

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie,
Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie
der Universität Hamburg
Direktor: Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

Hamburg-Eppendorf

**Untersuchung des Einflusses von Atorvastatin auf die
Stickstoffmonoxid-Synthese bei Patienten mit Hypercholesterinämie**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Lydia Kahl

Hamburg, 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Pathogenese der Atherosklerose.....	1
1.2. Bedeutung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels für die Endothelfunktion	3
1.3. Die endotheliale Dysfunktion	6
1.4. Statine bei Hypercholesterinämie und Atherosklerose	8
1.5. Pharmakologie von Atorvastatin	9
1.6. Cholesterinunabhängige Wirkungen der Statine.....	9
1.7. Ziel der Arbeit	11
2. Material und Methoden, Klinischer Teil	12
2.1. Genehmigungen	12
2.2. Studiendesign	12
2.2.1. Patienten und Probanden.....	12
2.2.2. Studienmedikation und Dosierung.....	13
2.3. Studienablauf.....	14
2.3.1. Eingangsuntersuchung.....	14
2.3.2. Baselineuntersuchung	14
2.3.3. Kontrolluntersuchung	15
2.3.4. Follow-up-Untersuchung	15
2.4. Abbruchkriterien.....	15
2.5. Messung der endothelabhängigen Vasodilatation	16
2.5.1. Geräte und Material.....	16
2.5.2. Angewendete Methode	16
2.6. Bestimmung der NO-Synthase-Aktivität in vivo	20
2.6.1. Geräte und Material.....	20
2.6.2. Angewendete Methode	20
3. Material und Methoden, Experimenteller Teil	22
3.1. NO-Synthese in vivo: Bestimmung von Nitrat und Nitrit im Urin mittels GC-MS	22
3.1.1. Geräte und Material.....	22
3.1.2. Angewendete Methode	23
3.2. Erfassung der Expression der endothelialen NO-Synthase.....	26
3.2.1. Isolierung von Proteinen aus Thrombozyten	26

3.2.1.1. Geräte und Material	26
3.2.1.2. Angewendete Methode	26
3.2.2. Proteinmessung nach Bradford	26
3.2.2.1. Geräte und Material	26
3.2.2.2. Angewendete Methode	27
3.2.3. SDS-Page	27
3.2.3.1. Geräte und Material	27
3.2.3.2. Angewendete Methode	28
3.2.4. Western Blots	29
3.2.4.1. Geräte und Material	29
3.2.4.2. Angewendete Methode	29
3.3. cGMP als Indikator der Enzymaktivität der eNOS	32
3.3.1. Geräte und Material	32
3.3.2. Angewendete Methode	32
3.4. Bestimmung von ADMA und L-Arginin mittels GC-MS	35
3.4.1. Geräte und Material	35
3.4.2. Angewendete Methode	36
3.5. Verlässlichkeit der angewendeten Methoden	38
4. Datenerhebung und Statistik	39
5. Ergebnisse	40
5.1. Baselinedaten der hypercholesterinämischen Patienten und der Probanden mit Normocholesterinämie	40
5.2. Baselinevergleich der Patientengruppe mit Atorvastatinbehandlung und der Patienten, die Placebo erhielten	50
5.3. Therapieeffekte von Statinen im Vergleich zu Placebo bei Patienten mit Hypercholesterinämie	54
6. Diskussion	62
6.1. Hypercholesterinämie und NO-Stoffwechsel	63
6.2. Effekte der Atorvastatintherapie	69
6.3. Eignung und Einschränkungen der verwendeten Methodik	75
7. Zusammenfassung	77
8. Literatur	78
9. Abkürzungsverzeichnis	99
10. Anhang	101

Danksagung.....	101
Lebenslauf	102
Erklärung.....	103

1. Einleitung

Herzkreislauferkrankungen gelten vor allem in der westlichen Welt als eine der häufigsten Todesursachen.

Die Hauptursache ist die Atherosklerose. Sie zeichnet sich durch eine Verdickung der Gefäßwände (Sklerose: krankhafte Verhärtung von Organen) und eine Akkumulation von Fett (Atherom ist vom griechischen Wortstamm *áθήρη* abgeleitet und heißt z.B. Brei oder Grützbeutel) aus.

Die klinischen Manifestationsformen der Atherosklerose sind vielseitig. Die häufigste Erscheinungsform ist die koronare Herzkrankheit (KHK) mit Angina Pectoris und Herzinfarkt. Weitere mögliche Folgen sind die Sklerose der hirnzuführenden Gefäße mit dadurch bedingten zerebralen Ischämien und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) mit der typischen Schaufensterkrankheit (Claudicatio intermittens). Außerdem können durch die Atherosklerose auch andere Erkrankungen auftreten wie z.B. die vaskuläre Schrumpfniere, Angina abdominalis und Aorten-Aneurysmen.

1.1. Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose kann als ein chronisch entzündlicher Prozeß der Blutgefäße betrachtet werden (Munro und Cotran 1988). Frühformen („fatty streaks“) treten vereinzelt bereits im Jugendalter auf (Munro und Cotran 1988).

Das von Ross et al. (1977) entwickelte „Response to injury“-Modell zur Entstehung der Arteriosklerose ging zunächst noch von einer direkten Verletzung des Gefäßendothels aus. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass eine Störung der funktionellen Integrität (endotheliale Dysfunktion) eine wesentliche Ursache für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen darstellt (Busse und Fleming 1996).

In Anwesenheit von Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie oder Nikotinabusus kommt es bereits in frühen Stadien der Atherosklerose zum Auftreten einer endothelialen Dysfunktion (siehe 1.3.) (Celermajer et al. 1992, Libby et al. 2002; Kinlay et al. 2000).

LDL-Cholesterin akkumuliert in der Intima des Gefäßes. Bevor es dort von Makrophagen aufgenommen werden kann, muß es modifiziert werden (Goldstein et al. 1979; Berliner et al. 1996). Wie das geschieht, ist noch nicht eindeutig geklärt. Zwei Mechanismen werden diskutiert: die Oxidation (Steinberg et al. 1997) und/oder

die enzymatische Modifikation (Torzewski et al.1998, Han et al. 2003, Marathe et al. 2000).

Durch Resorption des oxidierten LDL-Cholesterins wandeln sich die Makrophagen in Schaumzellen um, und es kommt zur Bildung lokaler Fettakkumulationen („fatty streaks“) (Knopp 1999). Damit ist die Plaquebildung eingeleitet. Oxidiertes LDL beschleunigt die Plaquebildung (Steinberg et al. 1989). Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den aktivierten Makrophagen und dem verletzten Endothel führt weiter zur Proliferation glatter Muskelzellen in der Intima des Gefäßes (Laufs 2003). Die Größe des Plaques nimmt zu und der Durchmesser des Gefäßes ab. An dem Schema in Abb. 1 wird der Prozeß nochmals verdeutlicht.

Aktivierte Makrophagen schwächen die Plaques durch Sekretion proteolytischer Metallixproteasen, was zur Plaqueruptur (Shah et al.1995) und letztlich zur Auslösung des akuten vaskulären Ereignisses (Libby 2001) führen kann.

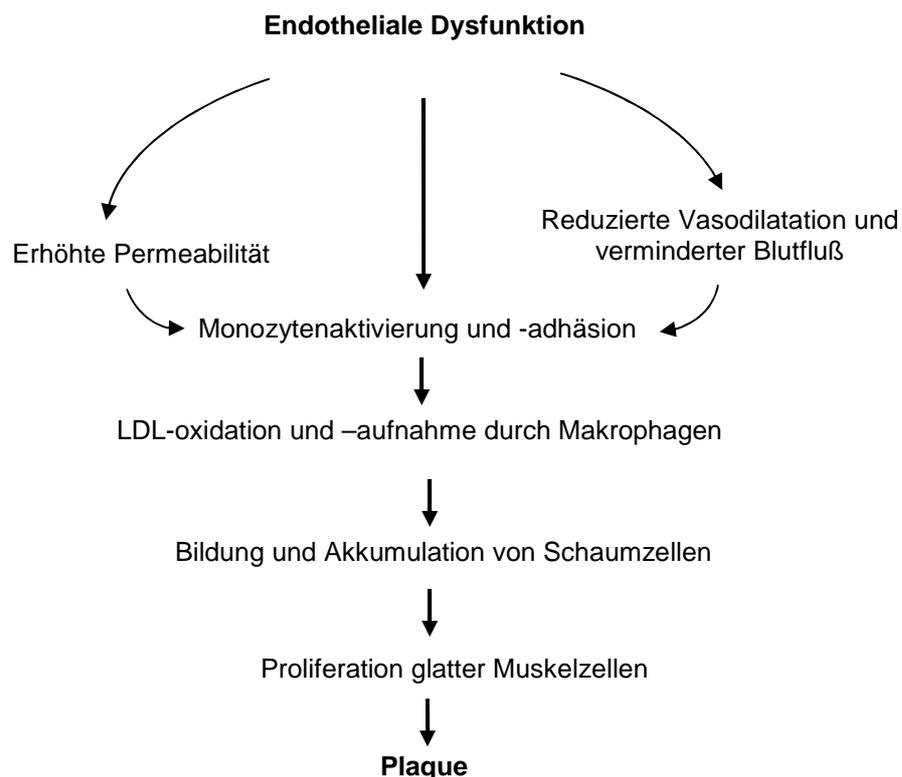


Abb. 1: Pathogenese der Atherosklerose

1.2. Bedeutung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels für die Endothelfunktion

Das Endothel spielt eine wichtige Rolle für die Gefäßregulation (Furchgott et al. 1980, Palmer et al. 1987, Palmer et al. 1988). Hierzu gehören:

- Kontrolle des Gefäßtonus
- Modulation der Immunantwort
- Regulation des Transports gelöster Teilchen oder Makromoleküle durch die Gefäßwand
- Regulation des Zellwachstums

Diese Effekte werden durch verschiedene aus dem Endothel freigesetzte Mediatoren bewirkt. Einen wesentlichen antiarteriogenen Einfluß übt hierbei Stickstoffmonoxid (NO) aus (Busse und Fleming 1996).

Die Bildung von NO in Endothelzellen erfolgt in zwei Schritten durch Abspaltung und Oxidation einer endständigen Guanidinogruppe aus der Aminosäure L-Arginin (Palmer et al. 1988) mit L-Citrullin als Produkt.

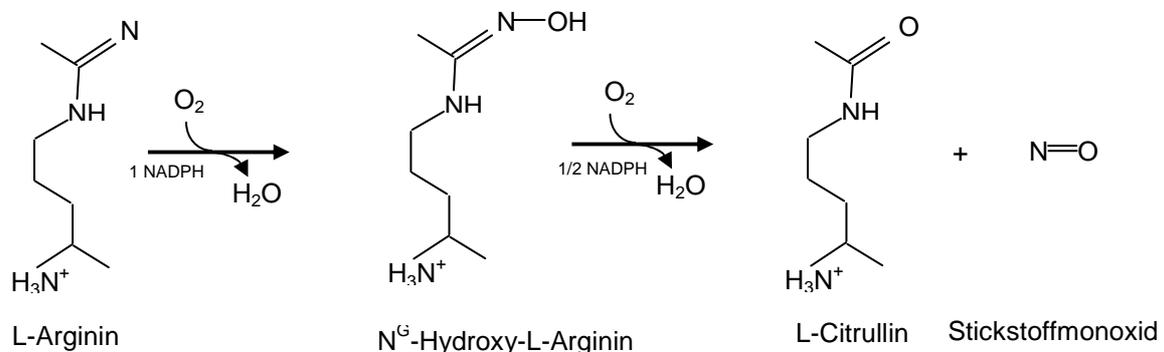


Abb. 2: Endogene Biosynthese des Stickstoffmonoxids aus L-Arginin katalysiert durch die NOS

NO hat nur eine sehr kurze Halbwertszeit und wird nach wenigen Sekunden (Griffith et al. 1984, Moncada et al. 1993) über Nitrit (NO_2^-) zu Nitrat (NO_3^-) oxidiert (Ignarro 1990), das dann mit dem Urin ausgeschieden wird (Wennalm et al. 1997) und somit als Parameter für die systemische NO-Syntheserate herangezogen werden kann.

Die NO-Freisetzung wird durch drei Isoenzyme - die NO-Synthasen katalysiert. Zwei Isoformen, die endotheliale (eNOS) (NOS III) und die neuronale NO-Synthase (NOS I), sind membranständig und konstitutiv vorhanden und durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktivierbar.

Eine dritte kalziumunabhängige Isoform ist primär im Zytosol lokalisiert. Sie wird im Wesentlichen nur nach einer Induktion durch Bakterien, Tumorzellen oder Zytokine exprimiert (Förstermann und Kleinert 1995) und daher als induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS II) bezeichnet.

Reize für eine Aktivierung der eNOS sind mechanische Stimulation (Schubspannung des strömenden Blutes, „Shear stress“) oder Rezeptoraktivierung (durch Ach, ATP, Serotonin, Histamin) (Schmidt 1994).

Durch die NO-Freisetzung kommt es zur Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase. Hierdurch wird der Anteil von cGMP (cyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat) in den Endothelzellen und (auf parakrinem Weg) in den anliegenden glatten Muskelzellen erhöht. Über cGMP-abhängige Proteinkinasen kommt es über eine Abnahme der zytosolischen Calciumkonzentration zu einer Verminderung des Gefäßtonus (Vasorelaxation).

Auch in Thrombozyten befindet sich eine cGMP-abhängige Proteinkinase. Über sie wird der aggregationshemmende Effekt von NO erklärt (Moncada et al. 1993, Radomski et al. 1990, Bode-Böger et al. 1994).

cGMP wird über Phosphodiesterasen abgebaut (Rybalkin et al. 2003) und über den Urin ausgeschieden (Tolins et al. 1990). Die cGMP-Konzentration im Urin kann somit genau wie die Urin-Nitrat-Exkretion als Parameter für die systemische NO-Syntheserate in vivo herangezogen werden (Bode-Böger et al. 1994, Kanno et al. 1992). Die Urin-cGMP-Exkretion zeigt allerdings im Gegensatz zur Urin-Nitrat-Exkretion die Bioverfügbarkeit von NO an, denn nur das biologisch aktive NO kann zum einem Anstieg von cGMP führen. Die Nitratkonzentration im Urin dagegen spiegelt die gesamte NO-Bildung wider- unabhängig davon, ob das gebildete NO biologisch aktiv gewesen ist oder nicht (Böger et al. 1996, Böger 1998).

Das vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) ist ebenfalls ein Effektorprotein der NO/ cGMP-Signalkaskade. Die Aktivierung erfolgt ebenfalls durch die cGMP-abhängige Proteinkinase. VASP fungiert als Modulator der Mikrofilamente und reguliert die Aktinpolymerisation und ist somit an der Regulation des vaskulären Tonus beteiligt.

Eine nicht-invasive Methode zur Erfassung bzw. Quantifizierung der Endothelfunktion stellt die flussinduzierte Vasodilatation der Arteria brachialis dar (Celermajer et al. 1992). Bei dieser Methode wird durch erhöhten Blutfluß bzw. Scherkräfte eine

endothelabhängige, NO-vermittelte Vasodilatation induziert und mittels Ultraschall gemessen.

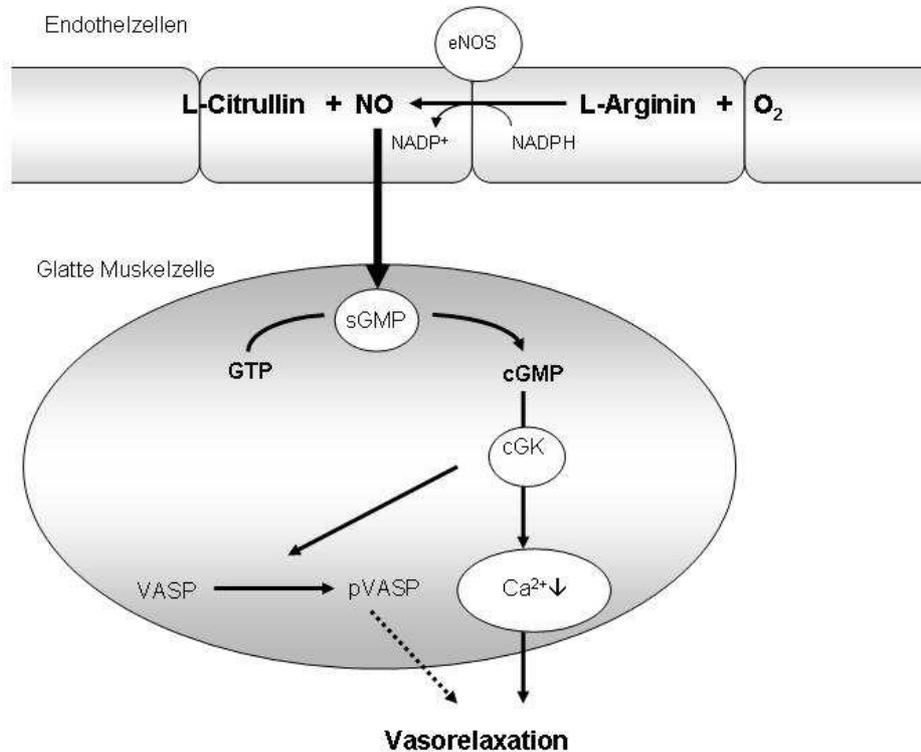


Abb. 3: NO/ cGMP-Signaltransduktionsweg

NO (Stickstoffmonoxidradikal, eNOS (endotheliale NO-Synthase), sGC (lösliche Guanylylzyklase), GTP (Guanosintriphosphat), cGMP (cyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat), cGK (cGMP-abhängige Proteinkinase), VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein), pVASP (phosphoryliertes VASP)

Neben der großen Bedeutung von NO für die Tonusregulation sind weitere, direkt antiatherosklerotische Wirkungen nachgewiesen worden: Es konnte gezeigt werden, daß NO einen hemmenden Einfluß auf die Expression pro-atherosklerotischer Genprodukte wie Adhäsionsmoleküle und Chemokine in Endothelzellen hat (Spiecker et al. 1998). Somit bewirkt NO eine Hemmung der Adhäsion von Monozyten und Leukozyten am Gefäßendothel (Kubes et al. 1991).

Von weiterer Bedeutung ist der hemmende Einfluß von NO auf die Proliferation glatter Muskelzellen (Nakaki et al. 1990). Durch NO kann bei fortgeschrittener Atheroskleroseentwicklung die Gefahr von Plaqueruptur und drohender Infarzierung gemindert werden (Böger et al. 1998). NO bewirkt außerdem eine Reduktion der Freisetzung von Superoxid-radikalen (O_2^-) (Clancy et al. 1992), die an zahlreichen inflammatorischen und zytotoxischen Prozessen beteiligt sind und vermindert die gesteigerte Oxidation von LDL-Partikeln (Hogg et al. 1993).

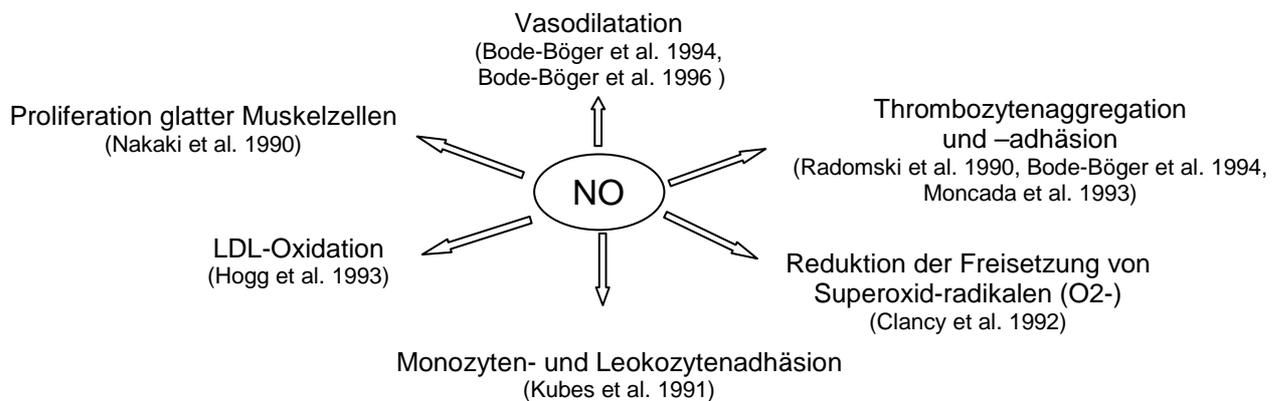


Abb. 4: Antiatherogene Wirkungen von NO am Endothel

1.3. Die endotheliale Dysfunktion

Eine endotheliale Dysfunktion, die bereits in frühen Stadien der Atherosklerose auftritt (siehe 1.1.), geht mit folgenden Störungen einher (Laufs 2003):

- (1) Störung der entzündungshemmenden Funktion mit erhöhter Monozytenaktivierung, -adhäsion und -migration
- (2) Erhöhte Gefäßpermeabilität für Lipoproteine und Makrophagen
- (3) Verminderte Vasodilatation und veränderter Blutfluß aufgrund einer herabgesetzten Verfügbarkeit von Vasodilatoren

Die endotheliale Dysfunktion ist unter anderem auf eine gestörte Synthese und/oder Aktivität des im Endothel gebildeten NO zurückzuführen (Ross et al. 1993, Vanhoutte 1997, Celermajer 1997, Drexler 1997, Cooke et al. 1991). Sie äußert sich klinisch in einer Reduktion der NO-vermittelten, endothelabhängigen Vasodilatation (Drexler et

al. 1989). Die geschädigten Gefäße reagieren weder ausreichend auf eine Steigerung der Durchblutung (Nabel et al. 1990), noch auf die Wirkung der endothelabhängigen Vasodilatoren Acetylcholin, Bradykinin und Substanz P (Ludmer et al. 1986, Creager et al. 1992). Außerdem sind bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion auf eine Stimulation des sympathischen Nervensystems paradoxe Reaktionen im Sinne einer Vasokonstriktion zu beobachten (Nabel et al. 1988, Furchgott et al. 1980).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine endotheliale Dysfunktion durch Risikofaktoren, die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen, wie die Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen und Hyperhomozysteinämie hervorgerufen wird (Vita et al. 1990, Seiler et al. 1993, Celermajer et al. 1994, McCully 1996).

Die oben beschriebenen Veränderungen im Tonusverhalten der Gefäße gehen mit einer höheren Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse einher (Heitzer et al. 2001, Schächinger et al. 2000).

Folgende Ursachen können für eine reduzierte NO-Aktivität ausschlaggebend sein (Böger et al. 1996):

- Verminderte NO-Synthese durch verminderte NO-Synthase-Expression (Jessup et al. 1996, Rosenkranz-Weiss et al. 1994), reduzierte L-Arginin-Verfügbarkeit oder Akkumulation endogener Inhibitoren (ADMA) (Böger et al. 1996)
- Erhöhter oxidativer Abbau von NO durch oxidiertes LDL (Simon et al. 1990, Plane et al. 1992) oder Superoxid-Radikale (O_2^-) (Ignarro et al. 1990, Huie et al. 1993)
- Verminderte Guanylatzyklasestimulation durch NO (Guerra et al. 1989)
- Überwiegen der Vasokonstriktoren in arteriosklerotischen Gefäßen (O_2^- Radikale, Thromboxan A_2 , zyklische Endoperoxide, Endothelin-1) (Kato et al. 1990, Tanner et al. 1993, Consentino et al. 1994)

ADMA (Asymmetrisches Dimethylarginin) ist ein natürlich vorkommender Bestandteil des menschlichen Blutplasmas (Vallance et al. 1992, Cooke et al. 2000), der bei zahlreichen kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen erhöht ist, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen. Hierzu gehören unter anderem die

Hypercholesterinämie (Böger RH et al. 2000), Arteriosklerose (Miyazaki et al 1999), Diabetes (Ito A. et al. 2002; Xiong Y et al. 2000) und Bluthochdruck (Goonasekera CD. Et al. 1997). ADMA wirkt als kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase (Vallance et al. 1992). Es bindet anstelle von L-Arginin an die NO-Synthase, wird jedoch nicht zu NO umgesetzt, wodurch die Bildung von NO im Gefäßendothel reduziert wird (Böger 2004).

Das Konzentrationsverhältnis zwischen L-Arginin und ADMA bestimmt die Aktivität der NO-Synthase (Böger 1997, Cardounel et al. 2006) und beeinflusst hierüber die NO-abhängigen physiologischen Wirkungen (Tsikas et al. 2001)

1.4. Statine bei Hypercholesterinämie und Atherosklerose

Neben arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und Nikotinabusus gilt die Hypercholesterinämie als wichtiger Risikofaktor für Entwicklung und Progression atherosklerotischer Gefäßschädigungen. Dabei ist vor allem eine Erhöhung des LDL-Cholesterins mit einem erhöhten Atheroskleroserisiko verbunden. Das HDL-Cholesterin dagegen hat eher eine protektive Wirkung (Brown et al. 1993). Die bei der Atherosklerose früh auftretenden „fatty streaks“ bestehen aus akkumuliertem oxidiertem LDL-Cholesterin in der Intima der Gefäßwand (Schell und Myers 1997). Große klinische Studien haben belegt, dass eine Reduktion des Plasmacholesterins, vor allem des LDL-Cholesterins, zu einer geringeren Sterblichkeit bei kardiovaskulären Erkrankungen führt [Scandinavian Simvastatin Survival Study Group 1994 (4S), CARE (Sacks et al. 1996), LIPID (1998), HPS 2003]. In diesen Studien wurden zur Therapie die Statine (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktaseinhibitoren) eingesetzt. Diese hemmen kompetitiv das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, die HMG-CoA-Reduktase. Mit Abnahme der intrazellulären Cholesterinkonzentration in der Leber wird kompensatorisch die Anzahl der LDL-Rezeptoren auf den Hepatozyten erhöht. LDL wird vermehrt in die Zellen aufgenommen, wodurch der Serum-Cholesterinspiegel sinkt. Die Triglyceridsynthese wird u.a. über die Hemmung des Schlüsselenzyms der Fettsäuresynthese der Acetyl-CoA-Carboxylase erreicht.

Ebenso konnte in mehreren klinischen Studien eine deutliche Minderung des Schlaganfall-Risikos während einer Statintherapie festgestellt werden (Crouse et al. 1998).

1.5. Pharmakologie von Atorvastatin

Atorvastatin ist eine synthetisch gewonnene Substanz, die von der Firma Pfizer (Karlsruhe, Deutschland) hergestellt wird (Handelsname: Sortis[®]). Das Statin gehört zur Gruppe der HMG-CoA-Reduktasehemmer. Atorvastatin wird nach oraler Gabe zu 95% resorbiert, hat aber wegen des hohen First-Pass-Effektes nur eine systemische Bioverfügbarkeit von 30%. Atorvastatin unterscheidet sich von den anderen Statinen durch seine lange Halbwertszeit (ca. 14 Stunden) und die Bildung von langwirkenden, aktiven Metaboliten (dadurch bis zu 30 Stunden Hemmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität). Die Inaktivierung erfolgt überwiegend durch das Cytochrom P450 3A4 in in der Leber.

1.6. Cholesterinunabhängige Wirkungen der Statine

Außer der Senkung des Plasmacholesterins scheinen Statine noch sogenannte pleiotrope Wirkungen zu haben, die -zumindest teilweise- nicht mit ihrer cholesterinsenkenden Wirkung zusammenhängen.

Statine verbessern die durch NO vermittelte endothelabhängige Vasodilatation (John et al. 1998, Perticone et al. 2000, Šebeštjen et al. 2002). Diese Funktion beruht vermutlich nicht auf einem verminderten LDL-Plasmaspiegel.

1998 wurde gezeigt, dass Statine in vitro auch in Abwesenheit von LDL-Cholesterin die Verfügbarkeit von NO erhöhen. Dieses geschieht über einen Anstieg der Genexpression der endothelialen Isoform der NO-Synthetase, sowie eine Stabilisierung ihrer mRNA (Laufs et al. 1998).

Auch in vivo konnte bei Patienten mit Hypercholesterinämie eine Zunahme der NO-Produktion unter Fluvastatin-Therapie nachgewiesen werden (John et al. 1998).

Die Erhöhung der NO-Verfügbarkeit ist von großer Bedeutung, da sie unter Hyperlipidämie dramatisch reduziert ist, was zu verminderter Vasodilatation und kardioprotektiven Wirkungen führt (Vane et al. 1990).

Unklar ist bisher, ob die klinisch nachweisbare Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation in vivo auf dem Mechanismus der gesteigerten Genexpression der NO-Synthetase beruht. Weitere nicht lipidsenkende Effekte durch Statine konnten nachgewiesen werden, die ebenfalls als Ursachen für die verbesserte endothelabhängige Vasodilatation infrage kommen:

- Statine mindern die Expression des Angiotensin-Typ1-Rezeptors und somit die vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin2 (Wassmann et al. 2001)
- Statine modulieren die Aktivität und Adhäsion von Leukozyten auf zellulärer Ebene (Weber et al. 1997)
- Statine inhibieren die Proliferation glatter Muskelzellen in vitro und in vivo (Soma et al. 1993, Negre-Aminou et al. 1997)
- Statine beeinflussen direkt die vaskuläre Superoxid- und Hydroxylradikalbildung (De Caterina et al. 2002; Rikitake et al. 2001) und reduzieren somit den oxidativen Streß
- Statine reduzieren die Produktion von Adhäsionsmolekülen (z.B. E-Selektin) bei Patienten mit Hyperlipidämie (Hackman et al. 1996)
- Statine reduzieren die Bildung freier O_2^- Radikale in der Gefäßwand (Wagner et.al. 2000)
- Statine hemmen direkt die Expression proteolytischer Metallixproteinasen (Aikawa et al. 2001) sowie deren Aktivität (Wong et.al 2001) und erhöhen somit die Plaquestabilität
- Statine haben antiinflammatorische Wirkungen (Ikeda and Shimada 2001)
- Statine beeinflussen möglicherweise die Bildung endogener NOS-Inhbitoren wie Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) (Lu et.al 2004)

1.7. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, aufzuklären, inwieweit eine Hypercholesterinämie, beziehungsweise eine Therapie mit Atorvastatin die NO-Synthese, NO-vermittelte Effekte und die endothelabhängige Vasodilatation in vivo beeinflussen.

Hierzu wurden 24 Patienten mit Hypercholesterinämie (LDL-Serumkonzentration >160 mg/dl), die klinisch asymptomatisch waren, über sechs Wochen mit täglich 40 mg Atorvastatin oder Placebo behandelt.

Im Vergleich wurden die Untersuchungen an zwölf normocholesterinämischen Probanden durchgeführt, die keine Medikation erhielten und gesund waren.

Die Fragestellung war wie folgt vorgegeben:

1. Bestehen Unterschiede hinsichtlich Endothelfunktion, eNOS-Expression und NO-Synthese zwischen hyper- und normocholesterinämischen Probanden?
2. Führt die Behandlung mit Atorvastatin zu einer Verbesserung der Endothelfunktion?
3. Führt die Behandlung mit Atorvastatin zu einer Steigerung der eNOS-Expression in vivo?
4. Führt die Behandlung mit Atorvastatin zu einer gesteigerten NO-Synthese bzw. zu einer Verbesserung der NO-Wirkung?

2. Material und Methoden, Klinischer Teil

2.1. Genehmigungen

Für die Studie lag ein positives Votum der Hamburger Ethikkommission (Bearbeitungsnummer 2051 Studie UKE-KP-2002/08), sowie eine Genehmigung des BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) (Aktenzeichen B VP2.A7140-0037/4019957) vor.

Die Studie wurde im Einklang mit der Deklaration von Helsinki, den GCP (Good Clinical Practice)-Richtlinien und den Vorgaben des AMG (Arzneimittelgesetz) durchgeführt und den zuständigen Behörden angezeigt. Alle Probanden und Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.2. Studiendesign

2.2.1. Patienten und Probanden

In die doppelblind randomisierte, monozentrische Studie wurden 24 klinisch asymptomatische männliche und weibliche Patienten mit Hypercholesterinämie (definiert als LDL-Cholesterin > 160 mg/dl) aufgenommen.

Als Vergleichsgruppe für die Baseline-Daten wurden zwölf normocholesterinämische Probanden mit LDL-Cholesterinwerten < 160 mg/dl herangezogen, die keine Medikation erhielten.

Für Patienten und Probanden galten folgende Ein- und Ausschlusskriterien:

Einschlusskriterien:

- Alter zwischen 35 und 68 Jahren
- Unbehandelte Hypercholesterinämie zum Zeitpunkt der Studie (definiert als LDL-Cholesterin > 160 mg/dl), bzw. bei der Vergleichsgruppe Normocholesterinämie (definiert als LDL-Cholesterin < 160 mg/dl). Bei Vorbehandlung mit Statinen wurden diese ausschleichend abgesetzt. Es bestand mindestens ein zweiwöchiges statinfreies Intervall, bevor mit der Prüfmedikation begonnen wurde
- Einverständniserklärung der Patienten

Ausschlußkriterien:

- Patienten mit Diabetes Mellitus
- Patienten mit bekannter koronarer Herzkrankheit
- Patientinnen, die orale Kontrazeptiva einnahmen oder Patientinnen mit postmenopausaler Hormonersatztherapie
- Patienten, die innerhalb der letzten 30 Tage an einer anderen klinischen Prüfung teilgenommen hatten
- Patienten mit bekanntem Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenmissbrauch.
- Schwangere oder stillende Patientinnen
- Patienten mit aktiver Lebererkrankung oder Leberinsuffizienz (Serum- GOT oder GPT > 1,5-fach oberhalb des oberen Normwertes)
- Patienten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz (errechnete Kreatinin-Clearance < 30 ml/Min [Cockcroft-Formel]), nephrotischem Syndrom oder Dysproteinämie
- Patienten mit bereits zuvor aufgetretener Unverträglichkeit eines HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors
- Patienten mit schweren oder chronischen Erkrankungen, die ein Gesundheitsrisiko aufgrund der Studienteilnahme eingehen
- Patienten bei denen nach geltenden Leitlinien eine Therapie mit Statinen indiziert ist

2.2.2. Studienmedikation und Dosierung

Der Versuchszeitraum betrug sechs Wochen. Die Randomisierung der hypercholesterinämischen Patienten erfolgte in zwei Gruppen. Eine Gruppe mit zwölf Personen erhielt zur Einnahme über sechs Wochen 40 mg Atorvastatin pro Tag, die andere Gruppe mit zwölf Personen erhielt Placebo. Die Einnahme der Studienmedikation begann 48 Stunden nach der ersten und endete 48 Stunden nach der zweiten [¹⁵N₂]-L-Arginininfusion-Infusion.

In der Verumgruppe mit 40 mg Atorvastatin pro Tag wurde eine Senkung des LDL-Cholesterins um ca. 40 bis 50 % erwartet (Lea und McTavish 1997). Die zwölf normocholesterinämischen Patienten erhielten weder Atorvastatin noch Placebo. Medikamente, die den Versuchsverlauf nicht beeinflussen konnten, durften während der Studie eingenommen werden.

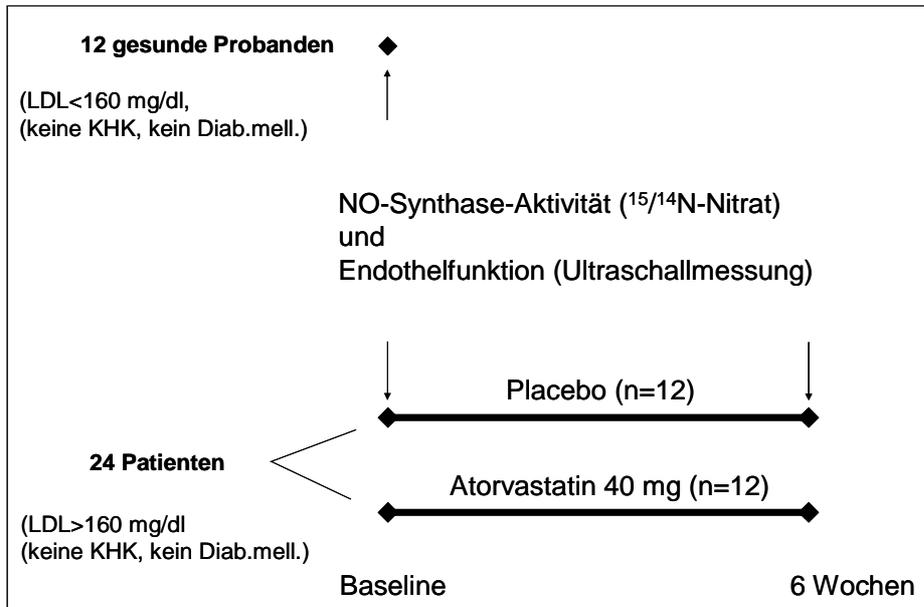


Abb. 5: Studiendesign

2.3. Studienablauf

2.3.1. Eingangsuntersuchung

Vor Beginn der Studie erfolgte eine körperliche Untersuchung der 36 Personen. Außerdem wurden klinisch-chemische und hämatologische Analysen, die ein kleines Blutbild (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Hb), GOT, GPT, CK, Kreatinin, Gesamt-Cholesterin, Triglyceride, LDL- Cholesterin, sowie HDL- Cholesterin beinhalteten, durchgeführt. Die Laborwerte wurden über ein zertifiziertes kommerzielles Labor (Arndt und Partner) mit Hilfe der üblichen Routineverfahren ermittelt. Weiterhin wurden der Framinghamscore (D'Agostino et al.2001), der Procamscore (Assmann et al. 2002), sowie das familiäre Risiko (Def.: Vater oder Mutter vor dem 60. Lebensjahr an einem Herzinfarkt verstorben) bestimmt.

2.3.2. Baselineuntersuchung

Am ersten Studientag erschienen die Patienten und Probanden morgens nüchtern. Zwei Stunden vor der Infusion von [¹⁵N₂]-L-Arginin (siehe 2.1.6.2.) wurde zum ersten Mal Blut abgenommen („Zeitpunkt -2“). Weitere Blutentnahmen folgten direkt vor der Infusion (Zeitpunkt 0), sowie 1, 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden nach der [¹⁵N₂]-L-Arginin-Infusion. Der Urin wurde für zwei Stunden vor Beginn der [¹⁵N₂]-L-Arginin-Infusion (Baseline) und über 0-8, 8-24 and 24-48 Stunden nach der Infusion gesammelt.

Hierfür wurden spezielle Gefäße, die Antioxidantien enthielten, verwendet. Nach der ersten Blutentnahme wurde die endothelabhängige Vasodilatation, wie unter 2.5. beschrieben, gemessen. Hiernach erfolgte die Infusion von [$^{15}\text{N}_2$]-L-Arginin (siehe 2.6.). Zwei Stunden nach Beginn der Infusion durften die Patienten essen, wobei auf eine nitratarme Kost geachtet wurde.

2.3.3. Sicherheitsuntersuchung

Nach zweiwöchiger Einnahme der Medikation wurden die Patienten körperlich untersucht und nach etwaigen Unverträglichkeiten befragt. Außerdem wurde eine Laborwertkontrolle mit kleinem Blutbild, GOT, GPT, CK, S-Kreatinin, Gesamt-Cholesterin, Triglyceride, LDL-Cholesterin, sowie HDL-Cholesterin durchgeführt.

2.3.4. Follow-up-Untersuchung nach sechs Wochen Therapie

Sechs Wochen nach Therapiebeginn wurden alle Untersuchungen der Baselineuntersuchung (siehe 2.3.2.) wiederholt.

2.4. Abbruchkriterien

Gründe für einen Abbruch der Studienteilnahme waren:

- Widerruf der Probandeneinwilligung
- Auftreten nichttolerierbarer unerwünschter Ereignisse (insbesondere Anstieg der CK- oder Transaminase-Aktivität über das Zehnfache des oberen Normwertes)
- klinische Anzeichen einer Myopathie
- Zutreffen eines Ausschlußkriteriums
- Mangelnde Compliance bzw. Kooperation des Probanden
- Schwerer Protokollverstoß
- Sonstige persönliche Gründe des Probanden (z.B. Ortswechsel)
- „Nicht mehr Erscheinen“ des Probanden

2.5. Messung der endothelabhängigen Vasodilatation

2.5.1. Geräte und Material

Ultraschallgerät (Fa. Siemens, Modell Sienna), 12 MHz-Schallkopf

SVHS-Videorecorder (Fa. Panasonic)

PC (Software: Vascular Imager und Brachial Analyzer (Fa. Medical Imaging Applications, Iowa, USA) Serien-Nr.:1650512832)

Blutdruckmessgerät mit Manschette

Nitrolingual-Pumpspray (Fa. Pohl-Boskamp)

SVHS-Videokassette

2.5.2. Angewendete Methode

Die Messung der Endothelfunktion orientierte sich an den Empfehlungen der *international brachial artery reactivity task force* (Coretti et al. 2002).

Sie erfolgte bei allen Patienten an der Arteria brachialis (Böger et al.1998) und fand stets in Ruhe bei Raumtemperatur (22°C) statt.

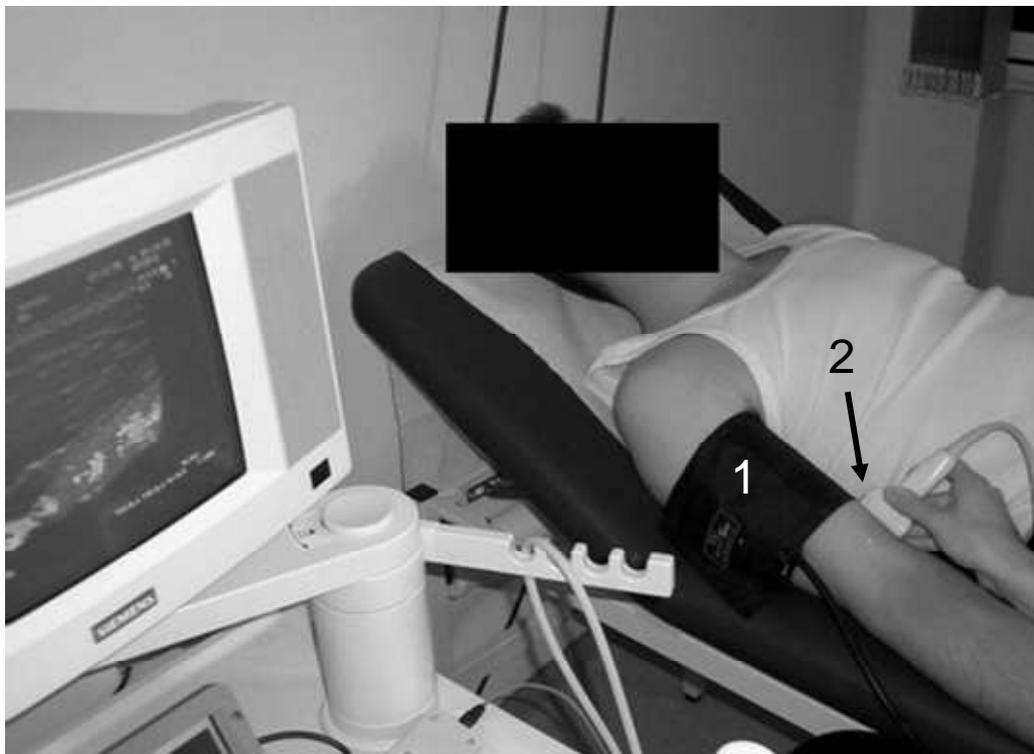


Abb. 6: Duplexsonographie der rechten Arteria brachialis
1 Blutdruckmanschette
2 Linear-12 MHz-Schallkopf

Mit Hilfe der Duplex-Sonographie wurde die Arteria brachialis geortet. Die Bestimmung des Längsdurchmessers erfolgte mit einem Linear-12 MHz-Schallkopf im B-Mode. Zum exakten Wiederfinden der gleichen Stelle dienten anatomische Strukturen.

Die Blutdruckmanschette wurde am liegenden Patienten zwei bis drei cm oberhalb der Ellenbeuge des rechten Armes angelegt und der Blutdruck dokumentiert. Anschließend wurde für zwei Minuten die Arteria brachialis im Längsschnitt mittels Ultraschall aufgenommen („baseline1“). Danach wurde die hyperämieinduzierte, endothelabhängige Vasodilatation gemessen. Hierfür wurde die Blutdruckmanschette auf suprasystolische Druckwerte aufgeblasen, der Druck der Manschette über fünf Minuten aufrechterhalten und dann schnell abgelassen, um so eine reaktive Hyperämie auszulösen. Nach dem Druckablassen wurde derselbe Abschnitt der A. brachialis wie für die Baseline-Messung dargestellt („cuff release“/“Hyperämie“/“FMD“ flow mediated vasodilation).

Nach einer zehnminütigen Ruhepause wurde erneut für zwei Minuten die A. brachialis dargestellt („baseline2“). Danach erhielten die Patienten einen Hub Nitrolingualspray ($\cong 0,4$ mg Glycerolnitrat) sublingual zur Messung der endothelunabhängigen Vasodilatation, wobei der Querschnitt der Arterie über einen fünfminütigen Zeitraum aufgenommen wurde („post-GTN“).

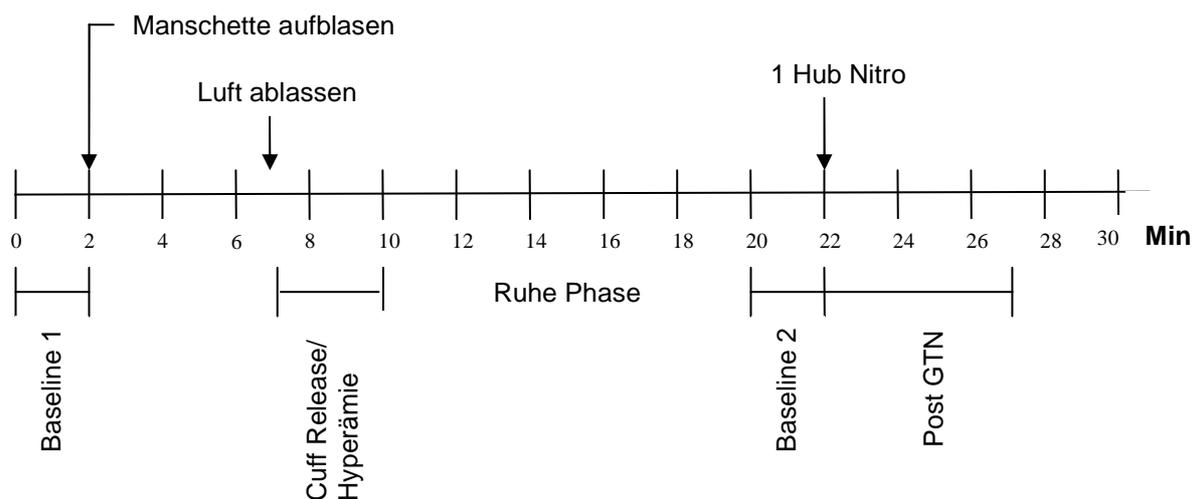


Abb. 7: Zeitlicher Ablauf der Ultraschalluntersuchung

Alle Ultraschallaufnahmen wurden mittels eines SVHS-Videorecorders aufgenommen und zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe des Programmes „Vascular imager“ auf den Computer überspielt.

Die Auswertung erfolgte unabhängig von mehreren, verblindeten Untersuchern mit dem Programm „Brachial analyzer“. Das Programm erstellt aus einer 30-sekündigen Zeitspanne innerhalb der aufgenommenen Videoabschnitte eine Abfolge von 300 Bildern. Mit dem Programm Brachial Analyzer wurden halbautomatisch die minimalen, mittleren und maximalen Gefäßdurchmesser in über 300 Bildern bestimmt. Aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit wurde der mittlere Gefäßdurchmesser zur Auswertung herangezogen.

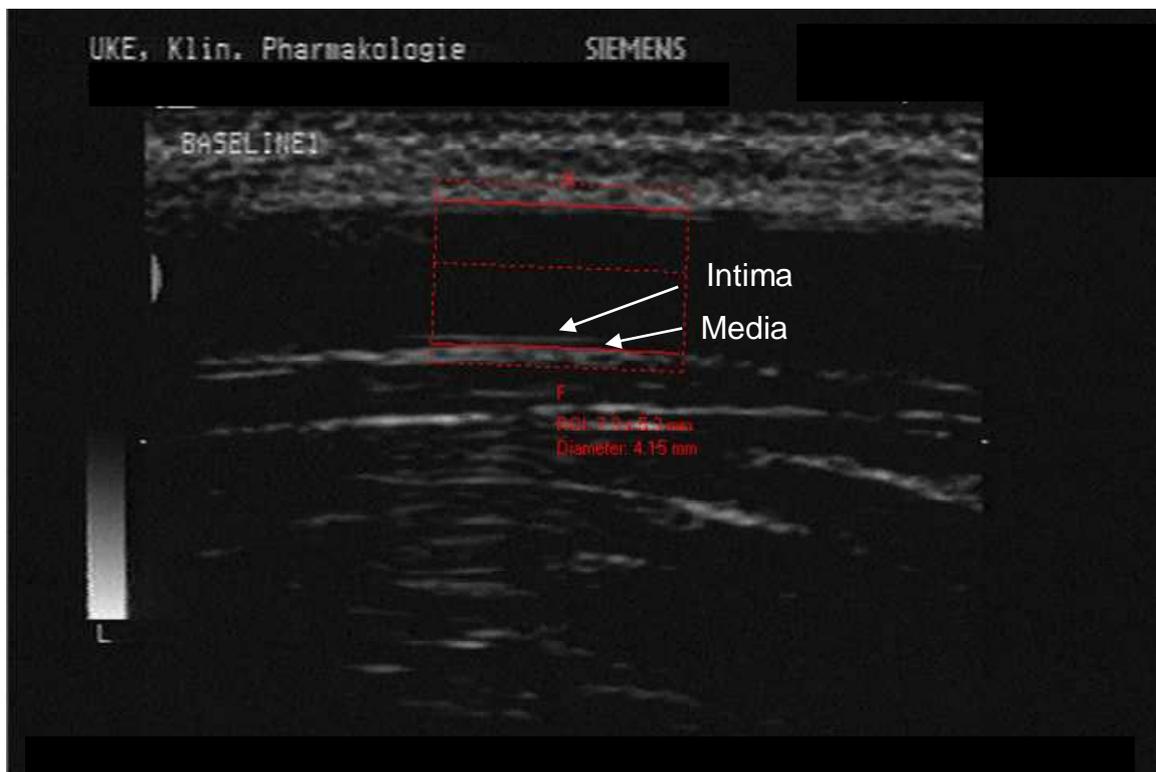


Abb. 8: Längsdurchmesser der A.brachialis im Ultraschall

Die dreiminütige Aufnahme des „Cuff release“/ „Hyperämie“/ „FMD“-Abschnittes wurde 60 bis 90 Sekunden nach dem Druckablassen ausgewertet, da in dieser Zeitspanne die maximale Hyperämie-induzierte Vasodilatation erwartet wurde (Böger et al.1998).

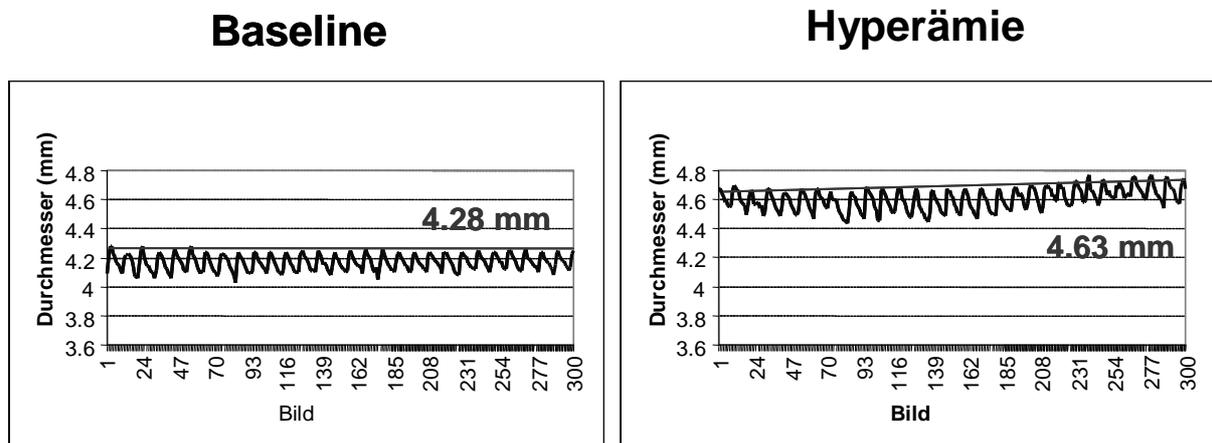
In der „Post-GTN“-Aufnahme wurde ein 30-sekündiger Zeitraum vier Minuten nach der Nitro-Gabe ausgewertet, da in dieser Zeitspanne die maximale endothelunabhängige Vasodilatation erwartet wurde.

Die flussvermittelte Vasodilatation (FMD) wurde als prozentuale Änderung des mittleren basalen Durchmessers (D_v) angegeben (Celermajer et al. 1992):

$$\text{FMD} = (D_n - D_v) / D_v \times 100$$

Nach der gleichen Formel wurde die nitroglycerinabhängige Vasodilatation errechnet.

$$\text{FMD} = (D_n - D_v) / D_v \times 100$$



$$4.63 \text{ mm} \times 100 / 4.28 \text{ mm} = 8.2\% \text{ Vasodilatation}$$

Abb. 9: Durchmesser der A. brachialis in Ruhe (Baseline) und bei Hyperämie über 30 Sekunden (= 300 Bilder)

2.6. Bestimmung der NO-Syntheserate in vivo

2.6.1. Geräte und Material

Braunüle (Fa. Braun)

Perfusor compact (Fa. Braun)

[¹⁵N₂]-L-Arginin-Infusion (>98,5 %ige Isotopen-Reinheit, Camebridge Isotope Laboratories IUK)

Urin-Sammelbehälter (Fa. Sarstedt)

2.6.2. Angewendete Methode

Ziel der Untersuchung war es, die Enzymaktivität der NO-Synthase zu bestimmen.

Die NO-Synthase katalysiert die Reaktion L-Arg → NO + L-Citrullin (siehe 1.3.).

NO wird über Nitrit zu Nitrat oxidiert, das über den Urin ausgeschieden wird.

Da NO aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit von wenigen Minuten nicht im Blut nachzuweisen ist, wurde Nitrat (NO₂⁻), der stabile Metabolit von NO, im Urin quantifiziert. Die Nitratausscheidung über den Urin spiegelt die endogene NO-Bildungsrate wider.

Um zu erkennen, inwieweit das quantifizierte Nitrat aus dem Abbau von NO stammt - und nicht aus Nahrungsmitteln oder aus bakterieller Nitratbildung durch die Darmflora, ist die Unterscheidung der beiden (nicht radioaktiven) Stickstoffisotope ¹⁴N und ¹⁵N notwendig. Die beiden Isotope ¹⁴N und ¹⁵N kommen in der Natur in einem Verhältnis 272:1 vor. Sie verhalten sich chemisch und biologisch weitgehend identisch und können lediglich nach gaschromatographischer Auftrennung mittels Massenspektrometrie (GC-MS) separat erfasst und quantifiziert werden (Tsikas et al. 2000).

Hierfür bekamen die Patienten zum Zeitpunkt null eine wässrige Lösung von 500 mg [¹⁵N₂]-L-Arginin (>98,5% Isotopenreinheit) in einem Zeitraum von zehn Minuten mit Hilfe eines Perfusors infundiert.

Der Urin wurde über 0-8, 8-24 und 24-48 Stunden gesammelt. Um die natürliche Anreicherung von ¹⁵N-Nitrat zu erfassen, wurde ebenfalls ein Null-Stunden-Urin genommen. Alle Urine wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren. Die Bestimmung von ^{14/15}N-Nitrat mittels GC-MS (Gaschromatographie/Massenspektrometrie) ist im experimentellen Teil unter 2.2.1. beschrieben.

Das nach der Infusion von [$^{15}\text{N}_2$]-L-Arginin mittels Massenspektrometer ermittelte ^{15}N -Nitrat muß nach diesem Verfahren eindeutig aus dem Abbau von NO stammen. Die ^{15}N -L-Arginin-Infusion wurde in Übereinstimmung mit der GLP (Good Laboratory Practice), GMP (Good Manufacturing Practice) und der deutschen und europäischen Pharmacopoe durch Herrn Sebastian Schulz in der Apotheke des Universitätsklinikums Eppendorf steril abgefüllt, auf Pyrogen- und Keimfreiheit überprüft und für die Anwendung am Menschen als sicher zertifiziert.

3. Material und Methoden, Experimenteller Teil

3.1. NO-Syntheserate in vivo: Bestimmung von Nitrat im Urin mittels GC-MS (Gaschromatographie/ Massenspektrometrie)

3.1.1. Geräte und Material

Quadrupol Massenspektrometer 1200 (Fa. Varian, Walnut Creek, USA), Software: Star Work Station

Gaschromatograph CP-3800 (Fa. Varian)

Chromatographische Bedingungen:

- Kapillarsäule 30 m x 0,25 mm; Filmdicke 0,25 µm
- T₀ (Kapillarsäule) 70 °C 2 min; Temperaturerhöhung 5 °C/min bis 100 °C, dann 30 °C/min bis 310 °C
- Constant Flow 1ml/min, Helium
- Injektor 200 °C, Transferlinie 250 °C, Ionenquelle 120 °C
- NICI(negative ion chemical ionisation)-Bedingungen: Ionisierungsenergie 230 eV, Elektronenstrom 300 µA
- Ionisierungsgas: Methan
- Injektionsvolumen 0,3 µl
- Multiplier (Detektion der Ionen): 1,2 kV für ^{14/15}N-Nitrat/Nitrit
- SIM(single ion monitoring)-Modus: Zielionen für Derivate von ¹⁴N- Nitrat m/z 62, ¹⁵N-Nitrat m/z 63, ¹⁴N-Nitrit m/z 46, ¹⁵N-Nitrit m/z 47

Evaporator (Zymark)

Heizblock (Scientifics)

Eppendorfcentrifuge 5415 R

Aceton (Fa. Merck)

PFB(Pentafluorbenzyl)-Bromid (Fa. Merck)

Toluol (Fa. Merck)

Autosampler-Gefäße (Fa. Machery-Nagel)

Mikrotitereinsätze (Fa. Braun)

¹⁵N-Nitrat-Stammlösung (8000 µMol) (Fa. Isotec)

¹⁴N-Nitrat-Stammlösung (800 µMol) (Fa. Sigma)

3.1.2. Angewendete Methode

Mit Hilfe der Gaschromatographie sollte die Konzentration an $^{14/15}\text{N}$ -Nitrat im Urin bestimmt werden (siehe auch 2.6.2.). Dabei wurde das in der Probe befindliche Nitrat als Pentafluorbenzyl (PFB)-Derivat gemessen. Hierfür mußte das Nitrat vor der GC-Messung in das spezifische PFB-Derivat überführt werden.

Die Gaschromatographie ist eine empfindliche Methode zur Analyse von komplexen Stoffgemischen. Das Prinzip beruht darauf, dass ein inertes Trägergas, in diesem Fall Helium, durch eine Säule strömt und die zu analysierenden Substanzen nach dem jeweiligen Siedepunkt und Polarität aufgetrennt werden. Am Ende der Säule befindet sich der Detektor, der die Intensität der aufgetrennten Substanzen als „Peaks“ misst. Die sogenannte Detektion erfolgte durch chemische Ionisation (NICI). Für die Messung im Massenspektrometer wurde als erstes eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen von ^{14}N - bzw. ^{15}N -Nitrat angesetzt:

Tab. 1: Standardreihe mit bekannten Konzentrationen von ^{14}N - und ^{15}N -Nitrat

	1.Probe	2.Probe	3.Probe	4.Probe
^{15}N -Nitrat	400 μmol (50 μl Stamm- lösung)	400 μmol (50 μl Stamm- lösung)	400 μmol (50 μl Stamm- lösung)	—
^{14}N -Nitrat	—	100 μmol (12,5 μl Stamm- lösung)	400 μmol (50 μl Stamm- lösung)	400 μmol (50 μl Stamm- lösung)
Wasser	50 μl	37,5 μl	—	50 μl

Die Urin-Proben wurden dann folgendermaßen aufbereitet, um Nitrat in das spezifische PFB-Derivat zu überführen:

Von dem Null-Stunden-Sammelurin, dem Sammelurin über acht, zwölf, sowie 24 Stunden wurden jeweils 100 μl Urin mit 500 μl Aceton und 10 μl PFB-Bromid in einem Autosampler-Gefäß gemischt. Die Proben wurden gevortext und für eine Stunde bei 50 $^{\circ}\text{C}$ im Thermoblock inkubiert. Nach Abkühlen der Proben wurden sie mit Hilfe des Evaporators unter Stickstoff bis zur Trübung eingeeengt. Anschließend wurden jeweils 100 μl Toluol zu jeder Probe pipettiert und die Proben für eine Minute gevortext. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur über fünf Minuten bei 2000 rpm

bildeten sich zwei Phasen. 100 µl der oberen Phase wurden mit jeweils 100 µl Toluol in Autosamplergefäßen mit Mikroeinsätzen gemischt.

Von allen Urinen wurden ein zweites Mal 100 µl, diesmal unter Zusatz von jeweils 10 µl ¹⁵N-markiertem Nitrat (8000 µMol) identisch aufbereitet („B-Proben“)

Bis zur Messung im Massenspektrometer wurden die Proben bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Berechnung der ¹⁵N-Nitrat-Konzentration im Urin

1. Im Null-Stunden-Sammelurin wurde **der natürliche Gehalt** an ¹⁵N-Nitrat (Ratio ¹⁵N-Nitrat/¹⁴N-Nitrat) erfaßt
2. Im Acht-, Zwölf-, sowie 24-Stunden-Sammelurin wurde das Verhältnis ¹⁵N-Nitrat/¹⁴N-Nitrat berechnet, um so die **Anreicherung nach der Infusion** bestimmen zu können
3. Zur Berechnung der **Molmenge** von ¹⁵N-Nitrat wurden die Proben mit den genau definierten Mengen ¹⁵N-Nitrat herangezogen (B-Proben). Bei diesen Proben wurde das Verhältnis ¹⁵N-Nitrat/¹⁴N-Nitrat mit der bekannten Molmenge von dazugespiktem ¹⁵N-Nitrat (800 µmol) multipliziert und so der ¹⁴N-Gehalt in Mol berechnet
4. Die **Konzentration** ergab sich aus der Multiplikation der errechneten Molmenge ¹⁴N mit der Anreicherung
5. Die **Gesamtausscheidung** für einen Sammelzeitraum wurde durch Multiplikation der ¹⁵N-Nitrat-Konzentration mit der Urinsammelmenge berechnet
6. Alternativ wurde die Ausscheidung auf das Kreatinin bezogen

Die vom Massenspektrometer gemessene ¹⁵N- sowie ¹⁴N-Nitrat-Mengen im Urin wurden mit Hilfe der verwendeten Software in Form von Flächen im Chromatogramm dargestellt und ausgewertet (siehe Abb. 10). Das peakflächenverhältnis entspricht in der Abbildung vor der ¹⁵N-L-Arginin-Infusion (¹⁵N/¹⁴N) $149206/3,265 \times 10^7$ also 0,45 %. Nach der Infusion von 500 mg ¹⁵N-L-Arginin entspricht das Verhältnis der Peakflächen (¹⁵N/¹⁴N) $593262/5,348 \times 10^7 = 1,11$ %.

Die Anreicherung ergibt sich aus der Subtraktion der beiden Werte:

1,11 %-0,45 %=0,65 %.

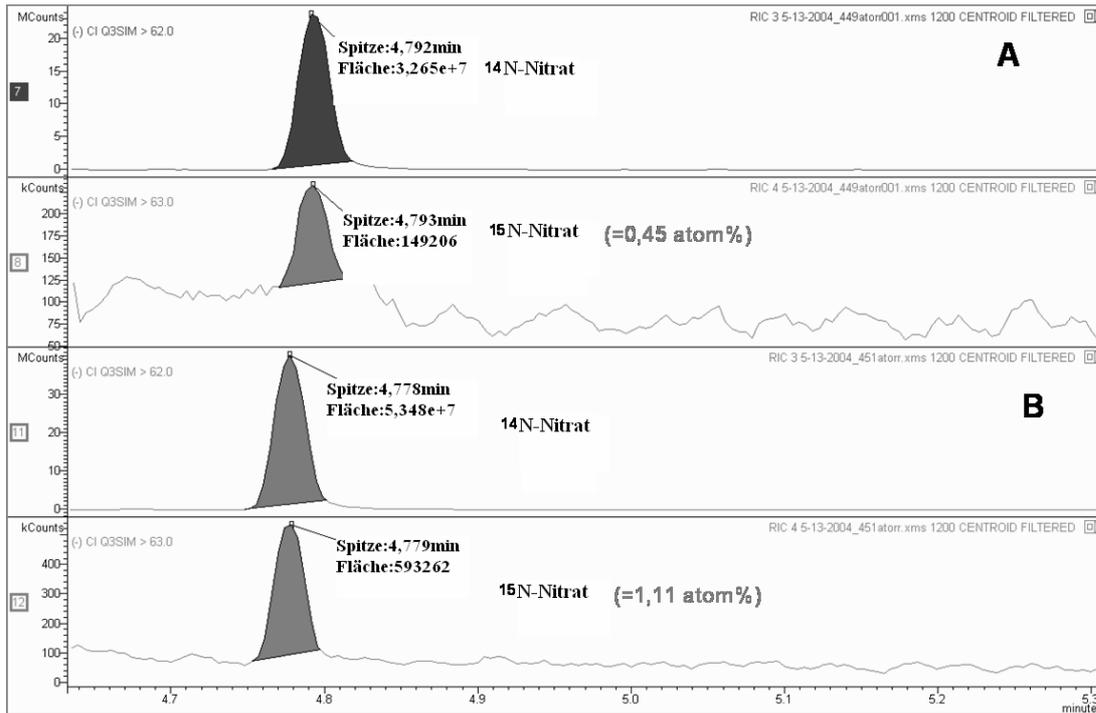


Abb. 10: Bestimmung von $^{14}\text{N-Nitrat}$ und $^{15}\text{N-Nitrat}$ mittels GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie)

A: Urin vor der $^{15}\text{N-L-Arginin}$ -Infusion

B: Urin acht Stunden nach der Infusion von 500 mg $^{15}\text{N-L-Arginin}$

Ordinate: [kCounts] (Kollisionsereignisse)

Abszisse: [min]

[atom %] = $^{15}\text{N-Nitrat}/\text{Gesamt-Nitrat}$

3.2. Erfassung der Expression der endothelialen NO-Synthase in Thrombozyten

3.2.1. Isolierung von Proteinen aus Thrombozyten

3.2.1.1. Geräte und Material

- Zentrifuge (Rotina 35R, Fa. Hetich)
- Ultraschallbad (Bandelin SONOREX 100)
- Citratröhrchen (Fa. Sarstedt)
- PBS (Fa. Biochrom)
- Chloroform (Fa. Merck)
- Isopropanol (Fa. Sigma)
- Lysispuffer (1 M Tris pH 7,5; 0,5 M KCl, 1 M NaCl; 0,3 M β -Glycerophosphat; 0,5 M NaF, 0,1M Na_3VO_4 ; Triton X 100; Nonidet P-40)
- Proteaseinhibitor (Fa. BioRad)

3.2.1.2. Angewendete Methode

Nach der peripheren Blutentnahme zum Zeitpunkt -2, 0, 1, 2, 4, 8, 24, sowie 48 h (siehe 2.3.2.) wurden die Monovetten für fünfzehn Minuten, rcf 200, 20 °C, zentrifugiert. Das erhaltene thrombozytenreiche Plasma wurde daraufhin für zehn Minuten, rcf 2000, 20 °C, zentrifugiert, so daß sich ein „Thrombozytenpellet“ bildete. Das überschüssige Plasma wurde abpipettiert und verworfen. Dem Pellet wurde 1 ml PBS zugefügt und erneut für zehn Minuten, rcf 2000, 20 °C, zentrifugiert. Danach wurde das PBS abpipettiert und verworfen. Die Monovette mit dem Pellet wurde nach Zugabe von jeweils 1 ml Lysispuffer, sowie 1 μl Proteaseinhibitor für einige Minuten ins Ultraschallbad gehalten bis sich das Pellet löste. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

3.2.2. Proteinmessung nach Bradford

3.2.2.1. Geräte und Material

- Spektrometer Lambda 2S (Pektin Elmer)
- Drucker (OKI Mikrolin 380)
- Bradfordreagenz für BioRad Protein Assay (Fa. BioRad)
- γ -Globulin-Standard (Fa. BioRad)
- Mikrovials (Fa. Sarstedt)

3.2.2.2. Angewendete Methode

Mit dem Assay nach Bradford (Bradford 1976) kann die Proteinkonzentration einer Probe einfach und genau bestimmt werden. Der quantitative Nachweis des Proteingehaltes einer Probenlösung erfolgt anhand von Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit der farbstoffbildenden Bradfordreagenz. Die Intensität des Farbstoffs korreliert direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen und kann photometrisch gemessen werden. Die entstehenden blauen Säurefarbstoffe werden als Coomassie-Brilliantblau bezeichnet. Im sauren Milieu bzw. in Gegenwart von Proteinen verschiebt sich ihr Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm. Bei dieser Wellenlänge (595 nm) wurde die Extinktion gemessen. Um eine Standardkurve zu erhalten, wurde eine Eichreihe aus verschiedenen Konzentrationen von γ -Globulin-Standard (3,45 μg bis 13,8 μg in 0,8 μl Wasser bidest) erstellt. Für die Messung wurden die Proben jeweils abhängig von der erwarteten Proteinmenge verdünnt oder unverdünnt eingesetzt. Die Proben und die Standardreihe besaßen ein Probenvolumen von je 800 μl , das in Mikrovials pipettiert wurde. Dazu wurden je 200 μl Bradfordreagenz zugegeben, gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sowohl Proben, als auch Standard wurden gegen einen Leerwert gemessen, der aus destilliertem Wasser bestand.

Die bei 595 nm Wellenlänge gemessene Extinktion wurde automatisch in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

3.2.3. SDS-Page (=Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

3.2.3.1. Geräte und Material

Gel-Elektrophorese-Apparatur und Zubehör (Fa. BioRad)

- Netzgerät Power Pac 3000 (Fa. BioRad)
- Gießstand für Gel, 4 Spacer, 4 Glasplatten (Fa. BioRad)
- Laufpuffer 5x (15 g Trisbase, 72 g Glycin, 25 ml 20 % SDS ad 1000 ml Aqua, pH 8,3). Gebrauchslösung: 200 ml Laufpuffer 5x, 800 ml Aqua
- Proteinstandard (Fa. BioRad)

Tab. 2: *Zusammensetzung des Trenn- und des Sammelgels*

	Trenngel (10%) (für 1 Gel)	Sammelgel (4%) (für 1 Gel)
Bis Acrylamid	1,26 ml	300 µl
2 M Tris pH 8,8	1 ml	
0.5 M Tris pH 6,8		800 µl
Wasser	2,74 ml	1,9 ml
20 % SDS (Larylsulfat)	25 µl	15 µl
TEMED (Tetramethylethyldiamin) (Sigma)	2,5 µl	1,5 µl
APS (10% Ammoniumpersulfat in Aqua dest.)	25 µl	15 µl

3.2.3.2. Angewendete Methode

Eine übliche Methode zur Auftrennung von Proteinen ist die Gel-Elektrophorese. Die Proteine werden durch den Zusatz von SDS denaturiert und während der Elektrophorese nach ihrer Grösse beziehungsweise ihrem Molekulargewichte aufgetrennt.

Nachdem zunächst getrennt Trenn- und Sammelgel hergestellt wurden, konnten die Gele gegossen werden. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten in den Giesstand gefüllt. Um eine glatte Oberfläche zu erzielen, wurde vorsichtig 1 ml aqua dest. auf das Trenngel gegeben und nach der Auspolymerisation (ca. nach 1 Stunde) wieder abgegossen. Daraufhin wurde das Sammelgel eingefüllt und ein Kamm für die späteren Laufaschen eingesetzt. Nach Auspolymerisation des Sammelgels konnte das Gel verwendet werden. Dazu wurde es in eine Gel-Elektrophoresekammer eingespannt, die mit ausreichenden Mengen von Laufpuffer bestückt wurde.

Die Proben wurden vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert. Eine Tasche wurde mit dem Standard bestückt.

Im elektrischen Feld von 150 Volt liefen die Proben in das Sammelgel ein und wurden im Trenngel aufgetrennt. Nachdem die Lauffront am unteren Ende des Gels angekommen war, wurde die Stromzufuhr gestoppt und damit der Auftrennungsprozess beendet.

3.2.4. Western Blots

3.2.4.1. Geräte und Material

Gel-Blottingkammer und Zubehör (Fa. BioRad)

- Netzgerät Power Pac 3000 (Fa. BioRad)
- Filterpapier (Whatman-Papier)
- Blotmembran aus Nitrocellulose Porengröße 0,45 µm (Fa. Schleicher+Schuell)
- Ponceaufärbelösung (0,2 % Ponceau in 3 % TCA=Trichloressigsäure)
- Röntgenfilme Kodak X (Fa. Sigma)
- Photokassette (Curix MR 200)
- Transferpuffer 10x (144,2 g Glycin, 30,3 g Tris, 10 ml 20 % SDS, ad 1000 ml Aqua)
- Gebrauchslösung: 100 ml 10x Transferpuffer, 100 ml Methanol, 800 ml Aqua
- Blockingpuffer (5 %) (2,5 g nonfat dry milk auf 50 ml TBS/T)
- TBS 10x (24,2 g Tris, 80 g NaCl, ad 1 l Aqua, pH 7,6 mit HCl eingestellt)
- TBS (100 ml TBS/T, 900 ml Aqua)
- TBS/T (1 l TBS, 1 ml Tween 20(100 %))
- Reagenz für die ECL-Reaktion (=Chemielumineszenz-Reaktion)
- Antikörper: **Primärer Antikörper:**
e-NOS, verdünnt 1:1000 in TBS/T und 1 % Milk
Sekundärer Antikörper:
Anti-Kaninchen, verdünnt 1:2000 in TBS/T

3.2.4.2. Angewendete Methode

Eine spezifische, häufig angewendete Methode zur Proteindarstellung und -analyse ist der Western Blot.

Die Western Blot Methode dient dazu, im SDS-PAGE aufgetrennte Proteine mittels Elektrobplot auf Nitrocellulose zu übertragen. So werden die aufgetrennten Proteine weiteren Analysen zugänglich gemacht.

Für den Elektrobplot erfolgte der Zusammenbau als „Sandwich“. Zunächst wurde in den Blothalter ein Fließ zur Polsterung gelegt und darauf zwei Filterpapiere geschichtet. Auf die Filterpapiere wurde vorsichtig das Trenngel, aus welchem die Proteine extrahiert werden sollten, gelegt. Das Gel wurde mit der Nitrocellulosemembran gedeckt. Anschliessend wurden zur Polsterung wieder zwei

Lagen Filterpapier und ein Fliess luftblasenfrei aufgelegt und der Blothalter zusammengeklappt und verschlossen. Die gesamte Prozedur wurde bereits in dem Transferpufferbad durchgeführt, um einerseits die Austrocknung des Gels zu verhindern und andererseits zu vermeiden, dass Luftblasen zwischen Gel und Membran gelangen.

Dann wurde der „Sandwich“ in die Blottingkammer gestellt, ein Kühlaggregat hinzugefügt und die Kammer mit Blottingpuffer aufgefüllt. Geblottet wurde über 1 Stunde bei 250 mA.

Die eNOS-Expression wurden durch Berechnung des Verhältnisses eNOS/ β -Tubulin quantifiziert.

Da die Proben nur eine sehr geringe Konzentration des eNOS-Proteins aufwiesen und somit mit den hier verfügbaren Proben nur ein qualitativer, aber kein quantitativer Nachweis möglich war, wurden die weiteren Westernblots in Kooperation mit Dr. Huige Li aus dem Institut für Pharmakologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt.

Die Ponceaufärbung:

Nach dem Blot wurde die Nitrocellulosemembran einer Ponceaufärbung unterzogen. Diese Färbung diente zur Orientierung, da die Membran für die anschliessende Antikörperinkubation geschnitten wurde. Gel und Filterpapier wurden verworfen und die Nitrocellulosemembran in die Ponceaufärbelösung gelegt und ca. zehn Minuten geschwenkt. Nach Sichtbarwerden der Proteine als Bandenschatten wurde die Membran mit Aqua dest. entfärbt, so dass die Banden als rote Striche auf weißem Grund erschienen. Danach wurde die Membran im gewünschten Bereich (unterhalb der 100-Bande) geschnitten.

Die Antikörperinkubation:

Um die Proteine auf der Nitrocellulosemembran spezifisch darstellen zu können, werden in der Regel gerichtete Antikörper gegen die gesuchten Proteine (in diesem Fall speziell gegen die endotheliale NO-Synthase) verwendet. Bei diesen Antikörpern spricht man von primären Antikörpern.

Die wie oben hergestellte Membran wurde fünf Minuten in TBS gewaschen, dann eine Stunde in Blockinglösung geschwenkt und danach dreimal für fünf Minuten mit TBS/T gewaschen. Danach wurde sie mit dem primären Antikörper über Nacht inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten von je fünf Minuten in TBS/T wurde die

Membran für mindestens eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert und erneut drei mal fünf Minuten in TBST geschwenkt.

Die Detektion:

Das Ansetzen der ECL-Lösung erfolgte, indem Lösung eins und Lösung zwei jeweils zu gleichen Teilen in ein Gefäss pipettiert und gründlich gemischt wurden.

Dieses Gemisch wurde auf die bereits in der Fotokassette liegende Membran gleichmässig aufgetragen, so dass die gesamte Membran bedeckt war.

Nach wenigen Sekunden wurde die ECL-Lösung mit einem Filterpapier abgenommen. Die ECL-Lösung reagierte mit der an den zweiten Antikörper gekoppelten Peroxidase und bewirkte eine Lichtreaktion. Diese konnte mit Hilfe der Filme detektiert und nach Entwicklung der Filme sichtbar und auswertbar gemacht werden. Je nach Stärke des Signals wurde die Belichtungszeit variiert.

3.3. Bestimmung der cGMP Ausscheidung im Urin als Indikator der eNOS-Aktivität

3.3.1. Geräte und Material

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Fa. Sarstedt)

96-Well-Mikrotiterplatte, beschichtet mit Anti-Kaninchen-IgG (Fa. Amersham)

ELISA-Reader Tecan-Sunrise, (Software: Magellan V4.00)

Plattenschüttler Titramax 101 (Fa. Heidolph)

Puffer (Fa. Amersham)

Standard (Fa. Amersham)

1. Antikörper (Anti-cGMP-Antikörper ,Kaninchen) (Fa. Amersham)

2. Antikörper (cGMP-Antikörper-Konjugat, gekoppelt an Peroxidase) (Fa. Amersham)

Wasch-Puffer (Fa. Amersham)

96-Well-Plattenwascher MRW

Tetramethylbenzidin (TMB)

1 M H₂SO₄ (Fa Merck)

3.3.2. Angewendete Methode: cGMP-EIA (=Enzymimmunoassay)

Ziel der Untersuchung war es, die Bioaktivität des NO zu bestimmen.

Durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch NO wird der Anteil von cGMP in den Endothelzellen und (auf parakrinem Weg) in den anliegenden glatten Muskelzellen erhöht. Über cGMP-abhängige Proteinkinasen kommt es durch Erschlaffen der glatten Muskelzellen zur Vasodilatation (siehe 1.3.). cGMP wird über Phosphodiesterasen abgebaut und über den Urin ausgeschieden.

Die Menge des cGMP kann somit Rückschlüsse auf NO-Menge und damit auf die Aktivität der NO-Synthase geben.

cGMP wurde im Urin nachgewiesen.

1. Standard- und Probenvorbereitung:

Um eine Standardkurve zu erhalten, wurde eine Eichreihe aus verschiedenen Konzentrationen des Standards in Reaktionsgefäßen angesetzt: 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 fmol cGMP. Hierfür wurde je ein Reaktionsgefäß mit 500 µl Puffer bestückt. Dann wurden zum Erstellen der 6400 fmol Lösung 500 µl des

Standards hinzupipettiert. Von diesem Reaktionsgefäß wurden wiederum 500 µl abgenommen und die doppelte Verdünnung hergestellt. So wurde fortgefahren. Die Urinproben wurden aufgetaut und mit Aqua bidest je 1:100 verdünnt.

2. Auftragen der Standards, Proben und Kontrollen:

Gemessen wurde jeweils in Doppelwerten. Pro Well wurden 100 µl der vorbereiteten Standard-Ansätze aufgetragen. Die Urinproben (der Null-Stunden-Sammelurin, der Sammelurin über 8, 12, sowie 24 Stunden) wurden je 1:100 verdünnt, dann wurden auch hiervon je 100 µl in die Wells pipettiert.

Sowohl Proben, als auch Standards wurden gegen einen Leerwert gemessen, der aus 100 µl Puffer bestand, sowie gegen einen „Blank“, in dem sich gar keine Lösung befand und somit die Extinktion nur durch das Gefäß bestimmt werden konnte. Ein NSB-Well (Non-Spezific-Binding) diente zur Quantifizierung unspezifischer Bindungen. In das NSB-Well wurden 200 µl Puffer pipettiert.

3. Inkubation mit Anti-cGMP-Antikörper (erster Antikörper):

Der Antikörper (erster Antikörper, Anti-cGMP-Antikörper) wurde in 11 µl Puffer vorsichtig gelöst und dann auf eine Endverdünnung von 1:1 gebracht.

Alle Wells, mit Ausnahme des Blanks und des NSB wurden mit je 100 µl Antikörperlösung bestückt. Die Anti-cGMP-Antikörper sollten an die feste Phase binden und die in der Lösung befindlichen cGMP-Moleküle fixieren (s. Abb. 11). Die Inkubation der Mikrotiter-Stripes mit der Antikörperlösung erfolgte bei 3-5 °C über Nacht.

4. Inkubation mit cGMP-Konjugat (zweiter Antikörper) und Starten der enzymatischen Reaktion:

Dieser Schritt erfolgt, um die von den Anti-cGMP gebundenen cGMP-Moleküle zu markieren.

Auch der zweite Antikörper wurde in 11 µl Puffer vorsichtig gelöst und dann auf eine Endverdünnung von 1:1 gebracht.

Es wurden je 50 µl des 2. Antikörpers (gekoppelt an Peroxidase) in alle Wells mit Ausnahme des Blanks pipettiert und für drei bis fünf Stunden bei 3-5 °C inkubiert. Hiernach wurden alle wells mit Wasch-Puffer je viermal mit Hilfe des Plattenwaschgerätes gewaschen. Nun mußten sofort je 200 µl TMB in alle Wells

pipettiert werden. Die Wells wurden dann 30 Minuten auf dem Plattenschüttler geschüttelt. Während dieser Zeit entwickelte sich ein blauer Farbstoff.

5. Photometrische Messung der enzymatischen Reaktion:

Durch Zugabe von je 100 µl 1 M H₂SO₄ wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Intensität des Farbstoffes wurde photometrisch innerhalb der nächsten 30 Minuten im Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und entspricht der Konzentration an cGMP in der Probe.

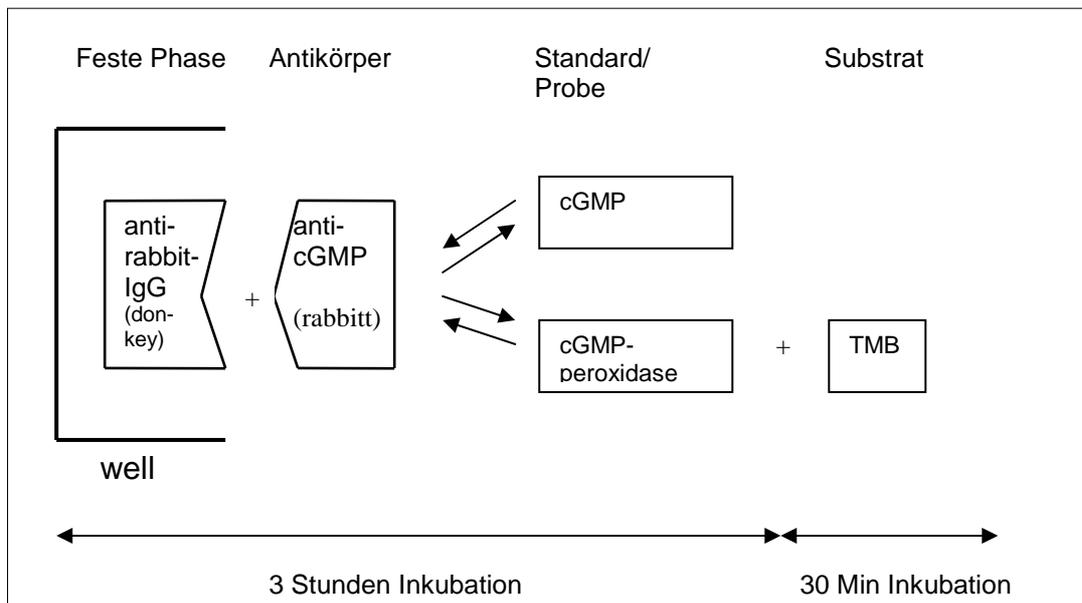


Abb. 11: EIA (=Enzymeimmunoassay)
rabbit = engl. Kaninchen
donkey = engl. Esel

3.4. Bestimmung von [²H₆]ADMA (Asymmetrisches Dimethylarginin) und L-Arginin im Plasma mittels GC-MS (Gaschromatographie/ Massenspektrometrie)

3.4.1. Geräte und Material

Quadrupol Massenspektrometer 1200 (Fa. Varian, Walnut Creek, USA), Software: Star Work Station

Gaschromatograph CP-3800 (Fa. Varian)

Chromatographische Bedingungen:

- Kapillarsäule 30 m x 0,25 mm; Filmdicke 0,25 µm
- T₀ (Kapillarsäule) 80 °C 2 min; Temperaturerhöhung 25 °C/min bis 300 °C
- Constant Flow 1 ml/min, Helium
- Injektor 260 °C, Transferlinie 250 °C, Ionenquelle 180 °C
- NICI (negative ion chemical ionisation)-Bedingungen: Ionisierungsenergie 70 eV, Elektronenstrom 300 µA
- Ionisierungsgas: Methan
- Injektionsvolumen 1,0 µl
- Multiplier (Detektion der Ionen): 1,8 kV für ADMA; 1,1 kV für L-Arginin
- SIM (single ion monitoring)-Modus: Zielionen für Derivate von ADMA m/z 634,3; für Derivate von L-Arginin m/z 586

Eppendorffzentrifuge 5415 R

EDTA-Blutentnahme-Röhrchen (Fa. Sarstedt)

Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml

Autosamplergefäß (Fa. Machery-Nagel), Mikroeingänge 0,3 ml

[²H₆]-ADMA (intern hergestellter und quantifizierter Standard, 20 µM)

[²H₇]-L-Arginin (500 µM) (Fa. Eurisotop)

Aceton (Fa. Merck)

2 M methanolische HCL (Fa. Merck)

PFAA (Pentafluorpropionsäure) (1:4 in Ethylacetat) (Fa. Fisher)

Toluol (Fa. Merck)

Borsäurepuffer (0,2 M, pH 8,5) (0,371g Borsäure, 20 ml Aqua, 2 N NaOH bis pH 8,5, ad 30 ml Aqua)

3.4.2. Angewendete Methode

ADMA und L-Arginin wurden mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmt.

ADMA wirkt als kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase. Es bindet anstelle von L-Arginin an die NO-Synthase, wird jedoch nicht zu NO umgesetzt, wodurch die Bildung von NO im Gefäßendothel reduziert wird (Böger 2004).

Das Konzentrationsverhältnis zwischen L-Arginin und ADMA bestimmt die Aktivität der NO-Synthase (Böger 1997) und beeinflusst hierüber die NO-abhängigen physiologischen Wirkungen (Vallance et. al 1992).

Vorraussetzung für die Analytik von ADMA mit Hilfe der GC-MS war ein isotopenmarkierter interner Standard ($[^2\text{H}_6]\text{ADMA}$). Die Synthese, Charakterisierung und Quantifizierung des Standards wurde von Albsmeier, J. 2004 entwickelt (Albsmeier et al. 2004). Der Standard wurde mir freundlicherweise überlassen.

Für die Analytik von L-Arginin mit Hilfe der GC-MS diente ein isotopenmarkierter Standard $[^2\text{H}_7]\text{-L-Arginin}$ der Firma Eurisotop.

Das Prinzip der Gaschromatographie wurde bereits in 2.2.1.2. beschrieben.

Nach der peripherenvenösen Blutentnahme zum Zeitpunkt -2, 0, 1, 2, 4, 8, 24, sowie 48 (siehe 2.1.3.2.) erfolgte die Zentrifugation der Monovetten für 10 Minuten, 2000 rcf, 20 °C. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Durch die im folgenden beschriebene Aufarbeitung der Plasmaproben wurde ADMA, bzw. L-Arginin zum entsprechenden Methylesterpropionsäureamid umgesetzt, das gaschromatographisch gemessen werden konnte.

Die Konzentrationen wurden über das Verhältnis zum $[^2\text{H}_6]\text{-ADMA}$, bzw. $[^2\text{H}_7]\text{-L-Arginin}$ errechnet.

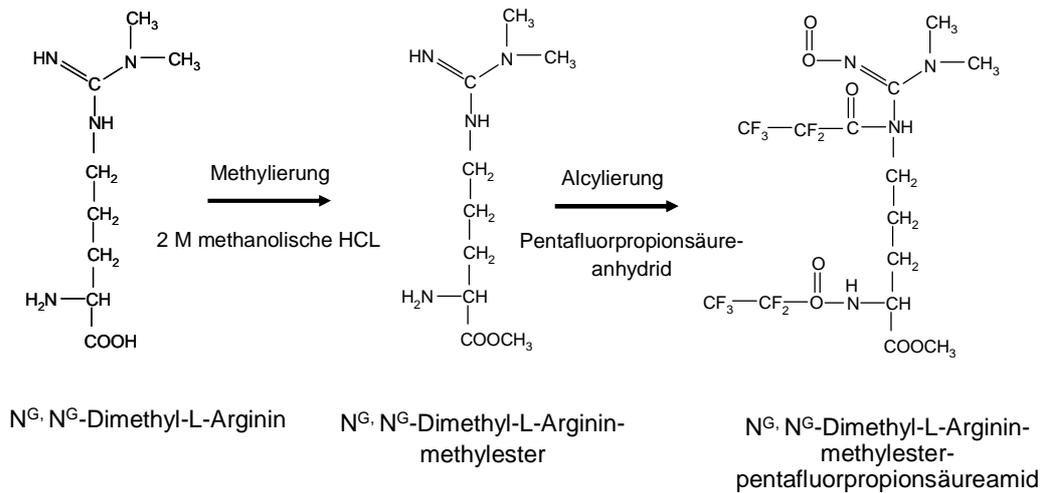


Abb. 12: Derivatisierung von ADMA für die Analyse mit Hilfe der GC-MS

Aufarbeitung der Plasmaproben für die GC-MS-Messung

Von den Plasmaproben wurden jeweils 50 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und nach Zugabe von 8 µl des internen Standards ADMA, sowie 8 µl L-Arginin-Standard (zur parallelen Bestimmung des L-Arginin/ ADMA-Verhältnisses) gut gemischt und für wenige Minuten bei 10000 rpm, 4 °C, zentrifugiert. Nach Abpipettieren und Verwerfen der flüssigen Phase wurden 100 µl Aceton zur Proteinfällung zu dem verbliebenen Sediment pipettiert, gut gevortext und für fünf Minuten bei 10000 rpm, Raumtemperatur, zentrifugiert.

Nach Abnahme des Überstandes und Überführung in Autosamplergefäße wurden die Proben unter Stickstoff bis zur Trübung eingeeengt. Anschließend wurden die Gefäße nach Zugabe von 100 µl methanolischer HCL gut verschlossen, ausgiebig gevortext und für eine Stunde bei 80 °C derivatisiert. Nach Abkühlen und Einengen der Proben wurden sie mit 100 µl PFAA eine Stunde bei 100 °C derivatisiert. Nach erneutem Abkühlen und Einengen der Proben erfolgte die Aufnahme in 500 µl Toluol und 100 µl Boratpuffer. Anschließend wurden die Proben für eine Minute gevortext und für zehn Minuten bei 4 °C und 800 g für zehn Minuten zentrifugiert.

Von allen Plasmaproben wurden ein zweites Mal 50 µl, diesmal ohne Zusatz von L-Arginin bzw. ADMA identisch aufbereitet.

Nach Überführen von 200 µl der oberen Toluolphase in Autosamplergefäße mit Mikroeinsätzen erfolgte die gaschromatographische Messung.

3.5. Verlässlichkeit der angewendeten Methoden

Um einen Anhaltspunkt für die intraindividuelle Variabilität und die die Stabilität der angewendeten Methoden zu gewinnen, wurden die Baseline- und Follow-up-Werte aller 24 Patienten bzw. der Patienten der Placebogruppe intraindividuell korreliert.

4. Datenerhebung und Statistik

Alle Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Testes auf Normalverteilung geprüft.

Bei vorliegender Normalverteilung wurden für fortlaufende Variablen Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM), bzw. Standardabweichung ermittelt. Lag keine Normalverteilung vor, wurden der Median, so wie die 25 % und 75 % Perzentilen bestimmt.

Für die Vergleiche innerhalb einer Behandlungsgruppe (vor und nach Einnahme der Medikation) wurde bei Normalverteilung der T-Test für abhängige Stichproben herangezogen, bei fehlender Normalverteilung der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test.

Für Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Gruppen wurde bei vorliegender Normalverteilung der T-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Lag keine Normalverteilung vor, wurde ein nicht parametrischer Test (Wilcoxon) verwendet.

Kategorische Variablen wurden mit dem Chi²-Test verglichen.

Korrelationen wurden mit Hilfe des Pearsons's Tests bewertet.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde der Unterschied als signifikant bezeichnet.

Für die statistische Analyse wurde das Statistikprogramm SPSS 14.0 verwendet.

Zur Erstellung der Grafiken wurden die Programme Prism 4,0 und Excel 2003 verwendet.

5. Ergebnisse

5.1. Baselinedaten der hypercholesterinämischen Patienten und der Probanden mit Normcholesterinämie (Tag 1)

Alters- und Geschlechtsverteilung

Die Stichprobe der hypercholesterinämischen Patienten setzte sich aus zwölf weiblichen und zwölf männlichen Patienten zusammen.

Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Studie lag bei 59 Jahren mit einer Streubreite von 45 - 65 Jahren. Die Frauen waren mit einem mittleren Alter von 57 Jahren (46 – 64 Jahre) jünger als die Männer mit 60 Jahren (46 – 68 Jahre) (siehe Abb. 13).

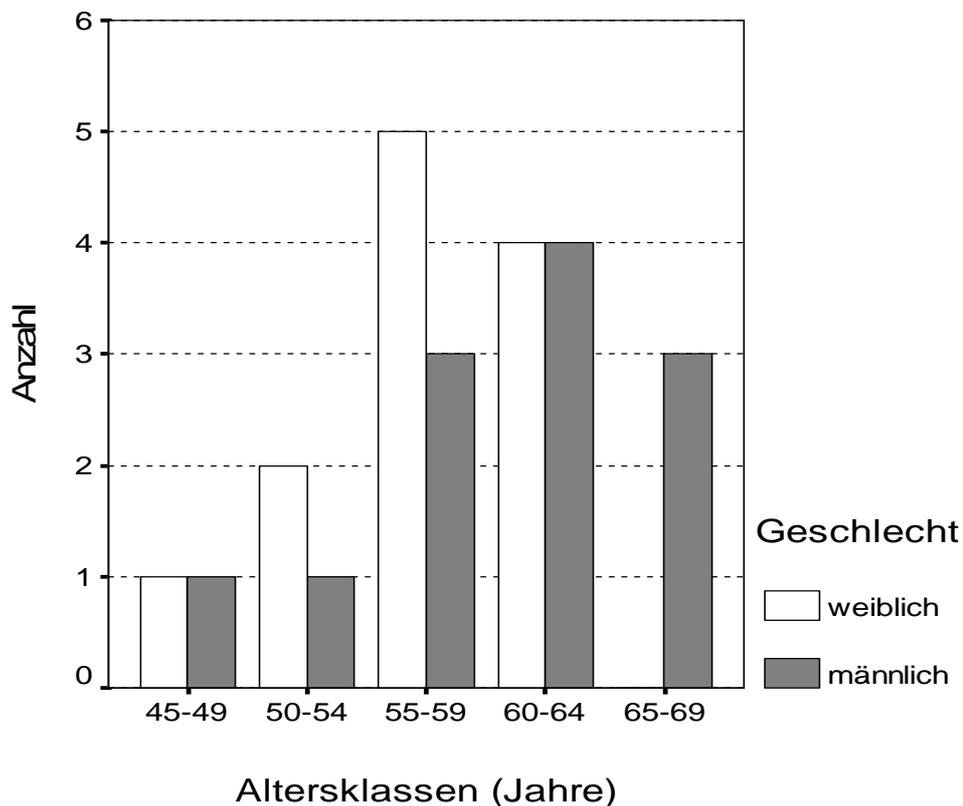


Abb. 13: Altersverteilung der Patienten mit Hypercholesterinämie in Abhängigkeit vom Geschlecht

Die Stichprobe der normcholesterinämischen Probanden setzte sich aus fünf weiblichen (41,7 %) und sieben männlichen (58,3 %) Patienten zusammen. Das mittlere Alter der Probanden lag bei 58 (38 - 67) Jahren.

Klinische Merkmale und Laborwerte zu Beginn der Studie

Aus der Tabelle 3 wird ersichtlich, dass sich hyper- und normocholesterinämische Studienteilnehmer bezüglich anamnestischer Daten, üblicher klinischer Untersuchungsbefunde und Routine-Laborparameter nicht in klinisch relevantem Maße unterscheiden.

Tab. 3: *Demographie, Routine-Laborparameter und klinische Befunde der hypercholesterinämischen Patienten vs. Probanden*

	Hypercholesterinämie (n=24)	Normocholesterinämie (n=12)	Signifikanz
Alter	58,6 ± 1,3	57,9 ± 2,7	p=0,787
Geschlecht (Anzahl männlich/weiblich)	12/12	7/5	p=0,637
Größe (cm)	171,3 ± 1,8	172,3 ± 3,0	p=0,773
Gewicht (kg)	72,8 ± 2,5	70,2 ± 3,3	p=0,539
BMI (kg/m ²)	24,8 ± 0,7	23,5 ± 0,5	p=0,224
Systol. Blutdruck (mm Hg)	126,0 ± 2,8	126,7 ± 3,1	p=0,876
Diastol. Blutdruck (mm Hg)	77,4 ± 1,6	80,0 ± 2,2	p=0,351
Glukose (mg/dl)	87,5 ± 2,1	85,7 ± 2,9	p=0,609
GOT (U/l)	28,1 ± 1,6	25,4 ± 1,8	p=0,312
GPT (U/l)	29,2 ± 9,8	21,7 ± 9,3	p=0,035
CK (U/l)	149,3 ± 27,9	152,3 ± 46,0	p=0,955
Serum-Kreatinin (mg/dl)	0,87 ± 0,02	0,88 ± 0,05	p=0,723
CRP (mg/dl) *	1,15 (0,70-2,00)	0,75 (0,70-2,03)	p=0,390
Kreatininclearance	105,2 ± 4,4	105,6 ± 26,2	p=0,958
Raucheranteil	8,33 %	8,33%	p=1,0

*Mittelwert ± SEM, *Median (25.-75. Perzentile)*

Lipidwerte der Patienten und Probanden zu Beginn der Studie

In der hypercholesterinämischen Patientengruppe waren der Gesamtcholesterin-, der LDL- und der Triglyceridwert im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, der HDL-Wert war numerisch etwas niedriger, allerdings ohne statistische Signifikanz.

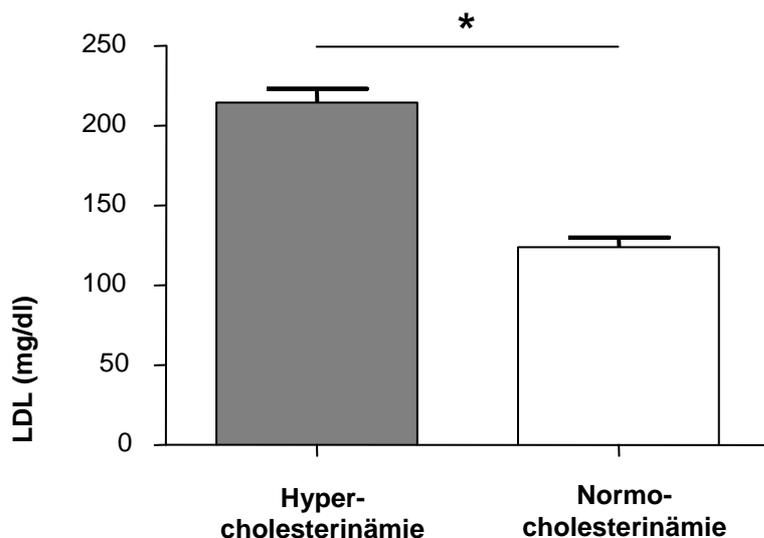


Abb. 14: Ausgangs-LDL-Werte der Patienten mit Hypercholesterinämie und der Kontrollgruppe, (Mittelwert ± SEM), $p < 0,001$

Tab. 4: Lipidwerte der hypercholesterinämischen Patienten vs. Probanden im Serum

	Hypercholesterinämie (n=24)	Normocholesterinämie (n=12)	Signifikanz
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	301,7 ± 10,3	204,4 ± 8,1	$p < 0,001$
LDL-Cholesterin (mg/dl)	216,3 ± 8,7	123,8 ± 6,1	$p < 0,001$
HDL-Cholesterin (mg/dl)	54,9 ± 2,6	61,1 ± 5,1	$p = 0,237$
Triglyceride (mg/dl)	153,5 ± 12,8	97,7 ± 10,8	$p = 0,008$

Mittelwert ± SEM

Prognosekriterien (Procām Score, Framingham Score und individuelles Risiko)

Die Tabelle 5 zeigt die Werte für den Framingham- und den Procāmscore. Die hypercholesterinämischen Patienten zeigten ein erhöhtes Risikoprofil im Vergleich zu den normocholesterinämischen Probanden bezüglich des Procāmscores.

Hierzu passend war der Framinghamscore im Vergleich zu der normocholesterinämischen Probandengruppe erhöht, jedoch nicht signifikant.

Das familiäre Risiko war ebenfalls in der hypercholesterinämischen Patientengruppe erhöht, unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Tab. 5: Framingham- und Procāmscore der hypercholesterinämischen Patienten vs. Probanden

	Hypercholesterinämie (n=24)	Normocholesterinämie (n=12)	Signifikanz
Framinghamscore	7,00 (2,25-13,75)	4,50 (1,25-9,50)	p=0,166
Procāmscore	7,20 (3,35-23,70)	2,85 (0,83-6,08)	p=0,011
Familiäres Risiko	37,5 %	8,3 %	p=0,06

Median (25.- 75. Perzentile)

Das „NO-System“ (L-Arginin-NO-Stoffwechsel und Gefäßfunktion)

¹⁵N- und ¹⁴N-Nitrat-Ausscheidung

Um die Enzymaktivität der NO-Synthase zu erfassen, wurde nach Verabreichen einer [¹⁵N₂]-markierten L-Arginin-Infusion die Anreicherung von ¹⁵N-Nitrat über 24 Stunden im Urin bestimmt.

Die ¹⁵N-Nitrat-Ausscheidung über den Urin war bei den hypercholesterinämischen Patienten signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe: ¹⁵N-Nitrat 6,80 µmol/24 h ± 0,49 vs. 9,64 µmol/ 24 h ± 1,44 (p=0,026).

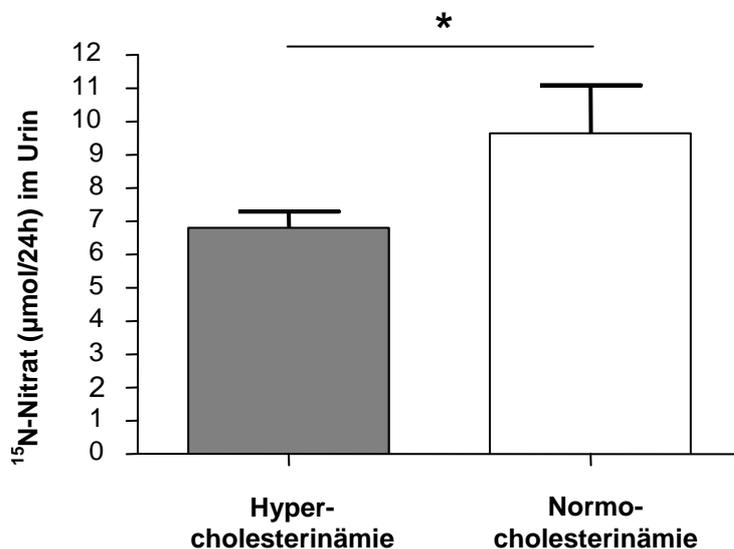


Abb. 15: Ausgangs-Werte der ¹⁵N-Nitrat-Ausscheidung bei Patienten mit Hypercholesterinämie und der Kontrollgruppe. (Mittelwert ± SEM), p=0,026

Die ¹⁴N-Nitrat-Ausscheidung hingegen unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen: ¹⁴N-Nitrat 1257,8 µmol/24 h ± 94,3 vs. 1320,2 µmol/24 h ± 133,6 (p=0,705) (siehe Abb. 16).

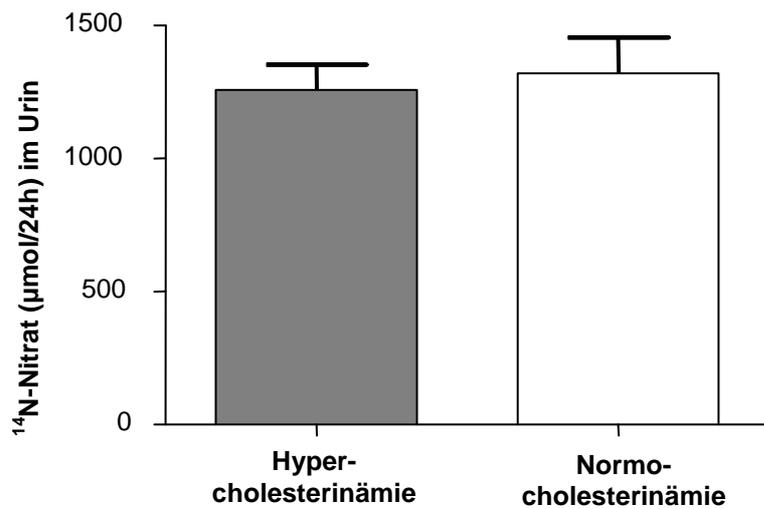


Abb. 16: Ausgangs-Werte der ¹⁴N-Nitrat-Ausscheidung bei Patienten mit Hypercholesterinämie und der Kontrollgruppe. (Mittelwert ± SEM), $p=0,705$

¹⁵N-L-Arginin im Plasma

Abbildung 17 zeigt den Verlauf der ¹⁵N-L-Argininwerte im Plasma nach der L-Arginin-Infusion. Hinsichtlich des Verlaufs der ¹⁵N-L-Argininkonzentrationen bestanden zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

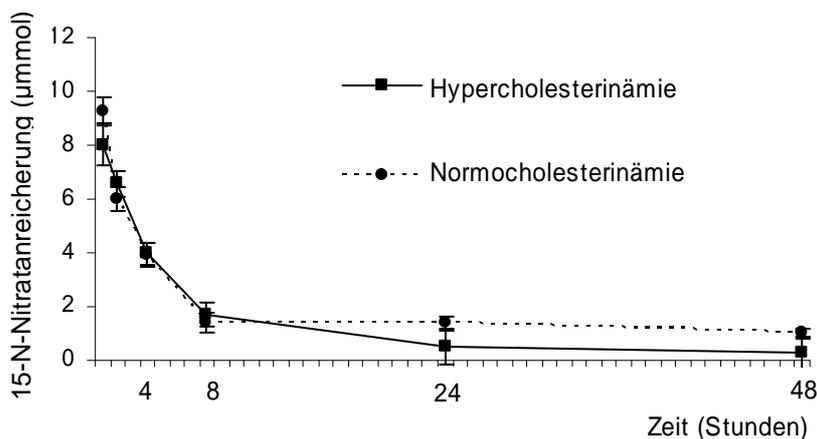


Abb. 17: Verlauf der ¹⁵N-L-Argininanreicherung im Plasma nach der L-Arginin-Infusion bei Patienten mit Hypercholesterinämie und der Kontrollgruppe. (Mittelwert ± SEM)

Tab. 6: ¹⁵N-L-Arginin-Anreicherung im Plasma der hypercholesterinämischen Patienten und der normocholesterinämischen Probanden nach Verabreichen der ¹⁵N-L-Arginin-Infusion

¹⁵ N-L-Arginin*	Hypercholesterinämie (n=24)	Normocholesterinämie (n=12)	Signifikanz
1 h	8,03 ± 0,77	9,26 ± 0,55	p=0,289
2 h	6,58 ± 0,48	5,96 ± 0,45	p=0,440
4 h	3,97 ± 0,42	3,93 ± 0,42	p=0,954
8 h	1,73 ± 0,43	1,39 ± 0,38	p=0,639
24 h	0,50 ± 0,64	1,41 ± 0,25	p=0,348
48 h	0,30 ± 0,60	1,01 ± 0,19	p=0,429

* Anreicherung (µmol)
Mittelwert ± SEM

Endothelabhängige und -unabhängige Vasodilatation

Die hypercholesterinämischen Patienten hatten eine signifikant reduzierte Endothelfunktion im Vergleich zu den normocholesterinämischen Probanden (endothelabhängige Vasodilatation 6,29 % ± 0,85 vs. 9,81 % ± 1,33; p=0,027).

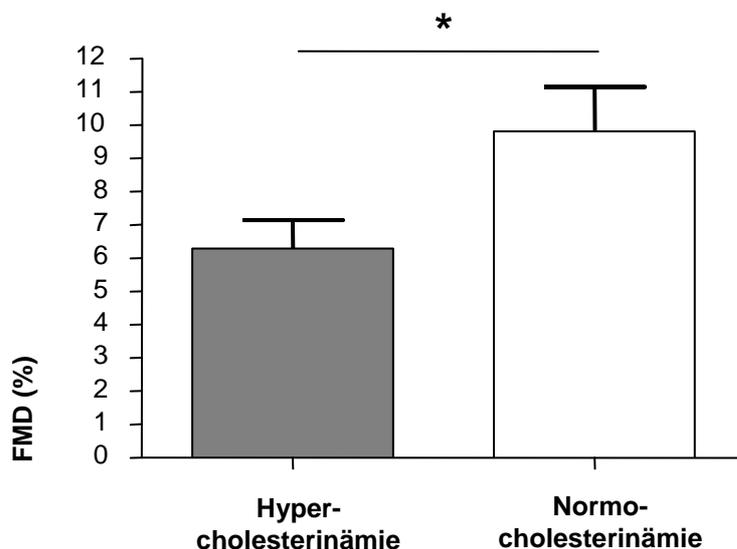


Abb. 18: Ausgangs-Werte der endothelabhängigen Vasodilatation (FMD) bei Patienten mit Hypercholesterinämie und der Kontrollgruppe. (Mittelwert ± SEM), p=0,027

Die endothelunabhängige Vasodilatation unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen (10,4 % \pm 0,9 vs. 10,5 % \pm 1,1; $p=0,924$).

Expression der eNOS

Die eNOS-Expression wurden durch Berechnung des Verhältnisses eNOS/ β -Tubulin quantifiziert.

Bei den hypercholesterinämischen Patienten war die Expression der eNOS im Vergleich zur Probandengruppe signifikant reduziert (Verhältnis eNOS/ β -Tubulin 0,37 \pm 0,04 vs. 0,59 \pm 0,04; $p=0,002$).

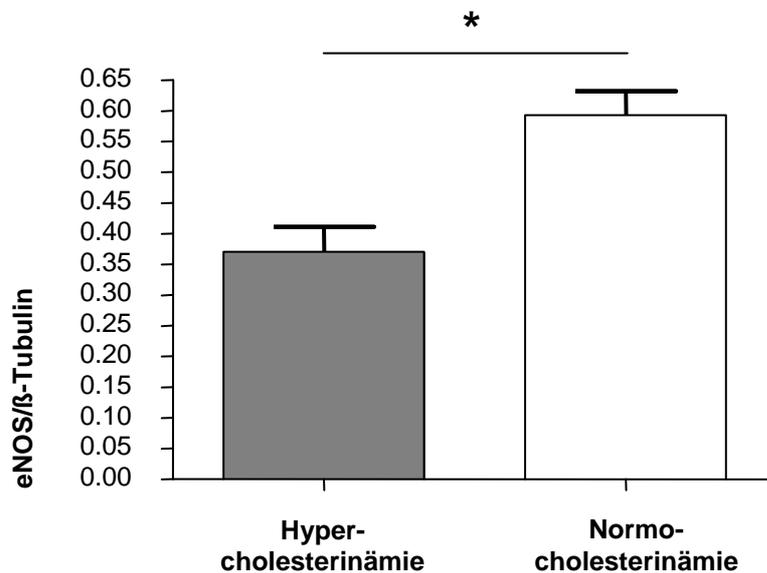


Abb. 19: eNOS-Expression; Ausgangs-Werte der Patienten mit Hypercholesterinämie und der Kontrollgruppe. Mittelwert \pm SEM, $p=0,002$

cGMP-Ausscheidung über den Urin

Die Urin-cGMP-Exkretion unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

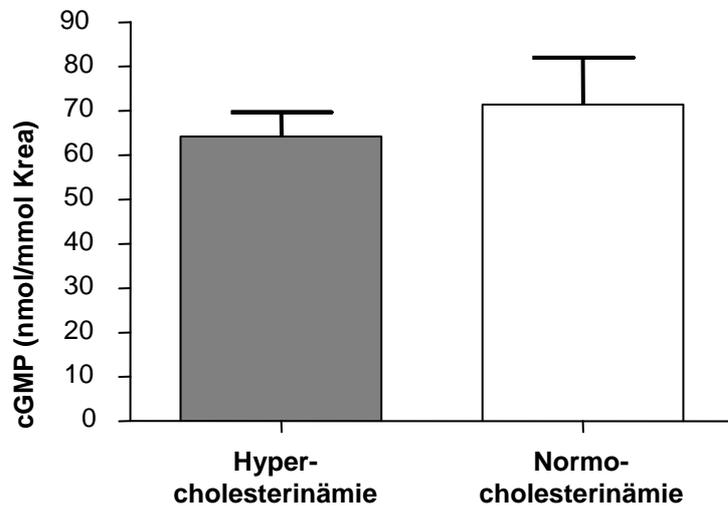


Abb. 20: cGMP-Konzentration im 24-Stunden-Sammelurin; Ausgangs-Werte der Patienten mit Hypercholesterinämie und der Kontrollgruppe. Mittelwert ± SEM, $p=0,504$

Tab. 7: Urin-cGMP-Exkretion der hypercholesterinämischen Patienten und der normocholesterinämischen Probanden

	Hypercholesterinämie (n=24)	Normocholesterinämie (n=12)	Signifikanz
cGMP-Exkretion*	64,2 ± 5,5	71,4 ± 10,6	$p=0,504$

Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes)

* bezogen auf die Kreatininkonzentration im Urin, (nmol/mmol Krea)

ADMA und ¹⁴-L-Arginin

Auch hinsichtlich der L-Arginin- und ADMA-Werte bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tab. 8: ADMA- und L-Arginin-Konzentration im Plasma der hypercholesterinämischen Patienten vs. Probanden im Serum

	Hypercholesterinämie (n=24)	Normocholesterinämie (n=12)	Signifikanz
ADMA (µmol/l)	0,62 ± 0,01	0,65 ± 0,02	p=0,164
L-Arginin (µmol/l)	68,3 ± 3,0	66,3 ± 4,4	p=0,709
L-Arginin/ADMA	110,8 ± 4,6	102,0 ± 6,0	p=0,265

Mittelwert ± SEM

5.2. Baselinevergleich der Patientengruppe mit Atorvastatinbehandlung und der Patienten, die Placebo erhielten (Tag 1)

Klinische Merkmale und Laborwerte zu Beginn der Studie

Bezüglich der Routinelaborparameter und der klinischen Befunde fanden sich keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Tabelle 9).

Tab. 9: *Demographie, Routinelaborparameter und klinische Befunde der mit Atorvastatin behandelten Patienten vs. Placebogruppe*

	Atorvastatin (n=12)	Placebo (n=12)	Signifikanz
Alter	58,9 ± 2,1	58,3 ± 1,4	p=0,821
Geschlecht (Anzahl) männlich/weiblich	6/12	6/12	p=0,895
Größe (cm)	170,7 ± 2,7	171,9 ± 2,4	p=0,736
Gewicht (kg)	70,5 ± 2,7	75,0 ± 4,1	p=0,370
BMI (kg/m ²)	24,2 ± 1,2	25,3 ± 0,5	p=0,405
Systol. Blutdruck (mmHg)	120,3 ± 3,2	131,7 ± 4,0	p=0,037
Diastol. Blutdruck (mmHg)	74,6 ± 6,6	80,3 ± 8,1	p=0,073
Glukose (mg/dl)	85,2 ± 3,4	89,3 ± 2,3	p=0,266
GOT (U/l)	30,1 ± 2,8	26,2 ± 1,7	p=0,240
GPT (U/l)	32,6 ± 3,7	25,8 ± 1,3	p=0,089
CK (U/l)	175,2 ± 185,3	123,5 ± 57,4	p=0,366
Serum-Kreatinin (mg/dl)	0,87 ± 0,03	0,87 ± 0,04	p=1,000
CRP (mg/dl) *	1,35 (0,70-2,83)	1,50 (0,70-2,38)	p=0,930
Kreatininclearance	107,0 ± 6,1	103,4 ± 6,6	p=0,691
Raucheranteil	0 %	16,7 %	p=0,336

*Mittelwert ± SEM, *Median (25.-75. Perzentile)*

Lipidwerte der Atorvastatin- und der Placebogruppe zu Beginn der Studie

Wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich, waren das Gesamtcholesterin, das LDL-Cholesterin und die Triglyceride der Placebogruppe etwas geringer als die der Atorvastatingruppe, jedoch nicht signifikant.

Das HDL-Cholesterin der Placebogruppe war ebenfalls etwas niedriger.

Tab. 10: *Lipidwerte der mit Atorvastatin behandelten Patienten vs. Placebogruppe im Serum*

	Atorvastatin (n=12)	Placebo (n=12)	Signifikanz
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	319,8 ± 17,5	283,6 ± 8,7	p=0,078
LDL-Cholesterin (mg/dl)	230,5 ± 15,6	202,0 ± 6,0	p=0,102
HDL-Cholesterin (mg/dl)	59,2 ± 3,3	50,6 ± 3,8	p=0,103
Triglyceride (mg/dl)	151,8 ± 20,3	155,2 ± 16,6	p=0,900

Mittelwert ± SEM

Prognosekriterien (Procamscore, Framingham Score und individuelles Risiko)

Der Framingham- und Procamscore unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen, waren jedoch beide in der Placebogruppe höher als in der Atorvastatingruppe.

Bezüglich des familiären Risikos bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen (siehe Tabelle 11).

Tab. 11: *Framingham- und Procamscore der mit Atorvastatin behandelten Patienten vs. Placebogruppe*

	Atorvastatin (n=12)	Placebo (n=12)	Signifikanz
Framinghamscore	6,00 (2,00-12,50)	7,50 (3,00-17,75)	p=0,257
Procamscore	6,00 (3,65-23,70)	8,95 (3,65-29,68)	p=0,603
Familiäres Risiko	33,3 %	41,7 %	p=0,165

Median (25.- 75.Perzentile)

Das NO-System (L-Arginin-NO-Stoffwechsel und Gefäßfunktion)

Wie aus der Tabelle 13 ersichtlich, bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des L-Arginin-NO-Stoffwechsels und der Endothelfunktion zwischen den Gruppen.

Tab. 12: *L-Arginin-NO stoffwechsel und Gefäßfunktion. Ausgangswerte der mit Atorvastatin behandelten Patienten vs. Placebogruppe*

	Atorvastatin (n=12)	Placebo (n=12)	Signifikanz
¹⁵ N-Nitrat-Ausscheidung (µmol/ 24h)	6,47 ± 0,80	7,14 ± 0,59	p=0,509
FMD (%)	5,61 ± 1,41	6,98 ± 0,96	p=0,433
GTN (%)	5,27 ± 0,16	5,13 ± 0,21	p=0,597
eNOS/β-Tubulin	3,35 ± 0,062	3,39 ± 0,06	p=0,578
cGMP-Exkretion *	58,8 ± 4,8	69,1 ± 9,5	p=0,360
ADMA (µmol/l)	0,61 ± 0,01	0,62 ± 0,02	p=0,813
¹⁴ L-Arginin (µmol/l)	70,0 ± 4,2	66,6 ± 4,3	p=0,570
L-Arginin/ADMA	114,3 ± 6,9	107,3 ± 6,3	p=0,461

Mittelwert ± SEM,

FMD endothelabhängige Vasodilatation, GTN endothelunabhängige Vasodilatation

**bezogen auf die Kreatininkonzentration im Urin (nmol/mmol Krea)*

¹⁵N-L-Argininwerte

Abbildung 22 zeigt den Verlauf der ¹⁵N-L-Argininwerte im Plasma nach der L-Arginin-Infusion. Hinsichtlich des Verlaufs der ¹⁵N-L-Argininkonzentrationen bestanden zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

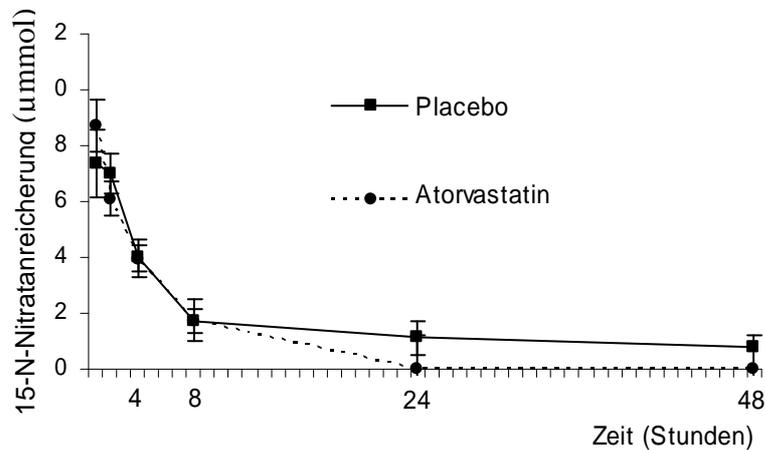


Abb. 22: Verlauf der ¹⁵N-L-Argininanreicherung im Plasma nach der L-Arginin-Infusion (Mittelwert ± SEM)

Tab. 13: ¹⁵N-L-Arginin-Anreicherung im Plasma der mit Atorvastatin behandelten Patienten und der Placebogruppe nach Verabreichen der ¹⁵N-L-Arginin-Infusion

¹⁵ N-L-Arginin*	Atorvastatin	Placebo	Signifikanz
1 h	8,74 ± 0,92	7,39 ± 1,21	p=0,395
2 h	6,09 ± 0,62	7,03 ± 0,72	p=0,339
4 h	3,96 ± 0,48	3,97 ± 0,69	p=0,989
8 h	1,73 ± 0,43	1,72 ± 0,75	p=0,995
24 h	0,00 ± 1,19	1,12 ± 0,59	p=0,326
48 h	0,00 ± 1,21	0,78 ± 0,32	p=0,411

* Anreicherung (µmol)
Mittelwert ± SEM

5.3. Therapieeffekte von Statinen im Vergleich zu Placebo bei Patienten mit Hypercholesterinämie

Lipidwerte

Unter der sechswöchigen Atorvastatinbehandlung kam es zu einer signifikanten Reduktion des Gesamtcholesterins um 57 %, des LDL-Cholesterins um 45 % und der Triglyceride um 57 %.

Bezüglich des HDL-Cholesterins war unter Atorvastatin lediglich ein positiver Trend feststellbar.

Placebo hatte auf alle genannten Werte keinen Einfluß (siehe Tabelle 9).

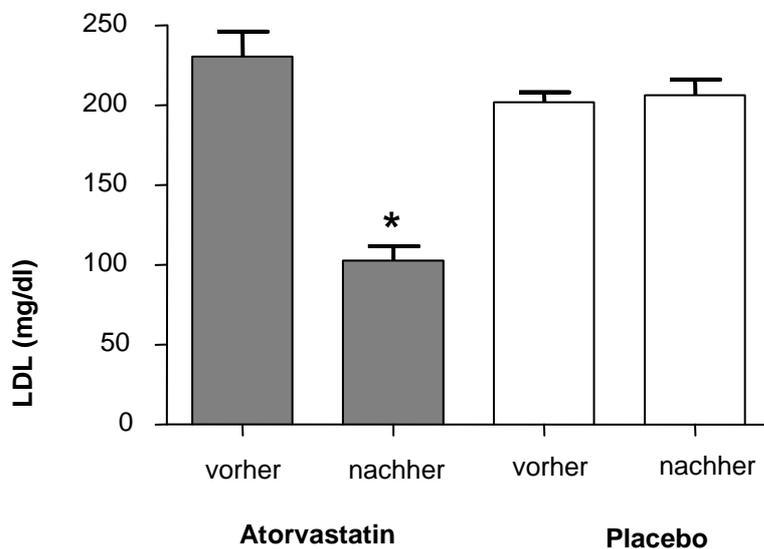


Abb. 21: LDL-Werte der Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme der Studienmedikation. (Mittelwert \pm SEM), $p < 0,001$ (Atorvastatin), $p = 0,625$ (Placebo)

Ergebnisse

Tab. 14: Lipidwerte der mit Atorvastatin behandelten Patienten (n=12) und der Placebogruppe (n=12) vor und nach sechswöchiger Einnahme der Medikation

Atorvastatin	vor	nach	Signifikanz
Gesamtcholesterin (mg/dl)	319,8 ± 17,5	182,2 ± 9,1	p<0,001
LDL (mg/dl)	230,5 ± 15,6	102,8 ± 9,1	p<0,001
HDL (mg/dl)	59,2 ± 3,34	62,3 ± 3,4	p=0,101
Triglyceride (mg/dl)	151,8 ± 20,3	86,5 ± 9,4	p=0,001
Placebo			
Gesamtcholesterin (mg/dl)	283,6 ± 8,7	289,2 ± 10,0	p=0,469
LDL (mg/dl)	202,0 ± 6,0	206,3 ± 10,0	p=0,625
HDL (mg/dl)	50,6 ± 3,8	51,4 ± 3,3	p=0,649
Triglyceride (mg/dl)	155,2 ± 16,6	158,3 ± 18,1	p=0,882

Mittelwert ± SEM

Routinelaborparameter

Unter der Atorvastatintherapie kam es zu einem geringen, aber signifikanten Anstieg der GPT. Die übrigen Routinelaborparameter veränderten sich weder unter Atorvastatin-, noch unter Placebothherapie signifikant (siehe Tabelle 15).

Tab. 15: Routinelaborparameter der Patienten vor und nach sechswöchiger Einnahme der Medikation

Atorvastatin	vor	nach	Signifikanz
GOT (U/l)	30,1 ± 2,8	33,8 ± 2,8	p=0,147
GPT (U/l)	32,6 ± 3,6	43,5 ± 4,5	p=0,004
CK (U/l)	175,2 ± 53,5	155,7 ± 28,2	p=0,659
Placebo			
GOT (U/l)	26,2 ± 1,7	25,8 ± 1,5	p=0,701
GPT (U/l)	25,8 ± 1,3	27,5 ± 1,3	p=0,530
CK (U/l)	123,5 ± 16,6	112,5 ± 11,9	p=0,287

Mittelwert ± SEM

NO-Synthese in vivo

Weder Atorvastatin ($6,47 \mu\text{mol} \pm 2,77$ vs. $7,19 \mu\text{mol} \pm 4,05$; $p=0,423$) noch Placebo ($7,14 \mu\text{mol} \pm 2,05$ vs. $7,39 \mu\text{mol} \pm 4,51$; $p= 0,846$) hatten einen signifikanten Einfluß auf die ^{15}N -Nitrat-Ausscheidung.

Eine intrainividuelle Korrelation der ^{15}N -Nitrat-Ausscheidung ($r=0,489$, $p=0,015$) konnte unabhängig von der Therapiegruppe nachgewiesen werden.

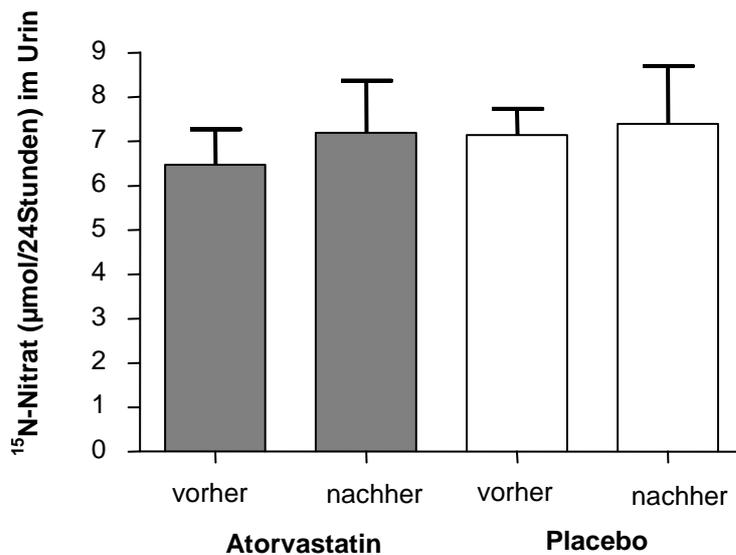


Abb. 23: Gesamtausscheidung von ^{15}N -Nitrat in 24 Stunden bei Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme von Atorvastatin/ Placebo. Mittelwert \pm SEM, $p=0,423$ (Atorvastatin) und $p= 0,846$ (Placebo)

Die unspezifische ^{14}N -Nitrat-Ausscheidung blieb sowohl unter Atorvastatin ($1264,4 \mu\text{mol}/24 \text{ h} \pm 170,6$ vs. $1196,1 \mu\text{mol}/24 \text{ h} \pm 128,32$; $p=0,772$), als auch unter Placebo ($1251,3 \mu\text{mol}/24 \text{ h} \pm 90,0$ vs. $1251,2 \mu\text{mol}/24 \text{ h} \pm 107,98$; $p=0,999$) unverändert (siehe Abb. 24).

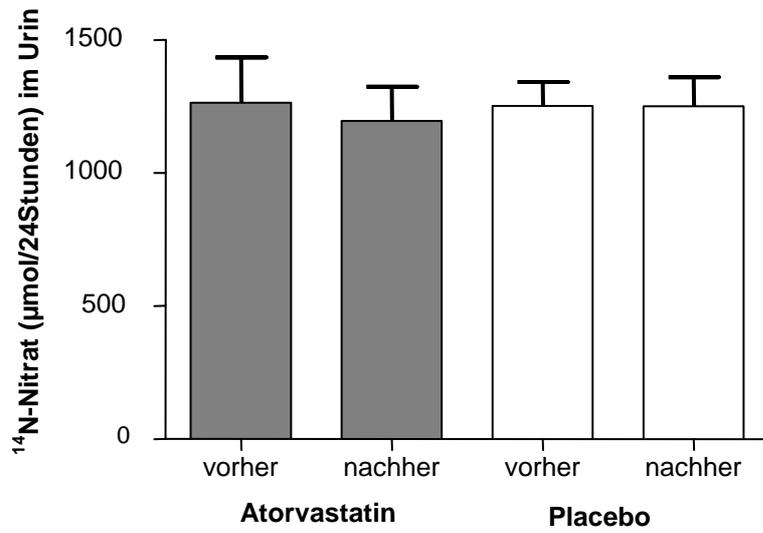


Abb. 24: Gesamtausscheidung von ^{14}N -Nitrat in 24 Stunden bei Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme von Atorvastatin/ Placebo. Mittelwert \pm SEM

Endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatation

Unter Atorvastatin kam es zu einem leichten, aber signifikanten Anstieg der endothelabhängigen Vasodilatation von 6,04 % ± 1,47 auf 8,87 % ± 1,15 (p=0,033).

Placebo hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Vasodilatation (von 7,01 % ± 1,05 auf 7,66 % ± 1,29; p=0,565).

Es fand sich intraindividuell eine Korrelation unabhängig von der Therapiegruppe (r=0,569, p=0,006).

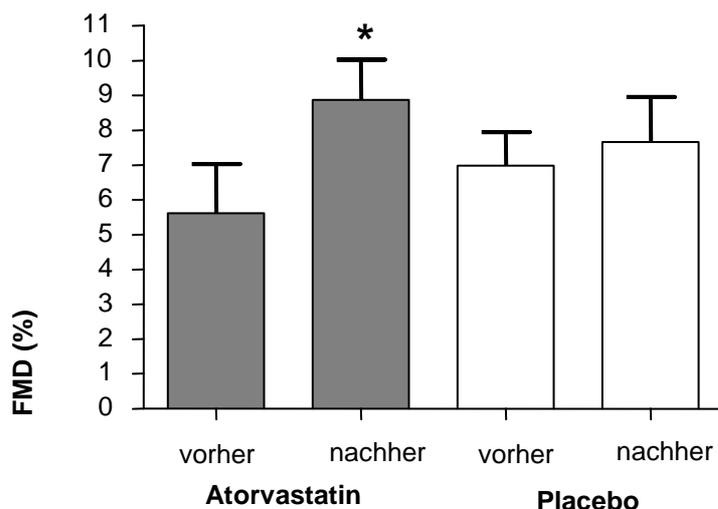


Abb. 25: endothelabhängige Vasodilatation bei Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme von Atorvastatin/ Placebo. Mittelwert ± SEM, p=0,033 (Atorvastatin, p=0,565 (Placebo)

Die endothelunabhängige Vasodilatation blieb sowohl unter Atorvastatin, als auch unter Placebo unverändert (siehe Tabelle).

Tab. 16: Endothelunabhängige Vasodilatation bei Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme von Atorvastatin/ Placebo

Atorvastatin	vor	nach	Signifikanz
GTN (%)	10,9 ± 1,4	10,6 ± 1,6	p=0,825
Placebo			
GTN (%)	10,3 ± 1,4	10,2±1,1	p=0,967

Mittelwert ± SEM,
GTN Endothelunabhängige Vasodilatation

Expression der eNOS

Weder Atorvastatin, noch Placebo bewirkten eine signifikante Änderung der eNOS-Expression in Thrombozyten.

Eine intraindividuelle Korrelation der eNOS-Expression ($r=0,699$, $p<0,001$) konnte unabhängig von der Therapiegruppe nachgewiesen werden.

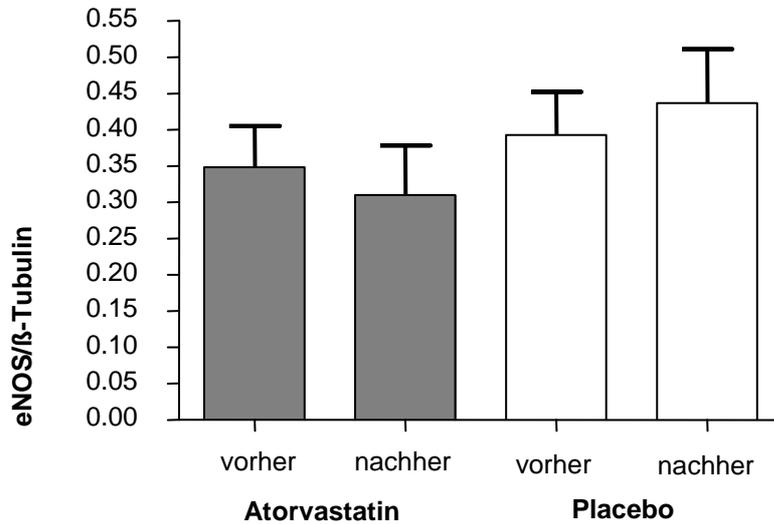


Abb. 26: eNOS-Expression bei Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme von Atorvastatin/ Placebo. Mittelwert \pm SEM, $p=0,554$ (Atorvastatin) und $p=0,349$ (Placebo)

Tab. 17: eNOS-Expression bei Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme von Atorvastatin/ Placebo

Atorvastatin	vor	nach	Signifikanz
eNOS	0,35 \pm 0,06	0,31 \pm 0,07	$p=0,554$
Placebo			
eNOS	0,39 \pm 0,06	0,44 \pm 0,07	$p=0,349$

Mittelwert \pm SEM,
eNOS Verhältnis eNOS/ β -Tubulin

cGMP-Konzentration und -Exkretion im Urin

Sowohl unter Atorvastatin, als auch unter Placebo blieb die Urin-cGMP-Exkretion unverändert (siehe Tabelle 18).

Unabhängig von der Therapiegruppe bestand eine intraindividuelle Korrelation der Urin-cGMP-Exkretion ($r=0,472$, $p=0,035$).

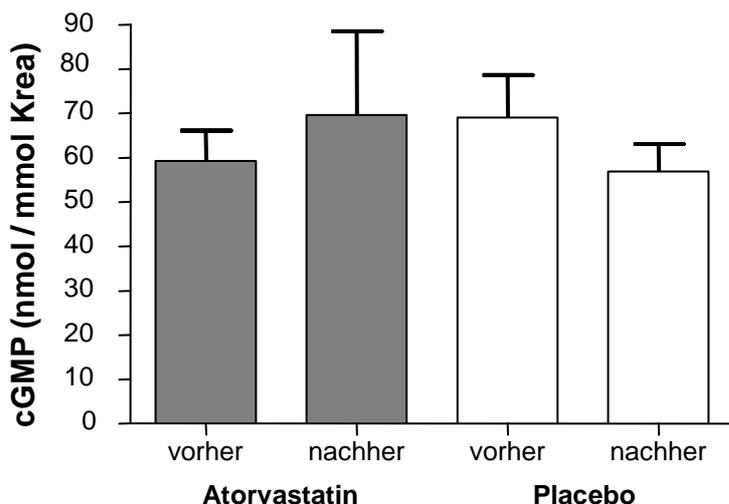


Abb. 27: cGMP im Urin bei Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme von Atorvastatin/ Placebo. Mittelwert \pm SEM, $p=0,538$ (Atorvastatin) und $p=0,115$ (Placebo)

Tab. 18: cGMP-Urin-Konzentration und -Exkretion bei Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme von Atorvastatin/ Placebo

Atorvastatin	vor	nach	Signifikanz
cGMP-Exkretion*	59,2 \pm 6,8	69,5 \pm 18,9	$p=0,538$
Placebo			
cGMP-Exkretion*	69,1 \pm 9,5	56,9 \pm 6,2	$p=0,115$

Mittelwert \pm SEM

*bezogen auf die Kreatininkonzentration im Urin, (nmol/mmol Krea)

ADMA- und ¹⁴-L-Arginin-Konzentration im Plasma

Weder Atorvastatin, noch Placebo bewirkten eine signifikante Änderung der ADMA-, oder L-Arginin-Konzentration.

Unabhängig von der Therapiegruppe bestand eine intraindividuelle Korrelation bei der L-Arginin- ($r=0,671$, $p<0,001$), sowie der ADMA-Konzentration ($r=0,710$, $p<0,001$).

Tab. 19: ADMA- und L-Arginin-Konzentration im Plasma bei Patienten mit Hypercholesterinämie vor und nach sechswöchiger Einnahme von Atorvastatin/ Placebo

Atorvastatin	vor	nach	Signifikanz
ADMA (µmol/l)	0,61 ± 0,01	0,60 ± 0,02	p=0,423
¹⁴ -L-Arginin (µmol/l)	70,0 ± 4,2	69,2 ± 4,5	p=0,803
L-Arginin/ADMA	114,3 ± 6,9	114,9 ± 7,1	p=0,905
Placebo			
ADMA (µmol/l)	0,62 ± 0,02	0,63 ± 0,02	p=0,164
¹⁴ -L-Arginin (µmol/l)	66,6 ± 4,3	65,8 ± 2,9	p=0,822
L-Arginin/ADMA	107,3 ± 6,3	106,1 ± 5,5	p=0,750

Mittelwert ± SEM

6. Diskussion

Die entscheidenden Ergebnisse der Studie waren:

- (1) Eine Hypercholesterinämie war in dem vorliegenden Patientenkollektiv mit einer reduzierten endothelabhängigen Vasodilatation, einer geringeren eNOS-Expression, sowie einer reduzierten ¹⁵N-Nitrat- und cGMP-Exkretion im Urin assoziiert.

- (2) Durch eine sechswöchige Atorvastatintherapie (40 mg pro Tag) verbesserte sich die endothelabhängige Vasodilatation leicht. Es waren jedoch keine signifikanten Effekte auf die eNOS-Expression, die Nitrat- oder cGMP-Bildung oder die Plasma ADMA Konzentration nachweisbar.

6.1. Hypercholesterinämie und NO-Stoffwechsel

Endothelfunktion und NO-Synthese bei Hypercholesterinämie

In mehreren kontrollierten klinischen Studien konnte zuvor bereits eine Assoziation zwischen erhöhten Cholesterinwerten und einer reduzierten Endothelfunktion bei Patienten mit Hypercholesterinämie nachgewiesen werden (Creager et al. 1990, Chowienczyk et al. 1992, Casino et al. 1995, Perticone et al. 1999, O'Driscoll et al. 1997, Simons et al. 1998).

Als möglicher Mechanismus, über den eine Hypercholesterinämie die physiologische Funktion des Endothels beeinträchtigt, kommt unter anderem eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit infrage (Cooke et al. 1991, Casino et al. 1993, Hornig et al. 1998).

In einer Studie von Casino et al. 1993 kam es bei hypercholesterinämischen Patienten nach Verabreichung des NO-Synthase-Inhibitors L-NMMA zu keiner signifikanten Reduktion der endothelabhängigen Vasodilatation, was auf eine deutlich reduzierte NO-Freisetzung zurückgeführt wurde, die durch L-NMMA entsprechend nicht mehr weiter reduziert werden konnte (John et al. 2000).

Die Arbeitsgruppe um Sun et al. zeigte jedoch bei sogenannten „eNOS-Knockout-Mäusen“, denen die NO-Synthase fehlt, dass es als Antwort auf eine reaktive Hyperämie weiterhin zur Vasodilatation kommen kann, was auf die Wirkung von Prostaglandinen zurückgeführt wurde (Sun et al. 1999).

Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die Endothelfunktion nicht allein durch die NO-Bildung bestimmt wird. Der Gefäßtonus resultiert aus einem Zusammenspiel von vasodilatierenden und vasokonstriktorisches Mediatoren. Weitere vasodilatierende Botenstoffe sind die Prostaglandine (PG I₂, D₂ und E₂), die durch die Cyclooxygenase gebildet werden, sowie der endotheliale hyperpolarisierende Faktor (EDHF = Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor), der über eine Modulation der Kalium-Kanäle der Plasmamembran interagiert.

Als Vasokonstriktoren wirken Angiotensin II und Adrenalin, sowie Endothelin-1 und vasokonstriktorisches wirkende Prostaglandine (Thromboxan A₂, Prostaglandin H₂ und Prostaglandin F_{2α}).

Die vorliegende Studie zeigte in Übereinstimmung mit den vorangehenden Ergebnissen, dass bei Hypercholesterinämie im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl

eine reduzierte Endothelfunktion, als auch eine verminderte NO-Synthese (^{15}N -Nitratausscheidung) vorliegt.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Vermutung, dass die endotheliale Dysfunktion in großen Teilen auf eine reduzierte NO-Synthese zurückzuführen ist.

Offen bleibt jedoch weiter die Frage, auf welchen genauen Mechanismus eine reduzierte NO-Verfügbarkeit bei endothelialer Dysfunktion in vivo zurückzuführen ist (Hornig et al. 1998, John et al. 2000).

Als Ursache der reduzierten NO-Verfügbarkeit sind zahlreiche mögliche Mechanismen beschrieben worden. Die relative Wertigkeit dieser Pathomechanismen wurde bisher aber nur unvollständig untersucht.

Folgende Ursachen können für eine reduzierte NO-Aktivität ausschlaggebend sein (Böger et al. 1996):

- Verminderte NO-Synthese durch verminderte NO-Synthase-Expression (Jessup et al. 1996, Rosenkranz-Weiss et al. 1994), reduzierte L-Arginin-Verfügbarkeit oder Akkumulation endogener Inhibitoren (ADMA) (Böger et al. 1996)
- Erhöhter oxidativer Abbau von NO durch oxidiertes LDL (Simon et al. 1990, Plane et al. 1992) oder Superoxid-Radikale (O_2^-) (Ignarro et al. 1990, Huie et al. 1993)
- Verminderte Guanylatzyklasestimulation durch NO (Guerra et al. 1989)
- Überwiegen der Vasokonstriktoren in arteriosklerotischen Gefäßen (O_2^- Radikale, Thromboxan A_2 , zyklische Endoperoxide, Endothelin-1) (Kato et al. 1990, Tanner et al. 1993, Consentino et al. 1994)

Die ^{14}N -Nitrat-Ausscheidung als weiterer Parameter der NO-Synthese unterschied sich nicht zwischen hyper- und normocholesterinämischen Patienten, ist aber auch ein sehr unspezifischer Parameter zur Beurteilung der NO-Synthese (siehe 6.3.).

eNOS-Expression

Eine mögliche zugrunde liegende Ursache für die reduzierte NO-Verfügbarkeit ist eine verminderte Expression der eNOS (Jessup et al. 1996, Rosenkranz-Weiss et al. 1994). Diese ist in der vorliegenden Studie in Thrombozyten quantifiziert worden.

Die bisher publizierten Daten bezüglich der eNOS-Expression sind sehr uneinheitlich. Hierbei ist sicherlich auch zu beachten, dass die eNOS-Expression in unterschiedlichen Geweben (Thrombozyten, Endothel, Herzklappen) untersucht wurde.

Es gibt Studien, die darauf hinweisen, dass die Expression der eNOS in Gefäßen bei Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie und Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Nikotinabusus und arterieller Hypertonie – abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung- sogar eher erhöht als erniedrigt ist (Li et al. 2002). Dabei ist eine Erhöhung oft sinnlos und geht mit einer geringeren Menge an biologisch aktivem NO einher.

Andere Daten dagegen zeigten einen Rückgang der eNOS-Expression bei erhöhtem LDL-Cholesterin (Vidal et al. 1998, Martínez-González et al. 2001).

In weiteren Studien konnte dagegen an arteriosklerotischen Tieren eine unveränderte oder kaum reduzierte eNOS-Expression trotz einer verminderten NO-Verfügbarkeit (Kanazawa et al. 1996, d'Uscio et al. 2001) gezeigt werden.

Auch in der vorliegenden Studie war die eNOS-Expression der hypercholesterinämischen Patienten im Vergleich zu den normocholesterinämischen Probanden signifikant erniedrigt.

Dieses könnte darauf schließen lassen, dass eine bei Hypercholesterinämie verminderte NO-Verfügbarkeit in vivo unter anderem durch eine reduzierte eNOS-Expression hervorgerufen wird, wobei der simple Vergleich zweier Patientengruppen natürlich keinen formellen Kausalitätsbeweis erlaubt.

cGMP-Ausscheidung

Kürzlich konnte in einer großen klinischen Studie (788 Männer und 753 Frauen) eine umgekehrte Korrelation zwischen dem Cholesterinspiegel und der Urin-cGMP-Ausscheidung festgestellt werden (Cui et al. 2005).

Auch bei Patienten mit pAVK war die Urin-cGMP-Exkretionsrate im Gegensatz zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (Böger 1998), wobei die Exkretion vom Schweregrad der arteriellen Verschlusskrankheit abhängig war.

Im Tiermodell des cholesteringefütterten Kaninchens konnte ebenfalls eine signifikant reduzierte Urin-cGMP-Exkretion nachgewiesen werden (Szilvassy et al. 2001, Böger et al. 1997).

Im Einklang mit diesen vorangehenden Ergebnissen waren in der vorliegenden Studie die mittlere cGMP-Konzentration im 24-Stunden-Sammelurin, sowie die Urin-cGMP-Gesamtausscheidung bei den hypercholesterinämischen Patienten niedriger als bei den gesunden Probanden, was auf eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit hinweist. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

ADMA und L-Arginin

Erhöhte ADMA-Konzentrationen im Plasma oder eine verringerte L-Arginin-Konzentration, bzw. L-Arginin-ADMA-Ratio könnten mögliche Ursachen für eine reduzierte NO-Verfügbarkeit und somit eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation sein (Tsikas et al. 2000).

In einer kontrollierten klinischen Studie wurde beobachtet, dass erhöhte ADMA-Werte mit einer verringerten endothelabhängigen Vasodilatation und einer reduzierten Nitratausscheidung bei jungen Patienten mit Hypercholesterinämie assoziiert sind. Diese Tatsache wies auf eine verringerte NO-Synthese durch ADMA hin (Böger et al. 1998).

Ob eine Assoziation zwischen erhöhten ADMA- und Cholesterinwerten besteht, wird bisher kontrovers diskutiert.

In mehreren klinischen Studien wurden erhöhte ADMA-Werte im Plasma von hypercholesterinämischen Patienten gefunden (Böger et al. 1998, Chan et al. 2000), die sogar als zugrundeliegender Pathomechanismus von kardiovaskulären Risikofaktoren diskutiert wurden (Cooke 2004, Böger et al. 2000).

Andere klinische Studien hingegen konnten keine Assoziation zwischen den Cholesterin- und den Plasma-ADMA-Werten finden (Maas et al. 2006, Paiva et al. 2003, Miyazaki et al. 1999, Lu et al. 2004).

Auch in der vorliegenden Studie waren die ADMA-Konzentrationen im Plasma der hypercholesterinämischen Patienten nicht signifikant erhöht. Daher ist wahrscheinlich, dass ein erhöhter ADMA-Spiegel nicht alleinige Ursache für die reduzierte Endothelfunktion und NO-Synthese bei Hypercholesterinämie ist.

Eine verminderte Substratverfügbarkeit für die NO-Synthase scheint in dem vorliegenden Patientenkollektiv ebenfalls nicht ausschlaggebend zu sein, da keine signifikanten Unterschiede bezüglich der L-Arginin-Konzentration zwischen den Gruppen zu verzeichnen waren.

Endothelunabhängige Vasodilatation bei Hypercholesterinämie

Auch die Daten, die zur endothelunabhängigen Vasodilatation vorliegen, weichen voneinander ab.

In einer Studie von Chowiencyk et al. (1992) wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der endothelunabhängigen Vasodilatation zwischen hyper- und normocholesterinämischen Patienten gefunden. Daher konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, dass die reduzierte NO-vermittelte, endothelabhängige Vasodilatation bei hypercholesterinämischen Patienten auf eine gestörte Antwort der glatten Muskulatur auf NO oder auf eine strukturelle Veränderung der Gefäßwand zurückzuführen ist (John et al. 2000). Eine verminderte NO-Verfügbarkeit/Wirkung als Ursache ist somit wahrscheinlich, da diese durch die Gabe von Nitroglycerin, das direkt die Guanylatzyklase aktiviert, ausgeglichen werden kann und es so zu einer ungestörten Vasodilatation kommt.

In der vorliegenden Studie unterschied sich die endothelunabhängige Vasodilatation ebenfalls nicht signifikant zwischen hyper- und normocholesterinämischen Patienten.

Es gibt jedoch auch Hinweise dafür, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren die nitroglycerinabhängige Vasodilatation negativ beeinflussen. So zeigte eine große klinische Studie mit 317 Männern und 483 Frauen, dass ein erhöhtes Cholesterin, Nikotinabusus, Diabetes Mellitus, Alter und männliches Geschlecht mit einer reduzierten nitroglycerinabhängigen Vasodilatation assoziiert sind (Adams et al. 1998).

Im Einklang hiermit konnte bei männlichen Patienten mit KHK eine reduzierte nitroglycerinabhängige Vasodilatation der Brachialarterie nachgewiesen werden, so dass bei klinisch manifester Arteriosklerose im Sinne einer KHK schon von einer

Dysfunktion der glatten Muskelzellen ausgegangen werden kann (Raitakari et al. 2001). Unterstützt wird diese Hypothese durch eine experimentelle Studie, die eine abgeschwächte Reaktion auf NO in Arterien von arteriosklerotischen Kaninchen zeigte (Verbeuren et al. 1990).

Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv könnte die ungestörte endothelunabhängige Vasodilatation somit ein Hinweis darauf sein, daß noch keine strukturellen Veränderungen der Gefäßwand vorlagen, was dafür spricht, daß es gelungen ist, Patienten lediglich mit Hypercholesterinämie aber ohne signifikante Gefäßveränderungen bzw. koronare Herzkrankheit in die Studie einzuschließen.

6.2. Effekte der Atorvastatintherapie

Lipidwerte

Die Senkung des LDL-Cholesterins entsprach den bei dieser Atorvastatin-Dosierung erwarteten Werten (Lea et al. 1997). In Studien, die den Einfluß unterschiedlicher Dosierungen von Atorvastatin auf die Lipidwerte untersuchten, senkte Atorvastatin im Gegensatz zu Placebo signifikant und dosisabhängig den Gesamtcholesterinspiegel, den LDL-Spiegel und die Triglyceride (Gmerek et al. 1996, Nawrocki et al. 1995, Heinonen et al. 1996). Der Einfluß von Atorvastatin auf den HDL-Spiegel war sehr unterschiedlich (siehe Tab. 17)

Tab. 20: Veränderungen der Lipidwerte unter Atorvastatin (verglichen mit Placebo) in unterschiedlichen Studien

	Dauer (Wo)	Dosierung (mg)	Gesamt- Cholesterin- senkung (%)	LDL- senkung (%)	Triglycerid- senkung (%)	HDL- senkung/- steigerung (%)
1.	26	10	26	35	21	1↓
2.	6	10-80	29-45	37-59	27-45	nb
3.	6	2,5-80	17-46	25-61	10-27	5↑-3↓
4.	6	40	43	55	43	5 ns

1. Heinonen et al. 1996

2. Gmerek et al. 1996

3. Nawrocki et al. 1995

4. Vorliegende Studie

nb nicht berichtet

ns nicht signifikant

Endothelfunktion und NO-Synthese unter Atorvastatin

Da eine Hypercholesterinämie mit einer endothelialen Dysfunktion einhergeht (siehe 6.1.), lag die Annahme nahe, dass eine Lipidsenkung zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führen würde.

Zum Einfluß von Statinen auf die Endothelfunktion liegen eher kontroverse Daten vor. Tendentiell scheinen die Statine jedoch eher eine Verbesserung der Endothelfunktion zu bewirken.

Eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation durch Statine bei Patienten mit Hypercholesterinämie konnte bereits in mehreren klinischen Studien nachgewiesen werden (John et al. 1998, Šebeštjen et al. 2002, Simons et al. 1998, Perticone et al. 2000). In diesen Studien wurden zur Cholesterinsenkung Fluvastatin (John et al. 1998), Simvastatin und Pravastatin (Šebeštjen et al. 2002), sowie Atorvastatin (Simons et al. 1998, Perticone et al. 2000) eingesetzt.

Der gleiche Effekt durch Statine konnte auch bei einem Patientenkollektiv mit Diabetes mellitus, sowie bei normocholesterinämischen Frauen in der Postmenopause gezeigt werden (Tsunekawa et al. 2001, Mercurio et al. 2002).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht die in der Ultraschalluntersuchung gezeigte leichte Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation der vorliegenden Studie durch Atorvastatin.

Eine durch Statine bewirkte Zunahme der flussvermittelten Vasodilatation wurde zunächst hauptsächlich auf die Reduktion des Serum-Cholesterinwertes zurückgeführt.

1997 konnte beispielsweise bei Patienten mit Hypercholesterinämie durch eine LDL-Apherese eine Verbesserung der Endothelfunktion erreicht werden (Tamai et al. 1997). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass eine cholesterinsenkende Therapie einen größeren Einfluß auf die Endothelfunktion hat, wenn die Lipidwerte vorher sehr hoch waren (Vita et al. 2000).

Mehrere klinische Studien ließen an dieser Vermutung jedoch Zweifel aufkommen (O'Driscoll et al. 1997, Treasure et al. 1995). In diesen Studien konnte durch eine Statintherapie eine Verbesserung der Endothelfunktion erreicht werden, bevor es zu einer signifikanten Reduktion des Serum-Cholesterinspiegels gekommen war. Daraus wurde geschlossen, dass für die verbesserte Endothelfunktion vor allem andere pleiotrope Mechanismen, die über die Lipidsenkung hinausgehen, verantwortlich sind. Unterstützt wird diese These durch eine Studie von Omori et al. 2002, in der es bei normocholesterinämischen Patienten nach einer einzigen Applikation von Cerivastatin zu einer Verbesserung der Endothelfunktion kam.

In weiteren klinischen Studien korrelierte die durch Statine erreichte Verbesserung der Endothelfunktion nicht mit der Veränderung der gemessenen Lipidparameter (Šebeštjen et al. 2002, O´Driscoll et al. 1997, Neunteufl et al. 1998).

Auch diese Tatsache könnte auf die Wirkung pleiotroper Effekte hinweisen.

Als eine mögliche Erklärung für die durch Statine verbesserte Endothelfunktion könnte eine erhöhte NO-Verfügbarkeit infrage kommen.

John et al. konnten (1998) nachweisen, dass die durch Fluvastatin verbesserte Endothelfunktion fast vollständig durch gleichzeitige Infusion des NO-Synthase-Inhibitors L-NMMA aufgehoben werden kann. Das spricht dafür, dass die Zunahme der endothelabhängigen Vasodilatation durch eine erhöhte NO-Verfügbarkeit verursacht wird, die durch die Behandlung mit Fluvastatin erreicht wurde.

In vitro konnte gezeigt werden, dass Statine auch in Abwesenheit von LDL-Cholesterin die Verfügbarkeit von NO über die Genexpression der endothelialen Isoform der NO-Synthetase ansteigen lassen, sowie eine Stabilisierung der mRNA erhöhen (Laufs et al. 1998).

In der vorliegenden Studie zeigten sich unter der Therapie mit Atorvastatin eine leicht, jedoch nicht signifikant erhöhte NO-Syntheserate (¹⁵N-Nitrat Ausscheidung), so dass davon auszugehen ist, dass der Effekt von Atorvastatin auf die NO Synthese in vivo eher gering ist. Wie bereits in 4.1. erwähnt, wird der Gefäßtonus über viele verschiedene Mediatoren reguliert, die hier ebenfalls Einfluß nehmen können.

Da in der vorliegenden Studie lediglich die basale NO-Syntheserate gemessen wurde, besteht immer noch die Möglichkeit, dass sich die stimulierte NO-Synthese unter Statintherapie stärker verändert als die basale.

Weiterhin unklar ist, ob die klinisch nachweisbare Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation durch Statine in vivo auf dem Mechanismus der gesteigerten Genexpression der NO-Synthetase beruht. In vitro und an Tieren wurden mehrere nicht lipidsenkende Effekte durch Statine nachgewiesen, die ebenfalls als Ursachen für die verbesserte endothelabhängige Vasodilatation infrage kommen (siehe 1.7.)

In anderen Studien konnte jedoch kein Effekt bezüglich der Endothelfunktion durch Statine erreicht werden (Maas et al. 2006, Vita et al. 2003).

Die Mechanismen, die durch Statine in vivo zu einer verbesserten NO-vermittelten Vasodilatation führen, scheinen somit komplexer zu sein, als bisher angenommen wurde.

eNOS-Expression

In der vorliegenden Studie bewirkte die Atorvastatintherapie keine signifikante Änderung der eNOS-Expression.

Die Arbeitsgruppe um Tannous et al. 1999 beschreibt nach einer einmonatigen Therapie mit Atorvastatin (10 mg/Tag) bei Patienten mit Hypercholesterinämie eine gesteigerte eNOS-Expression in Thrombozyten. Tannous et al. schlossen allerdings Patienten mit Hypertonie und KHK nicht aus, so dass insgesamt eine schlechtere Ausgangslage bezüglich der eNOS-Expression bestand, die die Wahrscheinlichkeit für signifikante Ergebnisse erhöhte. Eine detaillierte Interpretation der Ergebnisse ist nur begrenzt möglich, da die eNOS-Expression nicht durch Berechnung des Verhältnisses der eNOS mit einem Standardprotein wie dem β -Tubulin quantifiziert wurde.

Auch bei Mäusen (Laufs et al. 2000, Endres et al. 1998), sowie in vitro wurde bereits eine erhöhte eNOS-Expression durch Atorvastatin (Laufs et al. 1998, Laufs et al. 1999, Hernandez-Perera et al. 1998, Wassmann et al. 2001) und Simvastatin (Martínez-González et al. 2001) nachgewiesen, wobei ein Effekt in der Zellkultur bereits innerhalb von 24 – 48 Stunden zu verzeichnen war (Laufs et al. 1999).

Die Statindosierungen, die in der Studie von Laufs et al (2000) verwendet wurden, lagen allerdings 100- bis 1000fach über den bei Patienten üblichen Plasmakonzentrationen von Atorvastatin, die nach einmaliger Verabreichung (Posvar et al. 1996) oder bei einer Langzeittherapie mit Atorvastatin (Cilla et al. 1996) (10-50 nmol/l) erreicht werden.

Bei Mäusen waren beispielsweise signifikant erhöhte eNOS-mRNA-Konzentrationen in der Aorta und in Thrombozyten bei einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht zu beobachten. Eine Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht, die eher die übliche Dosierung am Menschen widerspiegelt, brachte jedoch keine signifikanten Veränderungen der eNOS-Expression (Laufs et al. 2000).

cGMP-Ausscheidung

Im Modell des cholesteringefütterten Kaninchens konnte kein signifikanter Einfluß von Lovastatin auf die Urin-cGMP-Ausscheidung festgestellt werden (Böger et al. 1997).

Diese Beobachtung wurde ebenfalls unter Atorvastatin bei einem Kollektiv von Patienten mit Diabetes mellitus Typ1 und Mikroalbuminurie gemacht. In dieser Studie wurde die cGMP-Konzentration im Plasma gemessen (Dogra et al. 2005).

Gleichermaßen hatte Atorvastatin in der vorliegenden Studie keinen signifikanten Einfluß auf die Urin-cGMP-Exkretion. Möglich wäre daher, dass Atorvastatin einen leichten Einfluß auf die NO-Synthese (¹⁵N-Nitratausscheidung) ausübt, ohne die Menge des biologisch aktiven NO zu beeinflussen.

ADMA

Da in mehreren klinischen Studien eine Assoziation zwischen erhöhten ADMA-Konzentrationen im Plasma und Hypercholesterinämie beschrieben worden war (Böger et al. 1998, Chan et al. 2000), lag die Vermutung nahe, dass eine cholesterinsenkende Therapie auch den Plasma-ADMA-Spiegel senken könnte (Paiva et al. 2003).

In Übereinstimmung mit dieser Vermutung konnte die Arbeitsgruppe um Lu et al. (2004) bei hypercholesterinämischen Patienten durch eine sechswöchige Medikation mit Rosuvastatin (10 mg/Tag) eine signifikante Reduktion der ADMA-Werte erreichen.

In weiteren klinischen Studien konnte jedoch durch eine Statintherapie trotz adäquater Lipidsenkung keine signifikante Senkung der ADMA-Werte bei hypercholesterinämischen Patienten erreicht werden (Paiva et al. 2002, Valkonen et al. 2003, Eid et al. 2003). In diesen Studien wurden Simvastatin, Atorvastatin und Pravastatin zur Cholesterinsenkung eingesetzt. Auch bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung wurden durch Cerivastatin keine Veränderungen der ADMA-Konzentration beobachtet (Maas et al. 2006).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen hatten sich in der vorliegenden Studie nach der sechswöchigen Atorvastatintherapie die ADMA-Werte ebenfalls nicht signifikant verändert. Da sich unter Atorvastatin die Endothelfunktion besserte, aber

die ADMA-Spiegel unverändert blieben, kommt eine Beeinflussung der Endothelfunktion durch Senkung der ADMA-Konzentrationen kaum infrage.

Endothelunabhängige Vasodilatation

In mehreren klinischen Studien konnte kein Einfluß von Statinen auf die endothelunabhängige Vasodilatation nachgewiesen werden (Vita et al. 2000, O'Driscoll et al. 1997, Treasure et al. 1995).

Dieses wurde in der vorliegenden Studie bestätigt. Daher ist anzunehmen, dass eine kurzfristige Therapie mit Atorvastatin die Wandstruktur der Gefäße nicht verändert (John et al. 1998).

Allerdings berichten Šebeštjen et al. (2002), dass es bei männlichen Patienten mit Hypercholesterinämie unter einer sechswöchigen Therapie sowohl mit Simvastatin, als auch mit Pravastatin bei einer Dosierung von jeweils 10 mg/Tag zu einer unerwarteten, signifikanten Verbesserung der endothelunabhängigen Vasodilatation kam. Eine Erklärung hierfür wurde von den Autoren allerdings nicht gefunden.

6.3. Eignung und Einschränkungen der verwendeten Methodik

Im Gegensatz zu allen vorangehenden Untersuchungen, in denen eine gestörte NO-Verfügbarkeit nur indirekt (fehlende L-NMMA-Wirkung und gestörte Endothelfunktion) oder unspezifisch (^{14}N -Nitrat Ausscheidung, cGMP-Ausscheidung) nachgewiesen werden konnte, wurde in der vorliegenden Studie mittels stabiler Isotopentechnik die reduzierte NO-Synthese in vivo erstmals direkt und spezifisch anhand der Urin- ^{15}N -Nitrat-Ausscheidung nachgewiesen. Ein solcher direkter Nachweis einer NO-Synthesestörung mittels stabiler Isotopentechnik lag bisher nur für Patienten mit arterieller Hypertonie vor (Forte et al. 1997).

Zusätzlich wurden in der vorliegenden Studie erstmals der gesamte Stoffwechselweg von der eNOS-Expression über die NO-Synthese bis hin zu NO vermittelten Wirkungen (cGMP-Synthese und endothelabhängiger Vasodilatation) in vivo untersucht, während in vorangehenden Studien lediglich einzelne Parameter isoliert betrachtet wurden.

Einschränkend muß gesagt werden, dass über die Messung des ^{15}N -Nitrat und der eNOS nicht auf den genauen NO-Syntheseort geschlossen werden kann. In der vorliegenden Studie wurde die eNOS aus Thrombozyten isoliert. Andere Zellen und Gewebe, in denen die eNOS vorkommt, sowie nicht berücksichtigt. Hierzu zählen die Erythrozyten (Kleinbongard et al. 2006), die Endothelzellen, sowie Hippocampus, Leber, Lunge und der Gastrointestinaltrakt (Randriamboavonjy et al. 2005).

Die Regulation der eNOS in Thrombozyten oder deren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, könnte sich allerdings von der in Endothelzellen unterscheiden (Randriamboavonjy et al. 2005).

Außerdem wurden die anderen Isoenzyme der NO-Synthase, die ebenfalls an der NO-Bildung beteiligt, aber bei Hypercholesterinämie nicht verändert exprimiert sind, nicht in die Messung miteinbezogen.

Bezüglich der cGMP- und ^{14}N -Nitrat-Ausscheidung muß eingeräumt werden, daß weder die cGMP-, noch die ^{14}N -Nitrat Ausscheidung sehr spezifische Parameter zur Quantifizierung der eNOS-Aktivität sind.

Die ^{14}N -Nitrat Ausscheidung über den Urin spiegelt die endogene NO-Bildungsrate wider, unabhängig davon, ob das als Nitrat gemessene NO biologisch aktiv war oder zuvor inaktiviert wurde (Böger et al. 1996b, Böger 1998, Bode-Böger 1998).

Die ^{14}N -Nitrat Ausscheidung wird durch die mit der Nahrung zugeführte Nitratmenge beeinflusst. Der $^{14}\text{NO}_3^-$ -Anteil in der Nahrung variiert sehr stark und nimmt dadurch Einfluß auf die Urin- $^{14}\text{NO}_3^-$ -Exkretionsrate (Granger et al 1991, Green et al. 1981).

Nur der Anteil von NO, der durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase biologisch aktiv ist, bewirkt auch einen Anstieg des cGMP im Urin (Böger et al. 1997). Trotzdem ist cGMP ein sehr unspezifischer Marker für die biologische Aktivität des NO, da es auch durch andere Botenstoffe, wie z.B. natriuretische Peptide zur Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und somit zum Anstieg von cGMP in extrazellulären Flüssigkeiten und im Urin (Hamet et al. 1989) kommt. Außerdem ist die cGMP-Konzentration abhängig von der Phosphodiesteraseaktivität.

Zudem sind beide Parameter von der Nierenfunktion abhängig. Werden die Urin-cGMP- und Urin-Nitrat-Konzentration jedoch in Verhältnis zum Kreatinin gesetzt, kann von der cGMP-/ 14 -Nitrat-Konzentration unabhängig von der Nierenfunktion auf die NO-Syntheserate geschlossen werden (Böger et al. 1996)

In der vorliegenden Studie unterschied sich die Kreatininclearance nicht signifikant zwischen den Gruppen, so dass bezüglich der Nitrat-Gesamtausscheidung kein Einfluß der Nierenfunktion zu erwarten war.

7. Zusammenfassung

Eine Hypercholesterinämie geht mit einer gestörten Endothelfunktion einher, die möglicherweise durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit hervorgerufen wird.

Durch die Einnahme von Statinen kommt es zu einer Verbesserung der flussvermittelten Vasodilatation. Als eine Erklärung hierfür könnte eine erhöhte NO-Verfügbarkeit durch Statine infrage kommen.

Unklar ist bisher, über welchen molekularen Wirkmechanismus eine Hypercholesterinämie, beziehungsweise eine Therapie mit Atorvastatin die Endothelfunktion bzw. die NO-Verfügbarkeit in vivo beeinflussen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden doppelblinden, randomisierten, plazebokontrollierten Studie bei 24 hypercholesterinämischen Patienten der gesamte Stoffwechselweg von der eNOS-Expression über die NO-Synthese bis hin zu NO-vermittelten Wirkungen (cGMP-Synthese und endothelabhängige Vasodilatation (FMD)) vor und nach sechswöchiger Medikation mit Atorvastatin untersucht.

Die Endothelfunktion wurde mittels Ultraschall der A.brachialis gemessen. Die NO-Synthase-Aktivität wurde nach der Infusion von ¹⁵N-markiertem L-Arginin als ¹⁵N-Nitrat-Urin-Ausscheidung mittels GC/MS bestimmt. Die Baselinedaten wurden mit denen von zwölf normocholesterinämischen Probanden verglichen.

In der vorliegenden Studie konnte bei Patienten mit Hypercholesterinämie eine gestörte Endothelfunktion und eNOS-Aktivität (gemessen als ¹⁵N-Nitrat-Urin-Ausscheidung), sowie eine verminderten eNOS-Expression in vivo nachgewiesen werden.

Bei einer Dosierung von 40 mg/Tag führte Atorvastatin zu einer Verbesserung der flussvermittelten Vasodilatation. Auf die eNOS-Expression, sowie die NO-Synthase-Aktivität waren keine signifikanten Effekte durch Atorvastatin nachweisbar.

Die Plasma-Konzentration des endogenen NO-Inhibitors ADMA war nicht mit Veränderungen der NO-Synthese assoziiert und änderte sich unter Statintherapie nicht.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlußfolgern, daß für die gestörte Endothelfunktion bei Hypercholesterinämie eine verminderte eNOS-Expression, bzw. eNOS-Aktivität ursächlich sein könnten.

Für die verbesserte Endothelfunktion unter Atorvastatin scheint eine gesteigerte NO-Synthese aber nicht der allein ausschlaggebende Faktor zu sein.

8. Literatur

1. Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS (1998) Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 32(1):123-127
2. Aengevaeren WR (1999) Beyond lipids the role of of the endothelium in coronary artery disease. *Artherosclerosis* 147 [Suppl]:S11-S16
3. Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Böger RH (2004). Determination of NG, NG-dimethyl-L-Arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 809(1):59-60
4. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, et al (1995) Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 26:1235–1241
5. Assmann G, Cullen P, Schulte H (2002) Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 22:105(3):310-315. Erratum in: *Circulation* 19:105(7):900
6. Berliner JA, Heinecke JW (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 20:707-727
7. Bode-Böger SM, Böger RH, Alfke H, Heinzl D, Tsikas D, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC. (1996) L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia. A randomized, controlled study. *Circulation* 1:93(1):85-90
8. Bode-Böger S.M., Böger R.H., Creutzig A., Tsikas D., Gutzki F.M., Alexander K., and Frölich J.C. (1994) L-arginine infusion decreases peripheral arterial

- resistance and inhibits platelet aggregation in healthy subjects. *Clin Sci (Lond.)* 87:303-310
9. Böger RH (2004) Asymmetrical methylarginine (ADMA) as a cardiovascular risk factor: epidemiological and prospective data. *Dtsch Med Wochenschr* 8:129(15):820-824
 10. Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Bohme M, Nafe R, Mugge A, Fröhlich JC (1997) Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 96(4):1282-1290
 11. Böger RH, Bode-Böger SM, Fröhlich C (1996) The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis* 127:1-11
 12. Böger RH, Bode-Böger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R, Fröhlich JC (1998) Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol fed rabbits. *Atherosclerosis* 136:67-77
 13. Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR (2000) Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocysteinemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*:20(6):1557-1564
 14. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP (1998) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98:1842-1847
 15. Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Fröhlich JC (1998) Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 95(8):2068-2074

16. Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM (2000) LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 87(2):99-105
17. Böger RH, Tsikas D, Bode-Böger SM, Phivtong-ngam L, Fröhlich JC (2000) Impaired conversion of L-[guanidino-¹⁵N₂]-arginine to [¹⁵N]-nitrate in hypercholesterolemic rabbits. *N S Arch Pharm* 361 (Suppl.): R42
18. Böger, R.H., Bode-Böger S.M, Gerecke U., Gutzki F.M., Tsikas D., and Fröhlich J.C. (1996b) Urinary NO₃ excretion as an indicator of nitric oxide formation in vivo during oral administration of L-arginine or L-NAME in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:11-15
19. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7:72:248-254
20. Brown BG, Zhao X, Sacco DE, Albers JJ (1993) Lipid lowering and plaque regression: New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 87:1781-1789
21. Busse R, Fleming I (1996) Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 33:181-196
22. Cardounel AJ, Cui H, Samouilov A, Johnson W, et al. (2006) Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. *J Biol Chem* 281(2):879-887
23. Casino PR, Kilcoyne CM, Cannon III RO, Quyyumi AA, Panza JA (1995) Impaired endothelium-dependent vascular relaxation in patients with hypercholesterolemia extends beyond the muscarinic receptor. *Am J Cardiol* 75:40-44

24. Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA (1993) The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 88:2541-2547
25. Celermajer DS (1997) Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 30(2):325-333
26. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE (1994) Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 15:24(6):1468-1474
27. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. (1992) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340:1111-1115
28. Chan JR, Böger RH, Bode-Böger SM, Tangphao O, Tsao PS, Blaschke TF, Cooke JP (2000) Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1040-1046
29. Chowienczyk PJ, Watts GF, Cockcroft JR, Ritter JM (1992) Impaired endothelium-dependent vasodilatation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemia. *Lancet* 340:1430–1432
30. Cilla DD Jr, Whitfield LR, Gibson DM, Sedman AJ, Posvar EL. (1996) Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 60(6):687-695.
31. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB (1992) Nitric Oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 90:1116-1121

32. Cooke JP (2000). Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2032–2037
33. Cooke JP (2004) Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 109(15):1813-1818
34. Cooke JP, Andon NA, Girerd HJ, Hirsch AT, Creager MA (1991) Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 83:1057-1062
35. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. (2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 16:39(2): 257-65 Erratum in: *J Am Coll Cardiol* 20;39(6):1082
36. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS (1994) Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 23(2):229-235
37. Creager MA, Cooke JP, Mendelssohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, et al. (1990) Impaired vasodilatation of forearm resistant vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 86:228-234
38. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke P (1992) L-arginine improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 90:1248-1253
39. Crouse JR, 3rd, Byington RP, Furberg CD (1998) HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data. *Atherosclerosis* 138:11-24

40. Cui R, Iso H, Pi J, Kumagai Y, Yamagishi K, Tanigawa T, Shimamoto T (2005) Relationship between urinary cGMP excretion and serum total cholesterol levels in a general population. *Atherosclerosis* 179:379-386
41. D'Agostino RB, Sr Grundy S, Sullivan LM, et al. (2001) Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. *JAMA* 286:180-187
42. d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS (2001) Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice. *Stroke* 32:2658–2664
43. Drexler H, Zeiher A, Wollschla"ger H, Meinertz T, Just H, Bonzel T. (1989) Flow-dependent artery dilation in humans. *Circulation* 80:466–474
44. Drexler H. (1997) Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 39(4):287-324
45. Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 21:95(15):8880-8885
46. Förstermann U, Kleinert H (1995) Nitric oxide synthase: Expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352:351-364
47. Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N (1997) Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 22:349(9055):837-842
48. Forte P, Copland M, Smith LM, Sutherland J, Benjamin N (1997) Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 349:837-842

49. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Johnston A, Benjamin N, Ritter JM (1998) Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension* 32:730-734
50. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 27:288:373-376
51. Gmerek A, Yang R, Bays H, et al. (1996) Atorvastatin causes a dose-dependent reduction in LDL-C and Triglycerides [abstract]. In: 66th Congress of the European Atherosclerosis Society. Abstract Book: 1996 13-7: Florene (Italy), 212
52. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:333-337
53. Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, Friend A, Shah V, Dillon MJ (1997) Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens.* 15(8):901-909
54. Granger DL, Hibbs JB Jr, Broadnax LM (1991) Urinary nitrate excretion in relation to murine macrophage activation. Influence of dietary L-arginine and oral NG-monomethyl-L-arginine. *J Immunol* 15:146(4):1294-302
55. Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P (1981) Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 3:212(4490):56-58
56. Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. (1984) The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 12-18:308(5960):645-647
57. Guerra R Jr, Brotherton AF, Goodwin PJ, Clark CR, Armstrong ML, Harrison DG (1989) Mechanisms of abnormal endothelium-dependent vascular

- relaxation in atherosclerosis: implications for altered autocrine and paracrine functions of EDRF. *Blood Vessels* 26(5):300-314
58. Hackman A, Abe Y, Insull W Jr, Pownall H, Smith L, Dun K, Gotto AM Jr, Ballantyne CM (1996) Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 93:1334-1338
59. Hamet P, Pang SC, Tremblay J (1989) Atrial natriuretic factor-induced egression of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Biol Chem* 264:12364-12369
60. Han SR, Momeni A, Strach K, Suriyaphol P, et al. (2003) Enzymatically modified LDL induces Cathepsin H in human monocytes: potential relevance in early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:661-667
61. Heinonen TM, Stein E, Weiss SR, et al. (1996) The lipid-lowering effects of atorvastatin, a new HMG-CoA-reductase inhibitor: results of a double-masked study. *Clin Ther* 18(5):853-63
62. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinerts T, Münzel (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104:2673-2678
63. Hernandez-Perera O, Perez-Sala O, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S (1998) Effects of the 3-Hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, Atorvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101(12):2711-2719
64. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S (1993) Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 15:334(2):170-174

65. Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H. (1998) Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 3:97(4):363-368
66. Huie RE, Padmaja S (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18(4):195-199
67. Ignarro LJ. (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:535-560
68. Ikeda U, Shimada K (2001) The anti-inflammatory effects of statins. *N Engl J Med* 345:1210
69. Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A (2002) Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circ J.* 66(9):811-815
70. Jessup W Oxidized lipoproteins and nitric oxide (1996) *Curr Opin Lipidol* 7(5):274-280
71. John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, Weidinger G, Schmieder RE (1998) Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation* 98:211-216
72. John S, Schmieder R (2000) Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J Hypertens* 18(4):363-374
73. Kanazawa K, Kawashima S, Mikami S, Miwa Y, Hirata K, Suematsu M, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M (1996) Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Pathol* 148:1949–1956

74. Kanno K., Hirata Y., Emori T., Ohta K., Eguchi S., Imai T., and Marumo F. (1992) L-arginine infusion induces hypotension and diuresis/natriuresis concomitant with increased urinary excretion of nitrite/nitrate and cyclic GMP in humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*19:619-625
75. Kato T, Iwama Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T (1990) Prostaglandin H2 may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 15(5):475-481
76. Katz SD Khan T, Zeballas GA, Mathew L, Potharlanka P, Knecht M, Whelan J (1999) Decreased activity of the L-arginine-nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. *Circulation* 99:2113-2117
77. Kinlay S, Ganz P (2000) Relation between endothelial dysfunction and the acute coronary syndrome: implications for therapy. *Am J Cardiol* 86[Suppl]:10J-13J
78. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozuyaman B, Schnurch HG, Godecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rosen P, Kelm M (2006) Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 1:107(7):2943-2951
79. Knopp RH (1999) Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med* 341:498-451
80. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1:88(11):4651-4655
81. Laufs U, Endres M, Liao JK (1999) Regulation of Endothelial NO Production by Rho GTPase. *Med Klin* 94:211-218
82. Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes,

- decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31(10):2442-2449
83. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97:1129-1135
84. Laufs U, Liao JK (1998) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273(37):24266-24271
85. Lea A, McTavish D (1997) Atorvastatin; A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential in The Management of Hyperlipidaemias. *Drugs* 53(5):828-847
86. Li H, Wallerath T, Münzel T, Förstermann U (2002) Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide Biol Chem* 7:149–164
87. Libby P (2001) Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104:365-373
88. Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105:1135-1143
89. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P (1986) Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic arteries. *N Engl J Med* 315:1046-1051
90. Maas R, Quitzau K, Schwedhelm E, Spieker L, Rafflenbeul W, Steenpass A, Luscher TF, Boger RH (2006) Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and coronary endothelial function in patients with coronary artery disease and mild hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* PMID: 16828780 [PubMed – as supplied by publisher]

91. Marathe S, Choi Y, Leventhal AR, Thabas I (2000) Sphingomyelase converts lipoproteins from apolipoprotein E knockout mice into potent inducers of macrophage foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2607-2613
92. Martinez-Gonzalez J, Raposo B, Rodriguez C, Badimon L (2001) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(5):804-809
93. Mary C. Corretti, FACC, Tod J. Anderson, Omelia J. Benjamin, et al. (2002) Guidelines for the Ultrasound. Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery. *J Am Coll Cardiol* 39(2):257-265
94. McCully KS (1996) Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 2(4):386-389
95. Mercurio G, Zoncu S, Saiu F, Sarais C, Rosano GM (2002) Effect of atorvastatin on endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women with average serum cholesterol levels. *Am J Cardiol* 1:90(7):747-750
96. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T (1999). Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99:1141–1146
97. Moncada S, Higgs EA (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012
98. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2):109-142
99. MRC/BHF (2003) Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360:7-22

100. Munro JM, Cotran RS (1988) The Pathogenesis of Atherosclerosis: Atherogenesis and Inflammation. *Lab Invest* 58:249-261
101. Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW, Selwyn AP (1988) Dilatation of normal and constriction of atherosclerotic arteries caused by the cold pressure test. *Circulation* 77:43-52
102. Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P (1990) Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: An endothelium-dependent mechanism that fails in patients with coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 16:349-356
103. Nakaki T, Nakayama M, Kato R (1990) Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 15:189(6):347-353
104. Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH, et al. (1995) Reduction of LDL-Cholesterol by 25 % to 60 % in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor. *Art Thrombosis Vasc Biol* 15:678-682
105. Negre-Aminou P, van Vliet AK, van Erck M, van Thiel GC, van Leeuwen RE, Cohen LH (1997) Inhibition of proliferation of human smooth-muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types. *Biochem Biophys Acta* 1345:259-268
106. Neunteufl T, Kostner K, Katzenschlager R, Zehetgruber M, Maurer G, Weidinger F (1998) Additional benefit of vitamin E supplementation to simvastatin therapy on vasoreactivity of the brachial artery of hypercholesterolemic men. *J Am Coll Cardiol* 32:711–716
107. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR (1997) Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 95:1126–1131

108. Omori H, Nagashima H, Tsurumi Y, Takagi A, et al. (2002) Direct in vivo evidence of cardiovascular smooth statin: a single dose of cerivastatin rapidly increases vascular endothelial responsiveness in healthy normocholesterolemic subjects. *Br J Clin Pharmacol* 54:395-399
109. Paiva H, Laakso J, Lehtimaki T, Isomustajarvi M, Ruukonen I, Laaksonen R (2003) Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 41(2):219-222
110. Palmer RMJ, Ashton RS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666
111. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 11-17:327(6122):524-526
112. Perticone F, Ceravolo R, Maio R, Cloro C, Candigliota M, Scozzafav MA, Mastroroberto P, Chello M, Mattioli PL (2000) Effects of Atorvastatin and Vitamin C on endothelial function in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 152: 511-518
113. Plane F, Bruckdorfer KR, Kerr P, Steuer A, Jacobs M (1992) Oxidative modification of low-density lipoproteins and the inhibition of relaxations mediated by endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 105(1):216-222
114. Posvar EL, Radulovic LL, Cilla DD Jr, Whitfield LR, Sedman AJ (1996) Tolerance and pharmacokinetics of single-dose atorvastatin, a potent inhibitor of HMG- CoA reductase, in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 36(8):728-731
115. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1990) Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 101(2):325-328

116. Raitakari OT, Seale JP, Celermajer DS (2001) Impaired vascular responses to nitroglycerin in subjects with coronary atherosclerosis. *Am J Cardiol* 15:87(2):217-219, A8
117. Randriamboavonjy V, Fleming I (2005) Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there? *Pharmacol Rep* 57 Suppl:59-65
118. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufman S, Watson CA, Pober JS (1994) Regulation of Nitric Oxide Synthesis by Proinflammatory Cytokines in Human Umbilical Vein Endothelial Cells: Elevations in Tetrahydrobiopterin Levels Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Specific Activity. *J Clin Invest* 93:2236-2243
119. Ross R 1993 The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 29:362(6423):801-809
120. Ross R, Glomset J, Harker L (1977) Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 86:675-664
121. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA (2003) Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 93:280–291
122. Sacks FM, Pfeffer FA, Moya LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JMO, Wun C-C, Davis BR, Braunwald E: for the Cholesterol and Recurrent Event Trial Investigators (1996): The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels (CARE). *N Engl J Med* 335:1001-1009
123. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994): Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Study (4S). *Lancet* 344:1383-1389

124. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101:1899–1906
125. Schächinger V; Britten, MD; Zeiher AM (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101:1899-1906
126. Schell WD, Myers JN (1997) Regression of atherosclerosis:A review. *Prog Cardiovasc Dis* 39:483-496
127. Schmidt HH. (1994) NO, endogenous messenger and cell poison. *Med Monatsschr Pharm*17(6):168-185
128. Šebešćtjen M, Boh M, Keber I (2002) Simvastatin and Pravastatin equally improve flow-mediated dilation in males with hypercholesterolemia. *Wien Klin Wochenschr* 114/23-24:999-1003
129. Seiler C, Hess OM, Buechi M, Suter TM, Krayenbuehl HP (1993) Influence of serum cholesterol and other coronary risk factors on vasomotion of angiographically normal coronary arteries. *Circulation* 88 (5 Pt 1):2139-2148
130. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, et al. (1995) Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 92:1565-1569
131. Simon BC, Cunningham LD, Cohen RA (1990) Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J Clin Invest* 86(1):75-79
132. Simons LA, Sullivan D, Simons J, Celermajer DS. 1998 Effects of atorvastatin monotherapy and simvastatin plus cholestyramine on arterial endothelial

- function in patients with severe primary hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 137(1):197-203
133. Soma MR, Donetti E, Parolini C, Mazzini G, Ferrari C, Fumagalli R, Paoletti R (1993) HMG-CoA reductase inhibitors. In vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 13:571-578
134. Spiecker M, Peng HB, Liao JK (1997) Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I κ B α . *J Biol Chem* 272:30969-30974
135. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. (1989) Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-926
136. Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A, Kaley G (1999) Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ Res* 6:85(3):288-293
137. Szilvassy Z, Csont T, Pali T, Droy-Lefaix MT, Ferdinandy P (2001) Nitric oxide, peroxynitrite and cGMP in atherosclerosis-induced hypertension in rabbits: beneficial effects of cicletanine. *J Vasc Res* 38(1):39-46
138. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T (1997) Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 95:76-82
139. Tanner FC, Boulanger CM, Luscher TF (1993) Endothelium-derived nitric oxide, endothelin, and platelet vessel wall interaction: alterations in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 19(2):167-175
140. Tannous M, Cheung R, Vignini A, Mutus B (1999) Atorvastatin increases ecNOS Levels in Human Platelets of Hyperlipidemic Subjects. *Thromb Haemost* 82:1390-1394

141. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group (1998) Prevention of cardiovascular events and death with Pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 315:1046-1051
142. Thorin E, Hamilton CA, Dominiczak MH, Reid JL (1994) Chronic exposure of cultured bovine endothelial cells to oxidised LDL abolishes prostacyclin release. *Arterioscler Thromb* 14:453-459
143. Tolins JP, Palmer RM, Moncada S, Raji L (1990) Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. *Am J Physiol* 258(3 Pt 2):H655-656
144. Torzewski M, Klouche M, Hock J, Messner M, et al. (1998) Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 18:369-378
145. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, et al. (1995) Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 332:481-487
146. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, et al. (1995) Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 332:481–487
147. Tsikas D, Boger RH, Sandmann J, Bode-Boger SM, Frolich JC (2000) Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 28:478(1-2):1-3

148. Tsunekawa T, Hayashi T, Kano H, et al. (2001) Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductaseinhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days. *Circulation* 104:376-379
149. Valkonen VP, Laakso J, Paiva H, Lehtimaki T, Lakka TA, Isomustajarvi M, Ruokonen I, Salonen JT, Laaksonen R (2003) Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and risk of acute coronary events. Does statin treatment influence plasma ADMA levels? *Atheroscler Suppl* 4(4):19-22
150. Vallance P, Collier J, Moncada S (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2:997-1000
151. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339:572–576
152. Vane JR, Änggard EE, Botting RM (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J* 323:27-36
153. Vanhoutte PM (1997) Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J* 18 Suppl E:E19-29
154. Verbeuren TJ, Jordaens FH, Van Hove CE, Van Hoydonck AE, Herman AG (1990) Release and vascular activity of endothelium-derived relaxing factor in atherosclerotic rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 27:191(2):173-184
155. Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L (1998) Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 15:252(3):378-384
156. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al (1990) Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 81:491–497

157. Vita JA, Yeung AC, Winniford M, Hodgson JM, Treasure CB, Klein JL, et al (2000) Effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelial vasomotor function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 102:846–851
158. Wagner AH, Köhler T, Rückschloß U, Just I, Hecker M (2000) Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:61-69
159. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rosen R, Bohm M, Nickenig G. (2001) HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 37(6):1450-1457
160. Weber C, Erl W., Weber KS (1997) HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterinämia. *J AM Coll Cardiol* 30:1212-1217
161. Wennalm A, Benthin G, Edlund A, et al. (1993) Metabolism and excretion of nitric oxide in humans: an experimental and clinical study. *Circ Res* 73:1121-27
162. Wong B, Lumma WC, Smith AM, Sisko JT, Wright SD, Cai TQ (2001) Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation. *J Leukoc Biol* 69:959-962
163. Xiong Y, Fu YF, Fu SH, Zhou HH (2003) Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 42(2):191-196

9. Abkürzungen

A, mA	Ampere, Milliampere
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AMG	Arzneimittelgesetz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
bzw.	beziehungsweise
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	cyklisches Guanosin-3',5'- monophosphat
Def.	Definition
ECL	enhanced chemiluminescence
EIA	Enzymimmunoassay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eV	Elektronenvolt
Fa.	Firma
FMD	flußvermittelte Vasodilatation
GC-MS	Gaschromatographie- Massenspektrometrie
GCP	Good Clinical Practice
GLP	Good Laboratory Practice
GMP	Good Manufacturing Practice
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoffion
HDL	high density lipoprotein

Abkürzungen

HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase
KHK	koronare Herzkrankheit
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LDL	low density lipoprotein
M	molar
m/z	Masse/Ladung
min	Minute
mmHg	mm Quecksilbersäule
mol, mmol, µmol, nmol, fmol	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol, Femtomol
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NICI	negative-ion chemical ionisation
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	NO-Synthase
NSB-Well	Non-Specific-Binding-Well
O ₂ ⁻	Superoxidradikal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PFB	Pentafluorbenzyl
PFAA	Pentafluorpropionsäure (pentafluorpropionic acid anhydrid)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pVASP	phosphoryliertes vasodilator stimulated phosphoprotein
rcf	Calculating relative centrifugal force
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute

Abkürzungen

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (\triangleq Laurylsulfat)
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	standard Error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
sGC	lösliche Guanylylzyklase
SIM	single ion monitoring
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	Tetramethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V, kV	Volt, Kilovolt
VASP	vasodilator stimulated phosphoprotein
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

10. Anhang:

Danksagung

Herrn Prof. Böger danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung meiner Arbeit und die Bereitstellung der benötigten finanziellen Mittel.

Herrn Dr. Renke Maas danke ich für seine Unterstützung, seine geduldige Einweisung in die spezielle medizinische Thematik und seine wertvollen Ratschläge, die mir bei meiner Arbeit sehr geholfen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Edzard Schwedhelm für die fachliche Unterstützung und Einweisung in die CC/MS-Technik.

Ferner geht mein Dank auch an Anna Steenpaß, Cornelia Wörmann, Mariola Kastner und Elisabeth Silberhorn, die mich in die labortechnischen Methoden eingearbeitet und mir während der gesamten Arbeit uneingeschränkt zur Seite gestanden haben.

Allen Mitarbeitern der Pharmakologie in Eppendorf danke ich für die außerordentlich freundliche Atmosphäre, in der ich arbeiten konnte.

Lebenslauf

Name: Lydia Kahl, geb. Schneider
Geburtsdatum: 21.02.1978
Geburtsort: Berlin
Wohnort: Hamburg
Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Schulbildung

1984 -1988 Kahlhorstschule, Lübeck
1988 -1997 Johanneum zu Lübeck

Studium

Seit März 1999 Medizinstudium, Universität Hamburg
August 2001 Physikum
August 2002 1. Staatsexamen
März 2004 2. Staatsexamen
Mai 2006 3. Staatsexamen

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Lydia Kahl