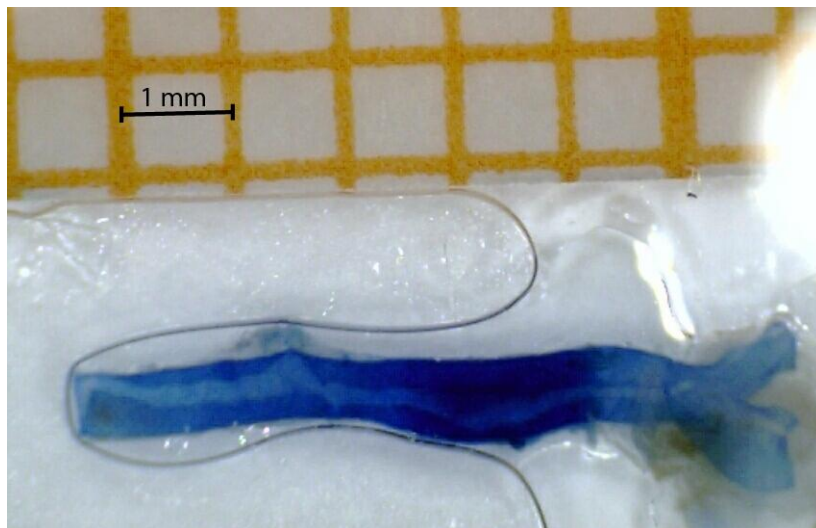


Abbildung 5: Fixiertes Präparat einer mit Evans Blue angefärbten A. carotis communis.

4.6.4 Berechnung der re-endothelialisierten Fläche

Das Präparat wird nach 24-stündiger Aushärtung fotografiert. Die Größe der geschädigten, d.h. dunkelblau gefärbten Fläche wird anhand des mit eingebetteten Millimeterpapiers mit Hilfe der BZ Image Analysis Software bestimmt. Die re-endothelialisierte Fläche berechnet sich durch Subtraktion der bestimmten Fläche vom gesamten geschädigten Areal von 4 mm Länge.

5 Ergebnisse

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde von PD Dr. Stefan Gräber aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Die quantitativen Veränderungen der in den folgenden Abschnitten aufgeführten Parameter wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test untersucht.

Die Differenz zwischen den beiden Patientengruppen in der Reendothelialisierungskapazität der endothelialen Progenitorzellen vor und nach der Behandlung wurde mittels einseitigem t-Test zum Signifikanzniveau $\alpha=0.025$ für unverbundene Stichproben verglichen. Die dabei untersuchte Nullhypothese lautet, dass die Verringerung der Reendothelialisierungskapazität von endothelialen Progenitorzellen in der Placebogruppe kleiner oder gleich der Verringerung in der Olmesartan-Gruppe ist.

5.1 Klinische Daten

Die klinischen Daten der Kontrollgruppe sowie der 28 Studienpatienten mit chronischer Niereninsuffizienz zum Zeitpunkt der Screening-Visite sind in Tabelle 3 dargestellt.

Das Durchschnittsalter der Patientengruppe mit chronischer Niereninsuffizienz war signifikant höher als das der gesunden Kontrollgruppe. Ebenso waren systolischer und diastolischer Blutdruck, Body Mass Index (BMI), Serum-CRP, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyzeride der Studienpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Entsprechend der chronisch eingeschränkten Nierenfunktion fanden sich bei den Studienpatienten signifikant erhöhte Cystatin C-Werte sowie eine eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sowohl bei Verwendung der MDRD-Formel als auch bei der Berechnung mit Cystatin C.

Bei den Werten von Hämoglobin, Harnstoff, HbA1c, HDL-Cholesterin, Kreatinin sowie Ausscheidung von Protein fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei Vergleich aller Patienten mit Niereninsuffizienz. Auch die erhöhte Albuminausscheidung im Urin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz war ohne statistische Signifikanz.

Klinische Ausgangsdaten

	Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz			Gesunde Kontrollen	
	Olmesartan (n=17)	Placebo (n=11)	Gesamt (n=28)		
Alter (Jahre)	56,8 ± 8,2	57,6 ± 9,3	57,1 ± 8,5	34,0 ± 9,8	§,§,%
Männlich : weiblich	9 : 8	5 : 6	14 : 14	6 : 6	
RR-sys (mmHg)	152,9 ± 15,9	143,2 ± 14,8	149,1 ± 15,9	125,6 ± 9,4	§,§,%
RR-dias (mmHg)	92,5 ± 11,5	93,1 ± 8,6	92,8 ± 10,3	80,8 ± 7,4	§,%
BMI (kg/m ²)	30,0 ± 3,9	27,8 ± 4,8	29,2 ± 4,3	24,1 ± 2,8	§,%
Hb (g/dl)	14,2 ± 1,9	14,2 ± 0,7	14,2 ± 1,6	14,2 ± 1,2	
Harnstoff (mg/dl)	44,4 ± 17,8	33,5 ± 7,8	40,1 ± 15,5	29,5 ± 8,8	§
CRP (mg/l)	3,6 ± 4,1	2,8 ± 2,3	3,3 ± 3,5	0,8 ± 0,8	§,§,%
HbA1c (%)	5,7 ± 0,4	5,8 ± 0,6	5,7 ± 0,5	5,3 ± 0,3	
Gesamtcholesterin (mg/dl)	213,0 ± 34,6	209,8 ± 37,5	211,8 ± 35,1	170,9 ± 27,0	§,%
HDL (mg/dl)	52,8 ± 13,0	58,1 ± 13,3	54,9 ± 13,1	60,2 ± 10,1	
LDL (mg/dl)	127,1 ± 25,2	127,6 ± 38,0	127,3 ± 31,3	96,7 ± 28,0	%
Triglyceride (mg/dl)	217,0 ± 152,5	156,8 ± 74,6	193,4 ± 129,4	91,9 ± 31,6	§,%
Kreatinin (mg/dl)	1,1 ± 0,4	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,1	
GFR MDRD (ml/min)	65,2 ± 19,3	70,8 ± 15,1	67,5 ± 17,6	88,9 ± 15,4	§,§,%
Cystatin C (mg/dl)	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,1	§,§,%
Cystatin C GFR (ml/min)	94,0 ± 41,5	104,1 ± 41,4	97,7 ± 40,9	139,3 ± 39,5	§,§,%
Albuminurie (mg/l)	38,0 ± 74,0	15,7 ± 21,2	28,3 ± 57,4	8,8 ± 7,6	
Proteinurie (mg/l)	92,7 ± 98,9	49,0 ± 37,2	73,7 ± 80,0	98,1 ± 62,8	

§ p<0.05 Gesunde Kontrolle vs. Olmesartan
 % p<0.05 Gesunde Kontrolle vs. alle Patienten mit chron. Niereninsuffizienz
 § p<0.05 Gesunde Kontrolle vs. Placebo

Tabelle 3: Klinische Ausgangsdaten (Mittelwert ± Standardabweichung).

5.2 Anzahl endothelialer Progenitorzellen

Die Anzahl endothelialer Progenitorzellen vor Beginn der Behandlung mit Olmesartan oder Placebo war in der Verumgruppe verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe signifikant niedriger (166 EPCs in der Patientengruppe, 401 EPCs in der Kontrollgruppe). Auch in der Placebogruppe war die Anzahl der EPCs mit 299 Zellen vor Behandlungsbeginn niedriger als in der Kontrollgruppe, ohne jedoch statistisch relevant zu sein. (Tabelle 4, Abbildung 6)

Nach zwölfwöchiger Behandlung mit Olmesartan konnte in der Verumgruppe ein signifikanter Anstieg der Anzahl endothelialer Progenitorzellen um durchschnittlich 114,2% auf 318 Zellen beobachtet werden, während die Anzahl der EPCs in der Placebogruppe im Durchschnitt sogar leicht abnahm (Abbildung 7).

	Olmesartan		Placebo		Gesunde Kontrollgruppe	
	V4	V6	V4	V6		
Abs. Anzahl EPCs	166 ± 77	318 ± 178	299 ± 126	286 ± 186	401 ± 141	§
Veränderungen der EPC-Anzahl (%)	100	214,2 ± 69,4	100	79,2 ± 39,1		§,%
Re-endothelialisierte Fläche (%)	17,6 ± 10,8	68,6 ± 20,7	11,4 ± 6,4	27,3 ± 19,6	87,7 ± 11,4	§,§, &,€
Albuminurie (mg/l)	42,9 ± 63,2	18,7 ± 35,6	15,0 ± 17,7	28,8 ± 42,8	8,8 ± 7,6	
Proteinurie (mg/l)	109 ± 81	83 ± 54	81 ± 32	85 ± 56	98 ± 63	

§ p<0.05 Gesunde Kontrolle vs. Olmesartan V4

% p<0.05 Olmesartan V6 vs. Placebo V6

€ p<0.05 Gesunde Kontrolle vs. Placebo V6

\$ p<0.05 Olmesartan V4 vs. Olmesartan V6

& p<0.05 Gesunde Kontrolle vs. Placebo V4

Tabelle 4: Veränderungen unter Behandlung mit Olmesartan oder Placebo (Mittelwert ± Standardabweichung).

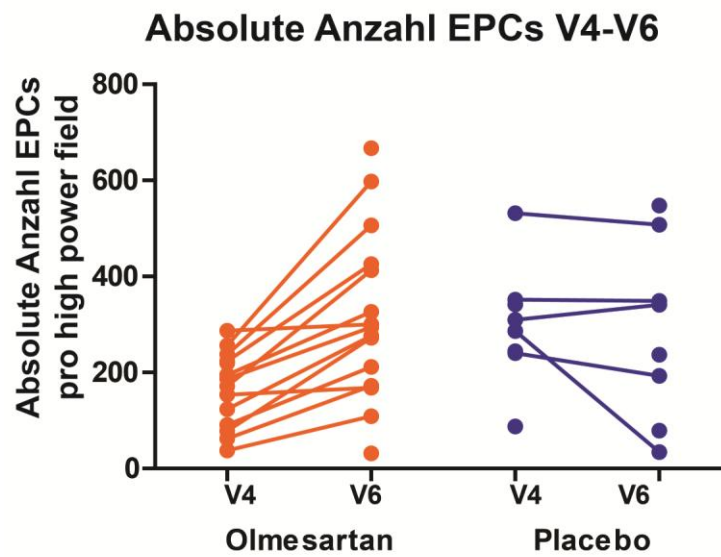
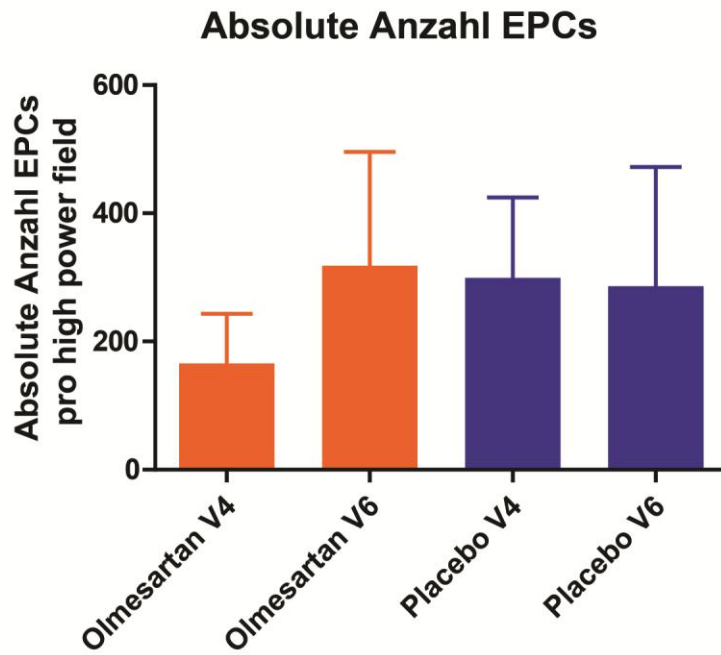


Abbildung 6: Absolute Anzahl an EPCs vor und nach Behandlung mit Olmesartan oder Placebo.

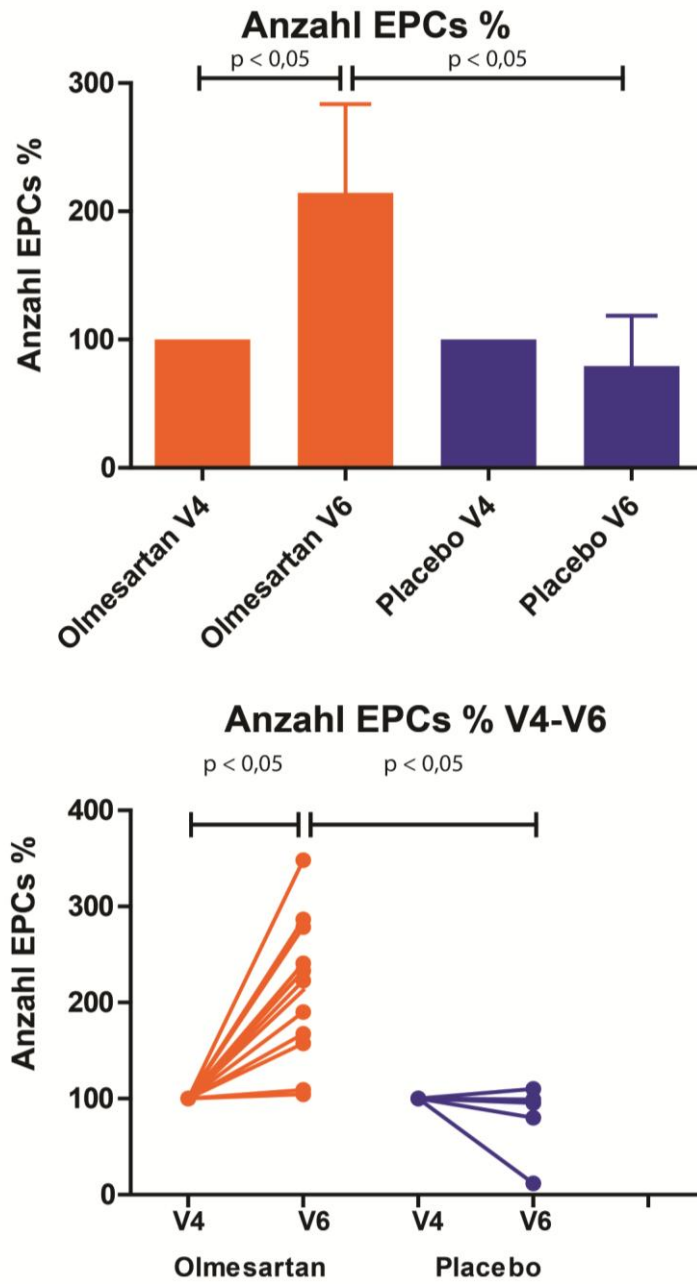


Abbildung 7: Relative Anzahl endothelialer Progenitorzellen vor und nach Behandlung mit Olmesartan oder Placebo.

5.3 Re-endothelialisierungskapazität anhand der re-endothelialisierten Fläche im Carotismodell

Im Carotismodell zur Bewertung der Re-Endothelialisierungskapazität zeigte sich in der Patientengruppe eine signifikant eingeschränkte Funktion der EPCs. In der Verumgruppe wurden vor Beginn der Olmesartan- bzw. Placebogabe 17,6% der geschädigten Fläche re-endothelialisiert, in der Placebogruppe waren es 11,4 %. Im Vergleich dazu wurde in der gesunden Kontrollgruppe eine Re-Endothelialisierung von 87,7% erreicht. Das re-endothelialisierte Areal vergrößerte sich nach Einnahme von Olmesartan auf 68,6% der geschädigten Fläche. Nach Einnahme des Placebos konnte bei einer re-endothelialisierten Fläche von 27,3% keine signifikante Verbesserung der Re-Endothelialisierungskapazität beobachtet werden (Abbildung 8).

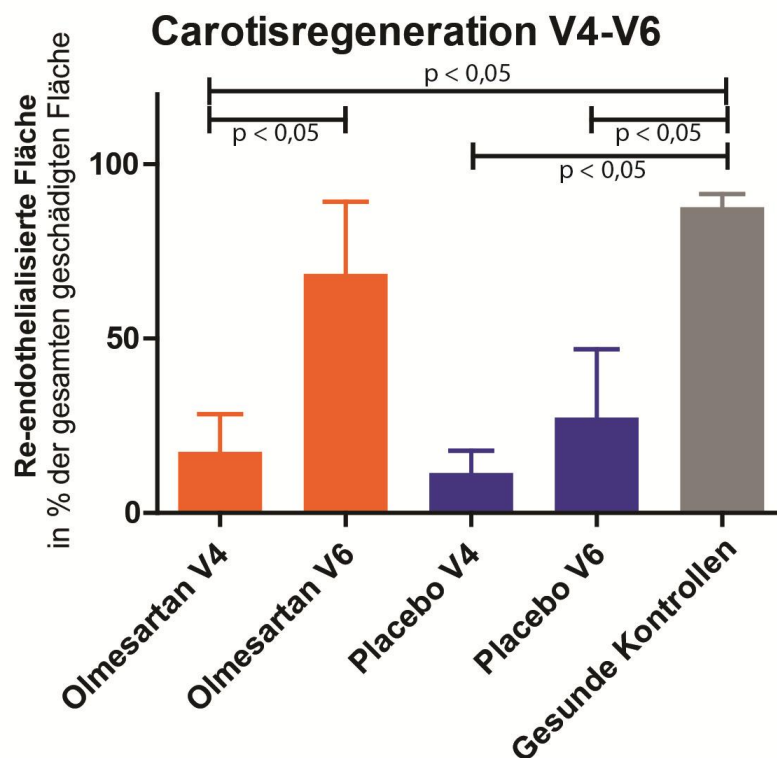


Abbildung 8: Re-endothelialisierte Fläche drei Tage nach Injektion von EPCs vor und nach Behandlung mit Olmesartan oder Placebo.

5.4 Effekt von Olmesartan auf Proteinurie und Albuminurie

Zu Studienbeginn fand sich insbesondere in der Verumgruppe eine erhöhte Albuminausscheidung im Urin (42,9mg/l in der Verumgruppe, 15,0 mg/l in der Placebogruppe), der Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe (8,8mg/l Albuminausscheidung) war jedoch nicht signifikant. Nach Einnahme von Olmesartan kam es zu einer Abnahme der Albuminurie auf 18,7mg/l, welche jedoch nicht im Bereich statistischer Signifikanz liegt. Nach Einnahme von Placebo wurden 28,8mg/l Albumin ausgeschieden. Auch im Bereich der Proteinurie zeigte sich keine statistisch signifikante Verbesserung durch Einnahme von Olmesartan. Es lässt sich jedoch ein Trend in Richtung Reduktion der Protein- und Albuminurie durch Olmesartan erkennen (Abbildung 9, Abbildung 10).

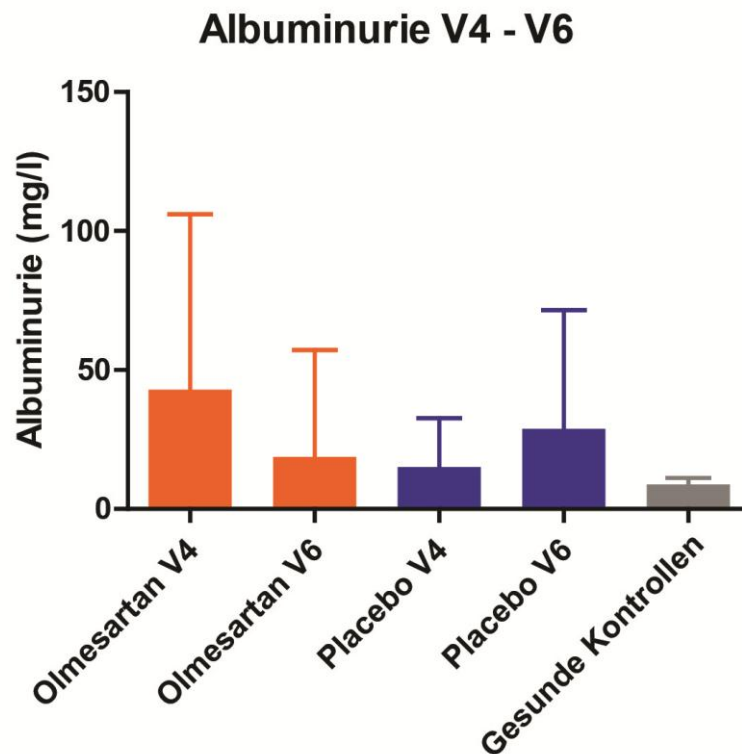


Abbildung 9: Albuminurie vor und nach Behandlung mit Olmesartan oder Placebo.

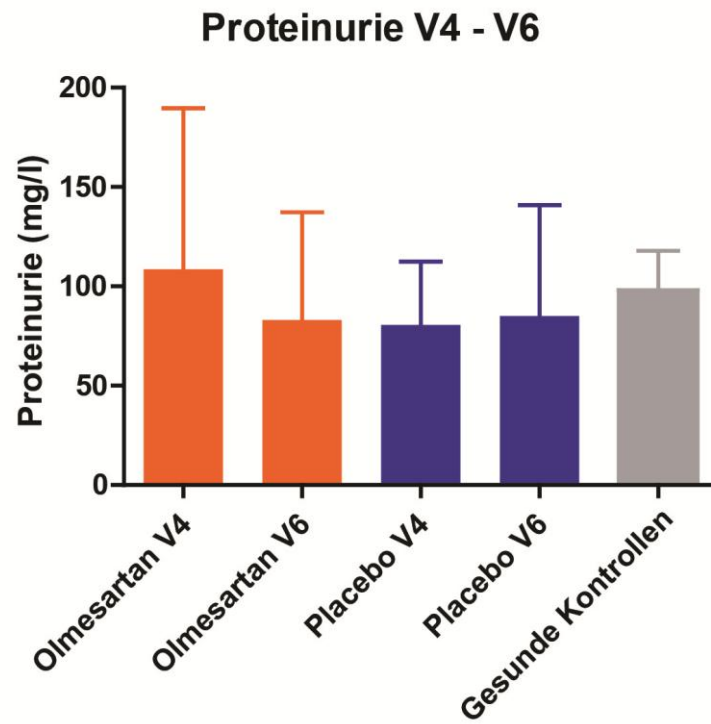


Abbildung 10: Proteinurie vor und nach Behandlung mit Olmesartan oder Placebo.

6 Diskussion

Die Hypothese, dass Olmesartan bei nierenkranken Patienten die Anzahl endothelialer Progenitorzellen erhöht, konnte in der vorliegenden Studie belegt werden. Außerdem wurde im Mausmodell gezeigt, dass auch die Funktion der EPCs im Sinne einer verbesserten Regeneration von Endothelschäden verbessert wird. Die stark eingeschränkte Re-Endothelialisierungskapazität der EPCs bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz normalisierte sich nach Olmesartaneinnahme fast vollständig. Bisher war dieser Effekt einer Olmesartaneinnahme nur für Patienten mit Diabetes mellitus Typ II nachgewiesen worden (Bahlmann, de Groot et al. 2005). Offen bleibt, ob Olmesartan auch bei nierengesunden Personen die Anzahl der EPCs ansteigen lässt und ihre Funktion verbessert und ob sich daraus Konsequenzen für eine präventive Therapie bei Patienten mit einem kardiovaskulären Risikoprofil ergeben.

Im Vergleich der drei Patientengruppen fällt auf, dass die Placebogruppe zu Studienbeginn eine höhere Anzahl EPCs als die Verumgruppe aufwies. Außerdem war die Nierenfunktion der Patienten in der Placebogruppe weniger stark eingeschränkt und die Albuminurie geringer ausgeprägt als in der Olmesartangruppe. Die gesunde Kontrollgruppe wies die höchste Anzahl endothelialer Progenitorzellen und die geringste Albuminausscheidung auf. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Ausmaß der Nierenschädigung mit der Anzahl der EPCs direkt korreliert. Dementsprechend wurde in der Studie ein Trend zur Verbesserung einer Albumin- und Proteinurie unter Olmesartaneinnahme sichtbar.

In früheren Untersuchungen konnte bereits demonstriert werden, dass Olmesartan bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II den Beginn der Mikroalbuminurie hinauszögern kann (Haller, Ito et al. 2011). In dieser Studie zeigt sich nun eine Tendenz in Richtung Verbesserung einer bereits vorliegenden Albuminurie unter Therapie mit Olmesartan. Dies lässt sich auf einen allgemein verbesserten Gefäßstatus zurückführen: Eine Mikroalbuminurie entsteht unter anderem auf dem Boden einer Dysfunktion des glomerulären Endothels, welche durch die bereits in der Einleitung erwähnten Faktoren induziert wird (Kang, Kanellis et al. 2002; Haraldsson, Nystrom et al. 2008). Das Vorliegen einer Albuminurie kann nicht nur als Ausdruck einer Nierenerkrankung, sondern auch als Zeichen der Progression einer systemischen mikrovaskulären Schädigung im Rahmen einer Atherosklerose gesehen werden (Glasscock 2010). Ungeachtet der Ursache wurde eine bestehende Albuminurie außerdem als begünstigender Faktor für das Fortschreiten einer Niereninsuffizienz (van der Velde,

Halbesma et al. 2009; Molitch, Steffes et al. 2010) sowie als zusätzlicher kardiovaskulärer Risikofaktor identifiziert (Matsushita, van der Velde et al. 2010; Smink, Lambers Heerspink et al. 2012).

Über eine Verringerung der Albuminausscheidung im Urin durch Olmesartan bietet sich also eine Möglichkeit, das kardiovaskuläre Risiko sowohl direkt als auch indirekt über den verlangsamten Progress der Niereninsuffizienz günstig zu beeinflussen. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob sich nach Olmesartaneinnahme parallel zur erhöhten Anzahl endothelialer Progenitorzellen und zur verminderten Albuminausscheidung auch die glomeruläre Filtrationsrate erhöht hat. Vor dem Hintergrund einer Studie von Chade, Zhu et al. aus dem Jahr 2009, in der im Tierexperiment durch intrarenale Infusion von EPCs die Nierenfunktion bei chronischer Nierenarterienstenose bewahrt werden konnte, ist dies anzunehmen. Die Resultate sollten jedoch in weiteren Untersuchungen validiert werden.

Außerdem wurde auch in dieser Studie deutlich, dass der Kreatininwert alleine kein valider Marker für die Bestimmung der Nierenfunktion ist. Zu Studienbeginn bestand zwischen Kontroll- und Patientengruppen kein signifikanter Unterschied der Kreatininwerte. Die eingeschränkte Nierenfunktion der Patientengruppe wird erst durch die Bestimmung von Cystatin C oder die Berechnung der glomerulären Filtrationsrate mittels der MDRD-Formel oder mit Hilfe von Cystatin C deutlich. Die größte Differenz in der Nierenfunktion zwischen Patientenpopulation und Kontrollgruppe ließ sich dabei mit Berechnung der GFR mit Cystatin C zeigen. Dieses Ergebnis ist konform mit Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass die Berechnung der GFR mit Hilfe der MDRD-Formel zu einer Überschätzung der Nierenfunktion tendiert und die mit Hilfe von Cystatin C ermittelte GFR akkurater ist. Darüberhinaus gibt letztere das Mortalitätsrisiko und das Risiko für eine Progression zur Dialysepflicht besser wieder (Inker, Schmid et al. 2012; Shlipak, Matsushita et al. 2013).

Abgesehen von den bereits diskutierten positiven Ergebnissen ist ein Kritikpunkt der Studie sicherlich die geringe Patientenzahl, da nicht die erwartete Anzahl Patienten die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllt haben. Außerdem ist die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen kritisch zu sehen. Die Kontrollgruppe bestand aus einem wesentlich jüngeren Patientengut mit entsprechend weniger Komorbiditäten. Es bleibt unklar, ob der Unterschied in den Ausgangswerten der EPCs bei einer älteren Kontrollgruppe ebenso groß gewesen wäre und ob es durch Einnahme von Olmesartan zu einem Anstieg der EPC-Zahl über den Wert der Kontrollgruppe hinaus gekommen wäre. Die grundsätzlich vielversprechenden Ergebnisse

müssen aus diesen Gründen sicherlich noch in weiteren Studien mit einer größeren Patientenzahl bestätigt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Ahmad, A., W. M. Rand, et al. (2001). "Reduced kidney function and anemia as risk factors for mortality in patients with left ventricular dysfunction." *J Am Soc Nephrol* 38: 955-962.
- Anavekar, N. S., J. J. V. McMurray, et al. (2004). "Relation between Renal Dysfunction and Cardiovascular Outcomes after Myocardial Infarction." *N Engl J Med* 351: 1285-1295.
- Annuk, M., M. Zilmer, et al. (2001). "Oxidative Stress and Endothelial Function in Chronic Renal Failure." *J Am Soc Nephrol* 12: 2747-2752.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis." *Science* 275: 964-966.
- Bahlmann, F. H., K. de Groot, et al. (2005). "Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists." *Hypertension* 45: 526-529.
- Bahlmann, F. H., K. de Groot, et al. (2004). "Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells." *Blood* 103: 921-926.
- Brenner, B. M., M. E. Cooper, et al. (2001). "Effects of Losartan on Renal and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes and Nephropathy." *N Engl J Med* 345: 861-869.
- Chade, A. R., X. Zhu, et al. (2009). "Endothelial progenitor cells restore renal function in chronic experimental renovascular disease." *Circulation* 119: 547-557.
- Choi, J.-H., K. L. Kim, et al. (2004). "Decreased Number and Impaired Angiogenic Function of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Chronic Renal Failure." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24: 1246-1252.
- Classen, M. B., Michael (eds) (2009). *Innere Medizin*. München, Elsevier, Urban & Fischer.
- Cody Md, R. J. (1997). "The Sympathetic Nervous System and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Cardiovascular Disease." *The American Journal of Cardiology* 80(9, Supplement 2): 9J-14J.
- Collins AJ, Foley RN, Herzog C, et al. (2011). "US Renal Data System 2010 Annual Data Report." *Am J Kidney Dis*. 57 (suppl 1): e1-e526
- Coresh, J., B. C. Astor, et al. (2003). "Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third national health and nutrition examination survey." *Am J Kidney Dis* 41: 1-12.

- Dirks, J. H., D. de Zeeuw, et al. (2005). "Prevention of chronic kidney and vascular disease: Toward global health equity[mdash]The Bellagio 2004 Declaration." *Kidney Int* 68: S1-S6.
- Fliser, D., K. Buchholz, et al. (2004). "Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation." *Circulation* 110: 1103-1107.
- Foley, R. N., A. M. Murray, et al. (2005). "Chronic Kidney Disease and the Risk for Cardiovascular Disease, Renal Replacement, and Death in the United States Medicare Population, 1998 to 1999." *J Am Soc Nephrol* 16: 489-495.
- Francis, G., C. Benedict, et al. (1990). "Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD)." *Circulation* 82: 1724-1729.
- Ghiadoni, L., A. Cupisti, et al. (2004). "Endothelial dysfunction and oxidative stress in chronic renal failure." *Journal of Nephrology* 17: 512-519.
- Glassock, R. J. (2010). "Is the presence of microalbuminuria a relevant marker of kidney disease?" *Curr Hypertens Rep* 12: 364-368.
- Go, A. S., G. M. Chertow, et al. (2004). "Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization." *N Engl J Med* 351(: 1296-1305.
- Haller, H., S. Ito, et al. (2011). "Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes." *N Engl J Med* 364: 907-917.
- Haraldsson, B., J. Nystrom, et al. (2008). "Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria." *Physiol Rev* 88: 451-487.
- Heeschen, C., A. Aicher, et al. (2003). "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." *Blood* 102: 1340-1346.
- Henry, R. M. A., P. J. Kostense, et al. (2002). "Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study." *Kidney Int* 62: 1402-1407.
- Hill, J. M., G. Zalos, et al. (2003). "Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk." *N Engl J Med* 348: 593-600.
- Hornig, B., U. Landmesser, et al. (2001). "Comparative Effect of ACE Inhibition and Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonism on Bioavailability of Nitric Oxide in Patients With Coronary Artery Disease : Role of Superoxide Dismutase." *Circulation* 103: 799-805.
- Hruska, K., S. Mathew, et al. (2011). "Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: does phosphate qualify[quest]." *Kidney Int* 79: S9-S13.
- Ingram, D. A., T. R. Krier, et al. (2007). "Clonogenic Endothelial Progenitor Cells Are Sensitive to Oxidative Stress." *STEM CELLS* 25: 297-304.

- Inker, L. A., C. H. Schmid, et al. (2012). "Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C." *N Engl J Med* 367: 20-29.
- Investigators, T. S. (1991). "Effect of Enalapril on Survival in Patients with Reduced Left Ventricular Ejection Fractions and Congestive Heart Failure." *N Engl J Med* 325: 293-302.
- Iwakura, A., C. Luedemann, et al. (2003). "Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury." *Circulation* 108: 3115-3121.
- Kang, D. H., J. Kanellis, et al. (2002). "Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease." *J Am Soc Nephrol* 13: 806-816.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group (2013). "KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease." *Kidney Int Suppl.* 3:1-150.
- Klinke, R. H. (ed) (2010). *Physiologie*. Stuttgart ; New York, NY, Thieme.
- Koh, K. K., J. Y. Ahn, et al. (2003). "Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients." *Journal of the American College of Cardiology* 42: 905-910.
- Kranzhöfer, R., J. Schmidt, et al. (1999). "Angiotensin Induces Inflammatory Activation of Human Vascular Smooth Muscle Cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19: 1623-1629.
- Levey, A. S., K. U. Eckardt, et al. (2005). "Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)." *Kidney Int* 67: 2089-2100.
- Lewis, E. J., L. G. Hunsicker, et al. (2001). "Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes." *N Engl J Med* 345: 851-860.
- Longenecker, J. C., J. Coresh, et al. (2002). "Traditional Cardiovascular Disease Risk Factors in Dialysis Patients Compared with the General Population: The CHOICE Study." *J Am Soc Nephrol* 13: 1918-1927.
- Longenecker, J. C., M. J. Klag, et al. (2005). "High Lipoprotein(a) Levels and Small Apolipoprotein(a) Size Prospectively Predict Cardiovascular Events in Dialysis Patients." *J Am Soc Nephrol* 16: 1794-1802.
- Mann, J. F. E., H. C. Gerstein, et al. (2001). "Renal Insufficiency as a Predictor of Cardiovascular Outcomes and the Impact of Ramipril: The HOPE Randomized Trial." *Annals of Internal Medicine* 134: 629-636.
- Maruyama, S., A. Taguchi, et al. (2008). "Low circulating CD34+ cell count is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients." *Kidney Int* 74: 1603-1609.

- Matsushita, K., M. van der Velde, et al. (2010). "Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis." *Lancet* 375: 2073-2081.
- Molitch, M. E., M. Steffes, et al. (2010). "Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study." *Diabetes Care* 33: 1536-1543.
- Oh, J., R. Wunsch, et al. (2002). "Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood-onset chronic renal failure." *Circulation* 106: 100-105.
- Parving, H. H., H. Lehnert, et al. (2001). "The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes." *N Engl J Med* 345: 870-878.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, et al. (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." *Blood* 95: 952-958.
- Rao, G. and B. Berk (1992). "Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression." *Circ Res* 70: 593-599.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis - An Inflammatory Disease." *N Engl J Med* 340: 115-126.
- Sarnak, M. J. (2003). "Cardiovascular complications in chronic kidney disease." *Am J Kidney Dis* 41: 11-17.
- Sarnak, M. J., B. E. Coronado, et al. (2002). "Cardiovascular disease risk factors in chronic renal insufficiency." *Clin Nephrol* 57: 327-335.
- Sarnak, M. J., A. S. Levey, et al. (2003). "Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease." *Hypertension* 42: 1050-1065.
- Schieffer, B., C. Bunte, et al. (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.
- Schiffrin, E. L., J. B. Park, et al. (2000). "Correction of Arterial Structure and Endothelial Dysfunction in Human Essential Hypertension by the Angiotensin Receptor Antagonist Losartan." *Circulation* 101: 1653-1659.
- Shastri, S. and M. J. Sarnak (2010). "Cardiovascular Disease and CKD: Core Curriculum 2010." *Am J Kidney Dis* 56: 399-417.
- Shlipak, M. G., K. Matsushita, et al. (2013). "Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function." *N Engl J Med* 369: 932-943.
- Smink, P. A., H. J. Lambers Heerspink, et al. (2012). "Albuminuria, estimated GFR, traditional risk factors, and incident cardiovascular disease: the PREVEND

- (Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease) study." *Am J Kidney Dis* 60: 804-811.
- Sorrentino, S. A., F. H. Bahlmann, et al. (2007). "Oxidant Stress Impairs In Vivo Reendothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells From Patients With Type 2 Diabetes Mellitus." *Circulation* 116: 163-173.
- Stumpe, K. O., E. Agabiti-Rosei, et al. (2007). "Carotid intima-media thickness and plaque volume changes following 2-year angiotensin II-receptor blockade. The Multicentre Olmesartan atherosclerosis Regression Evaluation (MORE) study." *Ther Adv Cardiovasc Dis* 1: 97-106.
- Swedberg, K., P. Eneroth, et al. (1990). "Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group." *Circulation* 82: 1730-1736.
- Tokmakova, M. P., H. Skali, et al. (2004). "Chronic Kidney Disease, Cardiovascular Risk, and Response to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition After Myocardial Infarction." *Circulation* 110: 3667-3673.
- van der Velde, M., N. Halbesma, et al. (2009). "Screening for albuminuria identifies individuals at increased renal risk." *J Am Soc Nephrol* 20: 852-862.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease." *Circulation* 103: 2885-2890.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate With Risk Factors for Coronary Artery Disease." *Circ Res* 89: e1-e7.
- Walter, D. H., K. Rittig, et al. (2002). "Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells." *Circulation* 105: 3017-3024.
- Warren, D. and T. Ferris (1970). "Renin Secretion In Renal Hypertension." *Lancet* 295: 159-163.
- Werner, N., S. Junk, et al. (2003). "Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury." *Circ Res* 93: e17-24.
- Werner, N., S. Kosiol, et al. (2005). "Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes." *N Engl J Med* 353: 999-1007.
- Yusuf, S. (2000). "Effects of an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor, Ramipril, on Cardiovascular Events in High-Risk Patients." *N Engl J Med* 342: 145-153.
- Yusuf, S., K. Teo, et al. (2008). "Effects of the angiotensin-receptor blocker telmisartan on cardiovascular events in high-risk patients intolerant to angiotensin-converting enzyme inhibitors: a randomised controlled trial." *Lancet* 372: 1174-1183.

Zhao, X.-Q. (2013, 03.09.2013). "Pathogenesis of atherosclerosis." Retrieved 08.10.2013, 2013, from www.uptodate.com.

Zoppini, G., G. Targher, et al. (2010). "Anaemia, independent of chronic kidney disease, predicts all-cause and cardiovascular mortality in type 2 diabetic patients." *Atherosclerosis* 210: 575-580.

8 Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die an der Durchführung der Doktorarbeit beteiligt waren.

Insbesondere geht mein Dank an meinen Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Danilo Fliser für die Überlassung des Themas und die abschließenden Korrekturen der vorgelegten Manuskripte.

Mein Dank gilt außerdem meinem Betreuer Herrn Dr. Dr. Ferdinand Hermann Bahlmann für die hervorragende Einarbeitung und Hilfestellung während der Erstellung der Arbeit und der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit.

Zu guter Letzt möchte ich noch meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums danken und Bruno Gavazzi für seine Hilfe bei technischen Problemen und die moralische Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am 18.09.1984 in Berlin.

Ledig.

Ausbildung

08/1996 – 06/2003 Besuch der Freiherr-vom-Stein-Oberschule (Gymnasium), Berlin-Spandau

- 6/2003 Abitur, Note 1,8.

10/2004 – 6/2011 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes, Homburg

- 10/2004 – 09/2006: Vorklinischer Studienabschnitt, Abschluss mit dem Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“ (1,5).
- 10/2006 – 6/2011: Klinischer Studienabschnitt, Abschluss mit der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“ (1,5).

Berufstätigkeit

3/2012 – 3/2013 Assistenzärztin in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie, Infektiologie, Altersmedizin, Ortenau-Klinikum Offenburg-Gengenbach, Prof. Dr. W.-B. Offensperger (bis 08/2012 Medizinische Klinik, Ortenau Klinikum Offenburg St. Josefsklinik).

4/2013 – 7/2013 Assistenzärztin in der Abteilung für Kardiologie, Pneumologie, Angiologie und Intensivmedizin, Ortenau-Klinikum Offenburg-Gengenbach, PD Dr. S. Wieshammer.

Seit 8/2013 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik, Ortenau-Klinikum Achern-Oberkirch, Dr. med. R. Feik.

10 Anhang

**Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-
Endothelialization Capacity of Endothelial
Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney
Disease (OECD Study)**

Study no.: FNH-DS001

Case Report Form

Patient Initials |__|__|

Patient No. |__|__|__|

Randomization No. |__|__|__|

Universität des Saarlandes

Klinik Innere Medizin IV- Nieren und Hochdruckkrankheiten

Universitätsklinikum des Saarlandes

Kirrbergerstr. Geb. 40.2

D-66421 Homburg/ Saar

Tel. 06841 / 16 21503 Fax: 06841 / 16 23540

GUIDELINES FOR THE CASE REPORT FORM COMPLETION

All data concerning this study have to be recorded.

All data collected during the study have to be documented in the case report form.

Identification of patients throughout the study is done by patient number and randomization number.

Please answer all questions and write clearly.

Please enter only one digit in one box. Data should be entered at the right hand margin.

e.g.: | _ | _ | _ | _ | 2 |

If a question is not applicable please use "NA" for "not applicable".

If an examination was not done use "ND" for "not done".

If a result is zero please write "0".

Comments should be as short as possible. Please do not enter comments outside the predefined areas.

Please use a black or blue ball-point pen.

Incorrect entries should be deleted with a single line. The original entry must be kept legible in any case.

All changes and/or corrections made to the case report form must be initialed and dated by the investigator or by another responsible person of the respective study centre. Moreover, the reason for changes should be specified.

The case report form has to be signed by the investigator. If a premature termination of the trial in a patient occurs, the case report form should be completed up to this day and the form concerning the study end (page 27 ff.) must be filled in.

The white pages of the case report form will be forwarded to data management by the monitors. The first carbon copy of the case report form pages will remain with the monitor, the second carbon copy has to be stored at the trial center for at least 15 years.

The case report form of study FNH-DS001 contains 43 pages.

Woche		-4	-2	0	2	6	Bei Bedarf
Nr. Der Visite	V1	V2	V3	V4	V5	V6	Interim*
	Screening	Washout			Medication		
In- and Exclusion criteria	X						
Informed Consent	X						
Demographic Data	X						
Medical History	X						
Pregnancy test	X						
Randomization		X					
Vital signs	X	X	X	X	X	X	X
Physical Examination	X	X	X	X	X	X	X
12-lead ECG	X					X	
Blood Count and Biochemistry	X			X		X	
EPC Isolation				X		X	
Dispense of Study Medication				X	X		X
Return of Study Medication					X	X	X
Compliance			X				X
Documentation of prev. and conc. Medication	X						X
Documentation of adverse events	X						X

Informed consent

Date of informed consent |_|_|_|·|_|_|_|·|_|_|_|
(day) (month) (year)

I informed the patient about the nature, objective and risks of this clinical trial. He/she declared his/her informed consent to participate in this study in writing. The patient received a copy of the patient information and written informed consent.

Investigator's signature _____
Name of investigator obtaining consent in block letters

|_|_|_|·|_|_|_|·|_|_|_| _____
(day) (month) (year) Signature
Date

Demographic Data

Date of birth | |_|_| . | |_|_| . | |_|_|_|_|
 (day) (month) (year)

Gender: | |_| male | |_| female

Height: | |_|_|_| cm

Alcohol Consumption

| |_| None

| |_| Sporadic (1 to 2 glasses of wine/beer per day or up to 6 drinks per week)

| |_| Regular (2 to 3 glasses of wine/beer per day or 6 to 20 drinks per week, patient is able to stop daily consumption)

| |_| Excessive (more than 3 glasses of wine/beer per day or more than 20 drinks per week, patient is unable to stop daily consumption)

Smoking History

| |_| Non-smoker

| |_| Smoker → cigarettes per day | |_|_|

 cigars per day | |_|_|

 pipes per day | |_|_|

 Date started | |_|_| . | |_|_| . | |_|_|_|_|
 (day) (month) (year)

| |_| Previous smoker → Date started | |_|_| . | |_|_| . | |_|_|_|_|
 (day) (month) (year)

 Date stopped | |_|_| . | |_|_| . | |_|_|_|_|
 (day) (month) (year)

Date of visit

|_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Inclusion and Exclusion Criteria

Inclusion Criteria	Yes	No
1. Signed written informed consent	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Woman or man aged 18 to 70 years	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Chronic Kidney Disease (CKD II-IV)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Endogenous creatinine clearance between 15 ml/min and 90 ml/min. No impending need for dialysis during the study	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. HbA1C <8% for patients with diabetes mellitus type II	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. No Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. No known metabolic disease except diabetes mellitus type II	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

|_|NA

If one inclusion criterion is answered with NO or one of the following exclusion criteria is answered with YES, the patient is NOT ALLOWED to be enrolled in the study!

Exclusion Criteria	Yes	No
1. Myelodysplastic or –proliferative diseases	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Malignant disease diagnosed within the last 5 years	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Renal anemia (Hb ≤10,5 g/dl for men or ≤10 g/dl for women) or therapy with rHuEPO or analogs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Therapy with growth factors, e.g. GM-CSF or VEGF	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Statin Therapy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Bleeding episodes relevant for Hb within the last 3 months or known gastrointestinal bleeding sources	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Foreseeable need for dialysis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Universität des Saarlandes Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)	Patient No. _ _ _ _	Visit 1 Screening		
Exclusion Criteria		Yes	No	
8.	Sitting dBp >100 mmHg with standard antihypertensives (incl. ACE Inhibitors or ARB)	_	_	
9.	Sitting sBP >100 mmHg with standard antihypertensives (incl. ACE Inhibitors or ARB)	_	_	
10.	Known intolerance of ARBs, e.g. Olmetec®, Diovan®, Lorzaar®, Atacand®, Aprovel®, Mircardis®, Teveten®	_	_	
11.	Known HIV infection	_	_	
12.	Systemic chemotherapy or radiotherapy	_	_	
13.	Chronic infection and/or CRP >10 mg/l at the beginning of the study	_	_	
14.	Acute cardiovascular episodes	_	_	
15.	Organ transplants	_	_	
16.	Pregnant or lactating woman	_	_	_ NA
17.	Woman of childbearing potential without adequate contraception	_	_	_ NA
18.	Psychiatric disease or chronic cerebral attacks	_	_	
19.	Non-compliance or participation in another clinical study within the last 30 days	_	_	

Chronic Kidney Disease History

Underlying disease leading to impaired renal function

|_____|

Antihypertensive Therapy

Current treatment with antihypertensive drugs?

Yes

No

If YES the patient should be switched to following treatment regimen in order to ensure a target blood pressure of 140/90 mmHg.

- Hydrochlorothiazide; Dose: 12.5mg & 25mg
- Metoprolol; Dose: 47.5mg & 95mg
- Clonidine; Dose: 0.075mg & 0.15mg

Statin Therapy

Current treatment with statins

Yes →

Therapy should be continued

No →

Cholesterol lowering therapy should not be started with statins during the trial – please use alternative drugs

Please document all previous and concomitant medication on page 38f.

Medical History

Please document any disease, surgery or allergy with exception of chronic kidney disease that occurred in the past three years and any relevant preexisting disease (more than three years ago) in the following table.

Disease	past	ongoing
1.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Vital Signs

Please perform the measurements in sitting positions after 10 minutes at rest on both arms with at least 5 min between the measurements. The arm with the highest diastolic blood pressure must be used for blood pressure assessments at all future visits.

	Blood pressure [mmHg]		Pulse rate [beats/min]
	systolic	diastolic	
Left arm	_ _ _	_ _ _	_ _ _
Right arm	_ _ _	_ _ _	_ _ _

Arm to be used in all further visits Left Right

Body temperature |_|_|_|,|_|_| °C

Body weight |_|_|_|_|,|_|_| kg

12- Lead ECG

QT interval |_|_|_|_| ms

QTC interval |_|_|_|_| ms

Interpretation Normal

Abnormal, clinically irrelevant

Abnormal, clinically relevant Please specify below

Not done

Specification of abnormalities

Please place a print-out of the ECG in the back-pocket of the folder.

Physical Examination

Organ	normal	abnormal	Not examined	If abnormal, please specify
Heart	_	_	_	
Lung	_	_	_	
Extremities	_	_	_	
Eyes / Ears / Nose / Throat	_	_	_	
Lymph Nodes	_	_	_	
Chest	_	_	_	
Abdomen	_	_	_	
Nervous System	_	_	_	
Endocrine System	_	_	_	
Skin	_	_	_	
Renal System	_	_	_	
Musculoskeletal System	_	_	_	
Vascular System	_	_	_	

Biochemistry

Parameter	normal	Abnormal		Comment (for clinically relevant abnormalities)
		not CR*	CR*	
Potassium	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sodium	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Calcium	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Urea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total Cholesterol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDL- Cholesterol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HDL- Cholesterol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Triglycerides	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Creatinine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
GOT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
GPT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
γ-GT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Alcaline Phosphatase	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Iron	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Transferrin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Transferrin saturation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
C-reactive Protein	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Ferritin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HbA1C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Cyctatine C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BGA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDH	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* CR = Clinically relevant

Blood Count

Parameter	normal	Abnormal		Comment (for clinically relevant abnormalities)
		not CR*	CR*	
Hemoglobin	_	_	_	
Hematocrit	_	_	_	
Erythrocytes	_	_	_	
Leucocytes	_	_	_	
Thrombocytes	_	_	_	

* CR = Clinically relevant

Please place a print-out of the laboratory results in the back-pocket of the folder.

Pregnancy Test

Date of test |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Result of test |_| Negative
|_| Positive → **Patient must be excluded from the study**
|_| Not applicable

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

**Visit 2
Week -4****Randomization**

Date of randomization

|_|_|·|_|_|·|_|_|_|_|

(day) (month) (year)

Please assign the lowest available randomization number (= study medication number).

Randomization No.

|_|_|_|_|

Date of visit

|_|_|·|_|_|·|_|_|_|_|

(day) (month) (year)

Vital Signs

Please perform the measurements in sitting positions after 10 minutes at rest at the arm specified on page 10.

Blood pressure

|_|_|_|_| / |_|_|_|_| mmHg
systolic diastolic

Pulse rate

|_|_|_|_| beats / min

Body temperature

|_|_|,|_| °C

Body weight

|_|_|_|_|,|_| kg

Physical Examination

Organ	normal	abnormal	Not examined	If abnormal, nealse specify
Heart	__	__	__	
Lung	__	__	__	
Extremities	__	__	__	
Eyes / Ears / Nose / Throat	__	__	__	
Lymph Nodes	__	__	__	
Chest	__	__	__	
Abdomen	__	__	__	
Nervous System	__	__	__	
Endocrine System	__	__	__	
Skin	__	__	__	
Renal System	__	__	__	
Musculoskeletal System	__	__	__	
Vascular System	__	__	__	

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

**Visit 3
Week -2**

Date of visit

|_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Vital Signs

Please perform the measurements in sitting positions after 10 minutes at rest at the arm specified on page 10.

Blood pressure |_|_|_|_| / |_|_|_|_| mmHg
systolic diastolic

Pulse rate |_|_|_|_| beats / min

Body temperature |_|_|_|, |_| °C

Body weight |_|_|_|_|, |_| kg

Physical Examination

Organ	normal	abnormal	Not examined	If abnormal, nealse specify
Heart	__	__	__	
Lung	__	__	__	
Extremities	__	__	__	
Eyes / Ears / Nose / Throat	__	__	__	
Lymph Nodes	__	__	__	
Chest	__	__	__	
Abdomen	__	__	__	
Nervous System	__	__	__	
Endocrine System	__	__	__	
Skin	__	__	__	
Renal System	__	__	__	
Musculoskeletal System	__	__	__	
Vascular System	__	__	__	

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

**Visit 4
Week 0****Date of visit**|_|_|_|·|_|_|·|_|_|_|_|
(day) (month) (year)**Vital Signs**

Please perform the measurements in sitting positions after 10 minutes at rest at the arm specified on page 10.

Blood pressure |_|_|_| / |_|_|_| mmHg
systolic diastolic

Pulse rate |_|_|_| beats / min

Body temperature |_|_|, |_| °C

Body weight |_|_|_|, |_| kg

Physical Examination

Organ	normal	abnormal	Not examined	If abnormal, nealse specify
Heart	__	__	__	
Lung	__	__	__	
Extremities	__	__	__	
Eyes / Ears / Nose / Throat	__	__	__	
Lymph Nodes	__	__	__	
Chest	__	__	__	
Abdomen	__	__	__	
Nervous System	__	__	__	
Endocrine System	__	__	__	
Skin	__	__	__	
Renal System	__	__	__	
Musculoskeletal System	__	__	__	
Vascular System	__	__	__	

Biochemistry

Parameter	normal	Abnormal		Comment (for clinically relevant abnormalities)
		not CR*	CR*	
Potassium	__	__	__	
Sodium	__	__	__	
Calcium	__	__	__	
Urea	__	__	__	
Total Cholesterol	__	__	__	
LDL- Cholesterol	__	__	__	
HDL- Cholesterol	__	__	__	
Triglycerides	__	__	__	
Creatinine	__	__	__	
GOT	__	__	__	
GPT	__	__	__	
γ-GT	__	__	__	
Alcaline Phosphatase	__	__	__	
Iron	__	__	__	
Transferrin	__	__	__	
Transferrin saturation	__	__	__	
C-reactive Protein	__	__	__	
Ferritin	__	__	__	
HbA1C	__	__	__	
Cyctatine C	__	__	__	
BGA	__	__	__	
LDH	__	__	__	

* CR = Clinically relevant

Blood Count

Parameter	normal	Abnormal		Comment (for clinically relevant abnormalities)
		not CR*	CR*	
Hemoglobin	_	_	_	
Hematocrit	_	_	_	
Erythrocytes	_	_	_	
Leucocytes	_	_	_	
Thrombocytes	_	_	_	

* CR = Clinically relevant

Please place a print-out of the laboratory results in the back-pocket of the folder.

Nitrosylhämoglobin (HbNO)

Date of blood sample |_|_|·|_|_|·|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Storage Number |_|_|_|_|

HbNO concentration |_|_|,|_|_| µM

Please place a print-out of the ESR results in the back-pocket of the folder.

Dispense of Study Medication

Date study medication dispensed |_|_|·|_|_|·|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets dispensed |_|_|.

Date of first application |_|_|·|_|_|·|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Please document the administration of the trial medication on page 37

Isolation of Endothelial Progenitor Cells

Date of blood sample |_|_|_|_|. |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Number of cells |_|_|_|_|_|, |_| x 10⁶

Date of cell staining |_|_|_|_|. |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

UEA-1 / acLDL cells |_|_|_|_|_|, |_| / high power field

Date of EPC isolation |_|_|_|_|. |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Number of cells |_|_|_|_|_|, |_| x 10⁶

Date of EPC migration Assay |_|_|_|_|. |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Number of migrated EPCs |_|_|_|_|_|, |_| / high power field

Date of NO Bioavailability Assay |_|_|_|_|. |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

NO Bioavailability in EPCs |_|_|_|_|_| pmol NO / 500,000 cells / h

Date of Superoxide Production Assay |_|_|_|_|. |_|_|_|_|. |_|_|_|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Superoxide Production in EPCs |_|, |_|_|_| pmol O²⁻ / 250,000 cells / min

Please place a print-out of the cell culture protocol in the back-pocket of the folder.

Carotid Injury Model

Animal Identification No |__|__|__|
Date of carotis Injury |__|__|_|.|__|__|_|.|__|__|__|__|
(day) (month) (year)
Time of carotis injury |__|__|_| : |__|__|_|
(hour) (min.)
Time of EPC transplantation |__|__|_| : |__|__|_|
(hour) (min.)
Date of organ sampling |__|__|_|.|__|__|_|.|__|__|__|__|
(day) (month) (year)
Re-endothelialized Area |__|__|__|, |__| %

Please place a print-out of the operation protocol in the back-pocket of the folder.

Animal Identification No |__|__|__|
Date of carotis Injury |__|__|_|.|__|__|_|.|__|__|__|__|
(day) (month) (year)
Time of carotis injury |__|__|_| : |__|__|_|
(hour) (min.)
Time of EPC transplantation |__|__|_| : |__|__|_|
(hour) (min.)
Date of organ sampling |__|__|_|.|__|__|_|.|__|__|__|__|
(day) (month) (year)
Re-endothelialized Area |__|__|__|, |__| %

Please place a print-out of the operation protocol in the back-pocket of the folder.

Animal Identification No |__|__|__|
Date of carotis Injury |__|__|_|.|__|__|_|.|__|__|__|__|
(day) (month) (year)
Time of carotis injury |__|__|_| : |__|__|_|
(hour) (min.)
Time of EPC transplantation |__|__|_| : |__|__|_|
(hour) (min.)
Date of organ sampling |__|__|_|.|__|__|_|.|__|__|__|__|
(day) (month) (year)
Re-endothelialized Area |__|__|__|, |__| %

Please place a print-out of the operation protocol in the back-pocket of the folder.

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in
Vivo Re-Endothelialization Capacity
of Endothelial Progenitor Cells from
Patients with Chronic Kidney Disease
(OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

**Visit 5
Week 2****Date of visit**|_|_|_|·|_|_|·|_|_|_|_|
(day) (month) (year)**Vital Signs**

Please perform the measurements in sitting positions after 10 minutes at rest at the arm specified on page 10.

Blood pressure |_|_|_| / |_|_|_| mmHg
systolic diastolic

Pulse rate |_|_|_| beats / min

Body temperature |_|_|,|_| °C

Body weight |_|_|_|,|_| kg

Physical Examination

Organ	normal	abnormal	Not examined	If abnormal, nealse specify
Heart	__	__	__	
Lung	__	__	__	
Extremities	__	__	__	
Eyes / Ears / Nose / Throat	__	__	__	
Lymph Nodes	__	__	__	
Chest	__	__	__	
Abdomen	__	__	__	
Nervous System	__	__	__	
Endocrine System	__	__	__	
Skin	__	__	__	
Renal System	__	__	__	
Musculoskeletal System	__	__	__	
Vascular System	__	__	__	

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in
Vivo Re-Endothelialization Capacity
of Endothelial Progenitor Cells from
Patients with Chronic Kidney Disease
(OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

**Visit 5
Week 2**

Return and Dispense of Study Medication

Date study medication returned |_|_|_|_|.|_|_|_|_|.|_|_|_|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets returned |_|_|_|_|.

Please check the compliance of the trial medication and explain the correct application to the patient once again, if necessary.

Date study medication dispensed |_|_|_|_|.|_|_|_|_|.|_|_|_|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets dispensed |_|_|_|_|.

Please document the administration of the trial medication on page 37

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

**Visit 6
Week 6
End of Study**

Date of visit

|_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Vital Signs

Please perform the measurements in sitting positions after 10 minutes at rest at the arm specified on page 10.

Blood pressure |_|_|_|_| / |_|_|_|_| mmHg
systolic diastolic

Pulse rate |_|_|_|_| beats / min

Body temperature |_|_|_|, |_| °C

Body weight |_|_|_|_|, |_| kg

Physical Examination

Organ	normal	abnormal	Not examined	If abnormal, nealse specify
Heart	_	_	_	
Lung	_	_	_	
Extremities	_	_	_	
Eyes / Ears / Nose / Throat	_	_	_	
Lymph Nodes	_	_	_	
Chest	_	_	_	
Abdomen	_	_	_	
Nervous System	_	_	_	
Endocrine System	_	_	_	
Skin	_	_	_	
Renal System	_	_	_	
Musculoskeletal System	_	_	_	
Vascular System	_	_	_	

Biochemistry

Parameter	normal	Abnormal		Comment (for clinically relevant abnormalities)
		not CR*	CR*	
Potassium	_	_	_	Potassium
Sodium	_	_	_	Sodium
Calcium	_	_	_	Calcium
Urea	_	_	_	Urea
Total Cholesterol	_	_	_	Total Cholesterol
LDL- Cholesterol	_	_	_	LDL- Cholesterol
HDL- Cholesterol	_	_	_	HDL- Cholesterol
Triglycerides	_	_	_	Triglycerides
Creatinine	_	_	_	Creatinine
GOT	_	_	_	GOT
GPT	_	_	_	GPT
γ-GT	_	_	_	γ-GT
Alcaline Phosphatase	_	_	_	Alcaline Phosphatase
Iron	_	_	_	Iron
Transferrin	_	_	_	Transferrin
Transferrin saturation	_	_	_	Transferrin saturation
C-reactive Protein	_	_	_	C-reactive Protein
Ferritin	_	_	_	Ferritin
HbA1C	_	_	_	HbA1C
Cyctatine C	_	_	_	Cyctatine C
BGA	_	_	_	BGA
LDH	_	_	_	LDH

* CR = Clinically relevant

Blood Count

Parameter	normal	Abnormal		Comment (for clinically relevant abnormalities)
		not CR*	CR*	
Hemoglobin	_	_	_	
Hematocrit	_	_	_	
Erythrocytes	_	_	_	
Leucocytes	_	_	_	
Thrombocytes	_	_	_	

* CR = Clinically relevant

Please place a print-out of the laboratory results in the back-pocket of the folder.

12- Lead ECG

QT interval |_|_|_|_| ms

QTC interval |_|_|_|_| ms

- Interpretation Normal
 Abnormal, clinically irrelevant
 Abnormal, clinically relevant Please specify below
 Not done

Specification of abnormalities

Please place a print-out of the ECG in the back-pocket of the folder.

Nitrosylhämoglobin (HbNO)

Date of blood sample |_|_|_|.|_|_|_|.|_|_|_|_|_|
 (day) (month) (year)

Storage Number |_|_|_|_|_|

HbNO concentration |_|_|,|_|_| μM

Please place a print-out of the ESR results in the back-pocket of the folder.

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

**Visit 6
Week 6
End of Study**

Isolation of Endothelial Progenitor Cells

Date of blood sample |_|_|_|.|_|_|_|.|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Number of cells |_|_|_|_|,|_| x 10⁶

Date of cell staining |_|_|_|.|_|_|_|.|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

UEA-1 / acLDL cells |_|_|_|_|,|_| / high power field

Date of EPC isolation |_|_|_|.|_|_|_|.|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Number of cells |_|_|_|_|,|_| x 10⁶

Date of EPC migration Assay |_|_|_|.|_|_|_|.|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Number of migrated EPCs |_|_|_|_|,|_| / high power field

Date of NO Bioavailability Assay |_|_|_|.|_|_|_|.|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

NO Bioavailability in EPCs |_|_|_|_| pmol NO / 500,000 cells / h

Date of Superoxide Production Assay |_|_|_|.|_|_|_|.|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Superoxide Production in EPCs |_|,|_|_| pmol O²⁻ / 250,000 cells / min

Please place a print-out of the cell culture protocol in the back-pocket of the folder.

Carotid Injury Model

Animal Identification No |_|_|_|_|
Date of carotis Injury |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)
Time of carotis injury |_|_| : |_|_|
(hour) (min.)
Time of EPC transplantation |_|_| : |_|_|
(hour) (min.)
Date of organ sampling |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)
Re-endothelialized Area |_|_|_|, |_| %

Please place a print-out of the operation protocol in the back-pocket of the folder.

Animal Identification No |_|_|_|_|
Date of carotis Injury |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)
Time of carotis injury |_|_| : |_|_|
(hour) (min.)
Time of EPC transplantation |_|_| : |_|_|
(hour) (min.)
Date of organ sampling |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)
Re-endothelialized Area |_|_|_|, |_| %

Please place a print-out of the operation protocol in the back-pocket of the folder.

Animal Identification No |_|_|_|_|
Date of carotis Injury |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)
Time of carotis injury |_|_| : |_|_|
(hour) (min.)
Time of EPC transplantation |_|_| : |_|_|
(hour) (min.)
Date of organ sampling |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)
Re-endothelialized Area |_|_|_|, |_| %

Please place a print-out of the operation protocol in the back-pocket of the folder.

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

**Visit 6
Week 6
End of Study**

Return and Dispense of Study Medication

Date study medication returned |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets returned |_|_|.

Please document the administration of the trial medication on page 37

Investigator's statement

I certify that I have reviewed the data recorded in the case report form, including laboratory data, adverse events and concomitant medication. I confirm that all information has been entered completely and accurately into the CRF.

|_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Signature date

Investigator's signature

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

Interim Visit 1**Date of visit**|_|_|_|·|_|_|_|·|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)**Examinations**

If there are any findings in vital signs, physical examination, biochemistry or blood count, please document these as adverse events on page 40ff.

Return and Dispense of Study Medication

Date study medication returned

|_|_|_|·|_|_|_|·|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets returned

|_|_|_|.

Please check the compliance of the trial medication and explain the correct application to the patient once again, if necessary.

Date study medication dispensed

|_|_|_|·|_|_|_|·|_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets dispensed

|_|_|_|.

Please document the administration of the trial medication on page 37

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

Interim Visit 2

Date of visit

|_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

Examinations

If there are any findings in vital signs, physical examination, biochemistry or blood count, please document these as adverse events on page 40ff.

Return and Dispense of Study Medication

Date study medication returned |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets returned |_|_|.

Please check the compliance of the trail medication and explain the correct application to the patient once again, if necessary.

Date study medication dispensed |_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets dispensed |_|_|.

Please document the administration of the trail medication on page 37

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

Interim Visit 3**Date of visit**|_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)**Examinations**

If there are any findings in vital signs, physical examination, biochemistry or blood count, please document these as adverse events on page 40ff.

Return and Dispense of Study Medication

Date study medication returned

|_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets returned

|_|_|_|.

Please check the compliance of the trial medication and explain the correct application to the patient once again, if necessary.

Date study medication dispensed

|_|_|_|. |_|_|_|. |_|_|_|_|_|
(day) (month) (year)

No. of tablets dispensed

|_|_|_|.

Please document the administration of the trial medication on page 37

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)

Patient No. |_|_|_|_|

Random No. |_|_|_|_|

Study Medication**Administration of Study Medication**

Please document for the initial dose as well as for each dose change the date of first application (start date) and the date of last application (end date).

	Start date [day.month.year]	End date [day.month.year]	Days	No of tablets dispensed	No of tablets returned
1.	_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	_ _	_ _	_ _
2.	_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	_ _	_ _	_ _
3.	_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	_ _	_ _	_ _
4.	_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	_ _	_ _	_ _
5.	_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	_ _	_ _	_ _

Universität des Saarlandes

Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-
Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor
Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD
Study)

Patient No. |_|_|_|

Random No. |_|_|_|

Concomitant Medication

Previous and Concomitant Medication

Please document all previous and concomitant medication taken during the study or within 30 days prior to the study.

	Drug (Trade name / Generic name)	Route*	Indication	Start [day.month.year]	End [day.month.year]	On- going
1.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
2.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
3.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
4.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
5.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
6.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
7.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
8.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
9.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
10.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
11.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	
12.				_ _ . _ _ . _ _	_ _ . _ _ . _ _	

*Route of administration: PO = oral, IM = intramuscular, IV = intravenous, SC = subcutaneous, INH = inhalation, TOP = topical, REC = rectal, OTH = other

<p style="text-align: center;">Universität des Saarlandes</p> <p style="text-align: center;">Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re- Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)</p>	<p style="text-align: center;">Patient No. _ _ _ </p> <p style="text-align: center;">Random No. _ _ _ </p>	<p>Concomitant Medication</p>
---	--	--------------------------------------

Previous and Concomitant Medication (page 2)

	Drug (Trade name / Generic name)	Route*	Indication	Start [day.month.year]	End [day.month.year]	On- going
13.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
14.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
15.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
16.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
17.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
18.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
19.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
20.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
21.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
22.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
23.						
24.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	
25.				_ _ . _ _ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _ . _ _ _	

*Route of administration: PO = oral, IM = intramuscular, IV = intravenous, SC = subcutaneous, INH = inhalation, TOP = topical, REC = rectal, OTH = other

<p align="center">Universität des Saarlandes</p> <p align="center">Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)</p>	<p align="center">Patient No. _ _ _ </p> <p align="center">Random No. _ _ _ </p>	<p align="center">Adverse Events</p>
--	--	---

Adverse events

Please document all adverse events occurring during the study and all serious adverse events occurring within 4 weeks after the end of the study.

Adverse event	Onset date and time / End date and time [day.month.year hours:min]	Action taken (trial medication) 1 None 2 Discontinued 3 Reduced 4 Interrupted	Action taken (other action) Code see below* Please document all actions taken	Severity 1 Mild 2 Moderate 3 Severe	Outcome** 1 recovered 2 recovered with sequelae 3 still present 4 death 5 unknown	Relation to trial medication 1 define 2 probable 3 possible 4 unlikely 5 unrelated	Serious AE 1 yes 2 no
1.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
2.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
3.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
4.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
5.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_

*Action taken: 1 = none, 2 = medication required, 3 = ambulant treatment, 4 = hospitalization, 5 = prolonged hospitalization 6 = other
 ** In case of ongoing AEs at study termination, the events should be followed up with reasonable effort until they have been resolved or until the degree of a permanent disability can be assessed.

I certify that I have reviewed the adverse events data, and I confirm that all information has been entered completely and accurately onto this page.
 Date (day.month.year) |_|_|.|_|_|.|_|_| Investigator's signature _____

Universität des Saarlandes Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)	Patient No. _ _ _ _ Random No. _ _ _ _	Adverse Events
---	--	-----------------------

Adverse events (page 2)

Adverse event	Onset date and time / End date and time [day.month.year hours:min]	Action taken (trail medication) 1 None 2 Discontinued 3 Reduced 4 Interrupted	Action taken (other action) Code see below* Please document all actions taken	Severity 1 Mild 2 Moderate 3 Severe	Outcome** 1 recovered 2 recovered with sequelae 3 still present 4 death 5 unknown	Relation to trail medication 1 define 2 probable 3 possible 4 unlikely 5 unrelated	Serious AE 1 yes 2 no
6.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
7.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
8.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
9.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
10.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_

*Action taken: 1 = none, 2 = medication required, 3 = ambulant treatment, 4 = hospitalization, 5 = prolonged hospitalization 6 = other

** In case of ongoing AEs at study termination, the events should be followed up with reasonable effort until they have been resolved or until the degree of a permanent disability can be assessed.

I certify that I have reviewed the adverse events data, and I confirm that all information has been entered completely and accurately onto this page.

Date (day.month.year) |_|_|.|_|_|.|_|_| Investigator's signature _____

Universität des Saarlandes Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)	Patient No. _ _ _ _ Random No. _ _ _ _	Adverse Events
---	--	-----------------------

Adverse events (page 3)

Adverse event	Onset date and time / End date and time [day.month.year hours:min]	Action taken (trail medication) 1 None 2 Discontinued 3 Reduced 4 Interrupted	Action taken (other action) Code see below* Please document all actions taken	Severity 1 Mild 2 Moderate 3 Severe	Outcome** 1 recovered 2 recovered with sequelae 3 still present 4 death 5 unknown	Relation to trail medication 1 define 2 probable 3 possible 4 unlikely 5 unrelated	Serious AE 1 yes 2 no
11.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
12.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
13.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
14.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
15.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_

*Action taken: 1 = none, 2 = medication required, 3 = ambulant treatment, 4 = hospitalization, 5 = prolonged hospitalization 6 = other

** In case of ongoing AEs at study termination, the events should be followed up with reasonable effort until they have been resolved or until the degree of a permanent disability can be assessed.

I certify that I have reviewed the adverse events data, and I confirm that all information has been entered completely and accurately onto this page.

Date (day.month.year) |_|_|.|_|_|.|_|_| Investigator's signature _____

Universität des Saarlandes Olmesartan, Oxidant Stress and in Vivo Re-Endothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Chronic Kidney Disease (OECD Study)	Patient No. _ _ _ _ Random No. _ _ _ _	Adverse Events
---	--	-----------------------

Adverse events (page 4)

Adverse event	Onset date and time / End date and time [day.month.year hours:min]	Action taken (trail medication) 1 None 2 Discontinued 3 Reduced 4 Interrupted	Action taken (other action) Code see below* Please document all actions taken	Severity 1 Mild 2 Moderate 3 Severe	Outcome** 1 recovered 2 recovered with sequelae 3 still present 4 death 5 unknown	Relation to trail medication 1 define 2 probable 3 possible 4 unlikely 5 unrelated	Serious AE 1 yes 2 no
16.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
17.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
18.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
19.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_
20.	_ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _ _ _ . _ _ . _ _ _ _ : _ _	_	_ _ _	_	_	_	_

*Action taken: 1 = none, 2 = medication required, 3 = ambulant treatment, 4 = hospitalization, 5 = prolonged hospitalization 6 = other

** In case of ongoing AEs at study termination, the events should be followed up with reasonable effort until they have been resolved or until the degree of a permanent disability can be assessed.

I certify that I have reviewed the adverse events data, and I confirm that all information has been entered completely and accurately onto this page.

Date (day.month.year) |_|_|.|_|_|.|_|_| Investigator's signature _____

