

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie

Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie

(Direktor: Prof. Dr. Eschenhagen)

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Einfluss von Telmisartan, Nisoldipin oder ihrer Kombination auf die
endothelabhängige Vasodilatation bei Patienten mit essentieller
Hypertonie**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Daniel Appel

aus Kassel

Hamburg, 2007

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Koreferent:

Inhaltsangabe

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Endothel.....	1
1.2	Endogene Inhibitoren der NO-Synthase.....	6
1.3	Endotheldysfunktion.....	8
1.4	Die arterielle Hypertonie.....	9
1.5	Endotheliale Integrität.....	11
1.6	Die Prüfmedikation.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Studienaufbau und Studienablauf.....	15
2.2	Patienten.....	17
2.2.1	Einschlußkriterien.....	17
2.2.2	Ausschlußkriterien.....	17
2.3	Messung des 24-Stunden-Blutdruckes.....	19
2.4	Messung der Endothelfunktion.....	19
2.4.1	Durchführung der Messung.....	21
2.4.2	Auswertung der Ultraschallbilder.....	21
2.5	Messung von Nitrat im Urin.....	22
2.5.1	Erstellen des internen Standards.....	22
2.5.1.1	Herstellung von ¹⁵ Nitrat.....	22
2.5.2	Probenaufbereitung und Messung.....	23
2.6	Messung der ADMA-Plasmakonzentrationen.....	23
2.6.1	Vorbereitung der Reagenzien.....	24
2.6.2	Probenvorbereitung (Acylierung).....	24
2.6.3	Testdurchführung.....	25
2.7	Messung der <i>ex vivo</i> -Thrombozytenaggregation.....	25
2.7.1	Messung der <i>ex vivo</i> -Thrombozytenaggregation.....	27

2.8	Messung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen im Blut.....	27
2.8.1	Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse)	27
2.8.2	Kolonie-Assay	28
2.9	Fallzahlschätzung und biometrische Auswertung	29
2.10	Material	29
2.10.1	Substanzen	29
2.10.2	Verbrauchsmaterial	30
2.10.3	Laborgeräte	31
2.10.4	Computerprogramme	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Patientenkollektiv	33
3.1.1	Charakteristika der Patienten	33
3.2	Blutdrucksenkung unter der antihypertensiven Therapie	37
3.3	Einfluss der Prüfmedikation auf die endothelabhängige Vasodilatation.....	38
3.4	Quantifizierung der Nitrat-Ausscheidung im Urin	40
3.5	Einfluss der Prüfmedikation auf die ADMA-Plasmakonzentration	41
3.6	Thrombozytenaggregation	42
3.7	Endotheliale Progenitorzellen.....	43
3.7.1	Mobilisierung von CD133 ⁺ /CD34 ⁺ -Zellen	43
3.7.2	Mobilisierung koloniebildender Zellen	44
3.7.3	Morphologische Charakterisierung der CFU-EC	47
4	Diskussion	49
4.1	Blutdrucksenkung und endothelabhängige Vasodilatation.....	49
4.2	Nitratausscheidung im Urin	53
4.3	ADMA	54
4.4	Thrombozytenaggregation	55
4.5	Endotheliale Progenitorzellen.....	56

5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis	61
7	Lebenslauf.....	77
8	Publikationen	78
9	Erklärung	79
10	Danksagung	80

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Ampere
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin ,N ^G ,N ^G - Dimethyl-L-Arginin
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Kinase Akt
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMG	Arzneimittelgesetz
AST	Aspartat-Aminotransferase
AT1	Angiotensin I

B

BKS	Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit
BMI	Body Mass Index

C

Ca ²⁺	Calcium
CFU	<i>Colony-forming units</i>
CFU-EC	<i>Circulating endothelial colony forming cells</i>
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CK	Kreatinkinase
CRP	C-reaktives Protein

D

DDAH	N ^G ,N ^G -Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DMF	Dimethylhylformamid

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
EPC	Endotheliale Progenitorzellen

F

FAD	Flavinadenindinucleotid
FMD	<i>Flow-mediated dilation</i> , flussabhängige Vasodilatation
FMN	Flavinmononucleotid

G

GTN	Glyceroltrinitrat
-----	-------------------

H

Hb	Hämoglobin
HDL	High Density Lipoprotein

I

iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
------	--

K

kV	KiloVolt
----	----------

L

LDL	Low Density Lipoprotein
-----	-------------------------

LOOH	Lipidhydroperoxid
LPS	Lipopolysaccharid
M	
MDA	Malondialdehyd
N	
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NMMA	Monomethylarginin
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
P	
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PI3	Phosphoinositid 3
PPAR-Gamma	Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor Gamma
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
R	
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>Reactive Oxygen Species</i>

S

SDF-1

*Stromal-cell derived factor-1***T**

TFPI

Tissue factor pathway inhibitors

t-PA

*Tissue plasminogen activator (Alteplase)***V**

VEGF

Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Das Endothel

Alle Gefäße des menschlichen Körpers werden durch das einschichtige Endothel ausgekleidet, welches das strömende Blut von den tieferen Schichten der Gefäßwand trennt. Das Endothel stellt jedoch keine passive zelluläre Barriere dar, vielmehr ist es ein großes endokrines Organ, das entscheidend die Regulation von Gefäßtonus und die Homöostase von Thrombozytenaggregation und Blutgerinnung beeinflusst sowie mit Leukozyten und Monozyten interagiert (siehe Abbildung 1).

Die Bedeutung des Endothels rückte 1980 in besonderem Maße in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses, nachdem Furchgott und Zawadzki zeigen konnten, dass Gefäße unter Acetylcholin nur dann dilatieren, wenn das Endothel der Gefäße intakt ist, während bei fehlendem oder geschädigtem Endothel eine Vasokonstriktion auftritt (Furchgott et al., 1980). Sie schlossen aus ihren Beobachtungen, dass das Endothel unter der Wirkung von Acetylcholin eine Substanz produziert und sezerniert, die in der benachbarten glatten Muskulatur zu einer Abnahme des Muskeltonus führt. Sie nannten diese Substanz „*Endothelium-derived relaxing factor*“ (EDRF), welche in der Folgezeit als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden konnte (Palmer et al., 1987). NO wird aus der Aminosäure L-Arginin in einer komplexen Reaktion über das Enzym, NO-Synthase (NOS) gebildet. NO hat eine extrem kurze Halbwertszeit, die im Bereich von wenigen Sekunden liegt (Griffith et al., 1984; Moncada et al., 1993). Letztendlich entstehen die relative stabilen Metaboliten Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) (siehe Abbildung 2) (Ignarro et al., 1990; Wennmalm et al., 1993). Nitrat und Nitrit werden ebenso wie cGMP, der *second messenger* des NO, über die Niere ausgeschieden, so dass die Ausscheidung dieser Stoffe im Urin als Surrogatmarker für Änderungen der NO-Synthese herangezogen werden kann (Bode-Böger et al., 1994; Böger et al., 1994; Böger et al., 1996).

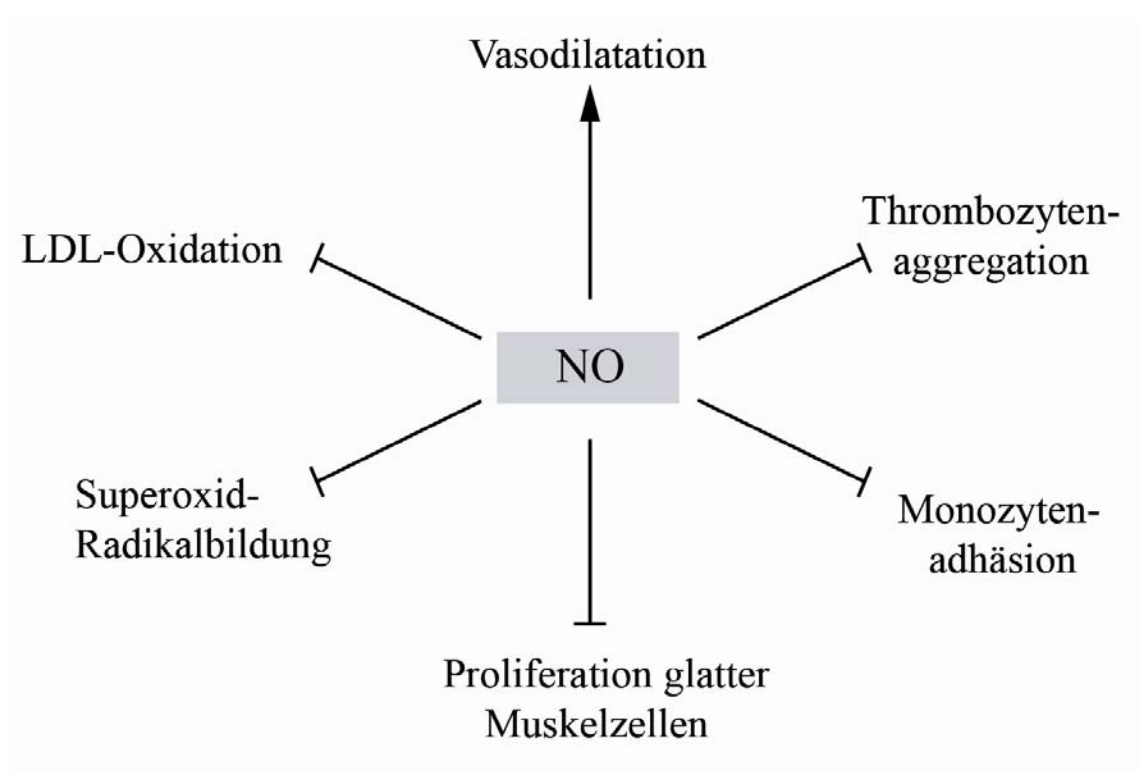


Abbildung 1: NO übt im kardiovaskulären System vielfältige Wirkungen aus, die zur vaskulären Homöostase beitragen. NO ist ein potenter Vasodilatator, hemmt die Thrombozytenaggregation, hemmt die Monozytenadhäsion am Endothel und wirkt als Inhibitor der Proliferation glatter Gefäßmuskulatur. Ferner übt NO eine hemmende Wirkung auf die Bildung freier Sauerstoffradikale und somit eine hemmende Wirkung auf die Entstehung von oxidierten LDL-Partikeln aus. Daher wird NO als „endogenes anti-arteriosklerotisches Molekül“ betrachtet.

Mittlerweile sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt, wobei die NOS I (nNOS) vor allem im Nervenwebe exprimiert wird und NO als Neurotransmitter zur Verfügung stellt, wohingegen die NOS II (iNOS) durch eine Reihe von Faktoren wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Zytokine in vielen Zelltypen induzierbar ist und eine wichtige Rolle bei immunologischen Reaktionen spielt (Moncada et al., 1993). Die NOS III wird insbesondere im Endothel gebildet, daher spricht man auch von der endothelialen NOS (eNOS). Die eNOS lässt sich aber auch in anderen Zelltypen, wie beispielsweise Thrombozyten oder Kardiomyozyten nachweisen (Förstermann et al., 1995). Alle drei Isoformen der NOS besitzen Bindungsstellen für NADPH, FAD, FMN

und Calmodulin, sowie eine Phosphatbindungsstelle. Tetrahydrofolsäure ist als Co-Faktor bei allen drei Isoformen für die Aktivität essentiell. Die konstitutiven Isoformen NOS I und NOS III werden durch Ca^{2+} und Calmodulin aktiviert, während die induzierbare NOS II Ca^{2+} -unabhängig aktiv ist.

Expression und Aktivität der eNOS unterliegen einer substantiellen Regulation. So führen zum Beispiel Scherkräfte des Blutstromes, die am Endothel wirken, sowie die Aktivierung von Proteinkinasen A-assoziierten Signalkaskaden zur Steigerung von Expression und Aktivität der eNOS (Papatropoulos et al., 1999) (siehe Abbildung 2).

Die Aktivierung der eNOS mit Freisetzung von NO initiiert auf molekularer Ebene eine Reihe von Signaltransduktionsmechanismen. So aktiviert NO beispielsweise die lösliche Guanylatzyklase und führt über die Bildung von cGMP zur Vasodilatation von glatten Muskelzellen durch Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Lundberg et al., 2005). NO vermittelt seine Wirkung zudem über Ca^{2+} -unabhängige Signaltransduktionswege. Die S-Nitrosylierung von Enzymen führt zu einer Modulation der Enzymaktivität. Dieser Regulationsmechanismus konnte für Enzyme wie Caspasen, Transkriptionsfaktoren oder Proteinen, welche direkt die Ca^{2+} -Homöostase der Zellen beeinflussen, nachgewiesen werden (Stamler et al., 1994; Xu et al., 1998). Sowohl die Wirkung von L-Arginin-Analoga, die als Inhibitoren der NO-Synthase wirken ohne eine eigene Vasokonstriktoraktivität zu besitzen, als auch eNOS-defiziente („*Knock-out*“) Mausmodelle konnten die Bedeutung von NO für die Regulation des Gefäßtonus untermauern. So führte die Applikation von L-Arginin-Analoga im Menschen zur Vasokonstriktion und Zunahme des arteriellen Blutdruckes (Leipner et al., 1999). Diese Beobachtungen unterstreichen die Rolle von NO bei der Regulation von Blutfluss, arterieller Resistance und Blutdruck (Vallance et al., 1989). Das Prinzip der Regulation des Gefäßtonus durch das Endothel wurde erstmals 1986 am Menschen untersucht, indem Acetylcholin als Stimulus der endothelialen NO-Freisetzung intrakoronar infundiert wurde (Ludmer et al., 1986). Analog zum Furchgott-Experiment kam es bei Individuen mit normalen Koronararterien zu einer Vasodilatation, während bei Patienten mit arteriosklerotisch veränderten Koronararterien eine Vasokonstriktion auftrat. In der Folgezeit wurden weitere nichtinvasive Messverfahren zur Bestimmung der endothelabhängigen Vasodilatation etabliert. Ein heute vielverwendetes Verfahren untersucht die flussabhängige Vasodilatation (*flow-mediated dilation*, FMD) der A.

brachialis. Nach mehrminütiger pneumatischer Okklusion kommt es zu reaktiver Hyperämie mit konsekutiver Zunahme von Scherkräften am Endothel, was wiederum zur NO-Freisetzung mit anschließender Vasodilatation führt (Corretti et al., 2002). Diese flussabhängige Vasodilatation lässt sich größtenteils durch die Gabe von L-Arginin-Analoga blockieren, was belegt, dass die flussabhängige Vasodilatation vor allem durch die Freisetzung von NO vermittelt wird (Hornig et al., 1996).

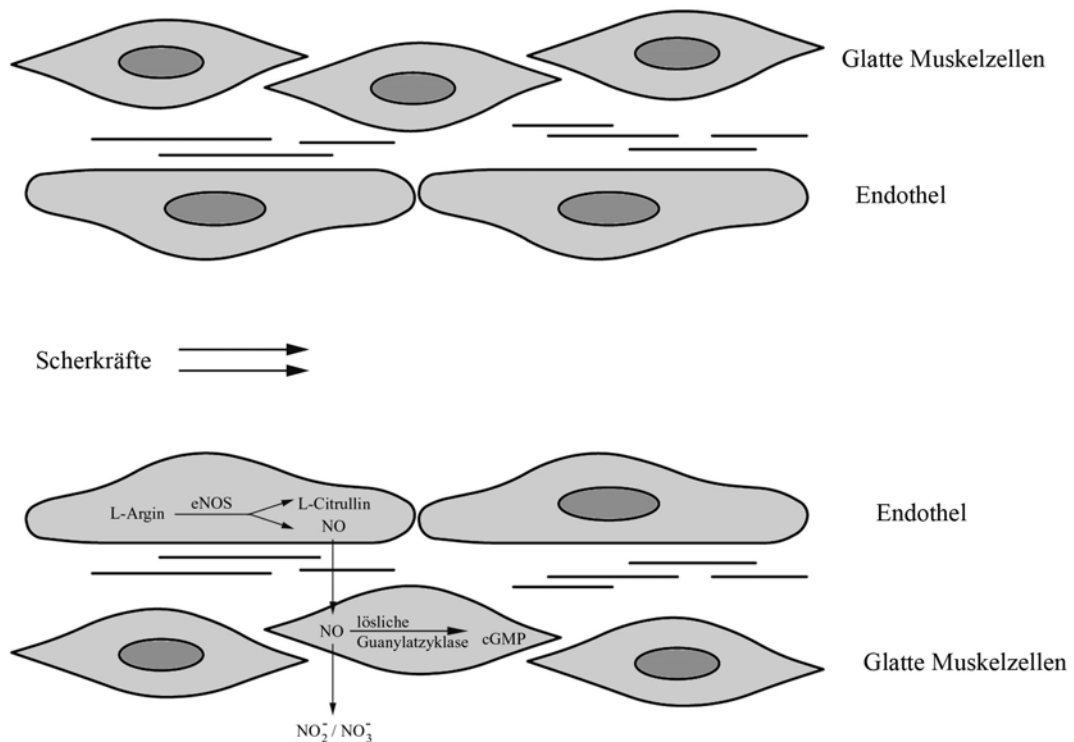


Abbildung 2: Scherkräfte, die am Endothel wirken, führen zu einer vermehrten Sekretion von NO, welches in der benachbarten glatten Muskulatur zur Relaxation führt. Die Metaboliten des NO, Nitrat und Nitrit, werden mit dem Urin ausgeschieden.

Unter dem Begriff der NO-Bioverfügbarkeit versteht man den NO-Anteil, der *in vivo* biologisch aktiv werden kann. Diese Größe ist nicht nur von der endothelialen NO-Synthese abhängig, sondern wird z.B. ebenfalls durch die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bzw. anderen reaktiven Molekülen bestimmt, die durch direkte Inaktivierung von NO zur Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit beitragen können (Berry et al., 2000; Rueckschloss et al., 2002). Neben einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit beobachtet man im Rahmen von vaskulären Erkrankungen, wie beispielsweise der

koronaren Herzerkrankung (KHK) eine Zunahme von so genanntem oxidativen Stress (Zunahme von ROS), welcher mit Aktivierung von Signaltransduktionswegen assoziiert ist, die als pro-inflammatorisch und pro-arteriosklerotisch anzusehen sind (Peng et al., 1995). So aktiviert oxidativer Stress beispielsweise den Transkriptionsfaktor NF kappa B, der eine wichtige Rolle bei der Regulation von pro-inflammatorischen Zytokinen spielt (Peng et al., 1995).

Neben der Regulation des Gefäßtonus partizipiert NO wesentlich an der Aufrechterhaltung anderer Funktionen des Endothels, welche für die vaskuläre Integrität entscheidend sind (Haller et al., 1997) (siehe Abbildung 1). So inhibiert es die Expression von Adhäsionsproteinen (ICAM, VCAM), die die Adhäsion und Invasion von Leukozyten und Monozyten ermöglichen, einen wichtigen Schritt bei der Initiierung des arteriosklerotischen Prozesses (Ross et al., 1999). Diese Beobachtungen legen nahe, dass durch NO-vermittelte Inhibition der Zelladhäsion anti-inflammatorische sowie anti-arteriosklerotische Wirkung erzielt werden können (Ross et al., 1999) (siehe Abbildung 1).

Das Endothel spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie der Blutgerinnung. Das intakte Endothel trennt die plasmatischen und zellulären humoralen Elemente von den thrombogenen Strukturen des Subendothels. Diese als Thromboresistenz bezeichnete Eigenschaft des Endothels wird durch die regulierte Synthese verschiedener Inhibitoren des plasmatischen Gerinnungssystems (Thrombomodulin, Heparansulfat, TFPI) und des Fibrinolyse-Systems (t-PA, PAI-1) im Endothel erreicht (Vaughan et al., 2002). Das Endothel sezerniert mit NO und Prostazyklin (PGI_2) zudem potente physiologische Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation. So kommt es im Falle der Aktivierung von Thrombozyten über die Freisetzung thrombozyteneigener Granulainhaltsstoffe, wie z.B. ADP, Thromboxan A_2 und Serotonin, zu einer vermehrten Synthese von NO durch das Endothel, was einer überschießenden intravasalen Thrombozytenaggregation entgegenwirkt (Siess et al., 1989).

Es gibt Hinweise, dass AT1-Rezeptor-Antagonisten durch die Erhöhung der NO-Aktivität in Endothelzellen als auch in Thrombozyten die Thrombozytenadhäsion bzw. -aggregation beeinflussen (Kalinowski et al., 2002; Wassmann et al., 2002). So konnte

gezeigt werden, dass der AT1-Rezeptor-Antagonist Losartan zu einer signifikanten Hemmung der *in vitro*-Aggregation von Thrombozyten führte (Kalinowski et al., 2002). Bisher ungeklärt war, ob Telmisartan vergleichbare Effekte ausübt und ob eine Therapie mit diesem AT1-Rezeptor-Antagonisten die *ex vivo*-Aggregation von aus Vollblut isolierten Thrombozyten beeinflusst. Auch für den Calciumkanalblocker Nisoldipin war dieser Sachverhalt bisher nicht geklärt. Wir haben daher in der vorliegenden Studie eine Untersuchung zum Einfluss beider Substanzen auf die *ex vivo*-Thrombozytenaggregationsfähigkeit durchgeführt.

1.2 Endogene Inhibitoren der NO-Synthase

Gegenspieler des Stickstoffmonoxids (NO) sind endogene Inhibitoren der NO-Synthase. Dies sind N^G-Monomethyl-L-Arginin (NMMA) und N^G,N^G-Dimethyl-L-Arginin, in der Literatur auch als asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) bekannt. ADMA entsteht bei der posttranslationalen Modifikation von argininhaltigen Proteinen durch die Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT) (Paik et al., 1968). Das beim anschließenden Proteinabbau freiwerdende ADMA wird zu über 90% durch das Enzym N^G,N^G-Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) metabolisiert, wobei L-Citrullin als Metabolit entsteht (Ogawa et al., 1987) (siehe Abbildung 3). Eine DDAH-Aktivität konnte in einer Vielzahl von Geweben wie Niere, Pankreas, Leber, Gehirn und Aorta von Ratten nachgewiesen werden (Kimoto et al., 1993).

Wenn Probanden ADMA infundiert wird, so lassen sich alle Symptome einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit beobachten. Der Blutdruck steigt, es kommt zu einer Vasokonstriktion, die kardiale Auswurfleistung sinkt, die glomeruläre Filtrationsrate und der renale Blutfluss sinken und es kommt zu einer verstärkten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen und einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen (Kielstein et al., 2004; Bech et al., 1996; Böger et al., 2000) (siehe Abbildung 4). Für eine Vielzahl von kardiovaskulären Risikofaktoren konnte eine positive Korrelation mit erhöhten Plasma-ADMA-Konzentrationen belegt werden: Hypercholesterinämie, Hypertonie, Hyperhomocysteinämie, Diabetes mellitus Typ 2 und terminaler Nierensuffizienz (Böger et al., 1998; Goonasekera et al., 1997; Böger et al., 2001; Abbasi et al., 2001; Vallance et al., 1992).

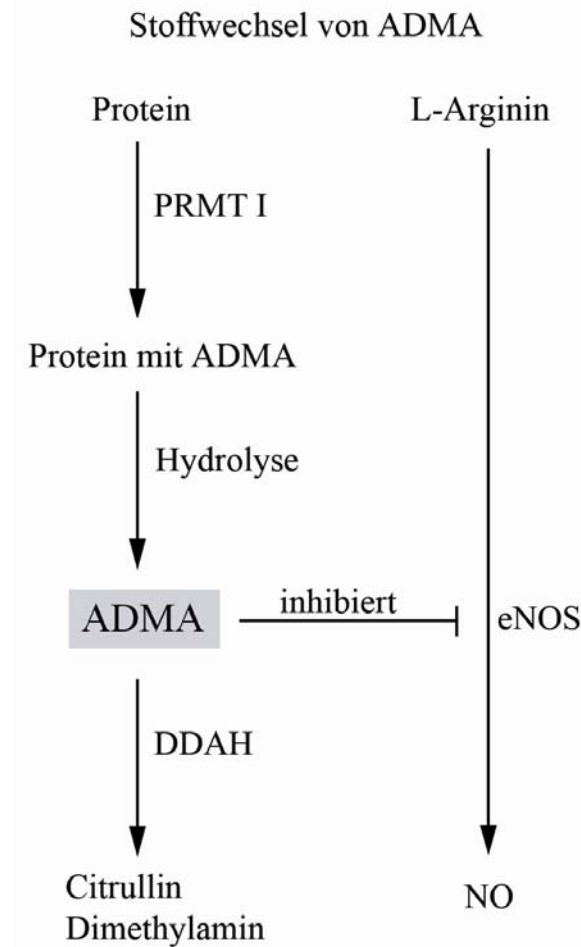


Abbildung 3: Durch PRMT I erfolgt die posttranslationelle Modifikation argininhaltiger Proteine. Beim Proteinabbau wird ADMA freigesetzt, welches als endogener Inhibitor der eNOS fungiert. Der Abbau von freiem ADMA erfolgt über DDAH.

Die wahrscheinlichen Ursachen des Anstiegs der ADMA-Konzentration bei kardiovaskulären Risikopatienten liegt zum einen in einer vermehrten Bildung von ADMA infolge einer vermehrten Methylierung von proteingebundenem L-Arginin, zum anderen in einer verminderten Metabolisierung durch die DDAH-Isoformen (Perticone et al., 2005). Eine verminderte Enzymaktivität der DDAH-Isoformen, die zur Reduktion der ADMA-Metabolisierung führt, wurde für oxidativen Stress, Hyperglykämie und Hyperhomocysteinämie beschrieben (Abbasi et al., 2001; Stühlinger et al., 2003). Für

Endothelzellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Zunahme der Scherkräfte am Endothel die Expression von PRMT steigert (Osnai et al., 2003). Da das Enzym PRMT an der ADMA-Entstehung beteiligt ist, könnte dies ein weiterer Erklärungsansatz für erhöhte ADMA-Konzentrationen bei Hypertonikern sein.

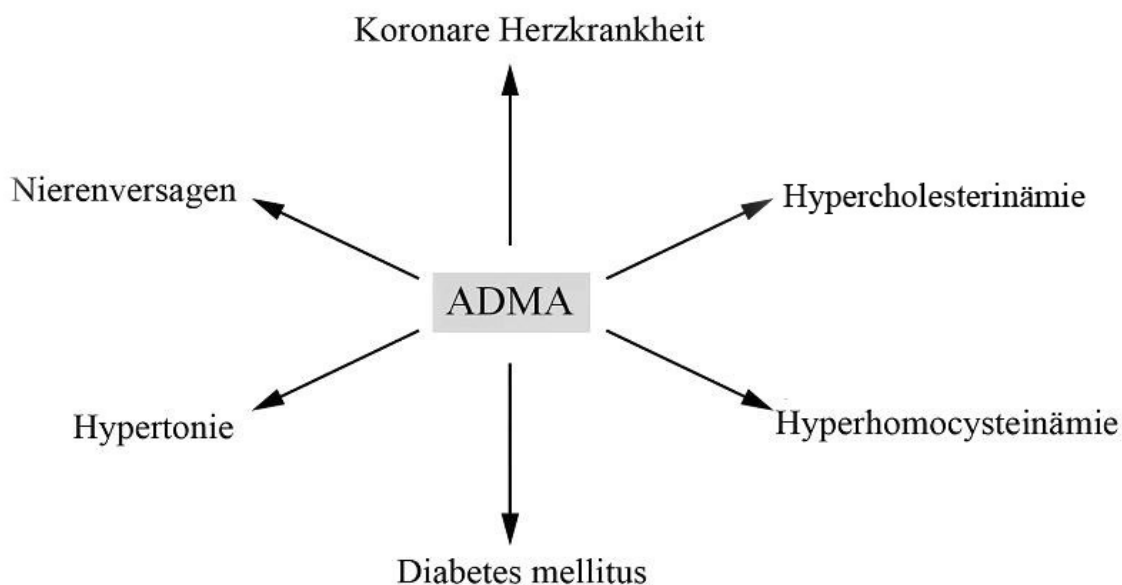


Abbildung 4: ADMA führt als endogener NOS-Inhibitor zu einer Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit und damit zu allen Symptomen, die sich aus dieser endothelialen Dysfunktion ableiten lassen.

Die Rolle des ADMA als kardiovaskulärer Risikofaktor konnte mittlerweile in einer Reihe von Studien belegt werden. So konnte gezeigt werden, dass der ADMA-Plasmaspiegel einen signifikanten Prädiktor sowohl für das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen als auch für die Gesamtmortalität darstellt (Maas 2007; Böger et al., 2005; Valkonen et al., 2001).

1.3 Endotheldysfunktion

Der Begriff der Endotheldysfunktion wird zur Beschreibung eines Zustandes verwendet, der mit einer Beeinträchtigung der „normalen“ Endothelfunktionen einhergeht. Ein Merkmal der Endotheldysfunktion ist die reduzierte NO-Bioverfügbarkeit (Ross et al., 1999). Die endothelabhängige Vasodilatation als Surrogatmarker der Endotheldysfunktion stellt eine objektivierbare Messgröße dar,

deren klinische Bedeutung in den letzten Jahren für eine Reihe von Risikofaktoren und kardiovaskuläre Erkrankungen verifiziert werden konnte (Heitzer et al., 2001; Perticone et al., 2004). Untersuchungen konnten zeigen, dass mit einer gestörten endothelabhängigen Vasodilatation in der Regel auch andere essentielle Funktionen des Endothels beeinträchtigt sind (Ross et al., 1999). Insofern kann die gestörte endothelabhängige Vasodilatation als Indikator für eine generelle funktionelle Schädigung des Endothels interpretiert werden.

1.4 Die arterielle Hypertonie

Im Rahmen der WHO-MONICA-Studie konnte gezeigt werden, dass die arterielle Hypertonie in der deutschen Bevölkerung ein weit verbreitetes, chronisches Gesundheitsproblem darstellt (Gasse et al., 2001). So beträgt die Punktprävalenz der arteriellen Hypertonie bei den über 60-jährigen mehr als 60% (Thefeld et al., 2000). Bei der Mehrheit dieser Patienten kann keine isolierte Ursache für das Bestehen des Bluthochdrucks identifiziert werden (Rudnick et al., 1977; Danielson et al., 1981; Sinclair et al., 1987). Diese Form der arteriellen Hypertonie wird daher als „primäre Hypertonie“ bezeichnet. Unterschieden hiervon wird die „sekundäre Hypertonie“, die dann vorliegt, wenn tatsächlich eine organische Ursache bzw. ein Auslöser für die Hypertonie identifiziert werden kann. Epidemiologische Studien haben zudem den Nachweis erbracht, dass neben einer engen Beziehung zwischen Lebensalter und Erhöhung des Blutdruckes auch eine Korrelation zwischen Blutdruck und dem Auftreten von Folgeerkrankungen besteht (Magrini et al., 1992). Eine Meta-Analyse aller in den letzten 30 Jahren durchgeführten prospektiven Beobachtungsstudien zu diesem Thema hat gezeigt, dass Unterschiede im durchschnittlichen diastolischen Blutdruck von etwa 30 mmHg mit einem fünffach erhöhtem Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit verbunden ist (Kaplan et al., 2002). Das Risiko steigt dabei von den niedrigen zu den hohen Blutdruckwerten kontinuierlich an. Ähnlich konstante, zum Teil sogar noch deutlichere Risikobeziehungen bestehen zwischen Blutdruckerhöhung und dem Auftreten von cerebrovaskulärer Komplikationen, chronischer Herzinsuffizienz sowie der Niereninsuffizienz (Kaplan et al., 2002).

Wie beschrieben, wird NO kontinuierlich im Endothel durch die eNOS gebildet und freigesetzt. Diese kontinuierliche basale NO-Sekretion trägt wesentlich zur Regulation des Gefäßtonus bei (Moncada et al., 1993). Es wird daher vermutet, dass die primäre Hypertonie durch eine Reduktion der basalen endothelialen NO-Bioverfügbarkeit bedingt ist. So konnte gezeigt werden, dass die basale Freisetzung von NO bei Patienten mit arterieller Hypertonie vermindert ist und Hypertoniker eine reduzierte endothelabhängige Vasodilatation aufweisen (Panza et al., 1993; Linder et al., 1990).

Eine Reihe von Studien belegen darüber hinaus die Bedeutung von Angiotensin II, dem Haupteffektorpeptid des Renin-Angotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), bei der Pathogenese endothelialer Funktionseinschränkungen und Hypertonie (Strawn et al., 2000; Schiffrin et al., 2000). So konnte eine Therapie mit AT1-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit bestehender Hypertonie eine bestehende endotheliale Dysfunktion signifikant verbessern (Schiffrin et al., 2000). Als ursächlich für diese Angiotensin II vermittelte endotheliale Dysfunktion wird hierbei die über den AT1-Rezeptor vermittelte Zunahme der Sauerstoffradikalbildung angesehen, die eine Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit im Endothel bedingt (Rueckschloss et al., 2002). Die gesteigerte RAAS-Aktivität und Zunahme der lokalen Angiotensin II-Konzentrationen, die häufig bei Patienten mit primärer Hypertonie beobachtet werden, gelten als eine Ursache der endothelialen Dysfunktion (Peters et al., 1995). Angiotensin II stimuliert die NADPH/NADH-Oxidase im Endothel und glatten Muskelzellen, was zur Induktion der ROS-Produktion führt (Nakashima et al., 2006). ROS induzieren wie beschrieben Signaltransduktionswege, die zu Endotheldysfunktion, Zellwachstum und Entzündung führen (Dimmeler et al., 1997; Peng et al., 1995). Diese Veränderungen induzieren unter anderem Endothelin, Adhäsionsmoleküle sowie *Nuklear-Factor- κ B* und andere Entzündungsmediatoren, führen aber auch zu gesteigertem Abbau von NO und Entkopplung der eNOS. In der Gesamtheit beobachtet man unter Einfluss von Angiotensin II eine Zunahme des vaskulären Widerstandes und ein verstärktes vaskuläres *Remodeling* (Schiffrin et al., 2002). Durch diese Prozesse aggraviert die endotheliale Dysfunktion die bestehende Hypertonie und beschleunigt das Fortschreiten von Arteriosklerose. Zudem wurde unter dem Einfluss von Angiotensin II eine Erhöhung des endogenen NO-Synthase Inhibitors ADMA im Plasma beobachtet, was weiter zur Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit beitragen könnte (Ito et al., 2001).

Telmisartan gehört zu den nicht-kompetitiven AT1-Rezeptor-Antagonisten und gilt als eines der am besten verträglichen Antihypertensiva (Sharpe et al., 2001). Bis dato sind allerdings keine Studien durchgeführt worden, die den Einfluss von Telmisartan auf die endothelabhängige Vasodilatation bzw. auf die NO-Aktivität des Endothels belegen.

Für den Calciumkanalblocker Nifedipin konnte eine Verbesserung der Endothelfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung nachgewiesen werden (ENCORE Investigators 2003). Wie Nifedipin steigert Nisoldipin, ebenfalls ein Calciumkanalblocker vom Dihydropyridin-Typ, *in vitro* die NO-Bildung kultivierter Endothelzellen und übt antioxidative Effekte aus (Berkels et al., 2001). Bisher fehlen allerdings *in vivo*-Studien, die einen möglichen Effekt von Nisoldipin auf die endothelabhängige Vasodilatation bzw. auf oxidative Vorgänge thematisieren. Im Rahmen dieser Studie haben wir daher den Effekt einer antihypertensiven Therapie von Telmisartan, Nisoldipin bzw. der Kombination beider Substanzen auf die endothelabhängige Vasodilatation bei Patienten mit essentieller Hypertonie untersucht.

1.5 Endotheliale Integrität

Mature Endothelzellen zeichnen sich durch ihre Langlebigkeit und somit einem niedrigen Proliferationsbedarf aus (Reinders et al., 2006). Unter physiologischen Bedingungen ist ihre regenerative Kapazität ausreichend, um die endotheliale Integrität aufrechtzuerhalten (Bonello et al., 2006). Mechanische und entzündliche Stimuli, wie sie beispielsweise im Rahmen der arteriellen Hypertonie bzw. bei chronisch entzündlichen Gefäßerkrankungen autoimmuner Genese beobachtet werden, können zur Ablösung maturer Endothelzellen aus dem intakten Endothelzellverband führen (Woywodt et al., 2003). Die vaskuläre Integrität wird somit durch das Gleichgewicht zwischen dem Ausmaß der Endothelschädigung und der endogenen Regenerationsvorgänge bestimmt. Zwei Mechanismen tragen zur Reparatur von Endothelschäden bei: Mature Endothelzellen, die aus benachbarten Regionen proliferieren und in das Gebiet der Denudierung migrieren und knochenmarkbasierte endotheliale Progenitorzellen (EPC), die über das zirkulierenden Blut an die denudierten Endothelabschnitte gelangen (Nishimura et al., 2005; Walter et al., 2002; Fujiyama et al., 2003). Die im Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen

machen weniger als 0.01% der zirkulierenden Zellen aus. Im Rahmen von Gefäßverletzungen, Herzmuskelverletzungen und Tumorerkrankungen kommt es zur vermehrten Freisetzung dieses Zelltyps aus dem Knochenmark in das periphere Blut (Rafii et al., 2003, Gill et al, 2001; Massa et al, 2005; Valgimigli et al, 2004; Kim et al, 2003). Maßgeblicher Mechanismus scheint dabei die Induktion verschiedener Wachstumsfaktoren, wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *stromal-cell derived factor-1* (SDF-1) zu sein (Gill et al., 2001).

Von EPC konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass sie maßgeblich an der Revaskularisierung ischämischer Organen sowie Endothelialisierung von denudierten Gefäßen und Gefäßimplantaten beteiligt sind (Peichev et al, 2000; Takahashi et al, 1999; Iwakura et al, 2003; Bhattacharya et al, 2000). Dies untermauert die entscheidende Bedeutung von EPC beim Erhalt der endothelialen Integrität (Urbich et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Zahl der zirkulierenden EPC positiv mit der endothelabhängigen Vasodilatation, also mit der Endothelfunktion *in vivo*, korreliert (Hill et al., 2003). Hingegen scheint eine inverse Korrelation bezüglich der Zahl zirkulierender EPC bzw. ihrer Funktionalität, wie z.B. der Migrationsfähigkeit, und dem kumulativen kardiovaskulären Risiko des Individuums zu bestehen (Vasa et al., 2001B). So konnte bei Patienten mit essentieller Hypertonie eine signifikant erniedrigte Zahl zirkulierender EPC im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv nachgewiesen werden. Zudem zeigen EPC von Hypertoniern eine gegenüber denen von gesunden Menschen signifikant reduzierte *ex vivo*-Migrationsfähigkeit (Vasa et al., 2001B). Die essentielle Hypertonie ist mit erhöhten Konzentrationen von Angiotensin II, dem Haupteffektorpeptid des RAAS assoziiert. Von Angiotensin II konnte gezeigt werden konnte, dass es eine vermehrte Proliferation von EPC induzieren kann (Imanishi et al.; 2004). Obwohl die Rolle von EPC für den Erhalt der vaskulären Integrität bekannt ist, blieb ihre Rolle im Rahmen der essenziellen Hypertonie oder der antihypertensiven Therapie bis jetzt undefiniert.

Endotheliale Progenitorzellen lassen sich durch verschiedene Ansätze im peripheren Blut detektieren. Um eine Differenzierung zwischen unreifer Stammzelle, maturer Endothelzelle und endothelialer Progenitorzellen zu ermöglichen, werden spezifische Oberflächenantigene herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass EPC die Kombination CD34⁺, CD133⁺, und VEGF-Rezeptor2⁺ auf ihrer Oberfläche exprimiert

und diese Zellen mittels FACS-Analyse identifiziert werden können (Gehling et al., 2000). Da ausgereifte Endothelzellen ebenfalls CD34 und VEGF-Rezeptor2 exprimieren können, stellt CD133 gegenwärtig den einzigen Marker zur Differenzierung zwischen EPC und Endothelzelle dar. (Fina et al, 1990; Patterson et al, 1995; Yin et al, 1997). Hämatopoetische Stammzellen können jedoch ebenfalls diese drei Oberflächenantigene aufweisen, was die Differenzierung zwischen EPC und hämatopoetischer Stammzelle schwer gestaltet (Miraglia et al, 1997; Civin et al, 1984; Ziegler et al, 1999). Das Zelladhäsionsmolekül CD146 (Endo-1 oder P1H12) scheint gegenwärtig eine Möglichkeit darzustellen, EPC zu identifizieren, da es weder auf ausgereiften Endothelzellen noch auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Solovey et al, 2001).

Ein weiterer Ansatz zur Identifikation und Quantifizierung von EPC stellt das Kolonie-*Assay* dar (Hill et al, 2003; Ingram et al, 2004; Peichev et al, 2000). Aus dem peripheren Blut gewonnene Progenitorzellen sind in der Lage *ex vivo* endothelial differenzierte Kolonie (CFU-EC) zu bilden. Als Kolonie wird eine klonale Ansammlung von mehr als 30-50 Zellen definiert, wobei diese Kolonien analog als *colony-forming units* (CFU) bezeichnet werden.

Das Verständnis für endotheliale Regenerationsmechanismen durch zirkulierende Progenitorzellen eröffnete neue Möglichkeiten der therapeutischen Einflussnahme. Unter der Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern (Statinen) konnte die Zahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen gesteigert werden (Vasa et al., 2001A; Llevadot et al, 2001). Zudem scheinen Statine die Alterung isolierter EPC zu verlangsamen und ihre Proliferationsfähigkeit zu erhöhen (Assmus et al., 2003). Bisher wurde der Einfluss des RAAS, vor allem seines Haupteffektorpeptides Angiotensin II, auf die Zahl bzw. Funktionalität zirkulierender EPC nicht untersucht. Daher untersuchten wir in der vorliegenden Studie, wie sich die antihypertensive Therapie mit dem AT1-Rezeptor-Antagonisten Telmisartan, dem Calciumkanalblocker Nisoldipin bzw. ihrer Kombination auf diesen Sachverhalt auswirkt.

1.6 Die Prüfmedikation

Calciumkanalblocker und AT1-Rezeptor-Antagonisten stehen in den „Empfehlungen zur Hochdruckbehandlung“ der Deutschen Hochdruckliga zusammen mit β -Blockern, Diuretika und ACE-Hemmern zur Monotherapie der primären Hypertonie zur Verfügung.

Telmisartan ist ein Vertreter der selektiven AT1-Rezeptor-Antagonisten, der durch nicht-kompetitiven Antagonismus die Wirkung des Peptidhormons Angiotensin II am AT1-Rezeptor reduziert (McClellan et al., 1998). Hierdurch kommt es unter anderem zu einem Abfall des systemischen Blutdrucks und einer Abnahme der Aldosteronkonzentration im Plasma mit Reduktion der Wasser- sowie Natriumrückresorption. Telmisartan hat keine Affinität zum Angiotensin II Subtyp 2-Rezeptor (Siragy et al., 1999). Unter der Therapie mit Telmisartan kommt es zu einem Anstieg des Angiotensin II Plasmaspiegels, was eine Überstimulation des Subtyp 2-Rezeptors zur Folge hat. Über die physiologische Bedeutung dieser Überstimulation kann nach dem heutigen Stand der Wissenschaft allerdings keine valide Aussage gemacht werden. Telmisartan hat eine mittlere Plasmahalbwertszeit von 20 Stunden, wobei es überwiegend durch hepatische Glucuronidierung inaktiviert und über die Galle ausgeschieden wird. Eine signifikante Senkung des systemischen Blutdrucks wurde bereits ab einer Dosierung von 20-40 mg Telmisartan / Tag beobachtet (Sharpe et al., 2001).

Nisoldipin gehört zu der Kategorie der Calciumkanalblocker von Dihydropyridin-Typ und blockiert spezifisch den langsamen, spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanal. Zugleich besitzt Nisoldipin Selektivität für periphere Widerstandsgefäße, die seine stark vasodilatatorische und ausgeprägte nachlastsenkende Wirkkomponente begründet (Scholz et al., 1997). Nisoldipin wird nach oraler Einnahme praktisch vollständig aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und unterliegt einem ausgeprägten *First-Pass*-Metabolismus in der Leber, so dass die systemische Bioverfügbarkeit von oral appliziertem Nisoldipin bei nur 4-8% liegt. Nisoldipin wird hepatisch über das Cytochrom P450 3A4-System metabolisiert. Die Halbwertszeit von Nisoldipin-Präparaten beträgt ca. 22 Stunden.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau und Studienablauf

Diese klinische Studie wurde als monozentrische einfach blinde Studie der Phase II im Parallelgruppen-Design konzipiert und nach Erhalt des Ethik-Votums der Ethikkommission Hamburg am 07. Oktober 2003 begonnen.

Die rechtlichen Grundlagen der Studie bildeten die Deklaration von Helsinki, § 10, 29, 40 -42, 47 63a, 64, 66, 67, 96, 97 des Arzneimittelgesetzes (AMG), die Bekanntmachung des Bundesministeriums für Jugend, Frauen, Familie und Gesundheit vom 19. Dezember 1987 „Grundsätze für die ordnungsgemäße Durchführung der klinischen Prüfung von Arzneimitteln“, sowie die International Conference on Harmonisation: Note for guidance and good clinical practice, CPMP/ICH/135/405.

Insgesamt wurden 37 Patienten mit essentieller arterieller Hypertonie gemäß den Ein- bzw. Ausschlusskriterien (siehe 2.2.1 und 2.2.2) eingeschlossen und nach schriftlicher Einwilligung in eine der drei Therapiegruppen randomisiert. Die Ausgabe der Studienmedikation sah eine Dosiserhöhung nach der Hälfte der Studiendauer vor. Patienten der Gruppe A erhielten in den Wochen 1-3 40 mg Telmisartan/Tag und in den Wochen 4-6 80 mg Telmisartan/Tag. Patienten der Gruppe B erhielten in den Wochen 1-3 10 mg Nisoldipin/Tag und in den Wochen 4-6 20 mg Nisoldipin/Tag. Patienten der Gruppe C erhielten in den Wochen 1-3 40 mg Telmisartan + 10 mg Nisoldipin/Tag und in den Wochen 4-6 80 mg Telmisartan + 10 mg Nisoldipin/Tag (siehe Tabelle 1). Die Studienmedikation wurde von Bayer Vital GmbH zur Verfügung gestellt und in der Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gemäß §40 AMG zu Studienzwecken umverpackt und in das verblindete Format überführt.

Patienten, die zuvor bereits ein Antihypertensivum eingenommen hatten, durchliefen eine zweiwöchige *Wash-Out*-Phase vor Erhalt der Studienmedikation. Um eine Blutdruckentgleisung in der *Wash-Out*-Phase zu verhindern, wurden die Blutdruckwerte der Patienten in der *Wash-Out*-Phase täglich in der Patientenselbstmessung bzw. im

Prüfzentrum überprüft. Als Grenzwerte für tolerierbare Blutdrücke wurden Blutdruckwerte kleiner als 180 mmHg systolisch bzw. 110 mmHg diastolisch definiert. Beim Überschreiten dieser Grenzwerte erhielten die Patienten als zusätzliche antihypertensive Medikation Hydrochlorothiazid, bei insuffizienter Blutdrucksenkung hierunter zusätzlich Clonidin.

Tabelle 1: Studienmedikation der einzelnen Therapie-Gruppen

Gruppe	n	Medikation Woche 1 – 3	Medikation Woche 4 – 6	Untersuchungstage (UT)
Gruppe A Telmisartan- Gruppe	12	40 mg Telmisartan /Tag	80 mg Telmisartan/Tag	1. UT am Tag 0 (<i>Baseline</i>) 2. UT am Tag 21 3. UT am Tag 42
Gruppe B Nisoldipin-Gruppe	13	10 mg Nisoldipin/Tag	20 mg Nisoldipin/Tag	1. UT am Tag 0 (<i>Baseline</i>) 2. UT am Tag 21 3. UT am Tag 42
Gruppe C Kombinations- Gruppe	12	40 mg Telmisartan/Tag + 10 mg Nisoldipin/Tag	80 mg Telmisartan/Tag + 10mg Nisoldipin/Tag	1. UT am Tag 0 (<i>Baseline</i>) 2. UT am Tag 21 3. UT am Tag 42

Vor Beginn, nach 3- sowie 6-wöchiger Therapie mit den beschriebenen Antihypertensiva fanden sich die Patienten zur Untersuchung und Erhebung der Zielp Parameter im Prüfzentrum ein. Am Tag 0 (*Baseline*-Untersuchung) trafen die Patienten nüchtern um 08:00 Uhr im Prüfzentrum ein, gaben eine Urinprobe ab und es erfolgte eine basale Blutentnahme. Die Blutentnahme beinhaltete als Routinediagnostik ein kleines Blutbild (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Hb), AST, ALT, CK, S-Kreatinin, CRP und Elektrolyte. Zusätzlich wurde für den Nachweis von ADMA EDTA-Vollblut, für die *ex vivo*-Messung der Thrombozytenaggregation Citrat-Vollblut und zum Nachweis endothelialer Progenitorzellen heparinisiertes Vollblut entnommen. Im Anschluss an die Blutentnahme erfolgte die Messung der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Vasodilatation mittels Duplex-Sonographie, wie bei Corretti und

Mitarbeitern beschrieben (Corretti et al., 2002). Anschließend erhielt der Patient seine Prüfmedikation mit einer detaillierten schriftlichen Einnahmeanleitung. Nach Anlegen des 24h-Blutdruckmessgerätes wurde der Patient nach Hause entlassen. Am Folgetag (Tag 1) erfolgte die Rückgabe des 24h-Blutdruckmessgerätes sowie die erste Medikamenteinnahme durch den Patienten. Analog hierzu erfolgten auch die Untersuchungen am Tag 21 und Tag 42.

2.2 Patienten

Die Prüfung begann, wenn anhand der Anamnese, körperlichen Untersuchung und Blutanalyse die Kriterien für den Einschluss in die Prüfung erfüllt waren, der Patient über die Zielsetzung der Studie, die Prüfmedikation, Risiken und Versicherungsschutz aufgeklärt war und die Einverständniserklärung unterzeichnet vorlag. Neben Anamnese und klinischer Untersuchung erfolgte eine Einschlussuntersuchung inklusive klinisch-chemischer und hämatologischer Analysen, die ein kleines Blutbild, AST, ALT, CK, S-Kreatinin, BKS, Gesamtcholesterin, Triglyceride, LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin enthielt. Patienten, die zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie ein Antihypertensivum einnahmen, setzten wie oben bereits beschrieben dieses zwei Wochen vor der Basaluntersuchung ab und hielten somit eine *Wash-Out*-Phase von zwei Wochen ein.

2.2.1 Einschlusskriterien

- Männliche und weibliche Patienten mit essentieller Hypertonie (definiert als RR systolisch ≥ 140 mmHg und/oder RR diastolisch ≥ 90 mmHg),
- Alter zwischen 25 und 80 Jahren,
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung des Patienten,
- Hämoglobin-Konzentration im Vollblut $\geq 12,0$ mg/dl.

2.2.2 Ausschlusskriterien

- Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung innerhalb der letzten 30 Tage,
- Patient mit bekanntem Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenabusus,

- Schwangere oder stillende Patientinnen,
- Einnahme oraler Kontrazeptiva oder postmenopausale Hormonersatztherapie,
- Aktive Lebererkrankung oder Leberinsuffizienz (Serum-AST oder Serum-ALT $\geq 1,5$ -fach oberhalb des oberen Normwertes),
- Obstruktive Gallenfunktionsstörung,
- Fortgeschrittene Niereninsuffizienz (errechnete Kreatinin-Clearance ≤ 30 ml/min [Cockcroft-Gault-Formel]),
- Nephrotisches Syndrom oder Dysproteinämie,
- Nierenarterienstenose,
- Bereits zuvor aufgetretene Unverträglichkeit gegen einen AT1-Rezeptor-Antagonisten und/oder einen Calciumkanalblocker,
- Höhergradige Aortenstenose, hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie,
- Diabetes mellitus,
- Primärer Hyperaldosteronismus,
- Akuter Myokardinfarkt innerhalb der letzten vier Wochen vor Einschluss in die Studie, instabile Angina pectoris,
- Patienten mit schwer einstellbarem oder in den letzten drei Monaten vor Beginn der Studie stark schwankendem Blutdruck,
- Aktive Blutspender,
- Vorliegen von hypertoniebedingten Endorganschäden (Niereninsuffizienz [errechnete oder gemessene Kreatinin-Clearance ≤ 30 ml/min], koronare Herzkrankheit [stabile oder instabile Angina pectoris oder Zustand nach akutem Myokardinfarkt] oder chronische Herzinsuffizienz [NYHA-Stadium \geq II], Zustand nach Schlaganfall oder TIA),
- Andere schwere oder chronische Erkrankungen.

2.3 Messung des 24-Stunden-Blutdruckes

Bei jedem Patienten wurde im Anschluss an die Ultraschalluntersuchung an jedem Studientag eine 24-Stunden-Blutdruckmessung durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem automatischen Blutdruckmessgerät der Firma DIASYS Integra nach der allgemein etablierten Methode von Riva-Rocci (1896), wobei zwei Größen von Blutdruckmanschetten zur Verfügung standen, um den Armumfang des Patienten berücksichtigen zu können und mögliche Messfehler zu minimieren. Die Messung erfolgte am linken Oberarm. Zwischen 08:00 Uhr und 21:00 Uhr erfolgten die Messungen im Abstand von 15 Minuten. Zwischen 21:00 Uhr und 08:00 erfolgten die Messungen mit einem Abstand von 30 Minuten. Nach Ablauf der 24 Stunden fanden sich die Patienten wieder im Prüfzentrum ein und die Messdaten wurden mit Hilfe der DIASYS Software in Microsoft Exceltabellen übertragen.

2.4 Messung der Endothelfunktion

Die Messung der endothelabhängige Vasodilatation erfolgte mittels Duplex-Sonographie der A. brachialis nach der Standardmethodik wie bei Corretti und Kollegen beschrieben (Corretti et al., 2002). Im Rahmen dieser Methodik wird die endothelabhängige Vasodilatation als Antwort auf eine mehrminütige Okklusion der A. brachialis und die hiermit verbundene Ischämie mittels Ultraschall visualisiert. Dem Okklusionsreiz folgt hierbei eine Steigerung der endotheleigenen NO-Produktion mit konsekutiver Vasodilatation der entsprechenden Arterie. Das Ausmaß der provozierten Vasodilatation erlaubt somit Rückschlüsse auf die Endothelfunktion. Um Störgrößen zu minimieren, wurden die Patienten angewiesen, eine achtstündige Nahrungs- sowie Genussmittelkarenz einzuhalten (Kaffee, Tabak). Die Einnahme von vasoaktiven Medikamenten führte bereits im Vorfeld zum Ausschluss an der Studienteilnahme. Um psychische und physische Einflussgrößen zu minimieren, wurde die Messung in einem ruhigen, temperaturkontrollierten Raum (22°C) am liegenden Patienten durchgeführt.

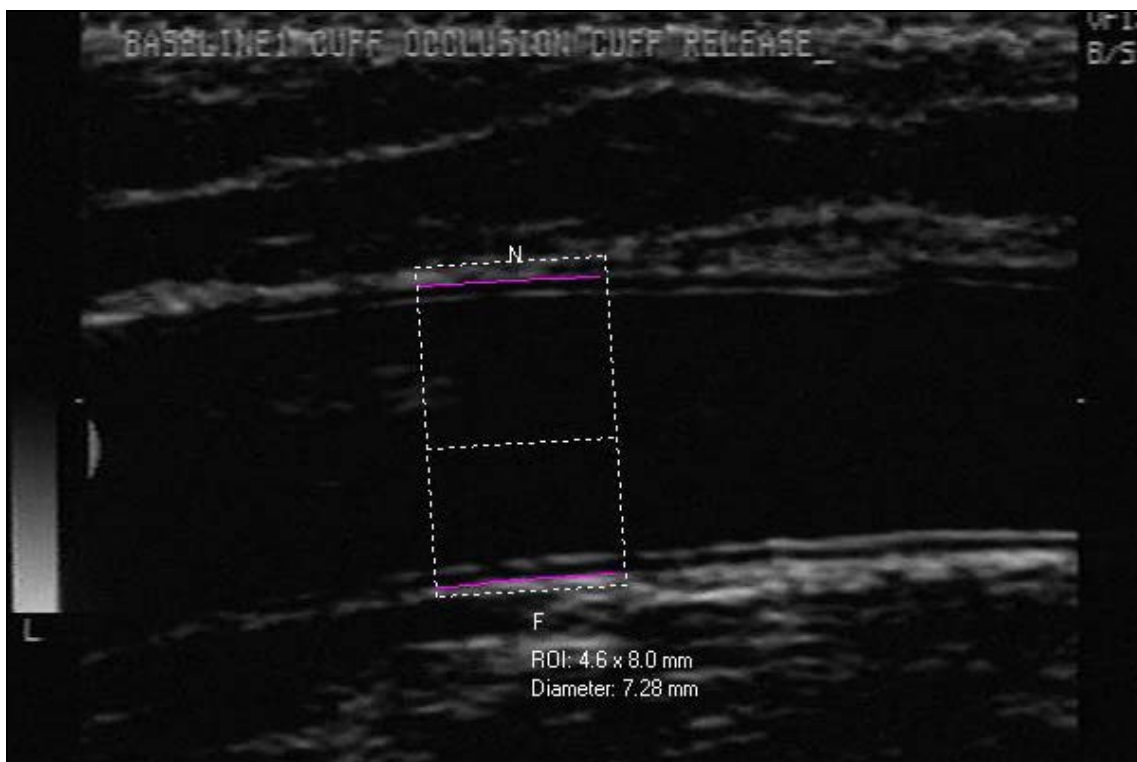


Abbildung 5: Messung der endothelabhängigen Vasodilatation. Mittels Duplex-Sonografie wurde die A. brachialis im Bereich der rechten Fossa cubitalis im Längsschnitt dargestellt. Die Breite des Messfensters wurde mit 4,6 mm für alle Messungen standardisiert. Als Grenzen für die Berechnung des Gefäßdurchmessers wurden jeweils die markierten Intima-Media-Grenzen herangezogen.

Zur Untersuchung wurde die A. brachialis im Längsschnitt im Bereich der rechten Fossa cubitalis mittels Duplex-Sonographie dargestellt (siehe Abbildung 5). Besonderes Augenmerk wurde dabei auf eine gute optische Abgrenzbarkeit zwischen Intima und Media der Gefäßwand gelegt. Der initial gewählte Gefäßabschnitt wurde für alle weiteren Messungen (Tag 2 und Tag 3) gezielt aufgesucht, um eine optimale Vergleichbarkeit zu erzielen. Die Ultraschalluntersuchungen wurden mittels Videorecorder fortlaufend auf eine Super-VHS-Kassette aufgezeichnet, digitalisiert und anschließend PC-gestützt (Brachial Analyzer®) ausgewertet.

2.4.1 Durchführung der Messung

Für die Bestimmung der endothelabhängigen Vasodilatation erfolgte eine *Baseline*-Bestimmung (*Baseline 1*) der A. brachialis in Ruhe. Anschließend wurde der Blutfluss der A. brachialis unter Verwendung einer Blutdruckmanschette für fünf Minuten durch Aufpumpen auf suprasystolische Druckwerte unterbunden (*Cuff Occlusion*). Nach dieser Okklusion wurde der Druck rasch aus der Blutdruckmanschette abgelassen (*Cuff Release*) und die reaktive Dilatation der A. brachialis für drei Minuten dokumentiert. Es folgte eine zehnminütige Ruhepause, in der der Ausgangstonus der A. brachialis wieder eintrat. Anschließend wurde die endothelunabhängige Vasodilatation bestimmt. Primär erfolgte erneut eine zweiminütige *Baseline*-Bestimmung (*Baseline 2*), der eine sublinguale Applikation von 0,4 mg Glyceroltrinitrat (GTN) folgte. Die GTN-induzierte Vasodilatation wurde für fünf Minuten aufgezeichnet und erreichte ca. eine Minute nach GTN-Applikation ihr Maximum.

2.4.2 Auswertung der Ultraschallbilder

Die Auswertung der Ultraschallbilder erfolgte computergestützt. 30 Sekunden jeder Messeinheit (*Baseline 1*, flussabhängige Vasodilatation, *Baseline 2*, flussunabhängige Vasodilatation) wurden mit Hilfe des Programms Brachial Analyzer Suite® in 300 Einzelbilder (10 Bilder/Sekunde) digitalisiert. Für die Messung der flussabhängigen Vasodilatation wurde der Zeitraum zwischen 60 – 90 Sekunden nach *Cuff Release* gewählt, da Vorergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, dass in dieser Zeitspanne die endothelabhängige Vasodilatation ihre Maximalwerte erreicht. Im Gegensatz dazu wurden für die Bestimmung der flussunabhängigen Vasodilatation eine 30 sekündige Sequenz drei Minuten nach GTN-Applikation digitalisiert. Die entstandenen 300 Einzelbilder wurden in das Programm Brachial Analyzer DICOM exportiert. Diese Software erlaubt es, den Gefäßdurchmesser und seine Veränderungen während der Messungen zu bestimmen, wobei die Berechnung jeweils die Intima-Media-Grenzen der longitudinal angeschnittenen Gefäßwand als Grenzen in die Berechnung einbezieht. Aus den 300 Einzelbildern entstanden so 300 Einzelwerte des Gefäßdurchmessers. Zur statistischen Berechnung von therapieinduzierten Veränderungen der endothelabhängigen und -unabhängigen Vasodilatation wurden jeweils die Maxima-Werte, die den Scheitelpunkt des Gefäßdurchmessers während der

Pulsation repräsentieren, in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel© exportiert (siehe Abbildung 6).

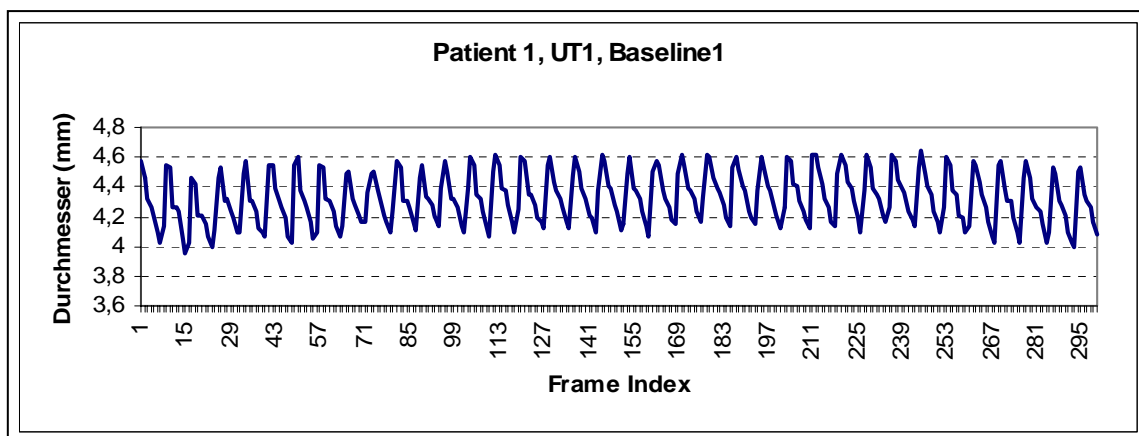


Abbildung 6: Für jede Messeinheit wurden 30 Sekunden in 300 Einzelbilder zerlegt (10 Bilder pro Sekunde), die den charakteristischen Verlauf des Gefäßdurchmessers widerspiegeln. Für die statistische Analyse wurden jeweils die Maxima-Werte, welche den Scheitelpunkt des Gefäßdurchmessers während der Pulsation repräsentieren herangezogen.

2.5 Messung von Nitrat im Urin

Die *ex vivo*-Untersuchung der NO-Synthase-Aktivität erfolgte durch Bestimmung des oxidativen Hauptmetaboliten des NO, Nitrat (NO_3^-) mittels GC-MS. Diese Methode erlaubt die Bestimmung des Metaboliten nach einem Derivatisierungsvorgang, bei dem das zu messende endogene Nitrat und sein zugesetztes ^{15}N -gelabelten Analogon, $^{15}\text{Nitrat}$, in einer Acetonlösung durch Pentafluorobenzylbromid (PFB-Bromid) in PFB- NO_3 und PFB- $^{15}\text{NO}_3$ überführt werden.

2.5.1 Erstellen des internen Standards

2.5.1.1 Herstellung von $^{15}\text{Nitrat}$

Für die Messung wurde $^{15}\text{Nitrat}$ in einer Konzentration von 800 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Als Ausgangslösung diente eine 100fach konzentrierte Lösung, von welcher 500 μl in 4500

μl destilliertem Wasser verdünnt wurden, um zu der gewünschten Konzentration zu gelangen.

2.5.2 Probenaufbereitung und Messung

100 μl Patientenurin wurden 10 μl ^{15}N Nitrat (800 $\mu\text{mol/l}$), 500 μl Aceton und 10 μl PFB-Bromid zugesetzt. Das Gemisch wurde in einem Autosamplergefäß gevortext und anschließend für eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Volumen von etwa 100 μl unter Stickstoffstrom eingengt. Im Anschluss wurde der Probe 300 μl Toluol zugesetzt und eine Minute gevortext. Zur Phasentrennung wurde die Probe für 5 Minuten bei 2000 rpm (Radius 150mm) zentrifugiert. 120 μl der entstandenen oberen Toluol-Phase wurden in ein Autosamplergefäß mit 0,1 ml Mikroinsert überführt und durch Zugabe von 120 μl Toluol 1:1 verdünnt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der GC-MS, die mit einer Kapillarsäule vom Typ DB-5 MS (30m \times 0,25 mm I.D., 0,25 μm Filmdicke) versehen war. Als Trägergas diente Helium (70 kPa). Das folgende Ofentemperaturprogramm wurde für die GC-Säule verwendet: 2 Minuten bei 70 °C, Erhöhung der Temperatur in Raten von 5 °C/min auf 100 °C, gefolgt von Raten von 30 °C/min auf 310 °C. Als Ionisierungsgas im Massenspektrometer diente Methan unter NICI (*negative ion chemical ionization*)-Bedingungen. Die Temperaturen im MS waren konstant 180 °C an der Ionenquelle, 280 °C an der Transferline und 200 °C am Injektor. Die Elektronenenergie und der Elektronenstrom wurden bei 230 eV und 300 μA eingestellt. Die Elektronen-Multiplier-Spannung wurde mit 1,2 kV festgesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 1 μl im *Splitless*-Modus. Das Peakflächenverhältnis, welches sich aus der Division des gemessenen internen Standards und der gemessenen endogenen Konzentrationen ergab, wurde multipliziert mit dem eingesetzten internen Standard sowie der Kreatinin-Clearance um die Menge des ausgeschiedenen Nitrats zu bestimmen.

2.6 Messung der ADMA-Plasmakonzentrationen

Für die Bestimmung der ADMA-Plasmakonzentrationen im Rahmen der Studie wurde ein validierter ADMA[®]-ELISA Kit verwendet. Dieser ELISA zeichnet sich durch seine hohe Spezifität aus (Schulze et al. 2004). Kreuzreaktivitäten zu Arginin, Monomethylarginin (NMMA) und SDMA können als vernachlässigbar betrachtet

werden. Aus ETDA-Vollblut wurde durch Zentrifugation bei 2000 G für 10 Minuten Plasma gewonnen, welches zur Bestimmung der ADMA-Plasmaspiegel diente. Alle Arbeitsschritte der ADMA-Messung fanden entsprechend der Arbeitsanleitung des Herstellers statt.

2.6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Die mitgelieferten Mikrotiterstreifen wurden innerhalb von etwa 10 Minuten auf Zimmertemperatur erwärmt. Der Waschpuffer wurde mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Die mitgelieferte Trockensubstanz der Ausgleichsreagenz wurde in 5 ml destilliertem Wasser gelöst, kurz gevortext und anschließend 30 min auf den Horizontalschüttler gelegt. Die Acylierungsreagenz wurde in 1,5 ml N-N-Dimethylhylformamid (DMF) gelöst und für 5 min auf den Horizontalschüttler gelegt. Die Acylierungsreagenz wurde vor Gebrauch immer frisch angesetzt. Alle anderen Reagenzien, die benötigt wurden, waren im ADMA[®]-ELISA Kit gebrauchsfertig enthalten.

2.6.2 Probenvorbereitung (Acylierung)

Im Lieferumfang waren sechs Fläschchen Standard (A – F) enthalten. Je 20 µl Standard A – F, je 20 µl Kontrolle 1 & 2 und je 20 µl der Plasmaprobe wurden in die Vertiefungen der im Kit enthaltenen Reaktionsplatte pipettiert. In jede Vertiefung kamen des Weiteren 25 µl Acylierungspuffer und 25 µl Ausgleichsreagenz. Die bestückte Reaktionsplatte wurde für 10 Sekunden gemischt. Vom frisch angesetzten Acylierungsreagenz wurden 25 µl in jede Vertiefung pipettiert und umgehend gemischt. Die Reaktionsplatte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. 1,5 ml des zuvor angesetzten Ausgleichsreagenzes wurden mit 9 ml destilliertem Wasser versetzt und jede Vertiefung mit 100 µl dieser Lösung bestückt. Abschließend wurde die Reaktionsplatte nochmals 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Je 50 µl der so vorbereiteten Proben wurden in dem ADMA-ELISA eingesetzt.

2.6.3 Testdurchführung

Jeweils 50 µl des vorbereiteten Standards A – F, 50 µl der vorbereiteten Kontrollen und 50 µl der vorbereiteten Proben wurden als Doppelbestimmung in die Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettiert. Anschließend wurde jede Vertiefung des Weiteren mit 50 µl Antiserum, welches gebrauchsfertig im Kit enthalten war, bestückt. Nachdem die Mikrotiterstreifen kurz auf dem Horizontalschüttler gemischt wurden, wurden die Proben mit Haftklebefolie abgedeckt und für 15 – 20 Stunden bei 2 – 8 °C inkubiert. Anschließend wurden die Mikrotiterstreifen gewaschen, indem die Vertiefungen entleert, mit 250 µl Waschpuffer bestückt und für einige Sekunden auf den Horizontalschüttler verbracht wurden. Die Mikrotiterstreifen wurden anschließend umgedreht und auf einem Papierhandtuch kurz ausgeklopft, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal durchgeführt. Nach dem Waschen wurden jeweils 100 µl Enzymkonjugat in die Vertiefungen pipettiert. Es schloss sich erneut eine Inkubation von 60 Minuten auf dem Horizontalschüttler an, bevor der oben beschriebene Waschvorgang wiederholt wurde, um nicht gebundenes Enzymkonjugat zu entfernen. Anschließend erfolgte die Substrat-Inkubation, indem jede Kammer mit 100 µl des mitgelieferten Substrates (TMB-Lösung) bestückt wurde und für 20 bis 30 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Das Stoppen der Substrat-Inkubation erfolgte durch Zugabe von 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung. Die Messung erfolgte anschließend photometrisch im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm.

2.7 Messung der *ex vivo*-Thrombozytenaggregation

Die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgte nach dem turbidimetrischen Verfahren wie bei Born und Kollegen beschrieben (Born et al., 1975). Dieses Messverfahren beruht auf der Tatsache, dass die optische Dichte einer Zellsuspension, in diesem Fall plättchenarmes bzw. plättchenreiches Plasma, von der Zellzahl in der Suspension abhängig ist. Tritt in einer Zellsuspension eine Aggregation ein, so nimmt entsprechend die Zellzahl ab und die Lichttransmission zu, was fortlaufend photometrisch registriert und in Kurvenform kontinuierlich aufgezeichnet werden kann. Die Bestimmung der Thrombozytenaggregation erfolgte nach Zugabe der pro-

aggregatorischen Mediatoren ADP bzw. Kollagen zum plättchenreichen Zitratplasma. Für die jeweilige Eichung der Messapparatur wurde (um den Nullwert der Lichttransmission darzustellen) plättchenreiches Plasma vor Zugabe des Agonisten verwendet. Plättchenarmes Plasma diente zur Darstellung der uneingeschränkten, bzw. 100%igen Lichttransmission. 10 ml Zitratblut wurden für 15 min bei 200 G bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die obere Phase, die das plättchenreiche Plasma bildete, mit einer Pipette entnommen und in ein 10 ml-Röhrchen überführt. Von dieser Suspension gingen 250 μ l in die Messung der Thrombozytenaggregation ein. Der im Blutentnahmeröhrchen verbliebene Blutkuchen wurde für die Gewinnung von plättchenarmen Plasma benutzt. Nach der Entnahme des plättchenreichen Plasmas wurde das im Blutentnahmeröhrchen verbliebene Pellet erneut zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 2000 G. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase, das plättchenarme Plasma, ebenfalls in ein 10 ml-Röhrchen überführt. Der im Blutentnahmeröhrchen verbliebene Blutkuchen wurde verworfen. Zum Auslösen des Aggregationsvorganges wurden die oben genannten plättchenaktivierenden Mediatoren dem plättchenreichen Plasma zugesetzt. Alle Arbeitsschritte der Herstellung der gewünschten Induktor-Lösungen erfolgten auf Eis gekühlt. Die Konzentration der Kollagen-Lösung wurde so gewählt, dass die Kollagen-Endkonzentration während der Messung in 250 μ l plättchenreichem Plasma 1 mg/l betrug. Dafür wurden 30 μ l Kollagenreagenz und 270 μ l Horn-Puffer in einer 1:10-Lösung zusammengeführt. 130 μ l dieser 1:10-Lösung und 370 μ l Hornpuffer ergaben die 26 mg/l-Lösung, die für die anschließende Messung verwendet wurde. Die Konzentration der ADP-Lösung wurde so gewählt, dass die Endkonzentration während der Messung in 250 μ l plättchenreichem Plasma 2 μ mol/l betrug. Als Ausgangslösung wurde eine 1 mg/ml-Lösung hergestellt, indem ADP-Trockensubstanz in einer äquivalenten Menge destilliertem Wasser gelöst wurde. 100 μ l dieser 1 mg/ml-Lösung mit 900 μ l Kochsalzlösung ergab die 1:10-Lösung, welche weiter verdünnt wurde indem 245 μ l der 1:10-Lösung zu 755 μ l Kochsalzlösung hinzugegeben wurden. Die durch diesen Arbeitsschritt entstandene 2 μ mol/l-Lösung wurde für die anschließende Messung verwendet.

2.7.1 Messung der *ex vivo*-Thrombozytenaggregation

Das Aggregometer wurde vor jeder Messung mit dem zu aggregierenden Patientenplasma geeicht. Für die Eichung wurden 250 µl plättchenarmes und 250 µl plättchenreiches Plasma in einer Küvette für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert und danach in den Strahlengang eingebracht. Für die Messung der Thrombozytenaggregation wurden jeweils 250 µl plättchenreiches Plasma für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert, danach in den Strahlengang eingebracht und die Aggregation durch Zugabe von 10 µl der jeweiligen Induktor-Lösung Kollagen bzw. ADP ausgelöst. Die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgte nach Zugabe der plättchenaktivierenden Substanz für 240 Sekunden, wobei das Sedimentieren der Zellsuspension durch konstantes Rühren von 1000 Umdrehungen/Minute verhindert wurde. Jede Messung erfolgte in Doppelbestimmung. Die fortlaufende Aggregation wurde in Kurvenform kontinuierlich aufgezeichnet. Anhand des Kurvenverlaufes konnten die maximale Aggregation [%] bestimmt werden.

2.8 Messung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen im Blut

Zur Bestimmung der Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen und ihrer Koloniebildungsfähigkeit wurde von den Probanden an allen drei Untersuchungstagen heparinisiertes Vollblut entnommen. Die Blutproben wurden für 5 Minuten in einem Hämolysepuffer (0,155 mol/L NH₄CL, 0,012 mol/L NaHCO₃, 0,1 mmol/L EDTA, pH 7,2) inkubiert, bevor sie der FACS-Analyse bzw. dem Kolonie-Assay zugeführt wurden.

2.8.1 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie ist ein Immunfluoreszenzverfahren zur Bestimmung der Expression von Zelloberflächenmolekülen (Herzenberg et al., 2000). Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht in der hydrodynamischen Fokussierung, d. h. eine Aneinanderreihung und Erfassung von Einzelzellen mittels polarisierten Lichtstrahls. Die entstehende charakteristische Lichtstreuung kann mit Hilfe von Detektoren gemessen werden. Zur Analyse der Zelloberflächenantigene wurden in der vorliegenden Studie mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC bzw. PE konjugierte monoklonale Antikörper verwendet. Das zur FACS-Analyse verwendete Gerät besitzt jeweils einen

Argonlaser (488 nm) und einen Rot-Diodenlaser (635 nm). Die Signale bezüglich Fluoreszenz und Streulicht wurden durch ein Filtersystem und Photomultiplier verstärkt und mittels Cell Quest Software analysiert. Die Zellen wurden für 5 Minuten im Hämolysepuffer inkubiert und anschließend mit PBS + 0,1% BSA gewaschen. Zur Inkubation mit verschiedenen Kombinationen monoklonaler Antikörper wurden die Zellen in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Pro *Well* wurden 1×10^6 Zellen mit den jeweiligen monoklonalen Antikörpern inkubiert. Monoklonale Antikörper gegen folgende Markerproteine wurden verwendet: CD133, CD34 sowie für die Untersuchung von Co-Expressionen CD45, CD14, CD146, CD144 und von Willebrand Faktor. Die Expression von VEGFR-2 wurde nicht untersucht, da zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie keine spezifischen Antikörper kommerziell erwerbbar waren. Als Negativkontrolle wurden PE- und FITC-konjugierte Isotypkontrollen eingesetzt. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen 20 min bei 4°C mit den Antikörpern inkubiert. Bei jeder Analyse wurden jeweils 50000 Ereignisse erfasst.

2.8.2 Kolonie-Assay

Die Bestimmung koloniebildender Einheiten (CFU) ist eine Methode zur Analyse der Proliferations- und Differenzierungskapazität von Progenitorzellen. Als Kolonien werden in der vorliegenden Arbeit Anhäufungen von mehr als 30 - 50 Zellen verstanden, die aus einer Ursprungszelle hervorgegangen sind. EPC bilden in diesem *Assay* morphologisch hochspezifische Kolonien aus und unterscheiden sich durch diese Eigenschaft von ausdifferenzierten Zellen (z. B. Endothelzellen, Monozyten). Die phänotypische Klassifizierung endothelialer Kolonien anhand ihrer typischen Morphologie ist eine etablierte Methode und wurde in der vorliegenden Studie nach bereits publizierten Kriterien vorgenommen (Gehling et al., 2000). Die Zellen wurden für 5 Minuten im Hämolysepuffer inkubiert und anschließend in Methylzellulose überführt. Es wurden 1×10^5 Zellen/ml Methylzellulose verwendet, wobei in einem Parallelansatz der Methylzellulose entweder eine Kombination aus Hämatopoetischen Wachstumsfaktoren oder der Kombination aus *stem cell growth factor* (SCGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zugegeben wurde. Die Inkubation fand für 21 tage bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit statt. Am Tag 21 wurden die

Kolonien phasenkontrastmikroskopisch quantifiziert und zudem nach qualitativen Aspekten (z. B. Koloniegröße) klassifiziert.

2.9 Fallzahlschätzung und biometrische Auswertung

In zwei vorangegangenen klinischen Studien, in denen der Effekt von AT1-Rezeptor-Antagonisten auf die endothelabhängige Vasodilatation das Hauptzielkriterium bildeten (Hornig et al. 2003, Schiffrin et al. 2000), waren Patienten-/Probandenzahlen von 10/10 bzw. 10/9 ausreichend, um statistisch signifikante Unterschiede zu belegen. Unter der Annahme einer vergleichbaren Schwankung der Meßwerte um den Mittelwert bei unserem Patientenkollektiv wurden insgesamt 37 Patienten (12/13/12) in die Studie eingeschlossen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mittels Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Fisher`s protected least significant difference Test für den Vergleich der Basalwerte zwischen den Therapiegruppen, sowie mittels ANOVA und nachfolgendem Scheffé f-Test für wiederholte Messungen für den Vergleich der Therapieeffekte in den drei Patientengruppen. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0.05$ akzeptiert.

2.10 Material

2.10.1 Substanzen

Alle Chemikalien waren von p.a.-Qualität, soweit nicht anders angegeben.

Aceton	Merck (Darmstadt)
ADP (Adenosindiphosphat)	Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg)
Argon-Gas (5,0) für GC-MS	Linde (Hannover)
<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	TEBU (Frankfurt)
Helium-Gas (5,0) für GC-MS	Linde (Hannover)

Horm-Puffer	NYCOMED Austria (Linz, Österreich)
Kochsalzlösung, isoton	Baxter (Unterschleißheim)
Kollagen	NYCOMED Austria (Linz, Österreich)
Methan-Gas (5,0) für die GC-MS	Linde (Hannover)
Methylzellulose	Stem Cell Technologies (St. Katharinen)
Natrium[15N]nitrat (98,5% 15N)	MSD Isotopes MFC (Montreal, Canada)
Natrium[15N]nitrat (98,5% 15N)	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA)
PFB-Bromid (Pentafluorobenzylbromid)	Sigma (Deisenhof)
<i>Stem cell growth factor</i> (SCGF)	TEBU (Frankfurt)
Toluol	Sigma (Deisenhof)

2.10.2 Verbrauchsmaterial

ADMA [®] -Kit	DLD Diagnostik (Hamburg)
Anti-CD133 monoklonale Antikörper	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Anti-CD14 monoklonale Antikörper	BD Pharmingen (Hamburg)
Anti-CD144 monoklonale Antikörper	Coulter-Immunotech (Krefeld)
Anti-CD34 monoklonale Antikörper	BD Pharmingen (Hamburg)
Anti-CD45 monoklonale Antikörper	BD Pharmingen (Hamburg)
Anti-von Willebrand Faktor monoklonale Antikörper	Serotec (Düsseldorf)
Autosamplergefäße mit Bördelverschluß	GC-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)
Autosamplergefäße mit Schnappdeckelverschluss	GC-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)

Blutentnahmeröhrchen (Monovetten)	B. Braun (Melsungen)
Butterfly	B. Braun (Melsungen)
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Röhrchen (15, 50 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Limited volume inserts 0,3 ml	Brown (Wertheim)
Miko-Küvetten mit Rührfisch 1,0 × 4,0	Biochemica (Flacht)
Nitrolingual-Spray	Pohl-Boskamp (Hohenlockstedt)
Polypropylen-Röhrchen 5 ml	Greiner (Frickenhausen)
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
Spitzen	B. Braun (Melsungen)
Sterican-Kanülen	B. Braun (Melsungen)
Ultraschallkontaktgel	Caeser & Loretz (Hilden)
Ultrazentrifugenröhrchen 30 ml	Sorvall (Newton, USA)
Wasser, doppelt destilliert (Aqua bidest.)	Aus der hauseigenen Wasser- aufbereitungsanlage. Millipore (Schwalbach)

2.10.3 Laborgeräte

Aggregometer „Labor APACT“	LABOR GmbH (Ahrensburg)
Analysewaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Blutdruckmanschette Typ Tycos	Welch Allyn (Arden, USA)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Digitalwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
GC-MS (CP-3800; 1200 Quadrupole MS)	Varian (Walnut Creek, USA)

Kapillarsäule DB-5 MS (30mm × 0,25mm I.D., 0,25 µm Filmdicke)	J. & W. Scientific (Ran. Cordova, USA)
Kühltruhe (-20°C, -80°C)	Kryotec (Hamburg)
Pulse Trace-Gerät	Micro Medical Limited (Rochster, England)
Serologische Pipetten (1, 2, 10, 25 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Evaporator "Turbo Vap LV"	Zymark
Sonographiegerät „SONOLINE Sienna“	Siemens (München, Berlin)
Thermoblock „Bioblock 890436F“	Bioblock Scientific (Illkirch Cedex, USA)
VHS-Videogerät Typ NVHS 830	Panasonic (Hamburg)
VHS-Videokassetten	Fuji (Kleve)
Vortexer	Heidolph (Kelheim)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Eschborn)
Zentrifuge "Centrifuge 5415R"	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge "Rotina 35R"	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
FACS-Analyse Zytometer	Becton Dickinson (Heidelberg)

2.10.4 Computerprogramme

Brachial Analyzer 4.1.3	Medical imaging applications LLC (Iowa, USA)
MS Data Review 6.3	Varian (Darmstadt)
SPSS 12	SPSS GmbH (Chicago, USA)
Vascular Imager 4.1.3	Medical imaging applications LLC (Iowa, USA)
Cell Quest software	Becton Dickinson (Heidelberg)

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Charakteristika der Patienten

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Telmisartan, Nisoldipin und ihrer Kombination auf die endothelabhängige Vasodilatation untersucht. Entsprechend den Ein- und Ausschlusskriterien (siehe 1.2.1 und 1.2.2) wurden 37 klinisch gesunde Patienten mit essentieller Hypertonie in eine der drei Therapiegruppen randomisiert und über 6 Wochen therapiert, wobei die Ausgabe der Studienmedikation eine Erhöhung der Dosierung nach 3 Wochen vorsah. Patienten, die zuvor ein Antihypertensivum eingenommen hatten, durchliefen vor Beginn der Studie eine *Washout*-Periode von zwei Wochen. Entsprechend einer Auflage der Ethikkommission erhielten die Patienten während dieser Zeit Hydrochlorothiazid und/oder Clonidin, wenn ihr Blutdruck Werte von 180 / 100 mmHg erreichte.

Vor der ersten Medikamenteneinnahme erfolgte neben der klinischen Untersuchung und ausführlichen Anamnese bei jedem Patienten auch die Durchführung einer Routinelabor-Kontrolle. Die bestimmten Werte der Basaluntersuchung sowie die demographischen Variablen der Patienten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Die drei Therapiegruppen unterschieden sich zu Beginn der Studie nicht in Ihren demographischen Variablen, wie z. B. Geschlecht, Alter oder Rauchgewohnheiten. Auch die Ergebnisse des Routine-Labors zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Therapiegruppen. Von den 21 Patienten, die ein Antihypertensivum während der *Washout*-Periode benötigten, wurden sechs Patienten in die Telmisartan-Gruppe, acht in die Nisoldipin-Gruppe und sieben Patienten in die Kombinations-Gruppe randomisiert, so dass bezüglich der *Washout*-Medikation kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand.

Tabelle 2: Baseline-Charakteristika der Patienten

	Telmisartan	Nisoldipin	Kombination	p
N	12	13	12	
Geschlecht (m/w)	7 / 5	6 / 7	7 / 5	Ns
Alter (Jahre)	59,0 ± 7	56,9 ± 8	59,6 ± 8	Ns
Systolischer RR (mmHg)	138 ± 11	142 ± 21	134 ± 11	Ns
Diastolischer RR (mmHg)	86 ± 9	92 ± 9*	83 ± 8*	< 0,05
BMI (kg/m ²)	23,0 ± 3,0	27,1 ± 4,1*	24,5 ± 4,2	< 0,05
CRP	1,3 ± 0,7	2,88 ± 2,4	2,73 ± 2,2	ns
Cholesterin	244 ± 32	236 ± 48	254 ± 42	ns
HDL	63 ± 13	56 ± 11	58 ± 16	ns
LDL	158 ± 25	150 ± 41	164 ± 28	ns
Raucher	0	1	1	ns
<u>Washout-Medikation:</u>				
Hydrochlorothiazid	6 (50%)	8 (62%)	7 (58%)	ns
Clonidin	2 (17%)	2 (15%)	1 (8%)	ns

Tabelle 2: Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) oder als prozentualer Teil des Patientenkollektivs in Klammern; #p<0,05 Nisoldipin- vs. Telmisartan-Gruppe; *p<0,05 Nisoldipin vs. Kombination.

Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Gruppen bezüglich ihres *Body Mass Index* (BMI; Körpergewicht [kg]/Körpergröße [m]²) und ihres diastolischen Ausgangsblutdruckes. Patienten der Nisoldipin-Gruppe hatten einen signifikant höheren BMI im Vergleich zu Patienten der Telmisartan-Gruppe (27,1 ± 4,1 vs. 23,0 ± 3,0; p<0,05). Der BMI zeigte keine Korrelation mit der endothelabhängigen Vasodilatation bei der *Baseline*-Untersuchung (r=0,015; p=0,932) oder zu der Veränderung der

endothelabhängigen Vasodilatation unter der medikamentösen Therapie ($r=0,032$; $p=0,854$).

3.1.2 Verlauf der Laborparameter und Verträglichkeit der Prüfmedikation

An den drei Untersuchungstagen fanden im Prüfzentrum eine klinische Untersuchung, eine ausführliche Anamnese, sowie eine Routinelabor-Kontrolle statt, um relevante Nebenwirkungen der Prüfmedikation zu detektieren. Während es bei keinem Patienten der Telmisartan-Gruppe zu unerwünschten Ereignissen kam, konnten in den anderen Therapiegruppen unerwünschte Ereignisse dokumentiert werden. Alle diese Ereignisse waren vom leichten Schweregrad mit vollständiger Wiederherstellung des Patienten und erforderten kein Absetzen der Prüfmedikation. In der Nisoldipin-Gruppe traten bei 5 Patienten unerwünschte Ereignisse auf. So wurden passagere Knöchelödeme (2 Patienten), Schwindel (1 Patient), Exantheme (1 Patient) und Kopfschmerzen (1 Patient) beobachtet. In der Kombinations-Gruppe traten bei 4 Patienten unerwünschte Ereignisse auf. Es konnten Kopfschmerzen (2 Patienten), Knöchelödeme und Schwindel (1 Patient) sowie eine passagere konjunktivale Hyperämie (1 Patient) beobachtet werden. Das Routinelabor zeigte weder zu Beginn der Studie noch während des Studienverlaufs signifikante Unterschiede zwischen den drei Therapiegruppen. Zudem induzierte die medikamentöse Intervention zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen der Sicherheits-Laborparameter im Vergleich zu den Ausgangswerten (siehe auch Tabelle 3).

Tabelle 3: Laborparameter zur Verträglichkeit der Prüfmedikation

	Telmisartan		Nisoldipin		Kombination	
	<i>Baseline</i>	Tag 42	<i>Baseline</i>	Tag 42	<i>Baseline</i>	Tag 42
K ⁺ [mmol/l]	4,63 ± 0,29	4,78 ± 0,30	4,84 ± 0,60	4,62 ± 0,38	4,7 ± 0,45	4,7 ± 0,28
Na ⁺ [mmol/l]	140 ± 1,7	140 ± 0,9	139 ± 2,8	139 ± 2,2	139 ± 3,3	139 ± 2,0
Kreatinin [mg/dl]	0,95 ± 0,17	0,95 ± 0,17	0,95 ± 0,15	0,91 ± 0,16	0,93 ± 0,18	0,86 ± 0,12
GOT [U/l]	26,4 ± 4,0	29,0 ± 6,7	30,8 ± 8,7	32,5 ± 11,5	28,3 ± 8,6	27,6 ± 10,5
GPT [U/l]	25,4 ± 6,0	30,5 ± 16,6	31,6 ± 12,5	31,6 ± 9,0	29,7 ± 17,8	29,8 ± 22,9
Cholesterin [mg/dl]	244 ± 32	233 ± 29	236 ± 48	240 ± 49	254 ± 42	246 ± 35
LDL [mg/dl]	158 ± 25	151 ± 27	150 ± 41	150 ± 41	164 ± 28	163 ± 24
HDL [mg/dl]	63 ± 13	61 ± 12	56 ± 11	57 ± 13	58 ± 16	55 ± 13
Triglyzeride [mg/dl]	118 ± 61	109 ± 42	149 ± 72	177 ± 118	163 ± 138	144 ± 87
Leukozyten [c/nl]	6,2 ± 1,1	5,6 ± 1,0	7,2 ± 2,6	7,5 ± 2,3	6,1 ± 1,5	6,1 ± 1,3
Thrombozyten [c/nl]	261 ± 40	256 ± 34	262 ± 119	256 ± 99	274 ± 65	288 ± 62

Tabelle 3: Darstellung wichtiger Laborparameter zur Verträglichkeit der Prüfmedikation vor und 42 Tage nach Beginn der Therapie mit Telmisartan, Nisoldipin oder der Kombination beider Substanzen. Keiner der erhobenen Kontrollparameter zeigte im Verlauf der vorliegenden Studie eine signifikante Veränderung im Vergleich zum Ausgangswert der *Baseline*-Untersuchung.

3.2 Blutdrucksenkung unter der antihypertensiven Therapie

Die 24h-Blutdruckmessung erfolgte basal vor der ersten Einnahme der Studienmedikation sowie 3 und 6 Wochen nach Einnahme der Studienmedikation, wobei nach 3 Wochen Therapiedauer wie unter 2.1 beschrieben eine Dosiserhöhung der Studienmedikation vorgenommen wurde. Während sich bezüglich der antihypertensiven *Washout*-Medikation und der systolischen Ausgangsblutdruckwerte in der basalen 24 Stunden Blutdruckmessung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen ergaben, war bei Patienten der Kombinations-Gruppe ein signifikant niedrigerer diastolischer Blutdruck (83 ± 8 mmHg) als bei Patienten der Nisoldipin-Gruppe (92 ± 9 mmHg; $p < 0,05$) festzustellen. Nach einer Therapiedauer von 3 Wochen kam es bei keiner der drei Therapiegruppen zu einer signifikanten Senkung des systemischen Blutdrucks. Nach sechswöchiger Therapie konnte ein signifikant blutdrucksenkender Effekt sowohl in der Telmisartan- als auch in der Kombinations-Gruppe beobachtet werden (Telmisartan-Gruppe: $138 \pm 11 / 86 \pm 9$ mmHg vs. $128 \pm 17 / 81 \pm 11$ mmHg; $p < 0,05$; Kombinations-Gruppe: $134 \pm 11 / 83 \pm 8$ mmHg vs. $122 \pm 9 / 76 \pm 5$ mmHg; $p < 0,05$). Unter der Monotherapie mit Nisoldipin konnte nach sechs Wochen ein Trend zur Blutdrucksenkung verzeichnet werden, der allerdings im Rahmen der vorliegenden Studie keine statistische Signifikanz erreichte ($-3,9$ mmHg; $p = 0,090$) (siehe Tabelle 4). In Bezug auf den Parameter der endothelabhängigen Vasodilatation konnten wir nachweisen, dass keine signifikante Korrelation zwischen dem Blutdruck und der endothelabhängigen Vasodilatation bei der *Baseline*-Bestimmung ($r = 0,065$; $p = 0,704$) oder der Blutdrucksenkung und der endothelabhängigen Vasodilatation bestand ($r = 0,061$; $p = 0,749$).

Tabelle 4: Blutdrucksenkung in den 3 Therapiegruppen

	<i>Baseline</i>	Tag 21	Tag 42
<u>Telmisartan</u>			
systolischer RR (mmHg)	138 ± 11	132 ± 13	128 ± 17*
diastolischer RR (mmHg)	86 ± 9	84 ± 8	81 ± 11*
<u>Nisoldipin</u>			
systolischer RR (mmHg)	142 ± 21	136 ± 18	136 ± 17
diastolischer RR (mmHg)	92 ± 9	87 ± 9	88 ± 7
<u>Kombination</u>			
systolischer RR (mmHg)	134 ± 11	129 ± 12	122 ± 9*
diastolischer RR (mmHg)	83 ± 8	78 ± 6	76 ± 5*

Tabelle 4: Darstellung der durchschnittlichen systolischen und diastolischen Blutdruckwerte vor und nach Therapie mit Telmisartan, Nisoldipin bzw. der Kombination beider Substanzen. Werte dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ Telmisartan- und Kombinations-Gruppe Tag 42 vs. *Baseline*.

3.3 Einfluss der Prüfmedikation auf die endothelabhängige Vasodilatation

Das primäre Ziel der Studie war es, die Auswirkungen einer sechswöchigen oralen Therapie mit Telmisartan, Nisoldipin oder ihrer Kombination auf die endothelabhängige Vasodilatation zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die endothelunabhängige Glyceroltrinitrat-induzierte Vasodilatation bestimmt. Zu Beginn der Studie lag die mittlere endothelabhängige Vasodilatation bei $5,31 \pm 0,48\%$, die mittlere endothelunabhängige Vasodilatation bei $6,96 \pm 0,79\%$. In den beiden mit Telmisartan behandelten Gruppen kam es während der Studie zu einer deutlichen Zunahme der endothelabhängigen Vasodilatation, die sowohl in der Telmisartan-Monotherapiegruppe

als auch in der Kombinations-Gruppe nach 6 Wochen das Signifikanzniveau erreichte (Telmisartan: $5,47 \pm 3,38\%$ vs. $10,91 \pm 4,69\%$, $p < 0,05$; Kombination: $4,56 \pm 1,65\%$ vs. $10,83 \pm 4,77\%$, $p < 0,05$) (siehe Abbildung 6).

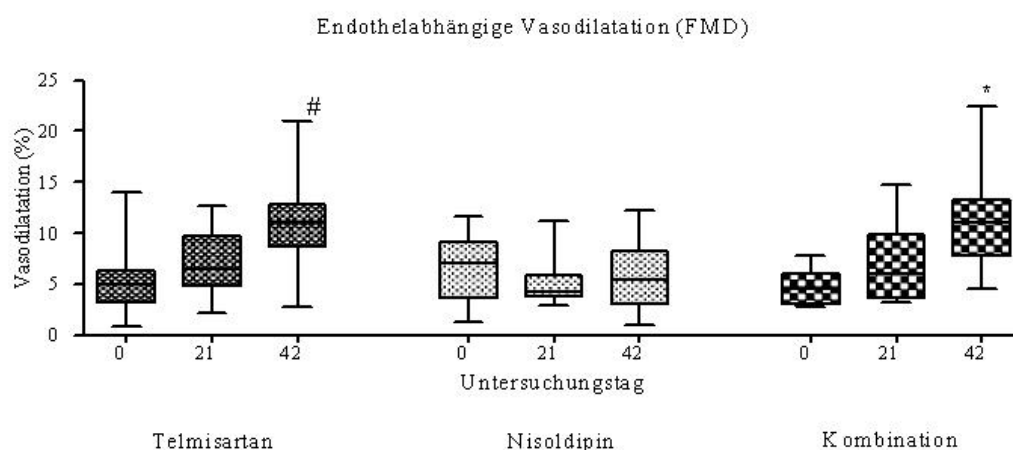


Abbildung 6: In den mit Telmisartan behandelten Gruppen kam es im Studienverlauf zu einer Zunahme der endothelabhängigen Vasodilatation, die am Tag 42 statistische Signifikanz erreichte ($\#p < 0,05$ Telmisartan-Gruppe Tag 42 vs. *Baseline*; $*p < 0,05$ Kombinations-Gruppe Tag 42 vs. *Baseline*).

In der mit Nisoldipin behandelten Gruppe konnte im Studienverlauf keine signifikante Veränderung der endothelabhängigen Vasodilatation festgestellt werden ($6,61 \pm 3,37\%$ vs. $5,93 \pm 3,74\%$, $p = 0,635$) und nur ein schwacher Trend zur Verbesserung der endothelunabhängigen Vasodilatation war detektierbar ($5,58 \pm 3,02\%$ vs. $8,11 \pm 4,96\%$, $p = 0,120$) (siehe Abbildung 7).

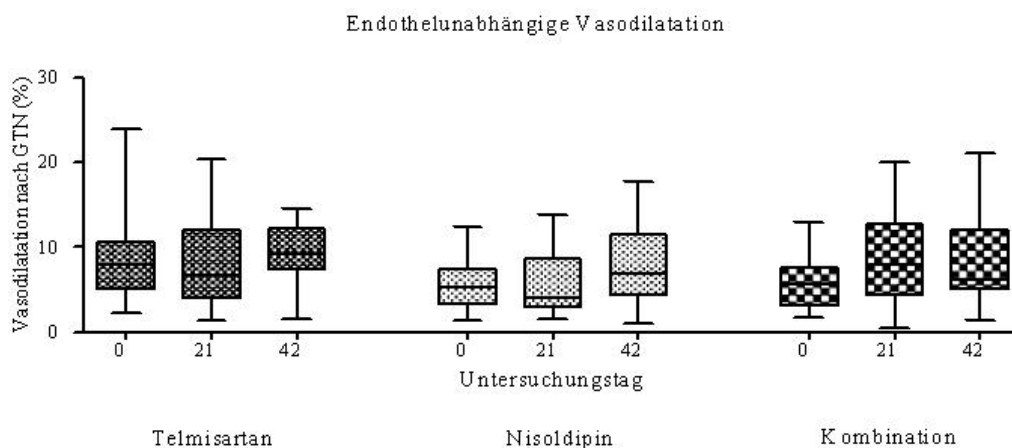


Abbildung 7: Im Gegensatz zur endothelabhängigen Vasodilatation konnte in der vorliegenden Studie in keiner der drei Therapiegruppen eine statistisch signifikante Veränderung der endothelunabhängigen Vasodilatation, welche durch Applikation von GTN ausgelöst wurde, detektiert werden.

3.4 Quantifizierung der Nitrat-Ausscheidung im Urin

Um potentielle Veränderungen des endogenen NO-Stoffwechsels zu detektieren, bestimmten wir die Ausscheidung von Nitrat, dem Hauptmetaboliten des NO, im Urin. An den drei Untersuchungstagen erschienen die Patienten nüchtern im Prüfzentrum und gaben für die Bestimmung eine Urinprobe ab. Die Bestimmung der Urinsekretion von Nitrat erfolgte wie bereits beschrieben mittels GC-MS. Die basale Nitrat-Ausscheidung im Urin war durch eine hohe Variabilität mit großen Standardabweichungen gekennzeichnet. Patienten, die in die Kombinations-Gruppe randomisiert wurden, zeigten im Vergleich zu Patienten der Nisoldipin-Gruppe eine signifikant höhere Ausscheidung von Nitrat im Urin ($109,01 \pm 46,25$ ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$) vs. $62,12 \pm 22,94$ ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$); $p < 0,05$). Im Verlauf der Studie sank die initial erhöhte Nitrat-Ausscheidung in der Kombinations-Gruppe ab, so dass am Tag 42 signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu den *Baseline*-Werten zu beobachten waren ($109,01 \pm 46,25$ ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$) vs. $74,29 \pm 39,39$ ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$); $p < 0,05$). In den beiden Monotherapie-

Gruppen war zu keinem Zeitpunkt der Studie eine signifikante Änderung der Nitrat-Ausscheidung im Urin zu verzeichnen (siehe Abbildung 8).

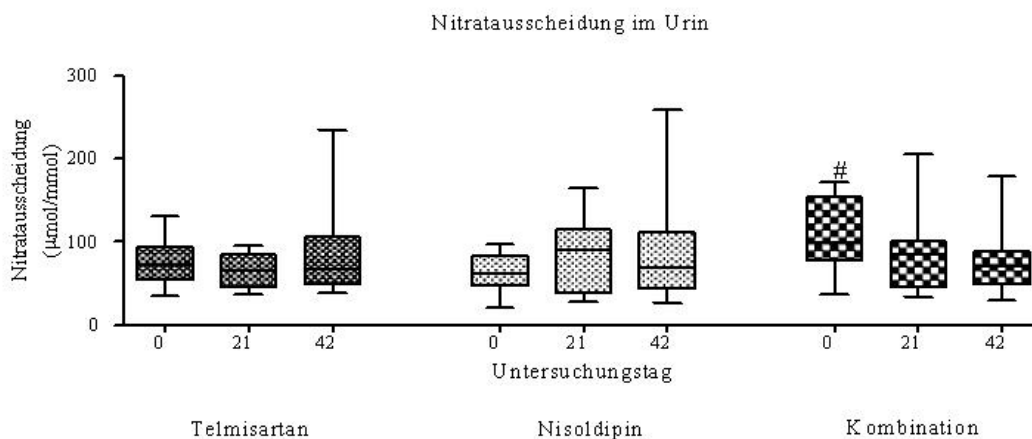


Abbildung 8: Um Veränderungen des NO-Stoffwechsels zu detektieren, bestimmten wir die Ausscheidung von Nitrat im Urin. Bei der *Baseline*-Untersuchung zeigten Patienten, die in die Kombinations-Gruppe randomisiert wurden, eine signifikant höhere Nitrat-Ausscheidung als Patienten der Nisoldipin-Gruppe ([#] $p < 0,05$ Kombinations-Gruppe vs. Nisoldipin-Gruppe).

3.5 Einfluss der Prüfmedikation auf die ADMA-Plasmakonzentration

Die Plasmakonzentration des endogenen NO-Synthase-Inhibitors ADMA wurde in der vorliegenden Studie mittels eines validierten *Enzymimmunoassays* (ELISA) bestimmt (Schulze et al., 2004). Im Rahmen der Therapie mit Telmisartan, Nisoldipin oder der Kombination beider Substanzen konnten wir in unserem Studienkollektiv keine signifikante Änderung der ADMA-Plasmakonzentration im Verlauf der Studie feststellen.

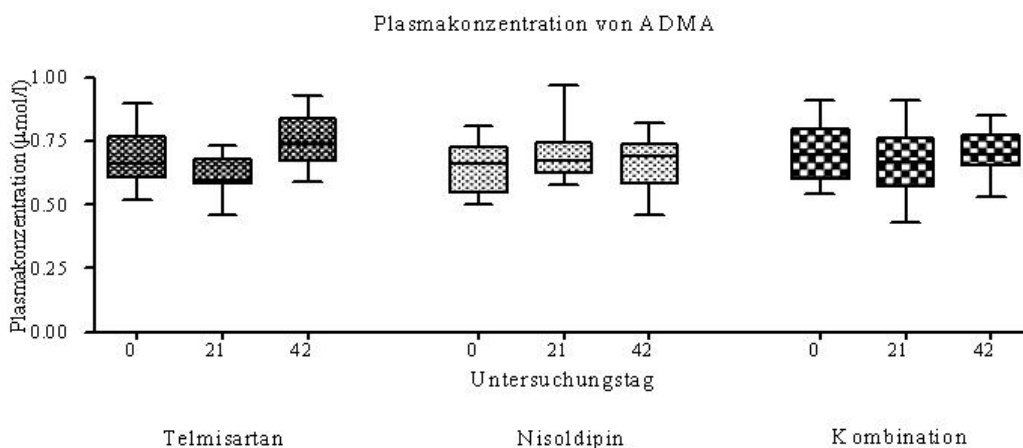


Abbildung 9: ADMA fungiert als endogener NOS-Inhibitor und erhält daher zunehmende Bedeutung als therapeutische Zielgröße. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten wir keine signifikanten Veränderungen der ADMA-Plasmawerte im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung feststellen.

3.6 Thrombozytenaggregation

Das Endothel sowie Thrombozyten sezernieren mit NO einen potenten physiologischen Hemmstoff der Thrombozytenaggregation. Im Falle einer Thrombozytenaktivierung mit Freisetzung thrombozyteneigener Mediatoren, wie beispielsweise ADP, reagiert das Endothel mit einer gesteigerten NO-Freisetzung, was einer überschießenden Thrombozytenaggregation entgegenwirkt. Vorausgegangene Publikationen berichteten von einer Erhöhung der NO-Aktivität in Endothelzellen und Thrombozyten mit Beeinflussung der Thrombozytenadhäsion bzw. -aggregation unter der Therapie mit dem AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan (Kalinowski et al., 2002; Wassmann et al., 2002). Wir konnten in der vorliegenden Studie keinen vergleichbaren Effekt unter der Therapie mit Telmisartan, Nisoldipin oder der Kombination beider Substanzen verzeichnen. Zu keinem Zeitpunkt kam es in einer der Therapiegruppe zu einer signifikanten Veränderung der *ex vivo*-Thrombozytenaggregation (siehe Abbildung 10).

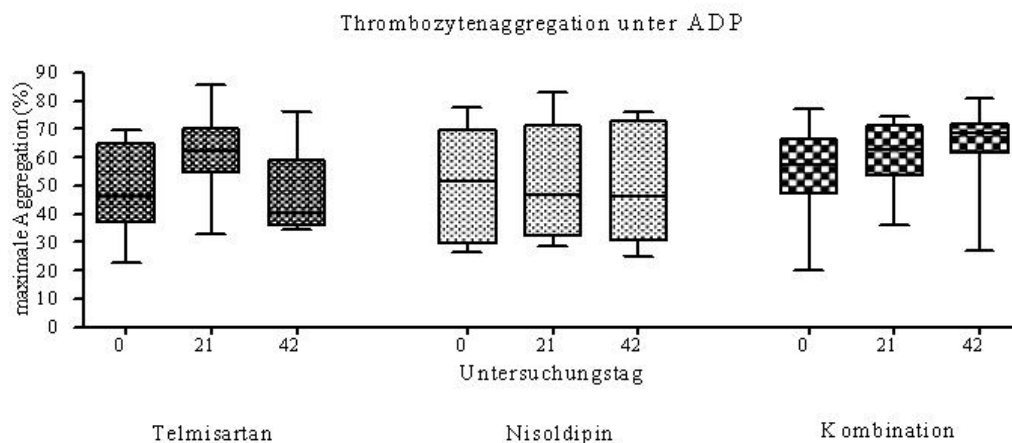


Abbildung 10: Im Verlauf der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Veränderungen der *ex vivo*-Thrombozytenaggregation, die durch den Plättchenagonisten ADP ausgelöst wurde, detektiert werden. Auch die Messung der Thrombozytenaggregation, die durch den Plättchenagonisten Kollagen ausgelöst wurde, wurde durch die therapeutische Intervention nicht im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung verändert.

3.7 Endotheliale Progenitorzellen

3.7.1 Mobilisierung von CD133⁺/CD34⁺-Zellen

Um endotheliale Progenitorzellen im peripheren Blut zu detektieren, erfolgte die Bestimmung der spezifischen Oberflächenantigene mittels FACS-Analyse. Als spezifische Oberflächenantigene für EPC wurden dabei die Oberflächenmarker CD133 und CD34 herangezogen. Bei der *Baseline*-Untersuchung zeigte sich eine große Variabilität bezüglich der Zahl zirkulierender CD133⁺/CD34⁺-Zellen in unserem Patientenkollektiv. Patienten, die in die Kombinations-Gruppe randomisiert wurden, zeigten am ersten Untersuchungstag im Vergleich zu Patienten der Nisoldipin-Gruppe eine signifikant niedrigere Zahl CD133⁺/CD34⁺-Zellen (Mittelwert \pm Standardabweichung: $0,38 \pm 0,1\%$ vs. $1,55 \pm 0,25\%$; $p < 0,05$). Im Vergleich zwischen

Patienten der Telmisartan- bzw. Kombinations-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die basale Zahl zirkulierender EPC. Nach drei Wochen Therapie mit der Studienmedikation kam es in den mit Nisoldipin therapierten Patienten zu einem signifikanten Anstieg CD133⁺/CD34⁺-Zellen (Nisoldipin-Gruppe: $3,8 \pm 1,1\%$; $p < 0,01$ und Kombinations-Gruppe: $0,73 \pm 0,1\%$; $p < 0,05$). Nach sechswöchiger Therapie war in keiner Therapiegruppe mehr ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung zu verzeichnen (siehe Abbildung 11).

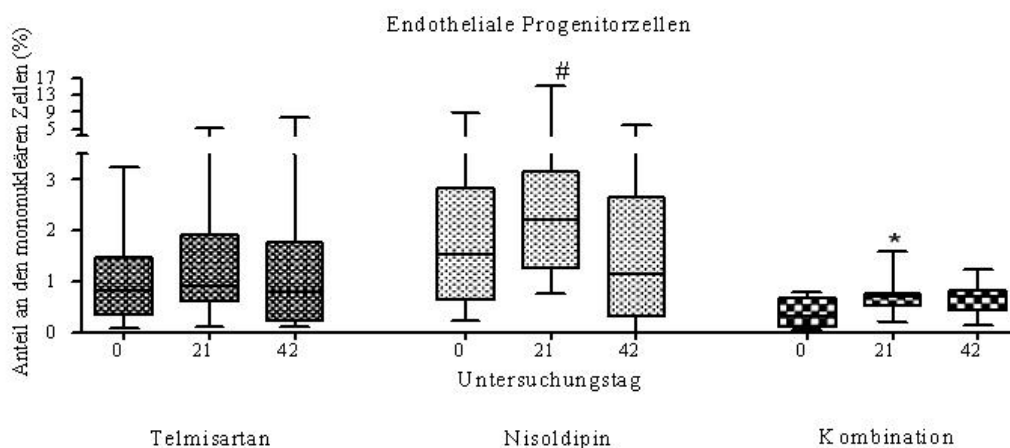


Abbildung 11: Am Tag 21 der vorliegenden Studie zeigte sich eine signifikante Zunahme der EPC in den mit Nisoldipin behandelten Gruppen im Vergleich zur *Baseline*-Bestimmung ([#] $p < 0,05$ Nisoldipin-Gruppe Tag 21 vs. *Baseline*; * $p < 0,05$ Kombinations-Gruppe Tag 21 vs. *Baseline*). Am Tag 42 war in keiner Therapiegruppe ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung mehr nachweisbar.

3.7.2 Mobilisierung koloniebildender Zellen

Der Nachweis von EPC kann durch Analyse von Oberflächenmarkern mittels FACS-Analyse erfolgen, erfolgt jedoch besonders spezifisch im funktionellen *Assay* durch Quantifizierung so genannter auswachsender endothelial differenzierter Kolonien (CFU-EC). Als Kolonie wurde hierbei eine klonale Ansammlung von mehr als 30-50

Zellen definiert. Die *Baseline*-Untersuchung zeigte überraschenderweise bei 15 Patienten (40,5%) auswachsender CFU-EC. Bei normotensiven gesunden Patienten werden dagegen nur selten CFU-EC beobachtet. In einer daraufhin durchgeführten Kontrolluntersuchung wurde bei 10 gesunden Personen (n=10; Alter: 29±7 Jahre; männlich/weiblich: 4/6) keine Koloniebildungen beobachtet.

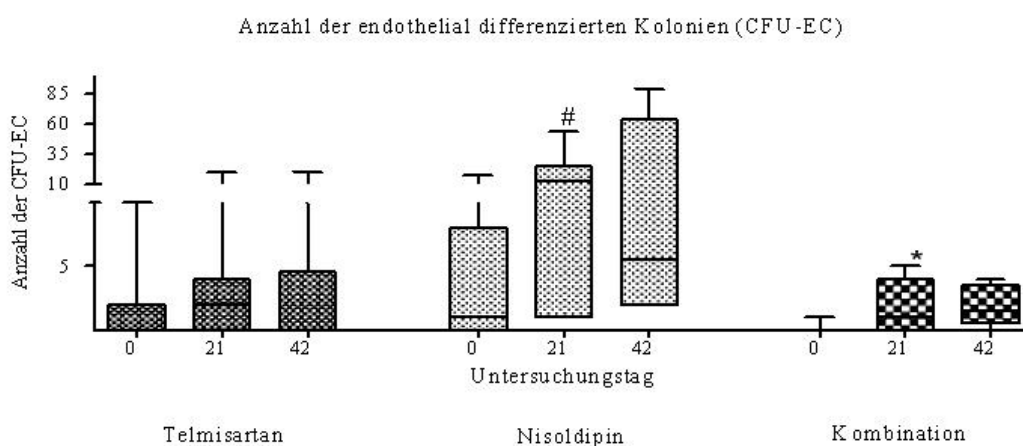


Abbildung 12: Parallel zum Anstieg der EPC in der FACS-Analyse konnte eine signifikante Zunahme der CFU-EC in den mit Nisoldipin behandelten Gruppen nachgewiesen werden. Sowohl in der Nisoldipin-Gruppe als auch in der Kombinations-Gruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme der CFU-EC am Tag 21 ($p < 0,05$ Nisoldipin-Gruppe Tag 21 vs. *Baseline*; $p < 0,05$ Kombinations-Gruppe Tag 21 vs. *Baseline*). Am Tag 42 war in keiner Therapiegruppe ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung mehr nachweisbar.

In Analogie zu den CD133⁺/CD34⁺-Zellen, war basal die Zahl von CFU-EC bei Patienten der Kombinations-Gruppe signifikant niedriger als bei Patienten der Nisoldipin-Gruppe ($0,18 \pm 0,41$ vs. $4,18 \pm 1,6$; $p < 0,05$). Unter der Therapie mit Nisoldipin konnte sowohl in der Monotherapiegruppe als auch in der Kombinations-Gruppe am Tag 21 eine signifikante Zunahme der CFU-EC detektiert werden (Nisoldipin: $14,9 \pm 5,0$; $p < 0,01$ vs. *Baseline* und Kombinations-Gruppe: $2,0 \pm 0,57$;

$p < 0,05$ vs. *Baseline*) (siehe Abbildung 12). Obwohl die Zahl der CFU-EC bei einigen mit Nisoldipin therapierten Patienten auch am Tag 42 erhöht blieb, konnte in der Gesamtheit keine statistische Signifikanz im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung mehr verzeichnet werden. In der mit Telmisartan behandelten Gruppe war zu keinem Zeitpunkt der Studie ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung zu verzeichnen.

Um die morphologischen Merkmale von funktionellen EPC zu beschreiben, führten wir verschiedenen Analysen der gewonnenen Zellen auf ihre Oberflächenantigene durch. Diese Analysen verschiedener Subfraktionen, zeigten eine außergewöhnliche Korrelation zwischen $CD133^+/CD34^+/CD146^+$ -Zellen und der Zahl detektierten CFU-EC ($r=0,93$; $p < 0,0001$) (siehe Abbildung 13)

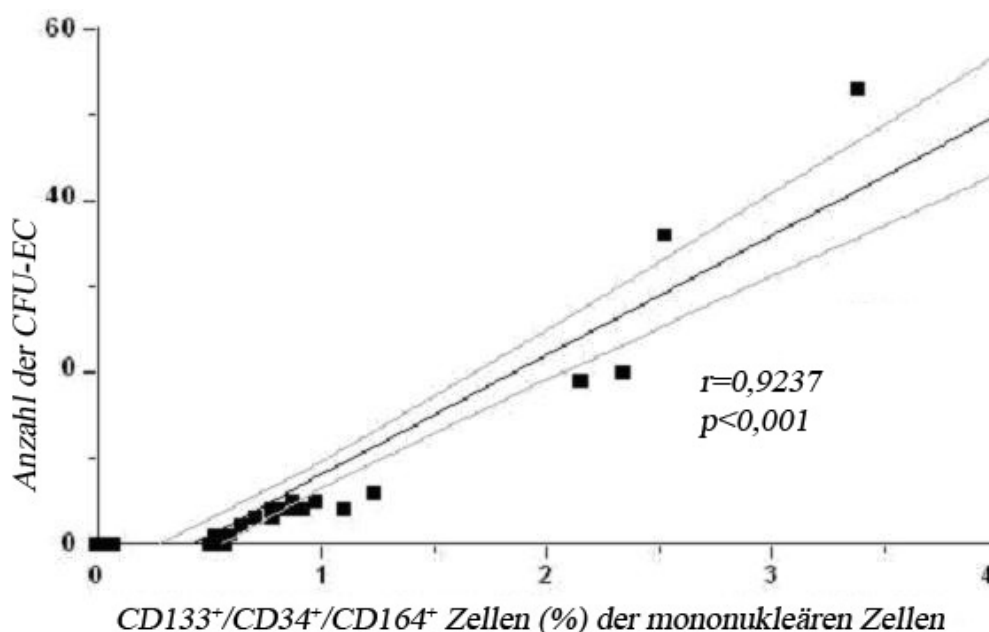


Abbildung 13: Subgruppen-Analysen zeigten eine außergewöhnliche Korrelation zwischen $CD133^+/CD34^+/CD146^+$ -Zellen und der Zahl der im funktionellen *Assay* auswachsenden CFU-EC.

Im Hinblick auf den erhöhten BMI der Nisoldipin-Gruppe im Vergleich zur Telmisartan-Gruppe sowie den verschiedenen Ausgangsniveaus von EPC bei der *Baseline*-Untersuchung, konnten wir nachweisen, dass keine Korrelation zwischen EPC

und klinischen Parametern, wie dem Blutdruck oder dem Ausmaß der Blutdrucksenkung durch die Studienmedikation bestand (siehe Abbildung 14).

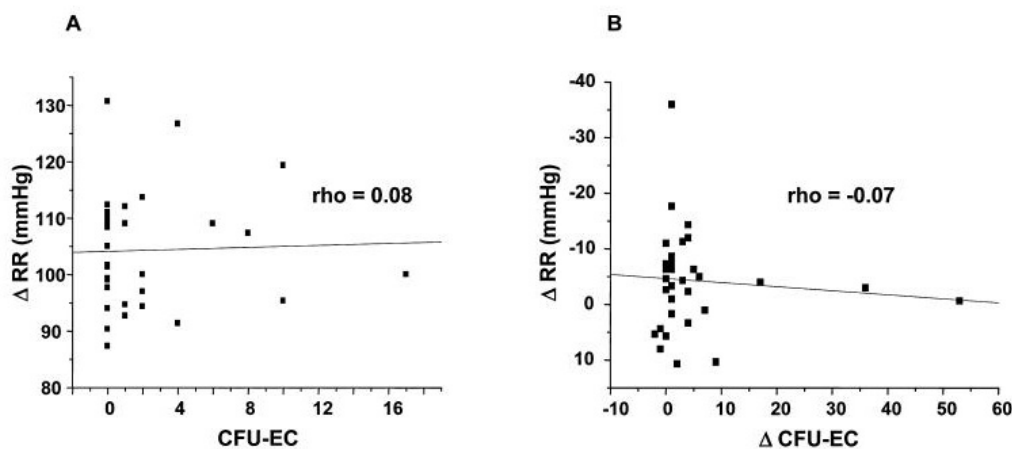


Abbildung 14: Die Zahl gebildeten CFU-EC korrelierte nicht mit dem arteriellen Mitteldruck bei der *Baseline*-Untersuchung (14 A) oder dem Ausmaß der Blutdrucksenkung am Untersuchungstag 21 (14 B). Die Korrelation ist dargestellt als Spearman's rho.

3.7.3 Morphologische Charakterisierung der CFU-EC

Neben der Quantifizierung der *ex vivo* ausgewachsenen CFU-EC wurden die Kolonien auch bezüglich ihrer Morphologie untersucht und beschrieben. In Hinblick auf ihre Größe, ließen sich drei Kategorien von CFU-EC voneinander differenzieren (siehe Abbildung 15). Die meisten Kolonien enthielten 20 – 100 lose gepackte, runde Zellen. Kolonien der mittleren Größe zeigten bis zu 500 Zellen und große Kolonien bis zu 1000 Zellen. Interessanterweise konnten die großen Kolonien nur bei Patienten der Nisoldipin-Gruppe detektiert werden (n = 5 Patienten).

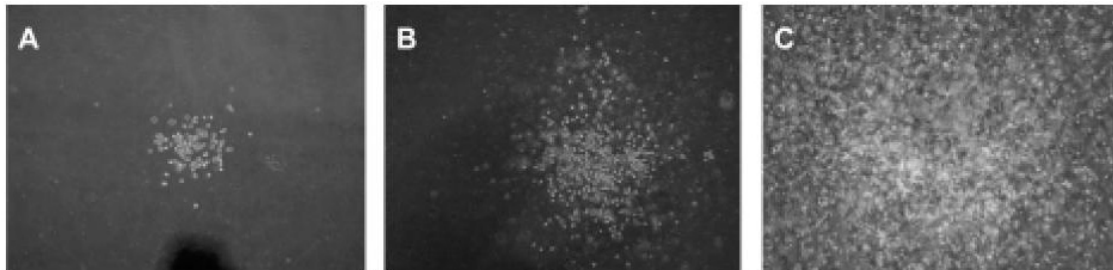


Abbildung 15: Die morphologische Charakterisierung der CFU-EC wurde anhand des Proliferationspotentials der Kolonien vorgenommen. Es konnten dabei drei verschiedene Größen von CFU-EC von einander differenziert werden. (A) Kleine CFU-EC zeigten 20 – 100 rundliche Zellen. (B) Kolonien der mittleren Größe zeigten bis zu 500 Zellen. (C) Große Kolonien wiesen bis zu 1000 Zellen auf. Interessanterweise wurden diese Kolonien nur unter der Monotherapie mit Nisoldipin beobachtet.

4 Diskussion

4.1 Blutdrucksenkung und endothelabhängige Vasodilatation

Die Hypertonie stellt einen bedeutenden kardiovaskulären Risikofaktor dar, dessen Bedeutung für die Entstehungen und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen klar demonstriert werden konnte (Sipahi et al., 2006; Magrini et al., 1992). Laut aktuellen Schätzungen des amerikanischen *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* leiden ca. 10 Millionen Deutsche an einer Hypertonie, und weltweit wird die Zahl der Hypertoniker auf 1 Milliarde geschätzt (Jones et al., 2004).

Im Rahmen der placebokontrollierten HOPE-Studie konnte demonstriert werden, dass eine Senkung des systemischen Blutdruckes bei kardiovaskulären Risikopatienten durch den ACE-Hemmer Ramipril das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie für die Gesamtmortalität signifikant senkt. Neben ACE-Hemmern stehen entsprechend der Empfehlung der Deutschen Hochdruckliga Betablocker, Calciumkanalblocker, Diuretika sowie AT1-Rezeptor-Antagonisten als Mittel der ersten Wahl zur Verfügung. Hierbei zeigen alle genannten Klassen von Antihypertensiva trotz z. T. erheblicher Unterschiede in der individuellen Wirksamkeit eine vergleichbare Effektivität in großen Vergleichskollektiven (Staessen et al., 2003; Psaty et al., 2003; Neaton et al., 1993; Materson et al., 1993, Bidiville et al., 1988). Zum Beispiel konnte für den neueren AT1-Rezeptor-Antagonisten Telmisartan eine Effektivität nachgewiesen werden, die mit der von Losartan, Enalapril und Amlodipin vergleichbar ist (Zhu et al., 2004; Neutel et al., 1999; Smith et al., 2002; Lacourciere et al., 1998).

In zahlreichen aktuellen Publikationen konnte neben einer vergleichbaren Blutdruckreduktion durch die verschiedenen Klassen von Antihypertensiva auch eine vergleichbarere Risikoreduktion bezüglich der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität demonstriert werden (Staessen et al., 2003). Die ALLHAT-Studie konnte diesbezüglich zeigen, dass die Therapie mit „konventionellen“ Antihypertensiva (Diuretika und Betablocker) im Vergleich zu der Therapie mit „neueren“

Antihypertensiva (ACE-Hemmer) das Mortalitätsrisiko von kardiovaskulären Hochrisikopatienten in einem ähnlichen Ausmaß senkt (ALLHAT, 2002). Im Gegensatz dazu konnte eine Metaanalyse von insgesamt 27 Studien demonstrieren, dass bestimmte Patientenkollektive einen speziellen Nutzen von Antihypertensiva haben, der nicht alleinig durch die Reduktion des systemischen Blutdruckes erklärbar ist (*Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration*, 2005). So wurde nachgewiesen, dass Hypertoniker mit einer elektrokardiographisch dokumentierten linksventrikulären Hypertrophie bei vergleichbarer Blutdrucksenkung besonders von AT1-Rezeptor-Antagonisten profitieren (Kjeldsen et al., 2002).

In der vorliegenden Studie setzten wir Telmisartan, Nisoldipin oder die Kombination aus beiden Substanzen als Prüfmedikation ein. In einer Dosisfindungsstudie wurden 222 Patienten über 6 Wochen mit Telmisartan therapiert. Unter Telmisartan 40 mg/Tag konnte eine durchschnittliche Blutdrucksenkung von 14/9 mmHg beziehungsweise 16/10 mmHg (80 mg/Tag) nachgewiesen werden (Mallion et al., 1999). Wir konnten in der vorliegenden Studie nach dreiwöchiger Therapie mit Telmisartan 40 mg/Tag eine im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung statistisch nicht signifikante Blutdrucksenkung von 6/4 mmHg detektieren. Nach Dosiserhöhung und anschließender Therapie mit Telmisartan 80 mg/Tag über weitere 3 Wochen zeigte sich eine signifikante Reduktion des systemischen Blutdruckes von 10/5 mmHg. In der Kombinations-Gruppe fiel die Blutdrucksenkung mit 12/9 mmHg nach sechswöchiger Therapie ebenfalls erstmals signifikant aus. Dass es unter der Kombinationstherapie zu einer deutlicheren Reduktion des systemischen Blutdruckes kam, lässt sich vermutlich durch die synergistischen Effekte der beiden Antihypertensiva erklären.

Für Nisoldipin wurde in vorangegangenen Studien eine Blutdrucksenkung von 8/6 mmHg (10 mg/Tag) bzw. 15/10 mmHg (30 mg/Tag) beschrieben (Opie et al., 1997). Im Gegensatz dazu erreichte die durch Nisoldipin (Monotherapie) induzierte Blutdrucksenkung zu keinem Zeitpunkt der vorliegenden Studie statistische Signifikanz. Da der Hauptzielparameter der vorliegenden Studie die Auswirkungen der antihypertensiven Therapie auf die Endothelfunktion war, mussten verschiedene Kompromisse bezüglich der Blutdruckwerte akzeptiert werden. So erfolgte keine individuelle Auftitrierung der Medikation zum Erreichen des maximalen Effekts oder eine Umstellung der Therapie bei Nichtansprechen auf die Studienmedikation. Zudem

wurde die vorliegende Studie nicht als Blutdruck- bzw. Dosisfindungsstudie konzipiert und war mit 12-13 Patienten pro Behandlungsgruppe und einem Beobachtungszeitraum von 6 Wochen zu klein und zu kurz, um valide Aussagen über das Ausmaß der medikamenteninduzierten Blutdruckreduktion machen zu können. Diese Faktoren könnten den überraschend moderaten blutdrucksenkenden Effekt von Nisoldipin in unserer Studie erklären. Allerdings deuten zahlreiche Studien darauf hin, dass Nisoldipin effizient und sicher bei Patienten mit essentieller Hypertonie eingesetzt werden kann (Yamagishi et al., 2007).

Die essentielle Hypertonie stellt einen kardiovaskulären Risikofaktor dar, der mit endothelialer Dysfunktion assoziiert ist (Endemann et al., 2004). In der Entwicklung der Arteriosklerose stellt die endotheliale Dysfunktion, methodisch charakterisierbar durch reduzierte flussabhängige Vasodilatation, ein wichtiges Frühstadium dar, dem vermutlich prognostische Bedeutung für das Risiko kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität zukommt (Endemann et al., 2004; Gokce et al., 2002; Brevetti et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II, das Haupteffektorpeptid des RAAS, durch AT1-Rezeptor-vermittelte Vasokonstriktion und Superoxidproduktion wesentlich zur Pathogenese der Hypertonie und der endothelialen Dysfunktion beiträgt (Griendling et al., 2000; De Gasparo et al., 2000). Eine medikamentöse Beeinflussung des RAAS durch ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptor-Antagonisten stellt entsprechend eine therapeutische Strategie zur Behandlung der essentiellen Hypertonie dar. Zudem konnte eine Therapie mit ACE-Hemmern und bestimmten AT1-Rezeptor-Antagonisten die Endothelfunktion von Patienten mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie der Hypertonie, verbessern (Wassmann et al., 2002; Prasad et al., 2000). Bisher war der Einfluss einer Therapie mit Telmisartan bzw. Nisoldipin auf die Endothelfunktion von Patienten mit essentieller Hypertonie nicht bekannt. Daher war das primäre Ziel dieser Studie, den Effekt beider Substanzen auf die flussabhängige (=endothelabhängige) und flussunabhängige Vasodilatation zu untersuchen. Nach sechswöchiger Therapie zeigte sich bei Patienten, die mit Telmisartan oder der Kombination aus Telmisartan und Nisoldipin behandelt wurden, eine signifikante Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation, während sich in der Patientengruppe, die Nisoldipin als Monotherapie erhielt, keine signifikante Veränderung im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung zeigte. Im

Gegensatz hierzu konnte in keiner Therapiegruppe eine Verbesserung der flussunabhängigen Vasodilatation beobachtet werden.

Wir folgern aus diesen Ergebnissen, dass eine antihypertensive Therapie mit Telmisartan die endothelabhängige Vasodilatation zumindest kurzzeitig verbessert. Unsere Daten sind im Einklang mit vorangegangenen Publikationen, welche den Einfluss von AT1-Rezeptor-Antagonisten, wie z. B. Losartan und Candesartan, bei Patienten mit manifester Arteriosklerose bzw. kardiovaskulären Risikofaktoren, wie der Hypercholesterolämie, untersuchten (Wassmann et al., 2002; Prasad et al., 2000). Als zugrunde liegender Mechanismus kann eine Reduktion der Superoxidbildung durch die Blockade von AT1-Rezeptoren angenommen werden. Ferner könnte die Reduktion des Gefäßtonus durch AT1-Rezeptor-Antagonisten zu einer Zunahme von Scherkräften am Endothel führen, was zur vermehrten Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden, wie z.B. des PI3-Kinase/Akt/eNOS-Signalwegs, und somit konsekutiv zur Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit führen könnte (Dimmeler et al., 1999). Neuere Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass bestimmte AT1-Rezeptor-Antagonisten, wie Telmisartan und Irbesartan, Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren γ (PPAR- γ) stimulieren (Schupp et al., 2004; Benson et al., 2004). Auch wenn der klinische Stellenwert dieser Beobachtung bisher unklar ist, konnten Campia und Kollegen zeigen, dass sich eine Therapie mit dem PPAR- γ Agonisten Pioglitazon positiv auf die Endothelfunktion von Patienten mit einem hohen kardiovaskulären Risiko auswirkt (Campia et al., 2006).

Entgegen unseren Beobachtungen fanden Ghiadoni und Kollegen keinen Effekt von Telmisartan auf die endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit essentieller Hypertonie, obwohl eine Reduktion des oxidativen Stresses nachgewiesen werden konnte (quantifiziert anhand der Surrogate MDA und LOOH) (Ghiadoni et al., 2003). Eine Ursache für diese abweichende Beobachtung könnte im Studiendesign begründet sein. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie bestimmten Ghiadoni und Kollegen die endothelabhängige Vasodilatation nach einer Therapiedauer von 6 Monaten, so dass hier möglicherweise bislang unbekannte gegenregulatorische Mechanismen den Effekt von Telmisartan auf das Endothel reduzieren könnten. Wir können daher nicht ausschließen, dass die von uns beobachtete Verbesserung der Endothelfunktion durch

Telmisartan (nach sechswöchiger Therapiedauer) bei dauerhafter Einnahme des Antihypertensivums abnimmt.

Bis dato wurde der Effekt einer antihypertensiven Therapie mit Nisoldipin auf die Endothelfunktion von Patienten mit essentieller Hypertonie nicht untersucht. Unsere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass es unter der Therapie mit Nisoldipin nicht zu einer signifikanten Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation kommt. Wir können allerdings nicht ausschließen, dass die unzureichende Blutdrucksenkung in der Nisoldipin-Gruppe für dieses Negativergebnis verantwortlich ist. Da in diesem Zusammenhang keine signifikante Korrelation zwischen Blutdruck und endothelabhängiger Vasodilatation (*Baseline*-Untersuchung) bzw. zwischen therapieinduzierter Blutdrucksenkung und der Veränderung endothelabhängiger Vasodilatation nachweisbar war, vermuten wir, dass die unzureichende Blutdrucksenkung nicht allein für dieses Negativergebnis verantwortlich gemacht werden kann. Des Weiteren hatten Patienten der Nisoldipin-Gruppe einen signifikant höheren BMI als Patienten der Telmisartan-Gruppe. Auch in diesem Zusammenhang war keine signifikante Korrelation zwischen BMI und endothelabhängiger Vasodilatation bzw. Veränderungen der endothelabhängigen Vasodilatation unter der antihypertensiven Therapie nachweisbar. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass auch dieser Faktor potentielle Effekte von Nisoldipin auf das Endothel negativ beeinflusst.

4.2 Nitratausscheidung im Urin

Die NO-Bioverfügbarkeit, d.h. die biologisch aktive NO-Menge, hängt von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren, wie z. B. der Aktivität der endothelialen NO-Synthase oder der Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies, die zu einer schnellen Inaktivierung von NO beitragen können, ab (Schulman et al., 2006). Aufgrund seiner zahlreichen anti-arteriosklerotischen Effekte spielt NO eine wichtige protektive Rolle im kardiovaskulären System, insbesondere beim Erhalt der endothelialen Integrität. Daher können Therapieregime, die die NO-Bioverfügbarkeit verändern, Einfluss auf die vaskuläre Homöostase nehmen. Im Rahmen dieser Studie führten wir daher Messungen zur NO-Bioverfügbarkeit durch, die über die Quantifizierung des stabilen oxidativen Metaboliten des NO, Nitrat, mittels GC-MS erfolgte (Tsikas et al., 1994). NO ist ein

Radikal mit kurzer Halbwertszeit (0,3 – 0,6 msec.) (Griffith et al., 1984; Moncada et al., 1993). Im Vollblut bindet NO schnell an Hämoglobin und wird zu Nitrat umgewandelt, welches mit einer Halbwertszeit von 5 – 8 Stunden im Urin ausgeschieden wird (Kelm et al., 1992). Die Nitratkonzentration wird jedoch stark durch extravaskuläre Faktoren, wie Nahrung sowie die Leber- und Nierenfunktion beeinflusst, so dass valide Aussagen über die endogene NO-Bilanz nur bei standardisierten und kontrollierten nitratarmen Diäten möglich sind (Änggard et al., 1994). Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen gilt die Quantifizierung des im Urin ausgeschiedenen Nitrats als Goldstandard zur Bilanzierung des NO-Umsatzes im menschlichen Organismus (Granger et al., 1991). Um potentielle Wirkungen der Studienmedikation auf den endogenen NO-Stoffwechsel zu detektieren, bestimmten wir an den 3 Untersuchungstagen die Nitratausscheidung im Urin der Probanden. Allerdings konnten wir vor Therapiebeginn bei Patienten, die in die Kombinations-Gruppe randomisiert wurden, eine signifikant höhere Nitratausscheidung als in den Patienten der anderen Therapiegruppen feststellen, die im Studienverlauf rückläufig war und nach 3 Wochen sogar signifikant erniedrigt im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung ausfiel. In den anderen Behandlungsgruppen konnten hingegen keine signifikanten therapieinduzierten Unterschiede verzeichnet werden. Da die gemessenen Nitrat-Werte in unserem Patientenkollektiv einer großen interindividuellen Variabilität unterlagen, kann unserer Ansicht das o. g. Ergebnis nur mit Vorsicht interpretiert werden. Aufgrund der zahlreichen Faktoren, die auf den Nitrathaushalt einwirken und durch das Studienprotokoll nur unzureichend reglementiert waren, vermuten wir, dass die Messergebnissen nicht ausschließlich den endogenen NO-Stoffwechsel widerspiegeln.

4.3 ADMA

Erhöhte Plasmakonzentrationen des endogenen NO-Synthase-Inhibitors ADMA lassen sich in Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko sowie verschiedenen Erkrankungen, wie der Hypercholesterinämie, der Hypertonie, der Hyperhomocysteinämie, dem Diabetes mellitus Typ 2 und der terminalen Nierensuffizienz nachweisen (Böger et al., 1998; Goonasekera et al., 1997; Böger et al., 2001; Abbasi et al., 2001; Vallance et al., 1992). Zudem konnte von unserer Arbeitsgruppe und anderen ADMA als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre

Morbidität und Mortalität identifiziert werden (Maas et al., 2007; Böger et al., 2005; Valkonen et al., 2001). Aufgrund seiner Rolle als unabhängiger Risikofaktor erhält ADMA zunehmend Bedeutung als therapeutische Zielgröße. Erste kleine klinische Studien aus den letzten Jahren konnten eine Senkung der ADMA-Plasmaspiegel durch eine Therapie mit ACE-Hemmern bzw. AT1-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit essentieller Hypertonie, Diabetes mellitus oder dem Syndrom X nachweisen (Chen et al., 2002; Napoli et al., 2004; Delles et al., 2002; Ito et al., 2002). Die durchschnittliche Reduktion der ADMA-Plasmawerte durch ACE-Hemmer bewegte sich in einem Rahmen von 12 – 20% des Ausgangsniveaus (Chen et al., 2002; Napoli et al., 2004). Eine Senkung der ADMA-Plasmawerte durch AT1-Rezeptor-Antagonisten wurde bisher für Eprosartan als Monotherapie bzw. in Kombination mit Enalapril sowie für Losartan beschrieben (Delles et al., 2002; Ito et al., 2002). Allerdings müssen aufgrund der geringen Zahl eingeschlossener Patienten, des häufig kurzen Behandlungszeitraums und methodischer Schwächen bei der Analyse der ADMA-Plasmaspiegel die Ergebnisse dieser Studien mit Vorsicht interpretiert werden. So konnten wir entgegen der genannten Studien in unserem Patientenkollektiv weder unter der Therapie mit Telmisartan, Nisoldipin oder der Kombiantion eine Senkung der ADMA-Plasmaspiegel feststellen. In diesem Zusammenhang können wir jedoch nicht ausschließen, dass aufgrund der geringen Zahl eingeschlossener Patienten unsere Studie nicht über eine ausreichende statistische *Power* zur Detektion potentieller therapieinduzierter Veränderungen von ADMA-Plasmaspiegel verfügte.

4.4 Thrombozytenaggregation

Thrombozyten partizipieren nicht nur bei der Blutgerinnung, sondern spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen, wie z. B. dem akuten Koronarsyndrom oder dem Apoplex. (Mayr et al., 2006). So gehört die medikamentöse Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Acetylsalicylsäure oder ADP-Rezeptorantagonisten, wie Clopidogrel, mittlerweile zur Standardtherapie kardiovaskulärer Hochrisiko-Patienten (Fuster et al., 1993; Hennekens et al., 1997). Neben den genannten Thrombozytenaggregationshemmern können vermutlich auch ausgewählte kardiovaskuläre Medikamente die Thrombozytenaktivierung bzw. die Thrombozytenaggregation beeinflussen. Dieser Sachverhalt hat in den letzten Jahren

zunehmendes Interesse geweckt, da antithrombotische Effekte Einfluss auf die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität nehmen können. So wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen über eine Erhöhung der NO-Aktivität in Endothelzellen und Thrombozyten mit konsekutiver Reduktion der Thrombozytenaggregation unter der Therapie mit dem AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan berichtet (Kalinowski et al., 2002; Wassmann et al., 2002). Des Weiteren konnte bei Patienten mit Angina pectoris unter einer achtwöchigen Therapie mit Nisoldipin (30 mg/d) eine Abnahme der *ex vivo*-Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden (Hiroki et al., 1982). Im Gegensatz zu o. g. Berichten konnten wir in der vorliegenden Studie keinen vergleichbaren Effekt unter der Therapie mit Telmisartan, Nisoldipin oder der Kombination beider Substanzen verzeichnen. Zu keinem Zeitpunkt kam es in einer der Therapiegruppen zu einer signifikanten Veränderung der *ex vivo*-Thrombozytenaggregation, allerdings konnten wir einen Trend zur Zunahme der *ex vivo*-Thrombozytenaggregation nach dreiwöchiger Therapie in der Telmisartan-Gruppe beobachten. Der Grund für diese diskrepanten Befunde ist unklar, allerdings könnten auch in diesem Zusammenhang Unterschiede im Studiendesign oder der Therapiedauer eine Rolle spielen.

4.5 Endotheliale Progenitorzellen

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von Telmisartan, Nisoldipin bzw. der Kombination beider Substanzen auf die Zahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen (EPC) untersucht, wobei EPC mit Hilfe von zwei methodischen Ansätzen identifiziert und quantifiziert wurden. So wurden im Rahmen der FACS-Analyse durch spezifische Antikörper die Fraktion der CD133⁺/CD34⁺-mononukleären Zellen quantifiziert. In einem weiteren Ansatz wurden EPC in einem Kolonie-*Assay* quantifiziert, in dem die Progenitorzellen zu endothelial differenzierten Kolonie (CFU-EC) heranwachsen. CFU-EC wurden darüber hinaus für Untersuchungen qualitativer Merkmale wie Koloniegröße und Zellmorphologie herangezogen.

Entgegen der allgemeinen Literaturmeinung fanden wir bei der *Baseline*-Untersuchung bei ca. 40% der Patienten eine erhöhte Zahl zirkulierender EPC, während bei gesunden Kontrollpersonen keine EPC im peripheren Blut nachweisbar waren. EPC spielen eine wichtige Rolle beim Erhalt der endothelialen Integrität durch Reendothelialisierung von

beschädigtem Endothel (Iwakura et al., 2003; Urbich et al., 2005). In diesem Zusammenhang könnte die essentielle Hypertonie durch Induktion lokaler Gefäßschäden und endothelialer Dysfunktion als Stimulus für die Mobilisierung von EPC aus dem Knochenmark fungieren und so die erhöhte Zahl von EPC bei Patienten mit essentieller Hypertonie erklären (Perticone et al., 2004).

Unter der Behandlung mit Nisoldipin und der Kombination aus Nisoldipin und Telmisartan kam es zu einem signifikanten Anstieg der CFU-EC nach drei Wochen. Nach sechs Wochen waren noch erhöhte Zahlen von EPC detektierbar, jedoch waren die Zahlen in den nicht signifikanten Bereich zurückgekehrt. Bei Patienten, die eine Monotherapie aus Nisoldipin erhielten, konnten zirkulierende EPC detektiert werden, die außergewöhnlich große CFU-EC mit bis zu 1000 Zellen generierten, was auf Zellen mit besonders hohem Proliferationspotential hinweist (5/13 Patienten). Wie erst kürzlich berichtet wurde, enthält Nabelschnurblut eine seltene Population hochproliferativer Zellen, welche große endotheliale Kolonien bilden können (*high proliferative potential-endothelial colony-forming cells*, HPP-ECFC) (Ingram et al., 2004). Auch wenn bisher die Existenz von HPP-ECFC im adulten Organismus nicht nachgewiesen werden konnte, ist es denkbar, dass die in unserer Studie beobachteten großen Kolonien von knochenmarkständigen HPP-ECFC abstammen. Die Erklärung für die fehlende Mobilisierung "hochproliferativer" EPC durch Patienten der Kombinations-Gruppe bleibt spekulativ, könnte jedoch mit dem beobachteten inhibitorischen Effekt von AT1-Rezeptor-Antagonisten auf die Mobilisierung von EPC zusammenhängen (Werner et al., 2005). Parallel zum Anstieg der CFU-EC kam es ebenfalls zum Anstieg der CD133⁺/CD34⁺-Zellen. Eine Analyse verschiedener Subfraktionen dieser Zellen zeigte eine außergewöhnliche Korrelation zwischen der Zahl der CD133⁺/CD34⁺/CD146⁺-Zellen und der Zahl gebildeter CFU-EC, was den Schluss zulässt, dass es sich bei diesem Phänotyp um funktionelle EPC handelt. Um zu untersuchen, inwieweit das Ausmaß der Blutdrucksenkung die Mobilisierung von EPC beeinflusst, führten wir Korrelationsanalysen durch. Es konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den Blutdruckwerten der *Baseline*-Untersuchung bzw. dem Ausmaß der Blutdrucksenkung und der Zahl zirkulierender EPC detektiert werden. Es bestanden zudem keine signifikanten Korrelationen zu anderen Parametern wie der *Wash-Out*-Medikation oder dem Geschlecht.

NO spielt eine entscheidende Rolle bei dem Erhalt der endothelialen Integrität (Urbich et al., 2005). Wie gezeigt werden konnte, ist NO zudem von großer Relevanz für die Mobilisierung von EPC. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Nisoldipin, wie auch andere Calciumkanalblocker vom Dihydropyridin-Typ, die Bioverfügbarkeit von NO, gemessen anhand des Surrogatmarkers cGMP, steigert (Salomone et al., 1996, Kishi et al., 1995). Diese Beobachtungen legen die Nisoldipin-induzierte Zunahme der NO-Bioverfügbarkeit in der Knochenmarknische als zugrunde liegenden Mechanismus der EPC-Mobilisierung nahe.

Am Tag 42 der vorliegenden Studie war die Zahl zirkulierender EPC wieder in den nicht signifikanten Bereich abgefallen. Dieser Abfall war mit einer Zunahme von mononukleärer Zellen eines endothelialen Phänotyps in der FACS-Analyse und dem Nachweis reifer Endothelzellen in den Kolonie-*Assays* assoziiert und könnte auf eine durch Nisoldipin induzierte Differenzierung von mobilisierten EPC hin zu reifen Endothelzellen hindeuten. Nisoldipin scheint somit nicht nur die Mobilisierung von EPC aus dem Knochenmark zu fördern, sondern auch die Reifung von EPC zu Endothelzellen zu stimulieren. Interessanterweise konnte dies ebenfalls für bekannte Stimulatoren der EPC-Mobilisierung, wie z. B. Statine oder VEGF, nachgewiesen werden (Llevadot et al., 2001).

Im Gegensatz zu den mit Nisoldipin behandelten Patienten konnte bei den Patienten, die als antihypertensive Therapie ausschließlich Telmisartan erhielten zu keinem Zeitpunkt der Studie ein signifikanter Anstieg der zirkulierenden EPC beobachtet werden. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen einer von Werner und Kollegen veröffentlichten Studie, in der die Verwendung von AT1-Rezeptor-Antagonisten negativ mit der Zahl zirkulierender EPC korrelierte (Werner et al., 2005).

5 Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Studie war es, den Einfluss einer Therapie mit dem AT1-Rezeptor-Antagonisten Telmisartan, dem Calciumkanalblocker Nisoldipin oder der Kombination beider Substanzen auf die endothelabhängige Vasodilatation bei Patienten mit essentieller Hypertonie zu untersuchen. Folgende sekundäre Endpunkte wurden definiert: Ausmaß der Blutdrucksenkung, Veränderung der Plasmakonzentrationen des endogenen NO-Synthase-Inhibitors ADMA, Veränderung der Ausscheidung von Nitrat, Veränderung der Zahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen (EPC) sowie der *ex vivo*-Thrombozytenaggregation. Um den Einfluss der Studienmedikation auf diese vordefinierten Zielkriterien zu untersuchen, führten wir eine randomisierte einfach blinde Studie im Parallelgruppendesign durch, in die 37 Patienten mit essentieller Hypertonie eingeschlossen wurden. Alle Patienten durchliefen eine zweiwöchige *Wash-Out*-Phase und wurden anschließend in einen der o. g. Behandlungsarme (n=12/13/12) randomisiert. Mit Ausnahme eines signifikant höheren BMI von Patienten der Nisoldipin-Gruppe im Vergleich zum BMI von Patienten der Telmisartan-Gruppe unterschieden sich die Patienten der verschiedenen Behandlungsarme nicht signifikant in Bezug auf wesentliche Patientencharakteristika, wie z. B. Ausgangsblutdruck, Geschlecht, Alter, CRP, LDL-/HDL-Cholesterin oder dem Anteil an Rauchern.

Nach sechswöchiger Therapie konnte bei Patienten, die mit Telmisartan oder der Kombination aus Telmisartan und Nisoldipin behandelt wurden, eine signifikante Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation beobachtet werden, während sich in der Patientengruppe, die Nisoldipin als Monotherapie erhielt, zu keinem Zeitpunkt der Studie eine signifikante Veränderung dieses Parameters im Vergleich zur *Baseline*-Untersuchung zeigte. Neben der Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation kam es bei Patienten der Telmisartan- und der Kombination-Gruppe nach sechswöchiger Therapie zu einer signifikanten Senkung sowohl des systolischen als auch des diastolischen Blutdrucks, wohingegen die Blutdrucksenkung in der Nisoldipin-Gruppe das Signifikanzniveau verfehlte. Obwohl wir keine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der Blutdrucksenkung und der Verbesserung der

Endothelfunktion detektieren konnten, ist somit nicht auszuschließen, dass die unzureichende Blutdrucksenkung zu dem Negativergebnis der Nisoldipin-Gruppe beigetragen hat. Eine therapieinduzierte Veränderung der Plasmaspiegel des NO-Synthase-Inhibitors ADMA, bzw. der *ex vivo*-Thrombozytenaggregation konnten wir hingegen nicht detektieren.

Weiterhin untersuchten wir den Effekt der antihypertensiven Therapie auf die Zahl zirkulierender EPC. Interessanterweise konnte bereits in der Ausgangsmessung bei den eingeschlossenen Patienten eine im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöhte Zahl zirkulierender EPC detektiert werden. In Phänotyp-Analysen konnten wir zudem mit CD146 einen EPC-Marker identifizieren, der für die endotheliale Differenzierungskapazität verantwortlich sein könnte. Während der antihypertensiven Therapie kam es zu einem signifikanten aber transienten Anstieg der zirkulierenden EPC in den mit Nisoldipin behandelten Patienten (Mono- und Kombinationsgruppe), während in Patienten der Telmisartan-Gruppe keine Veränderung zu verzeichnen war. Des Weiteren mobilisierten ausschließlich Patienten der Nisoldipin-Gruppe EPC mit außergewöhnlich hohem Proliferationspotential. Sechs Wochen nach Beginn der Therapie konnten wir in den mit Nisoldipin therapierten Patienten eine Zunahme zirkulierender Zellen endothelialen Phänotyps feststellen, was möglicherweise darauf hindeutet, dass Nisoldipin neben der Mobilisierung von EPC auch deren endotheliale Differenzierung beeinflusst.

Wir schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass Telmisartan zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation bei Patienten mit essentieller Hypertonie führt, während Nisoldipin in diesem Patientenkollektiv die Freisetzung von z. T. hochproliferativen EPC induziert. Größere Studien müssen nun klären, ob diese Phänomene blutdruckunabhängig zu den vaskuloprotektiven Effekten der o. g. Substanzen beitragen.

6 Literaturverzeichnis

Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Stuehlinger M, Tsao PS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2001;88:1201-1203.

ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Jama.* 2002;288:2981-2997.

Änggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet.* 1994;343:1199-1206.

Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rossig L, Spyridopoulos I, Zeiher AM, Dimmeler S. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res.* 2003;92:1049-1055.

Bech JN, Nielsen CB, Pedersen EB. Effects of systemic NO synthesis inhibition on RPF, GFR, UNa, and vasoactive hormones in healthy humans. *Am J Physiol.* 1996;270:845-851.

Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension.* 2004;43:993-1002.

Berkels R, Egink G, Marsen TA, Bartels H, Roesen R, Klaus W. Nifedipine increases endothelial nitric oxide bioavailability by antioxidative mechanisms. *Hypertension.* 2001;37:240-245.

Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Dominiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation.* 2000;101:2206-2212.

Bhattacharya V, PA McSweeney, Q Shi, B Bruno, A Ishida, R Nash, RF Storb, LR Sauvage, WP Hammond and MH Wu. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells. *Blood*. 2000;95:581–585.

Bidiville J, Nussberger J, Waeber G, Porchet M, Waeber B, Brunner HR. Individual responses to converting enzyme inhibitors and calcium antagonists. *Hypertension*. 1988;11:166-173.

Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration, Turnbull F, Neal B, Algert C, Chalmers J, Chapman N, Cutler J, Woodward M, MacMahon S. Effects of different blood pressure-lowering regimens on major cardiovascular events in individuals with and without diabetes mellitus: results of prospectively designed overviews of randomized trials. *Arch Intern Med*. 2005;165:1410-9.

Bode-Böger SM, Böger RH, Schroder EP, Frolich JC. Exercise increases systemic nitric oxide production in men. *J Cardiovasc Risk*. 1994;1:173-8.

Böger RH, Bode-Böger SM, Gerecke U, Frolich JC. Long-term administration of L-arginine, L-NAME, and the exogenous NO donor molsidomine modulates urinary nitrate and cGMP excretion in rats. *Cardiovasc Res*. 1994;28:494-9.

Böger RH, Bode-Böger SM, Gerecke U, Gutzki FM, Tsikas D, Frolich JC. 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*. 1996;23:11-5.

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;98:1842-1847.

Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2287-2295.

Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci*. 2001;100:161-167.

- Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:1124-1129.
- Bonello L, Sabatier F, Basire A, Paganelli F, Dignat-George F. The imbalance between circulating endothelial cells and progenitors in cardiovascular diseases: a mirror of disrupted endothelial integrity. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2006;99:607-13.
- Born GV, Feinberg H. Binding of adenosine diphosphate to intact human platelets. *J Physiol.* 1975;251:803-816.
- Brevetti G, Silvestro A, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk prediction in peripheral arterial disease: additive value of flow-mediated dilation to ankle-brachial pressure index. *Circulation.* 2003;108:2093-2098.
- Campia U, Matuskey LA, Panza JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation with pioglitazone improves endothelium-dependent dilation in nondiabetic patients with major cardiovascular risk factors. *Circulation.* 2006;113:867-875.
- Chen JW, Hsu NW, Wu TC, Lin SJ, Chang MS. Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition reduces plasma asymmetric dimethylarginine and improves endothelial nitric oxide bioavailability and coronary microvascular function in patients with syndrome X. *Am J Cardiol.* 2002; 90: 974–82.
- Civin CI, LC Strauss, C Brovall, MJ Fackler, JF Schwartz and JH Shaper. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984;133:157–165.
- Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer, D.Charbonneau F,Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. 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.* 2002;39:257-265.
- Danielson M, Dammstrom B. The prevalence of secondary and curable hypertension. *Acta Med Scand.* 1981;209:451-455.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52:415-472.

Delles C, Schneider MP, John S, Gekle M, Schmieder RE. Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2002; 15: 590–93.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601-605.

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med.* 1997;185:601-607.

ENCORE Investigators. Effect of nifedipine and cerivastatin on coronary endothelial function in patients with coronary arterydisease: the ENCORE I Study (Evaluation of Nifedipine and Cerivastatin On Recovery of coronary Endothelial function). *Circulation.* 2003;107:422-8.

Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:1983-1992.

Fina L, HV Molgaard, D Robertson, NJ Bradley, P Monaghan, D Delia, DR Sutherland, MA Baker and MF Greaves. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75:2417–2426.

Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol.* 1995;50:1321-1332.

Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2003;93:980-989.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.

- Fuster V, Dyken ML, Vokonas PS, Hennekens C. Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. *Circulation*. 1993;87:659-675.
- Gasse C, Hense HW, Stieber J, Doring A, Liese AD, Keil U. Assessing hypertension management in the community: trends of prevalence, detection, treatment, and control of hypertension in the MONICA Project, Augsburg 1984-1995. *J Hum Hypertens*. 2001;15:27-36.
- Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000;95:3106-3112.
- Ghiadoni L, Magagna A, Versari D, Kardasz I, Huang Y, Taddei S, Salvetti A. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension*. 2003;41:1281-1286.
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88:167-174.
- Gill M, S Dias, K Hattori, ML Rivera, D Hicklin, L Witte, L Girardi, R Yurt, H Himel and S Rafii. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88:167-174.
- Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. 2002;105:1567-1572.
- Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, Friend A, Shah V, Dillon MJ. Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens*. 1997;15:901-909.
- Granger DL, Hibbs JB Jr, Broadnax LM. Urinary nitrate excretion in relation to murine macrophage activation. Influence of dietary L-arginine and oral NG-monomethyl-L-arginine. *J Immunol*. 1991;146:1294-302.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86:494-501.

Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*. 1984;308:645-647.

Haller H. Endothelial function. General considerations. *Drugs*. 1997;53 Suppl 1:1-10.

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104:2673-2678.

Hennekens CH. Aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease. *Annu Rev Public Health*. 1997;18:37-49.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600.

Hiroki T, Inoue T, Yoshida T, Arakawa K. Effect of the calcium antagonistic agent nifedipine on platelet aggregation response to exercise in patients with angina pectoris. *Arzneimittelforschung*. 1982;32:1572-1574.

Hornig B, Kohler C, Schlink D, Tatge H, Drexler H. AT1-receptor antagonism improves endothelial function in coronary artery disease by a bradykinin/B2-receptor-dependent mechanism. *Hypertension*. 2003;41:1092-1095.

Hornig B, Maier V, Drexler H. Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1996;93:210-214.

Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990;30:535-560.

Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res*. 2004;27:101-8.

Ingram DA, LE Mead, H Tanaka, V Meade, A Fenoglio, K Mortell, K Pollok, MJ Ferkowicz, D Gilley and MC Yoder. Identification of a novel hierarchy of endothelial

progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752–2760.

Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752-2760.

Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. 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* 2002;66:811–815.

Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. *Jpn Circ J*. 2001;65:775-778.

Iwakura A, C Luedemann, S Shastry, A Hanley, M Kearney, R Aikawa, JM Isner, T Asahara and DW Losordo. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*. 2003;108:3115–3121.

Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*. 2003;108:3115-3121.

Jones DW, Hall JE. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure and evidence from new hypertension trials. *Hypertension*. 2004;43:1-3.

Kalinowski L, Matys T, Chabielska E, Buczko W, Malinski T. Angiotensin II AT1 receptor antagonists inhibit platelet adhesion and aggregation by nitric oxide release. *Hypertension*. 2002;40:521-527.

Kaplan N, Schachter M, Editors. *New Frontiers in Hypertension*, Lippincott Williams & Wilkins, 2002

Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. *The biology of nitric oxide*. Portland Press. 1992;1:319-322

Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Fröhlich JC, Hoepfer MM, Haller H, Fliser D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation*. 2004;109:172-177.

Kim HK, KS Song, HO Kim, JH Chung, KR Lee, YJ Lee, DH Lee, ES Lee, HK Kim, KW Ryu and JM Bae. Circulating numbers of endothelial progenitor cells in patients with gastric and breast cancer. *Cancer Lett*. 2003;198:83–88.

Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300:657-662.

Kishi Y, Watanabe T, Makita T, Sakita S, Watanabe R, Ashikaga T, Numano F. Effect of nifedipine on cyclic GMP turnover in cultured coronary smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26:590-595.

Kjeldsen SE, Dahlof B, Devereux RB, Julius S, Aurup P, Edelman J, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Snapinn S, Wedel H. Effects of losartan on cardiovascular morbidity and mortality in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy: a Losartan Intervention for Endpoint Reduction (LIFE) substudy. *Jama*. 2002;288:1491-1498.

Lacourciere Y, Lenis J, Orchard R, Lewanczuk R, Houde M, Pesant Y, Wright J, Wilson T, Martin K. A comparison of the efficacies and duration of action of the angiotensin II receptor blockers telmisartan and amlodipine. *Blood Press Monit*. 1998;3:295-302.

Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 1999;43:542-8.

Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation*. 1990;81:1762-1767.

Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2001;108:399-405.

Llevadot J, S Murasawa, Y Kureishi, S Uchida, H Masuda, A Kawamoto, K Walsh, JM Isner and T Asahara. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2001;108:399-405.

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-1051.

Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):915-22.

Maas R, Quitzau K, Schwedhelm E, Spieker L, Rafflenbeul W, Steenpass A, Luscher TF, Böger RH. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and coronary endothelial function in patients with coronary artery disease and mild hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2007;191:211-9.

Magrini F, Reggiani P. Epidemiology of hypertension in Europe. *Eur Heart J*. 1992;13 Suppl H:27-34.

Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Jama*. 2002;288:2981-2997.

Mallion J, Siche J, Lacourciere Y. ABPM comparison of the antihypertensive profiles of the selective angiotensin II receptor antagonists telmisartan and losartan in patients with mild-to-moderate hypertension. *J Hum Hypertens*. 1999;13:657-664.

Massa M, V Rosti, M Ferrario, R Campanelli, I Ramajoli, R Rosso, GM de Ferrari, M Ferlini, L Goffredo, A Bertolotti, C Klersy, A Pecci, R Moratti and L Tavazzi. Increased

circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*. 2005; 105:199–206.

Materson BJ, Reda DJ, Cushman WC, Massie BM, Freis ED, Kochar MS, Hamburger RJ, Fye C, Lakshman R, Gottdiener J. Single-drug therapy for hypertension in men. A comparison of six antihypertensive agents with placebo. The Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *N Engl J Med*. 1993;328:914-921.

Mayr FB, Jilma B. Current developments in anti-platelet therapy. *Wien Med Wochenschr*. 2006;156:472-480.

McClellan KJ, Markham A. Telmisartan. *Drugs*. 1998;56:1039-1044.

Miraglia S, W Godfrey, AH Yin, K Atkins, R Warnke, JT Holden, RA Bray, EK Waller and DW Buck. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*. 1997;90:5013–5021.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-2012.

Nakashima H, Suzuki H, Ohtsu H, Chao JY, Utsunomiya H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: recent topics of Angiotensin II type-1 receptor signaling in the vasculature. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006;4:67-78.

Napoli C, Sica V, de Nigris F, Pignatelli O, Condorelli M, Ignarro LJ, Liguori A. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am Heart J*. 2004;148: e5.

Neaton JD, Grimm RH, Jr., Prineas RJ, Neaton JD, Grimm RH Jr, Prineas RJ, Stamler J, Grandits GA, Elmer PJ, Cutler JA, Flack JM, Schoenberger JA, McDonald R. Treatment of Mild Hypertension Study. Final results. Treatment of Mild Hypertension Study Research Group. *Jama*. 1993;270:713-724.

Neutel JM, Frishman WH, Oparil S, Papademitriou V, Guthrie. Comparison of telmisartan with lisinopril in patients with mild-to-moderate hypertension. *Am J Ther*. 1999;6:161-166.

Nishimura H, Asahara T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascular formation. *Exs.* 2005;94:147-154.

Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Watanabe H, Sasaoka K. Metabolism of NG,NG- and NG,N'G-dimethylarginine in rats. *Arch Biochem Biophys.* 1987;252:526-537.

Opie LH. What does nisoldipine coat core (CC) add to current therapy that is clinically meaningful? *Am J Cardiol.* 1997;79:29-32.

Osanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension.* 2003;42:985-990.

Paik WK, Kim S. Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem.* 1968;243:2108-2114.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* Jun 1987;327:524-526.

Panza JA, Casino PR, Badar DM, Quyyumi AA. Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation.* 1993;87:1475-1481.

Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 1999;43:509-520.

Patterson C, MA Perrella, CM Hsieh, M Yoshizumi, ME Lee and E Haber. Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1995;270:23111–23118.

Peichev M, AJ Naiyer, D Pereira, Z Zhu, WJ Lane, M Williams, MC Oz, DJ Hicklin, L Witte, MA Moore and S Rafii. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952–958.

Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem.* 1995;270:14214-14219.

Perticone F, Maio R, Tripepi G, Zoccali C. Endothelial dysfunction and mild renal insufficiency in essential hypertension. *Circulation*. 2004;110:821-825.

Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Böger RH, Tripepi G, Sesti G, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:518-523.

Peters J. Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensin. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1995;9:657-678.

Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH, Mincemoyer R, Panza JA, Waclawin MA, Ellahhan S, Quyyumi AA. Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2000;101:2349-2354.

Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH, Mincemoyer R, Panza JA, Waclawin MA, Ellahham S, Quyyumi AA. Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2000;101:2349-54.

Psaty BM, Lumley T, Furberg CD, Schellenbaum G, Pahor M, Alderman MH, Weiss NS. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *Jama*. 2003;289:2534-2544.

Rafii S, Avezilla S, Shmelkov S, Shido K, Tejada R, Moore MA, Heissig B, Hattori K. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:49-60.

Reinders ME, Rabelink TJ, Briscoe DM. Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:932-42.

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

Rudnick KV, Sackett DL, Hirst S, Holmes C. Hypertension in a family practice. *Can Med Assoc J*. 1977;117:492-497.

Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1845-1851.

Salomone S, Silva CL, Morel N, Godfraind T. Facilitation of the vasorelaxant action of calcium antagonists by basal nitric oxide in depolarized artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996;354:505-512.

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000;101:1899-1906.

Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation.* 2000;101:1653-1659.

Schiffrin EL. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens.* 2002;15:115S-122S.

Scholz H. Pharmacological aspects of calcium channel blockers. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997;10 Suppl 3:869-872.

Schulman IH, Zhou MS, Raj L. Interaction between nitric oxide and angiotensin II in the endothelium: role in atherosclerosis and hypertension. *J Hypertens Suppl.* 2006;24:45-50.

Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42:1377-1383.

Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation.* 2004;109:2054-2057.

Sharpe M, Jarvis B, Goa KL. Telmisartan: a review of its use in hypertension. *Drugs.* 2001;61:1501-1529.

Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev.* 1989;69:58-178.

Sinclair AM, Isles CG, Brown I, Cameron H, Murray GD, Robertson JW. Secondary hypertension in a blood pressure clinic. *Arch Intern Med.* 1987;147:1289-1293.

Sipahi I, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Wolski KE, Nicholls SJ, Balog C, Crowe TD, Nissen SE. Effects of normal, pre-hypertensive, and hypertensive blood pressure levels on progression of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:833-838.

Siragy H. Angiotensin II receptor blockers: review of the binding characteristics. *Am J Cardiol.* 1999;84:3-8.

Smith DH. Treatment of hypertension with an angiotensin II-receptor antagonist compared with an angiotensin-converting enzyme inhibitor: a review of clinical studies of telmisartan and enalapril. *Clin Ther.* 2002;24:1484-1501.

Solovey AN, L Gui, L Chang, J Enestein, PV Browne and RP Hebbel. Identification and functional assessment of endothelial P1H12. *J Lab Clin Med.* 2001;138:322-331.

Staessen JA, Wang JG, Thijs L. Cardiovascular prevention and blood pressure reduction: a quantitative overview updated until 1 March 2003. *J Hypertens.* 2003;21:1055-1076.

Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 1994;78:931-936.

Strawn WB, Dean RH, Ferrario CM. Novel mechanisms linking angiotensin II and early atherogenesis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000;1:11-17.

Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2003;108:933-938.

Takahashi T, C Kalka, H Masuda, D Chen, M Silver, M Kearney, M Magner, JM Isner and T Asahara. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Med.* 1999;5:434-438.

Thefeld W. Verbreitung der Herz-Kreislauf-Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Übergewicht, Hypertonie und Rauchen in der Bevölkerung. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz.* 2000; 43:415-423

Tsikas D, Böger RH, Bode-Böger SM, Gutzki FM, Fröhlich JC. Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas

chromatography-mass spectrometry using their ¹⁵N-labelled analogs. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994;661:185-191.

Urbich C, Dimmeler S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int.* 2005;67:1672-1676.

Urbich C, Dimmeler S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int.* 2005;67:1672-6.

Valgimigli M, GM Rigolin, A Fucili, MD Porta, O Soukhomovskaia, P Malagutti, AM Bugli, LZ Bragotti, G Francolini, E Mauro, G Castoldi and R Ferrari. CD34 and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation.* 2004;110:1209–1212.

Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimaki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet.* 2001;358:2127-2128.

Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989;2:997-1000.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339:572-575.

Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103:2885-2890.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:1-7.

Vaughan DE. Angiotensin and vascular fibrinolytic balance. *Am J Hypertens.* 2002;15:3-8.

Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a

novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;105:3017-3024.

Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Bohm M, Nickenig G. Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1208-1212.

Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson AS, Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res*. 1993;73:1121-1127.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005;353:999-1007.

Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet*. 2003;361:206-210.

Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. 1998;279:234-237.

Yamagishi S, Nakamura K. Revival of nifedipine, a dihydropyridine-based calcium blocker. *Med Hypotheses*. 2007;68:565-567.

Yin AH, S Miraglia, ED Zanjani, G Almeida-Porada, M Ogawa, AG Leary, J Olweus, J Kearney and DW Buck. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90:5002-5012.

Zhu JR, Bai J, Cai NS, Tang B, Fan WH, Guo JZ, Ke YN, Guo JX, Sheng LH, Lu ZY, Cheng NN. Efficacy and safety of telmisartan vs. losartan in control of mild-to-moderate hypertension: a multicentre, randomised, double-blind study. *Int J Clin Pract Suppl*. 2004:46-4

Ziegler BL, M Valtieri, GA Porada, R De Maria, R Muller, B Masella, M Gabbianelli, I Casella, E Pelosi, T Bock, ED Zanjani and C Peschle. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science*. 1999;285:1553-1558.

7 Lebenslauf

Name: Daniel Appel
Geburtsdatum: 12. August 1977
Geburtsort: Kassel
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch
E-Mail: D.Appel@uke.uni-hamburg.de

Schulbildung

Grundschule in Kassel 1984 – 1988
Goetheschule, Gymnasium in Kassel 1988 – 1998

Studium

Studium der Medizin an der Universität Hamburg 2000 – 2006
Ärztliche Vorprüfung (Physikum) März 2002
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung März 2003
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung September 2005
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung November 2006

Promotion

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie 2003 - 2007
Arbeitsgruppe Klinische Pharmakologie

Berufstätigkeit

Wissenschaftlicher Mitarbeiter seit Januar 2007
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

8 Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

Benndorf RA, Gehling UM, Appel D, Maas R, Schwedhelm E, Schlagner K, Silberhorn E, Hossfeld DK, Rogiers X, Böger RH. Mobilization of Putative High-Proliferative-Potential Endothelial Colony-Forming Cells during Antihypertensive Treatment in Patients with Essential Hypertension. *Stem Cells and Development*. 2007;16:329-338.

Bajcetic M, Benndorf RA, Appel D, Schwedhelm E, Schulze F, Riekhof D, Maas R, Böger RH. Pharmacokinetics of oral doses of telmisartan and nisoldipine, given alone and in combination, in patients with essential hypertension. *J Clin Pharmacol*. 2007;47:295-304.

Benndorf RA, Rudolph T, Appel D, Schwedhelm E, Maas R, Schulze F, Silberhorn E, Boger RH. Telmisartan improves insulin sensitivity in nondiabetic patients with essential hypertension. *Metabolism*. 2006;55:1159-64.

Benndorf RA, Appel D, Maas R, Schwedhelm E, Wenzel UO, Böger RH. Telmisartan Improves Endothelial Function in Patients With Essential Hypertension. *J. Cardiovasc Pharmacol*. 2007; in press

9 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Einfluss von Telmisartan, Nisoldipin oder ihrer Kombination auf die endothelabhängige Vasodilatation bei Patienten mit essentieller Hypertonie

in der Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R.H. Böger ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den 08.08.2007

D. Appel

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. T. Eschenhagen und Herrn Prof. Dr. R.H. Böger danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie diese Arbeit anfertigen zu können.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R.H. Böger für die Überlassung des Themas und für die umfassende und kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit in der Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie.

Besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn Dr. R.A. Benndorf für umfassende und uneingeschränkte Betreuung und Unterschätzung bei der praktischen Arbeit sowie beim Verfassen dieser Promotion.

Ich danke Anna Steenpaß, Mariola Kastner, Anneke Bierend, Elisabeth Silberhorn, Cornelia Wörmann, Renke Maas, Friedrich Schulze, Edzard Schwedhelm für das hervorragende Arbeitsklima und ihre kontinuierliche Hilfsbereitschaft.

Besonders danke ich meinen Eltern, Harald und Wilma Appel, meinen Großeltern, Hermann und Martha Appel sowie meiner Freundin Jumi Klettke. Durch ihre Unterstützung haben sie mir das Studium und diese Promotion erst ermöglicht.