

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie
des Universitären Herzzentrums GmbH
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. T. Meinertz

Einfluss von Oxypurinol auf die koronare und periphere Endothelfunktion von
Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Dissertation

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

Klaus Gustav Koss
aus München

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 31.03.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. med. Ralf Köster

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. med. Stephan Baldus

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Rainer Böger

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung.....	3
2. Einleitung.....	4
2.1. Atherosklerose.....	5
2.2. Endothel.....	6
2.2.1. Endothelfunktion.....	8
2.2.2. Stickstoffmonoxid.....	9
2.2.3. Biologie von Stickstoffmonoxid.....	10
2.2.4. Rolle des Endothels in der Regulation des Gefäßtonus.....	12
2.3. Pathogenese der Atherosklerose.....	13
2.4. Endotheliale Dysfunktion.....	16
2.4.1. Reduzierte Bioverfügbarkeit von NO.....	18
2.4.2. Verbrauch von NO.....	19
2.4.3. Produktion von ROS (Reaktiven Sauerstoffspezies).....	20
2.5. Xanthinoxidase.....	22
2.5.1. Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation.....	24
2.5.2. Hemmung der Xanthinoxidase.....	26
2.5.3. Die Rolle der Xanthinoxidase bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	27
2.6. Klinische Evidenz für die Endothelfunktion.....	29
2.7. Koronare Gefäßversorgung und myokardiale Durchblutung.....	30
2.8. Fragestellung der Arbeit.....	31
3. Material und Methoden.....	32
3.1. Studiendesign.....	32
3.2. Studienpopulation.....	34
3.2.1. Einschlusskriterien.....	34
3.2.2. Ausschlusskriterien.....	34
3.2.3. Beobachtungszeitraum.....	36
3.3. Studienmedikation.....	37
3.4. Herzkatheteruntersuchung.....	38
3.4.1. Laevokardiographie.....	40
3.4.2. Koronarangiographie.....	41
3.4.3. Quantitative Koronarangiographie.....	44
3.4.4. Intrakoronare Flußmessung mit dem Dopplerdraht.....	45

3.5.	Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität und der Plasmaspiegel von Oxypurinol, Xanthin, Hypoxanthin und Urat.....	47
3.6.	Bestimmung der Fluss-abhängigen Dilatation am Unterarm.....	48
3.7.	Statistische Auswertung.....	50
4.	Ergebnisse.....	51
4.1.	Patienten.....	51
4.2.	Sicherheit.....	53
4.3.	Plasmaspiegel von Oxypurinol und der Purinmetabolite.....	54
4.4.	Quantitative Koronarangiographie.....	56
4.5.	Intrakoronare Flussmessungen.....	58
4.6.	Fluss-abhängige Dilatation am Unterarm.....	60
5.	Diskussion.....	61
5.1.	Patientenkollektiv.....	63
5.2.	Methodenkritik.....	65
5.2.1.	Quantitative Koronarangiographie.....	65
5.2.2.	Intrakoronare Flussmessungen.....	67
5.2.3.	Flussabhängige Dilatation am Unterarm.....	70
5.2.4.	Korrelation der biochemischen Parameter.....	72
5.3.	Ausblick.....	73
6.	Zusammenfassung.....	74
7.	Literaturverzeichnis.....	76
8.	Danksagung.....	100
9.	Lebenslauf.....	101
10.	Erklärung.....	102

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Es soll der Einfluss einer intravenösen Gabe von Oxypurinol, einem Inhibitor der Xanthinoxidase, auf die Endothelfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung als einer Manifestation der Atherosklerose untersucht werden.

Als Indikator der Endothelfunktion wird die vasodilatatorische oder vasokonstriktorische Wirkung einer intrakoronaren Infusion von steigenden Dosen von Acetylcholin angenommen. Acetylcholin bewirkt durch endothelabhängige Freisetzung von NO eine Vasodilatation, bei erkrankten Patienten mit endothelialer Dysfunktion zeigt sich jedoch eine Vasokonstriktion durch direkte Wirkung des Acetylcholin auf die glatte Muskulatur der Gefäße.

Es wird die Hypothese aufgestellt, dass die Infusion von Oxypurinol durch Hemmung der Xanthinoxidase eine Verbesserung der Endothelfunktion bewirkt.

Hierzu werden 18 Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung untersucht, definiert als das Vorliegen generalisierter Wandveränderungen oder dem Vorliegen einer oder zwei Koronararterien, für die eine PTCA, Stentimplantation oder ein anderer perkutaner Eingriff geplant ist. Nach Intervention wird bei den Pat. die endothelabhängige Relaxation sowie die koronararterielle Flussreserve unter Acetylcholin in steigender Dosierung (von 10^{-7} über 10^{-6} bis 10^{-5} mol/L) bestimmt. Die Zielarterie ist eine angiographisch nicht verschlossene Arterie der linken Koronararterien mit minimalen Läsionen (Stenose <40%). Im Anschluss wird Oxypurinol infundiert und die Relaxation der Arterie sowie die koronare Flussreserve auf Acetylcholin erneut bestimmt.

Es werden zwei primäre Endpunkte betrachtet: erstens die Acetylcholin-induzierte Änderung des Koronararteriendiameters – der Endpunkt ist hier die Nettodifferenz des Diameters des auf Acetylcholin 10^{-5} mol/l am stärksten konstringierenden Koronararteriensegments vor und nach Infusion von Oxypurinol in Prozentpunkten. Als zweiter Parameter wird die Acetylcholin-induzierte Änderungen des intrakoronaren Flusses betrachtet: hier ist der Endpunkt ist die stärkste Veränderung der intrakoronaren Flussreserve auf Acetylcholingabe vor und nach Infusion von Oxypurinol in Prozentpunkten. Wenn 10^{-5} mol/l Acetylcholin nicht toleriert wird, werden die Werte der höchsten, in beiden Messungen tolerierten Acetylcholindosis miteinander verglichen.

2. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die koronare Herzerkrankung als Manifestation der Arteriosklerose an den Herzkranzgefäßen, sind die führende Todesursache in den westlichen Industrienationen (Murray und Lopez, 1997). Nach Angaben des statistischen Bundesamtes starben allein in Deutschland im Jahre 2001 mehr als 250.000 Menschen an Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems, insgesamt liegt der Anteil der kardiovaskulären Erkrankungen an der Gesamtmortalität bei über 50%. Der überwiegende Anteil dieser kardial bedingten Sterbefälle wird durch die Manifestationen und Folgen der koronaren Herzerkrankung, insbesondere durch den akuten Myokardinfarkt bedingt.

Eine große Zahl epidemiologischer Studien konnten den Einfluß des Lebensstiles mit den entsprechenden Folgen auf das Risiko der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung zeigen (Windler und Zyriax, 2001). Als starke Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose konnten erworbene Veränderungen wie z. B. die arterielle Hypertonie, die Hypercholesterinämie, ein Nikotinabusus und das Vorliegen eines Diabetes mellitus identifiziert werden (Murray und Lopez, 1997).

2.1. Atherosklerose

Ursprünglich wurde der Vorgang der Atherosklerose als degenerativer Prozess gesehen. In den letzten Jahren mehrten sich jedoch die Erkenntnisse, dass die der Arteriosklerose zugrunde liegenden Pathomechanismen in Anbetracht der Vielfalt zellulärer und molekularer Vorgänge einen chronischen Entzündungsprozess widerspiegeln (Braunwald, 1997; Ross 1999; Libby, 2002).

Die Entstehung der Atherosklerose ist ein multifaktorieller Vorgang, als zentraler Prozess wird heutzutage eine Verletzung der Gefäßwand mit konsekutiver Entzündung und Reparatur angesehen („response-to-injury“) (Hansson, 2005). Die genaue Ätiologie ist nicht bekannt, es konnten jedoch in der Mitte des letzten Jahrhunderts Risikofaktoren für das Auftreten der Atherosklerose, insbesondere ihrer Manifestation am Herzen, der koronaren Herzerkrankung definiert werden. Diese Faktoren waren zunächst nur epidemiologisch definiert, im weiteren Verlauf konnten jedoch der pathogenetische Beitrag der Faktoren auf zellulärer und subzellulärer Ebene weitergehend determiniert werden (Glass und Witztum, 2001).

Eine zentrale Rolle im pathogenetischen Ablauf dieser unspezifischen Entzündung nimmt das Endothel ein.

2.2. Endothel

Ein Blutgefäß besteht aus 3 Schichten, einer Adventitia, einer Media und einer Intima (siehe Abbildung). Die Adventitia ist eine lockere Schicht aus Bindegewebe, mit der das Gefäß in der Umgebung verankert ist. Die Media besteht vor allem aus glatten Muskelzellen. Über eine Kontraktion oder Relaxation wird die Gefäßweite reguliert. Bei Arterien, insbesondere den arteriellen Widerstandsgefäßen ist die Media proportional deutlich kräftiger angelegt als bei den Venen.

Die Intima liegt im Inneren des Gefäßes und bildet die Grenze zum fließenden Blut. Sie besteht aus einer einschichtigen Lage von flachen spindelförmigen Endothelzellen, einer Basalmembran und einer subendothelialen Schicht aus lockerem Bindegewebe (Schiebler et al., 2001).

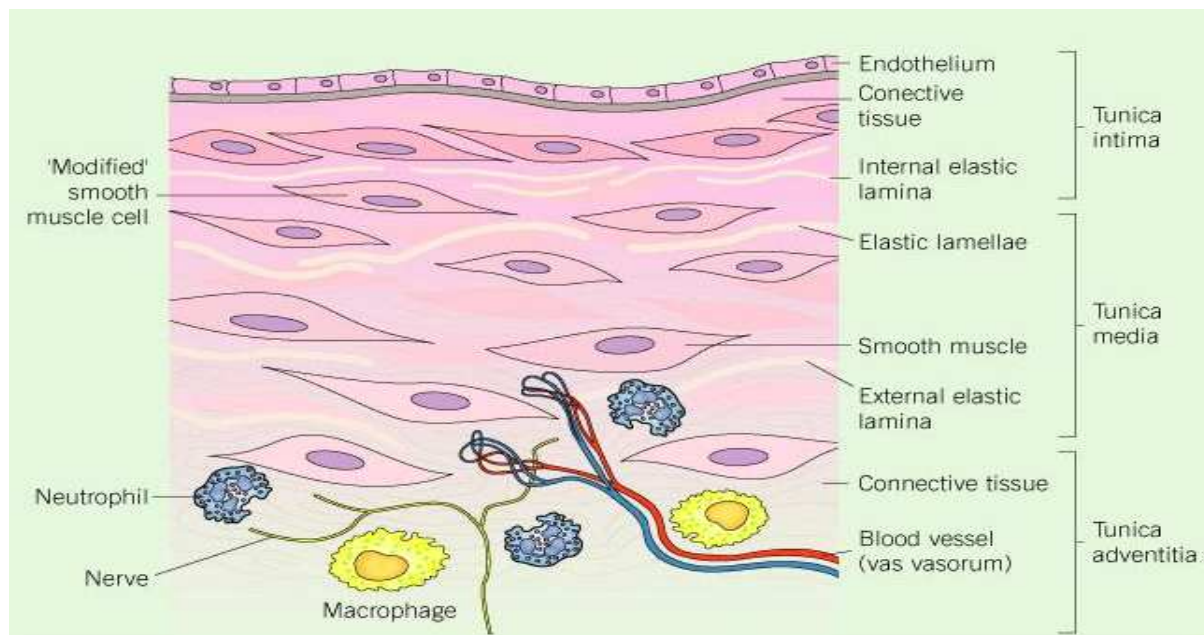


Abb. 1: Aufbau der Gefäßwand. Zunächst liegt die Tunica intima, zum Gefäßlumen wird diese vom Endothel begrenzt. Das Endothel ist an einer Basallamina verankert. Darunter liegt eine dünne Bindegewebsschicht, die Lamina elastica interna. Die Tunica media besteht vor allem aus lagenförmig angeordneten glatten Muskelzellen, umgeben von einem Geflecht aus elastischen Fasern. Die Tunica adventitia als äußerste Schicht besteht vor allem aus Bindegewebe, hier verlaufen die das Gefäß versorgenden Vasa vasorum und das sympathische Nervengeflecht (Hansson und Nilsson, 2003).

Lange Zeit wurde das Endothel als rein passive anatomische Barriere zwischen dem Blut und dem Gefäßparenchym gesehen, welches in bestimmten Bereichen der Mikrozirkulation kleinmolekulare Substanzen passieren ließ, und die Diffusion der Makromolekularen und zellulären Anteile des Blutes verhinderte.

Nach Erkenntnissen der letzten 20 Jahre nimmt das Endothel jedoch eine aktive Rolle in verschiedensten Prozessen wahr, so ist es als Produzent von verschiedenen Hormonen mit endokriner und parakriner Wirkung wohl das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers bei einer geschätzten Gesamtmasse von circa 1.5 kg und einer Zellzahl von über einer Billion Zellen (Dzau et al., 1994). Das Endothel hat Einfluss auf immunologische Prozesse, unter anderem über die Beeinflussung der Adhärenz von Leukozyten (Cybulski und Gimbrone, 1991) und Thrombozyten (Hartwell und Wagner, 1999), einer Regulation der Permeabilität der Gefäße (Blann und Lip, 1998) und es synthetisiert Wachstumsfaktoren und beeinflusst so die Struktur der Gefäße (Rudic et al., 1998) und übt einen modulierenden Effekt auf die intravasalen Gerinnungsmechanismen aus (Gimbrone, 1995).

Die Kernfunktion des Endothels jedoch ist die Regulierung des Tonus der Gefäße. Auf Stimulation durch Neurotransmitter, Hormone und thrombozytär gebildeten parakrinen Faktoren reagiert es mit der Bildung und Modulation verschiedener vasoaktiver Substanzen.

2.2.1. Endothelfunktion

Auf Veränderungen der Stromstärke des fließenden Blutes reagiert das Endothel mit einer Änderung der Gefäßweite. Als Reiz fungiert hier die Scherkraft des vorbeiströmenden Blutes („shear stress“), das Endothel reagiert mit der Bildung von vasoaktiven Substanzen. Diese vasoaktiven Substanzen sorgen für eine Dilatation des Gefäßes über eine Relaxierung der glatten Muskelzellen der Media. Furchgott und Zawadski beschrieben diese Eigenschaft des Endothels erstmalig 1980: Gefäße dilatieren nach Gabe von Acetylcholin nur dann, wenn das Endothel intakt ist. Ein isolierter Ring einer Pulmonalarterie dilatierete unter Gabe von Acetylcholin, wurde jedoch mittels Reiben das Endothel entfernt, reagierte das Gefäß mit einer Vasokonstriktion. Sie zogen daraus den Schluss, dass das Endothel eine Substanz produziert, dessen Freisetzung durch Acetylcholin stimuliert wird und welche die Vasodilatation vermittelt. Fehlt nun das Endothel, bewirkt Acetylcholin eine direkte Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und somit die Vasokonstriktion. Sie benannten die Substanz „Endothel derived relaxing factor“ oder EDRF (Furchgott und Zawadski, 1980).

Als das die EDRF-Aktivität vermittelnde Agens wurde 1987 das kleinmolekulare Gas Stickstoffmonoxid identifiziert (Ignarro et al., 1987). Neben Stickstoffmonoxid bildet das Endothel noch weitere vasoaktive Substanzen, unter anderem das vasodilatierende und aggregationshemmende Prostazyklin PGI₂ und die vor allem unter Streßbedingungen wie Hypoxie gebildeten vasokonstriktorisches Substanzen Angiotensin II, Endothelin und einige Produkte des Arachidonsäure-Metabolismus, wie z. B. PGE₂ (Ludmer et al., 1986).

2.2.2. Stickstoffmonoxid

Ein Jahr nach der Entdeckung der Identität von EDRF konnte erstmalig die Bildung von NO aus der essentiellen Aminosäure L-Arginin beschrieben werden (Palmer et al., 1988). Die Synthese des NO wird durch ein endotheliales Enzym, der NO-Synthase (NOS) katalysiert, welche 1990 nachgewiesen wurde (Bredt et al., 1990). Aus Arginin wird in einem ersten Schritt zunächst NG-Hydroxy-L-Arginin synthetisiert, daraus wird in einem zweiten Schritt NO freigesetzt und Citrullin entsteht als Abfallprodukt. Beide Reaktionsschritte verbrauchen NADPH und O₂.

Von diesem Enzym existieren 3 Isoformen. In neuronalem Gewebe wird die NOS I exprimiert (auch neuronale NO-Synthase oder nNOS genannt), welche im zentralen Nervensystem zahlreiche Funktionen einschließlich des Gedächtnisses (Zhuo et al., 1993; Lipton et al., 1994) beeinflusst und im peripheren Nervensystem die Steuerung von gastrointestinalen (Brookes, 1993), respiratorischen (Lundberg, 1993) und urogenitalen Funktionen (Burnett et al., 1992) verantwortlich ist. Die NO-Synthase II ist in verschiedenen Zelltypen wie etwa in Makrophagen oder Granulozyten, durch eine Reihe von Faktoren, so z. B. Lipopolysaccharide (Stuehr und Marletta, 1985) oder Zytokine (Busse und Mülsch, 1990a) induzierbar, kann jedoch unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur in geringen Mengen nachgewiesen werden (deshalb auch als induzierbare oder iNOS bezeichnet). Über diesen Weg spielt NO eine Rolle in der nichtspezifischen Immunität (Liew und Cox, 1991) und bei Prozessen wie dem septischen Schock (Titheradge, 1999) und anderen Entzündungen sowie dem hyperdynamen Kreislaufstatus der Leberzirrhose (Vallance und Moncada, 1991). In den vaskulären Endothelzellen wird die konstitutiv exprimierte Variante der NO Synthase NOS III oder eNOS für die Bildung von NO nachgewiesen. Jedoch unterliegt auch die Expression und Aktivität der endothelialen NO-Synthase einer deutlichen Regulation (Fleming und Busse, 1999). Letztlich wird direkt über einen Calcium-Einstrom (Busse und Mülsch, 1990b) und indirekt über eine Signalkaskade mittels Phosphorylierung u. a. durch die Proteinkinase C (AKT) das Enzym aktiviert (Dimmeler et al., 1999).

Die NO-Synthasen tragen Erkennungsmotive für NADPH und FAD und enthalten als Coenzym Tetrahydrobiopterin, welches für die Aktivität des Enzyms notwendig ist.

2.2.3. Biologie von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist ein freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron, ein Molekül mit hoher Reagibilität. Aufgrund seiner geringen Größe und seiner Ladungsneutralität kann Stickstoffmonoxid frei über die Zellmembran hinweg in die Wand und das Lumen des Gefäßes diffundieren (Lancaster, 1994).

Auf molekularer Ebene werden durch NO drei prinzipielle Wirkmechanismen unterschieden:

Stickstoffmonoxid kann durch eine Komplexbildung an Metallzentren in Häm-Molekülen von Hämoproteinen binden, auf diesem Weg wird zum Beispiel durch Bindung an eine Häm-Gruppe in der Guanylat-Zyklase (Zhao et al., 1999) die wichtigste biologische Wirkung von NO vermittelt. Ein weiteres Beispiel ist die Bindung des Hämeisens von Hämoglobin, hierdurch wird NO inaktiviert (Gow und Stamler, 2001).

Weiterhin kann das NO mit der Thiol-Gruppe von Cystein in Proteinen reagieren, so wird zum Beispiel durch Bindung an Cystein-Reste im Hämoglobin eine Art Speicher gebildet. Die Bindung kann aber auch zu einer Modulation der Aktivität der entsprechenden Proteine, so z. B. von Enzymen wie den Caspasen oder auch Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Marshall et al., 2004) führen.

Als wichtigster Rezeptor für NO in den Zielzellen (glatte Muskelzellen, Thrombozyten, Leukozyten) fungiert jedoch eine zytosolische lösliche Guanylatcyclase (sGC), welche nach Bindung von NO an ein Häm-Eisen die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus dem Trinukleotid GTP katalysiert (Moro et al., 1996). Das kleine lösliche Molekül cGMP wirkt dann in der Rolle eines second-messengers und vermittelt durch Aktivierung einer cGMP-abhängigen Kinase eine Aktivierung oder Hemmung verschiedener intrazellulärer Proteine die biologische Funktion des NO (Arnold et al., 1977). Der Anstieg des cGMP führt so über verschiedene Zwischenschritte letztlich zu einem Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration, in den glatten Muskelzellen dann zu einer Relaxation. Auf luminaler Seite führt dies zu einer Hemmung der Aggregation der Thrombozyten (Schrör K, 1991) und zur direkten Hemmung der Adhäsion von Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten und vermittelt so einen anti-inflammatorische Wirkung des NO (De Caterina et al., 1995). Auf der Seite der Gefäßwand wird über eine Hemmung der Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen (Garg und Hassid,

1989), als auch einer Inhibierung der Synthese von Matrixproteinen durch Fibroblasten der Intima und glatte Gefäßmuskulatur (Von der Leyen et al., 1995) die Integrität von Funktion und Struktur der Gefäße aufrechterhalten. Über direkte autokrine und parakrine Wirkung auf umliegende Endothelzellen kann NO durch eine Herabregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle (Lefer et al., 1999) und Senkung der endothelialen Permeabilität zusätzlich entzündlichen Reizen entgegenwirken (He et al., 1997).

Als physiologischer Hauptreiz der endothelabhängigen NO-Freisetzung dient die Scherkraft des strömenden Blutes in pulsatilem Muster (Tsao et al., 1996). Hormonelle Reize sind vor allem die von Thrombozyten freigesetzten und gebildeten Stoffe Serotonin, Thrombin, Histamin, ADP und ATP, Bradykinin und Acetylcholin.

Aufgrund seiner hohen Reagibilität besitzt das NO insbesondere in seiner physiologischen Umgebung nur eine geringe (biologische) Halbwertszeit. NO wird im menschlichen Körper vor allem zu Nitrit und Nitrat abgebaut. Der größte Teil des endothelial gebildeten NO wird zunächst im Plasma mit molekularem Sauerstoff zu Nitrit oxidiert. Nitrit reagiert dann innerhalb der Erythrozyten in Anwesenheit von oxygeniertem Hämoglobin HbO_2 zu Nitrat, wobei das Hämoglobin zu Methämoglobin reduziert wird. Das Nitrat als vasoinactive Stoffwechsel-Endprodukt wird über die Nieren filtriert und mit dem Urin ausgeschieden. Alternativ kann NO auch direkt in die Erythrozyten diffundieren und dort ebenfalls unter Methämoglobinbildung zu Nitrat oxidiert werden (Doyle und Hoekstra, 1981).

2.2.4. Rolle des Endothels in der Regulation des Gefäßtonus

Die NO-Synthase wird wie bereits erwähnt in Endothelzellen konstitutiv exprimiert, reagiert Calcium- und Calmodulin-abhängig auf extrazelluläre Reize wie Scherkräfte des strömenden Blutes und rezeptorvermittelte Hormoneinwirkung mit der Bildung von geringen Mengen an Stickstoffmonoxid. Die funktionelle Bedeutung dieser Expression wurde durch mehrere Experimente Anfang der 90er Jahre gezeigt, so kommt es bei knock-out-Mäusen mit deletiertem eNOS-Gen zu einer arteriellen Hypertonie (Huang et al., 1995). Wird Versuchspersonen das Arginin-Analogon L-NMMA infundiert, welches als ein Inhibitor der NO-Synthase wirkt, so reagieren diese mit einem Blutdruckanstieg (Valance et al, 1989). Da L-NMMA selbst keine vasokonstriktorische Wirkung hat, resultiert seine vasokonstriktive Wirkung vollkommen endothelabhängig aus der Hemmung der endogenen Synthese und Freisetzung von NO. Diese Experimente zeigten, dass beim Menschen ein physiologischer vasodilatatorischer NO-abhängiger Effekt für Regulation von Blutdruck und Blutfluß verantwortlich ist und eine kontinuierliche basale Freisetzung von NO im Sinne eines Vasodilatatoren-Tonus besteht.

2.3. Pathogenese der Atherosklerose

Die Störung der endothelialen Funktion wird heute wie bereits erwähnt als ein Schlüsselfaktor in der Pathogenese der Atherosklerose gesehen.

Aktuell gilt eine chronisch progrediente Entzündung der Gefäße im Sinne einer generalisierten Ausbreitung als ursächlich (Ross 1999; Libby, 2002). Pathologisch-anatomisch kann eine Entzündung der Intima festgestellt werden, mit Infiltrationen durch Makrophagen und Lymphozyten.

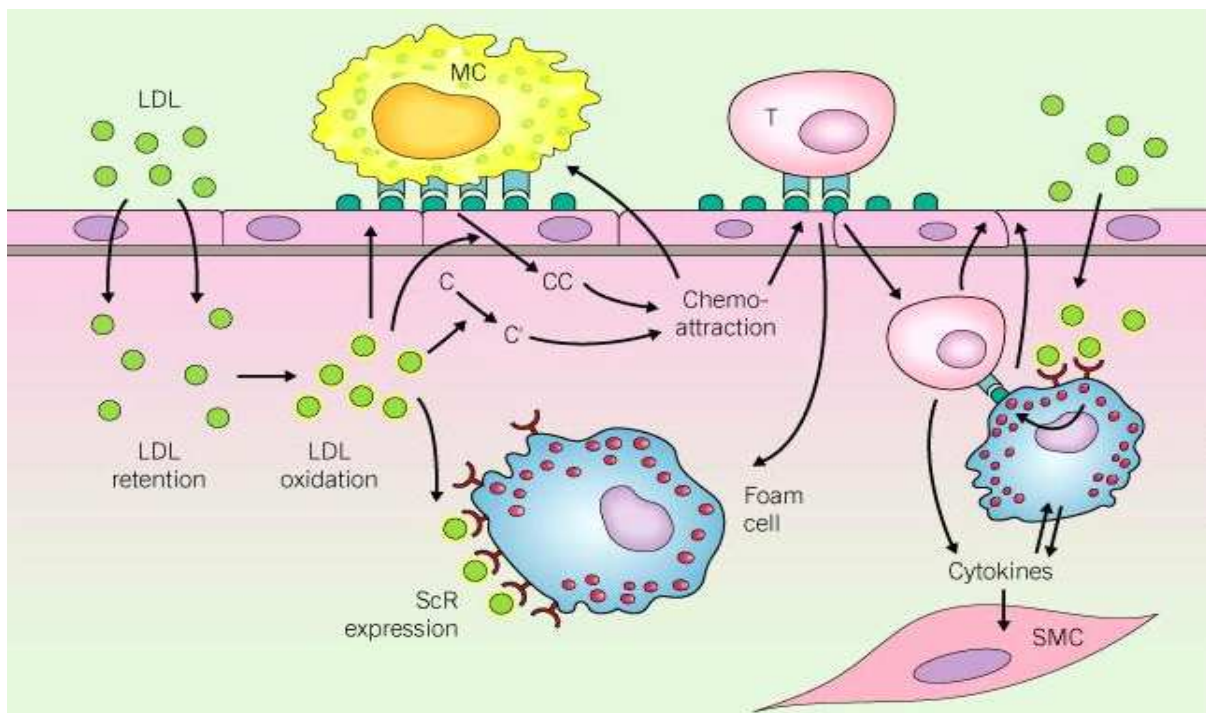


Abb. 2: Pathogenese der Atherosklerose. Zunächst lagert sich Lipoprotein gebundenes Cholesterin aufgrund einer gesteigerten Durchlässigkeit des Endothels in der Intima ab. Durch freie Radikale in der Gefäßwand wird das LDL oxidiert. Dadurch entstehen proinflammatorische Lipidmoleküle, welche in den Endothelzellen eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen induzieren, eine Ausschüttung von Chemokinen bewirken und Komplement aktivieren. Diese Faktoren führen gemeinsam zu einer vermehrten Adhäsion und zu einem Übertritt von Leukozyten, insbesondere Monozyten und T-Zellen in die Intima. Die Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen, welche über den scavenger-Rezeptor (ScR) oxidiertes LDL phagozytieren und zu Schaumzellen differenzieren. Über eine Präsentation von Fragmenten des oxLDL durch die Makrophagen wird eine Autoimmunreaktion induziert, die T-Zellen bilden weitere proinflammatorische Cytokine, welche über eine Wirkung auf die Endothelzellen, auf Makrophagen und auf bestehende glatte Muskelzellen die Entzündung weiter propagieren (Hansson und Nilsson, 2003).

Vorstellungen über den Mechanismus stellen heute als primäres Ereignis eine gesteigerte Durchlässigkeit des Endothels für Lipide in den Vordergrund („response to injury“-Hypothese von Ross), am ehesten auf dem Boden einer Dysfunktion der Endothelzellen. Diese Lipide, vorwiegend an Lipoproteine niedriger Dichte (LDL, low

density lipoprotein) gebundenes Cholesterin (Nordestgaard, 1996), lagern sich im subendothelialen Bindegewebe ab (Simionescu et al., 1986), werden an die extrazelluläre Matrix, insbesondere die Proteoglykane gebunden (Boren et al., 2000) und über eine Oxidation verändert (Steinberg, 1997). Über eine dauerhafte Stimulierung der Endothelzellen durch Zytokine (Nieman-Jonson et al., 2000) und infolgedessen vermehrter Bildung von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (Cybulsky et al., 2001) und den P- und E-Selectinen (Dong et al., 1998) auf der dem Gefäßlumen zugewandten Oberfläche binden Monozyten aus dem Blut und wandern per Diapedese in die Intima (Jonason et al., 1986; van der Wal et al., 1989). Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen und phagozytieren die modifizierten Lipoproteine (ox-LDL) über den scavenger-Rezeptor. Das phagozytierte ox-LDL kann jedoch nicht völlig metabolisiert werden, die Makrophagen verwandeln sich in Schaumzellen und produzieren Zytokine (Palkama, 1991) sowie reaktive Sauerstoffspezies, welche auf die umgebenden Zellen eine parakrine Wirkung entfalten (Brown und Goldstein, 1983). So wird zum Beispiel das Endothel zur weiteren Produktion der Adhäsionsmoleküle stimuliert (Rajavashisth et al., 1990), infolgedessen werden weitere Monozyten und auch T-Zellen angelockt. Über die Präsentation von Antigenen an die T-Zellen induzieren die Makrophagen eine Autoimmunantwort, welche in der Folge zur weiteren Progression der Entzündung im Sinne einer positiven Feedback-Schleife führt (Hanson, 1997). Glatte Muskelzellen in der Umgebung werden zur Proliferation angeregt und weitere Monozyten über einen chemotaktischen Effekt herangezogen (Leonard und Yoshimura, 1990). Mit Progression des Atheroms werden dann auch ortsständige Fibroblasten zu Proliferation und Bildung extrazellulärer Matrix stimuliert (Assoian und Marcantonio, 1996) bzw. glatte Muskelzellen dedifferenzieren zu Myofibroblasten (Chamley-Campbell et al., 1981) und so resultiert eine zunehmende Fibrosierung mit bindegewebigem Umbau und letztlich regressiven Veränderungen durch Einlagerungen von Kalk zum fibrösen Plaque. Dieser Plaque kann einerseits dann zu einer zunehmenden Einengung des Lumens des betroffenen Gefäßes führen (Davies, 1996), mit der Folge einer zunächst nur unter Belastung, dann auch in Ruhe abnehmenden Durchblutung, welche sich klinisch ab einer angiographisch sichtbaren Einengung von ca. 75% als stabile Angina pectoris äußert. Die den arteriosklerotischen Plaque bedeckende fibrotische Schicht kann andererseits aufplatzen und über eine Aggregation von Thrombozyten bei Kontakt mit dem hoch

gerinnungsaktiven Plaquematerial und eine sekundäre Gerinnungsaktivierung dann zu einem rasch progredienten teilweisen oder völligen Verschluss des Gefäßes führen (Falk et al., 1995), ein Ereignis welches klinisch am Herzen als akute Myokardischämie mit den verschiedenen Manifestationen des akuten Koronarsyndromes (instabile Angina, NSTEMI oder STEMI) imponiert.

Als früheste Manifestationen finden sich diese Ablagerungen von Lipiden und Makrophagen bereits in frühester Jugend und Kindesalter als sogenannte „fatty streaks“ (Stary et al., 1994). Bei entsprechender Behandlung der ursächlichen Faktoren bzw. Eliminierung der auslösenden Noxe ist eine Rückbildung der Läsionen in gewissem Ausmaß möglich.

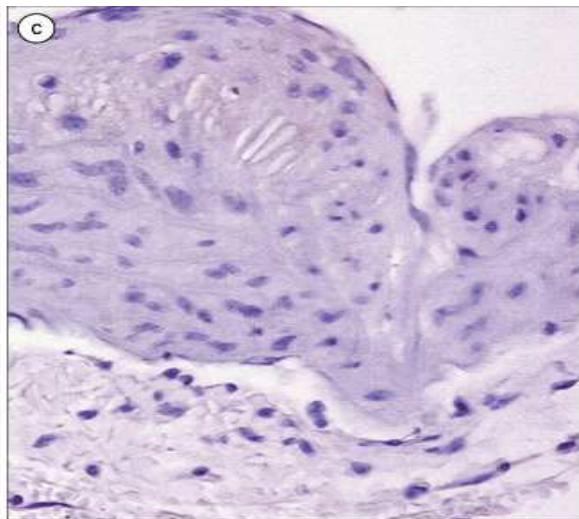
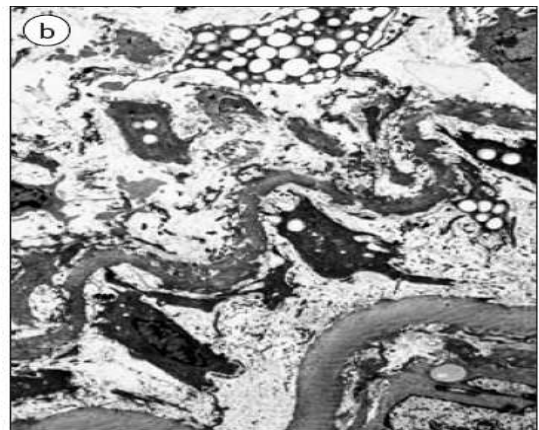
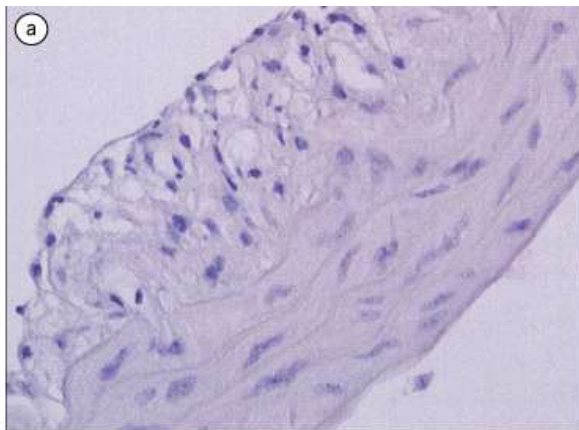


Abb. 3: Stadien der Atherosklerose (Hansson und Nilsson, 2003).

- a. Histologischer Schnitt einer Gefäßwand im Frühstadium der Atherosklerose: „fatty streak“ mit Lipid-gefüllten Makrophagen.
- b. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Lipiden gefüllten Makrophagen.
- c. Fibröse Kappe.

2.4. Endotheliale Dysfunktion

Der Begriff der Endotheldysfunktion umfasst mehrere Phänomene, wird aber in der klinischen Literatur im engeren Sinne vor allem über eine experimentellen Messungen gut zugängliche Störung der Vasomotorik definiert. Hierbei wird die Endotheldysfunktion als verminderte Aktivität oder auch (Bio-)Verfügbarkeit von NO bezeichnet. Generell ist die Endotheldysfunktion natürlich nicht nur auf eine Störung der Vasomotorik beschränkt, sie betrifft auch andere Funktionen des Endothels wie z. B. die Regulation der Adhäsion (Kubes et al., 1991; Tsao et al., 1996; Theilmeier et al., 1997) und Migration der Leukozyten (Boring et al., 1998; Zeiher et al., 1995; Tsao et al., 1997), eine Störung der Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten (de Graaf et al., 1992; Tsao et al., 1994; Wolf et al., 1997; Diodati et al., 1998) sowie eine Wirkung auf die Proliferation der glatten Muskulatur (Von der Leyen et al., 1995; Boeger et al., 1998) als wichtige proatherogene Effekte. Die klinisch messbare Störung der endothelabhängigen Vasodilatation wird hierbei lediglich als Indikator für eine generelle Schädigung der Endothelfunktion gesehen.

Bereits vor Entstehung hämodynamisch relevanter und somit angiographisch nachweisbarer Einengungen von arteriellen Gefäßen in Form der atherosklerotischen Plaques ist eine Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation nachweisbar (Werns et al., 1989).

Alle bedeutsamen kardiovaskulären Risikofaktoren führen zu einer Endotheldysfunktion, so auch Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Rauchen (Creager et al., 1990; Panza et al., 1990; Calver et al., 1992; Zeiher et al., 1995). Insbesondere ist die Endotheldysfunktion jedoch bei manifester Atherosklerose nachzuweisen, in peripheren, koronaren und zerebralen Gefäßen (Landmesser et al., 2001; Vita et al., 2002). Im Einklang mit der fundamentalen Bedeutung der gestörten Endothelfunktion für die Pathogenese der Atherosklerose zeigten mehrere klinische Studien, dass eine ausgeprägte Störung der Endothelfunktion in koronaren Gefäßen ohne signifikante Stenosen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (Myokardinfarkt, Schlaganfall und Tod) einhergeht (Al Suwaidi et al., 2000; Schächinger et al., 1999). Weiterhin ließ sich der beschriebene Zusammenhang nicht nur für die gestörte koronare Endothelfunktion darstellen, es zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen kardiovaskulärem Risiko und Ausmaß einer endothelialen Dysfunktion der peripheren Gefäße (Anderson et al., 1995; Neunteufl et al., 2000).

Die endotheliale Dysfunktion ist insgesamt nicht als Epiphänomen im Rahmen der Atherosklerose zu werten (Vita et al., 2002), sie muss einerseits als frühe und eventuell reversible Manifestation der Atherosklerose im Sinne einer funktionellen Schädigung gesehen werden, sie ist unter anderem bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie schon im Kindesalter nachweisbar (Sorensen et al., 1994), bleibt aber auch mit zunehmender Progression der Atherosklerose manifest und mit der Prognose der Patienten eng korreliert (Heitzer et al., 2001).

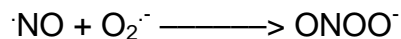
2.4.1. Reduzierte Bioverfügbarkeit von NO

Verschiedene Faktoren kommen als Ursache für die unter bestimmten Bedingungen gefundenen reduzierten Spiegel von NO in Betracht: einerseits eine reduzierte Produktion von NO, andererseits ein erhöhter Abbau durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS = „reactive oxygen species“). Eine Reduktion der Produktion von NO ist prinzipiell durch verschiedene Mechanismen denkbar – reduzierte Expression der endothelialen NO-Synthase, Mangel an Substraten oder Cofaktoren oder auch Veränderungen in der Signaltransduktion, mit der Folge einer mangelnden Aktivierung der eNOS trotz physiologischer oder supraphysiologischer Spiegel von NO. Einige dieser Faktoren konnten bei den verschiedenen Krankheitsprozessen mit Endotheldysfunktion nachgewiesen werden, so konnte durch Supplementierung von L-Arginin als Präkursor des NO eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit Hypercholesterinämie erreicht werden (Drexler et al. 1991; Creager et al., 1992; Clarkson et al., 1996) und durch Gabe von Tetrahydrobiopterin (einem Kofaktor der NO-Synthese) verbesserte sich die periphere Endothelfunktion von Rauchern (Heitzer et al., 2000a) und Patienten mit Diabetes mellitus (Heitzer et al., 2000b). In den meisten Fällen fand sich jedoch eine gesteigerte Produktion von NO, erklärt werden kann der absolute Mangel von Stickstoffmonoxid bei erhöhter Syntheserate durch einen ebenfalls deutlich gesteigerten Abbau, welcher die Produktion noch überkompensiert (Bouloumie et al., 1997).

2.4.2. Verbrauch von NO

Trotz der unter inflammatorischen Bedingungen damit a priori *erhöhten* ·NO-Synthese sind akute wie chronisch vaskuläre Entzündungszustände charakterisiert durch *verminderte* ·NO-Bioverfügbarkeit mit in der Folge verminderter vaskulärer Relaxation, erhöhter thrombozytärer Aggregation sowie vermehrter Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle (Moncada und Higgs, 1993). Die zumindest partielle Reversibilität dieser Prozesse durch NO-Donatoren unterstützt das pathophysiologische Konzept der verminderten vaskulären Bioverfügbarkeit von ·NO (von der Leyen et al., 1995; Channon et al., 1998; von der Leyen und Dzau, 2000).

Für die Erklärung der Diskrepanz zwischen erhaltener bzw. erhöhter ·NO-Synthese und verminderter ·NO-Bioverfügbarkeit ist die ungewöhnliche Reaktivität des ·NO Radikals entscheidend: Zum einen hat ·NO die für ein freies Radikal ungewöhnlich lange Halbwertszeit von mehreren Sekunden (Lancaster, 1994), zum anderen reagiert ·NO nur mit wenigen anderen Radikalen und in Abhängigkeit seiner Lokalisation im Gefäß (Thomas et al., 2001). Zu den bisher am besten charakterisierten Reaktionen zählt die Reaktion von ·NO mit Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), dessen Geschwindigkeit nur diffusionslimitiert ist ($k=6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und zur Generation des toxischen Oxidanz Peroxynitrit ($^{\cdot}\text{ONOO}$) führt (Beckman und Koppenol, 1995).



2.4.3. Produktion von ROS

In Säugetierzellen sind als potenzielle Quellen für die Bildung von ROS verschiedene Enzymsysteme denkbar. Möglich wären die mitochondriale Atmungskette, die Enzyme Lipoxigenase und Cyclooxygenase aus dem Arachidonsäure-Metabolismus, Cytochrom p450, Xanthinoxidase, verschiedene NAD(P)H-Oxidase (unter anderem im Endothel selbst als auch in Leukozyten), die NO-Synthasen selber und einige andere Hämoproteine. Im Falle der kardiovaskulären Erkrankungen wurde eine Beteiligung vor allem für drei der genannten Enzyme gezeigt: die NADH/NADPH-Oxidase, die NO-Synthase und die Xanthinoxidase.

Die NADH/NADPH-Oxidase ist ein in Leukozyten lokalisiertes Enzym, welches unter Verbrauch von NAD(P)H Superoxid-Radikale bildet, und somit wiederum zu einem vermehrten Abbau von NO führt. In der Gefäßwand von Patienten mit koronarer Herzerkrankung, aber nicht bei Gesunden können vermehrt Granulozyten mit p91-Expression (eine Untereinheit der NADPH-Oxidase) mittels Fluoreszenz-Markierung lokalisiert werden, ebenso konnte eine Expression eines homologen Enzyms (gp91phox) in vaskulären Endothelzellen gezeigt werden (Griendling et al., 2000). Es gibt mehrere Hinweise für eine klinische Bedeutung dieses Enzymes in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, in einem knock-out-Maus-Modell der Atherosklerose mit Defizienz einer Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase war die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen um den Faktor 5 reduziert (Barry-Lane et al., 2001), ebenso konnte eine Beteiligung des Enzymes in Frühstadien der Atherosklerose bei Patienten gezeigt werden (Warnholtz et al., 1999). Bei Patienten mit Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie konnte eine deutlich erhöhte NADH-abhängige Superoxidproduktion nachgewiesen werden (Guzik et al, 2000).

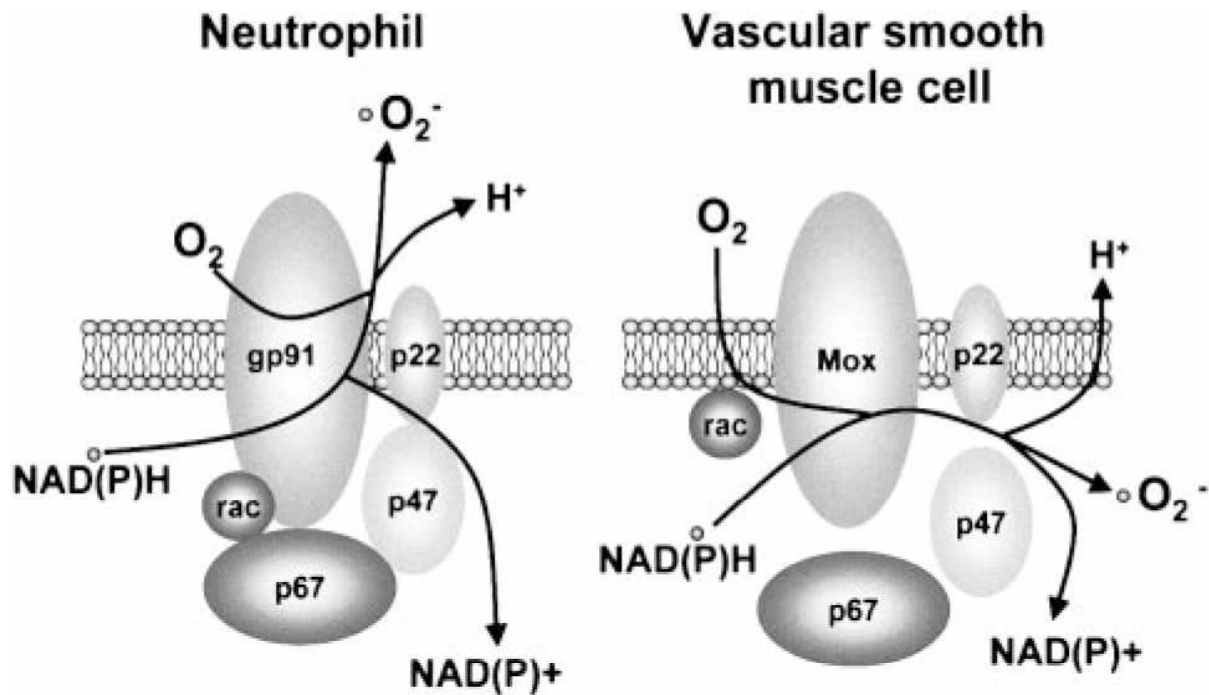


Abb. 4: Homologe Enzymsysteme der NAD(P)H-Oxidase in Neutrophilen und glatten Muskelzellen der Gefäßmuskulatur.

Ein weiteres Enzymsystem scheint die endotheliale NO-Synthase selbst zu sein. Unter bestimmten Bedingungen, insbesondere in Abwesenheit von L-Arginin - als Präkursor von NO (Vasquez-Vivar et al., 1998) und Tetrahydrobiopterin - als Co-Faktor in der Synthese (Tiefenbacher et al., 2000) kann die NO-Synthase selbst Superoxid und H₂O₂ produzieren (Alp und Channon, 2004). Dieses Phänomen wird als Entkoppelung (uncoupling) bezeichnet. Im Tiermodell kann eine Rolle der NOS-abhängigen Superoxid-Produktion bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen bzw. deren Risikofaktoren definiert werden, so ist bei spontanhypertensiven Ratten (SHR) in der Aorta die Superoxid-Produktion erhöht, und diese kann entweder durch Entfernung des Endothels oder durch Infusion von L-NAME (einem Inhibitor der NO-Synthase) normalisiert werden (Kerr et al., 1999). Bei chronischen Rauchern kann durch intraarterielle Infusion von Tetrahydrobiopterin die endothelabhängige Vasodilatation verbessert werden, hier scheint der Mangel an BH4 zu einer Entkoppelung der NOS zu führen (Heitzer et al., 2000).

2.5. Xanthinoxidase

Eine entscheidende Quelle vaskulärer Superoxidproduktion ist die Xanthinoxidoreductase (XOR). Strukturell ist die Xanthinoxidoreductase ein Molybdoenzym, d. h. im aktiven Zentrum des Enzyms ist ein Molybdopterin lokalisiert, d. h. ein Molybdän-Atom gebunden an eine Pteringruppe (Hille und Nishino, 1995).

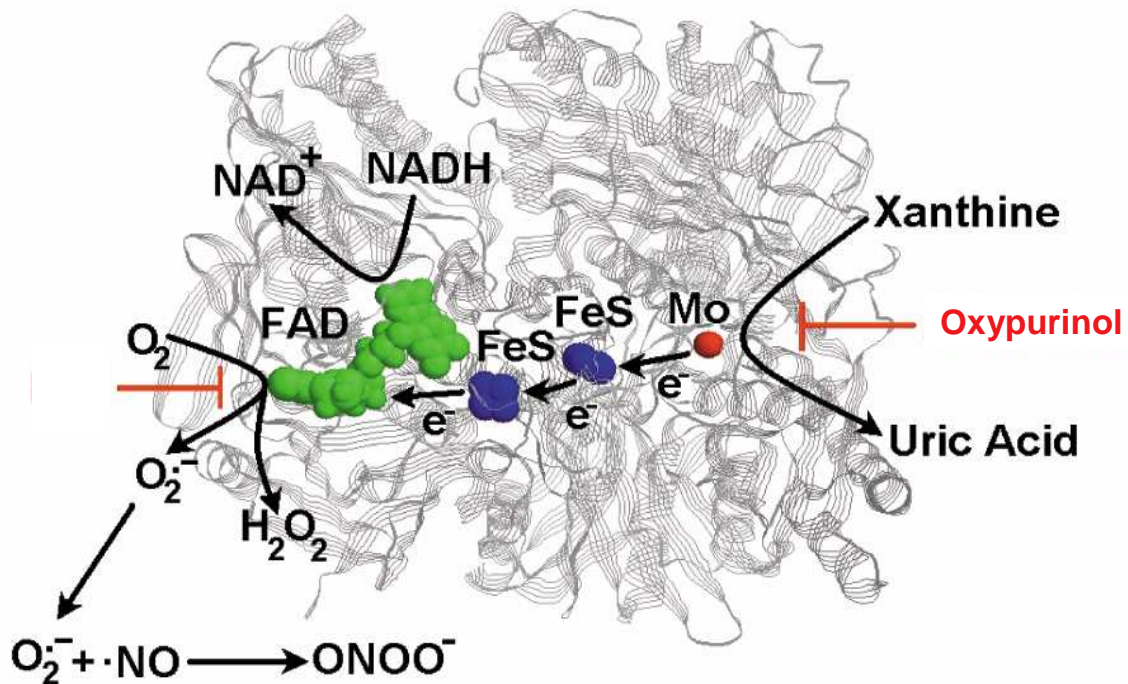


Abb. 5: Struktur der Xanthinoxidase (n. Hille und Nishino, 1995).

Die Xanthinoxidoreductase liegt in 2 Isoformen vor, das Verhältnis der beiden Isoformen variiert je nach herrschenden Bedingungen (Stirpe und Della Corte, 1969). Die Expression der XOR wird auf mehreren Ebenen reguliert, vor allem auf der transkriptionellen Ebene, hier wirken als positive Regulatoren insbesondere inflammatorische Reize, wie z. B. verschiedene Mediatoren der Entzündungskaskade, z. B. Lipopolysaccharide, Interleukin-1 und -6, Interferon- γ und TNF- α (Pfeffer et al., 1994), aber auch eine Hypoxie können die Transkription induzieren (Terada et al., 1997). Primär wird auf diese Reize hin die Xanthindehydrogenase gebildet. Unter bestimmten physiologischen als auch pathologischen Bedingungen werden jedoch variable Mengen der XDH zu Xanthinoxidase modifiziert. In einer physiologischen Umgebung liegt der größte Teil der Xanthinoxidoreductase in der XDH-Form vor, nach Einwirkung der o. g.

inflammatorischen Reize oder auch durch eine Hypoxie wird die XDH-Form durch limitierte Proteolyse irreversibel zur Xanthinoxidase konvertiert (Poss et al., 1996), die Aktivität der XO wird jedoch zusätzlich durch eine ebenfalls zytokin- und hypoxie-induzierte Phosphorylierung moduliert (Della Corte et al., 1969). Unter experimentellen Bedingungen kann eine reversible Umwandlung durch Oxidation bestimmter Thiolgruppen mittels Sulfhydryl-Reagenzien stattfinden (Waud und Rajagopalan, 1976), die limitierte Proteolyse kann in vitro durch Zugabe von Trypsin oder Chymotrypsin und weiterer Proteasen vonstattengehen (Amaya et al., 1990).

Die Xanthinoxidoreductase reagiert mit mehreren Substraten, unter anderem Purinen, Purin-Ribonucleosiden und 2'-Desoxyribonucleosiden (Krenitsky et al., 1974), vor allem aber ist es ein essentielles Enzym des Nucleinsäurekatabolismus, und katalysiert hier den Abbau von Hypoxanthin zu Xanthin sowie von Xanthin zu Urat (Parks und Granger, 1986). Bei niederen Säugetieren wird Urat dann von der Uratoxidase zu Allantoin umgesetzt, beim Menschen ist dieses Enzym jedoch inaktiviert, Urat somit Endprodukt des Purinstoffwechsels (Usuda et al., 1988). Bei der Konversion von Hypoxanthin zu Xanthin und der Oxidierung von Xanthin zu Urat entsteht als Nebenprodukt H_2O_2 und Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) (Houston et al., 1999).

Die beiden Isoformen der XOR unterscheiden sich in ihrer Kinetik und Substratspezifität. Die Xanthindehydrogenase benötigt NAD^+ als Akzeptor für die Elektronen der Redox-Reaktion, hierbei entsteht $NADH$ als stabiles Endprodukt, wohingegen die Xanthinoxidase NAD^+ nicht als Akzeptor zu nutzen vermag. Ihr dient molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor, in der Folge entsteht Superoxid (Saito und Nishino, 1989).

Gesichert ist, dass die Xanthinoxidase unter hypoxischen oder ischämischen Bedingungen Superoxid produziert (Brown et al., 1988).

2.5.1. Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisierung

Die Gewebeverteilung mit verschiedenen Methoden bestimmt werden, welche jeweils zu verschiedenen Ergebnissen führen: Über Antikörperabhängige Methoden wie z. B. die Immunhistochemie lassen sich aktive und inaktive Formend des Enzyms im intakten Gewebe nachweisen, während biochemische Methoden über einen Nachweis der Enzymaktivität in Gewebehomogenaten wirken. Diese unterschiedlichen Mechanismen haben vor allem eine Bedeutung in menschlichen Geweben, da ein großer Teil der Enzymmengen von XOR inaktiv sind (Abadeh et al., 1992).

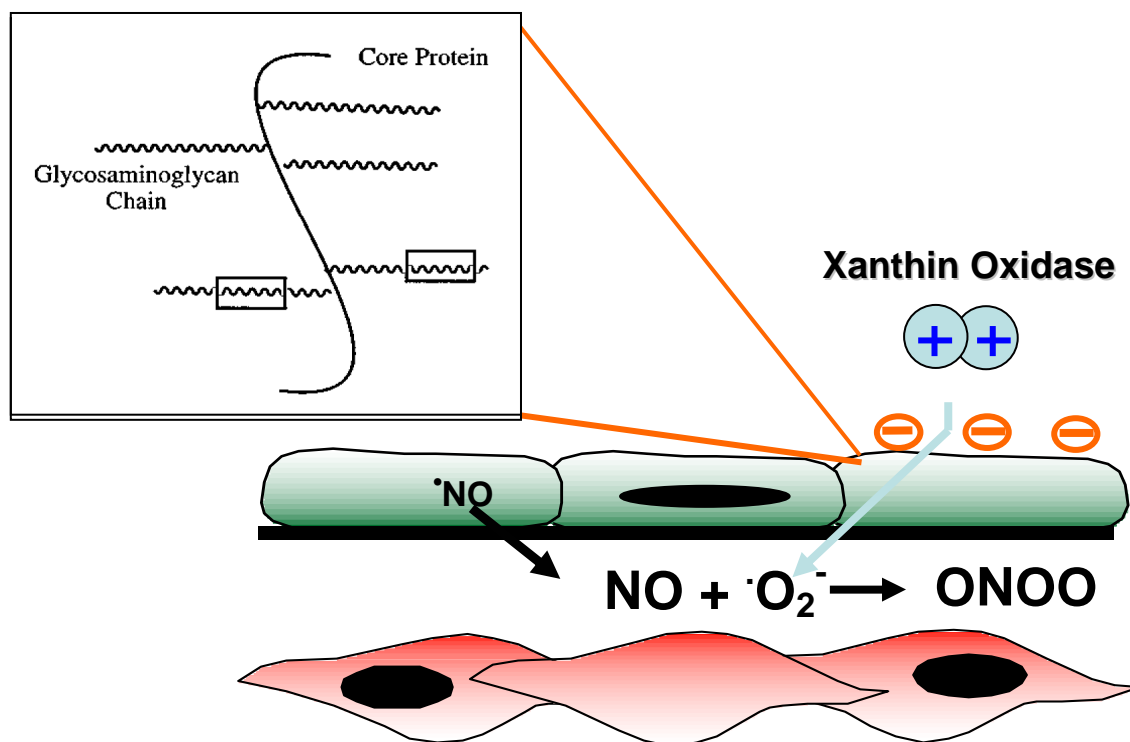


Abb. 6: Unspezifische Bindung der Xanthinoxidase an Endothelzellen über Proteoglykane.

Ein großer Teil der Xanthinoxidase wird bei Menschen in der Leber synthetisiert (Parks und Granger, 1986; Linder et al., 1999), von dort in die Zirkulation abgegeben und bindet dann an Endothelzellen, darüber hinaus zeigen Endothelzellen aber auch endogene XO Aktivität (Jarasch et al., 1981; Jarasch et al., 1986). Vermehrte XO Immunreaktivität fand sich im Bereich des koronararteriellen Endothels von Pat. mit koronarer Herzkrankheit (Spiekermann, 2003).

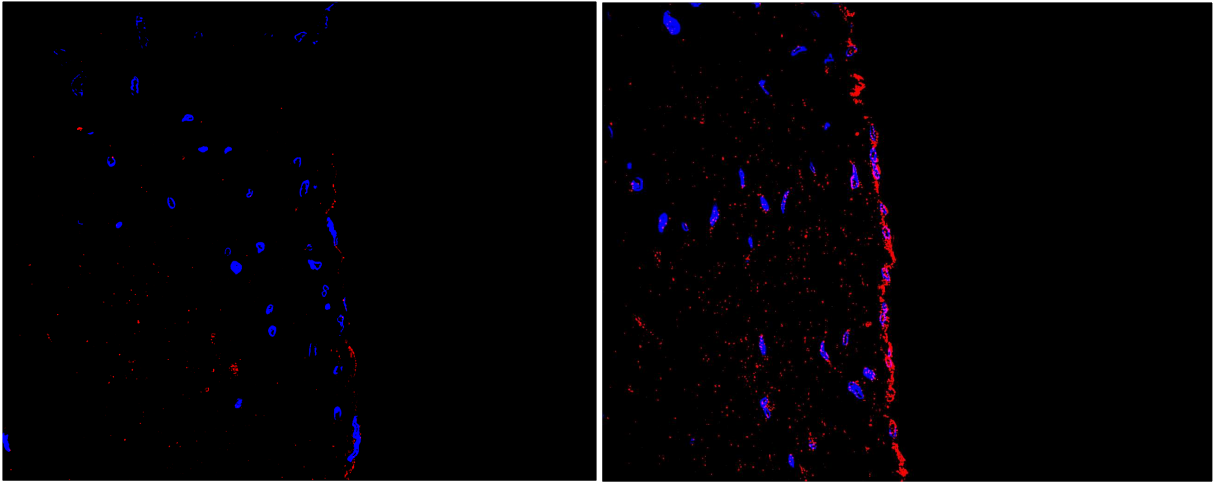


Abb. 7: Immunfluoreszenznachweis von Xanthinoxidase auf Endothelzellen von Patienten mit koronarer Herzerkrankung.

2.5.2. Hemmung der Xanthinoxidase

Xanthinoxidase kann durch Gabe von Purin-Analoga inhibiert werden. Seit den 60er Jahren ist Allopurinol als Inhibitor der Xanthinoxidase Standardtherapie bei der Behandlung der Gicht durch Reduktion des Endproduktes des Purinsäurestoffwechsels Harnsäure. Allopurinol ist ein strukturelles Analogon von Hypoxanthin. Nach enteraler Aufnahme wird Allopurinol durch die Xanthinoxidoreductase selbst oxidiert zu seinem primären Metaboliten Alloxanthin/Oxypurinol. Oxypurinol bindet direkt an das Molybdän-Atom im reaktiven Zentrum des Enzymes und inhibiert so die weiteren Reaktionen des Enzyms mit anderen Substraten. Während Allopurinol bei unmittelbarer glomerulärer Filtration eine Plasmahalbwertszeit von nicht mehr als 2-3 Stunden hat, findet sich bei Oxypurinol aufgrund ausgeprägter tubulärer Reabsorption eine Halbwertszeit von 18 bis 30 Stunden, durchschnittlich ca. 28 Stunden (Cameron und Simmonds, 1987).

2.5.3. Die Rolle der Xanthinoxidase bei kardiovaskulären Erkrankungen

Zunächst konnte in Tierversuchen eine Beteiligung der Xanthinoxidase an Störungen der Endothelfunktion gezeigt werden, so konnte durch Gabe von Allopurinol bei Hunden die Dysfunktion der koronaren Endothelien nach experimentellem Myokardinfarkt und anschließender Reperfusion verhindert werden (Sobey et al., 1992) und die Hemmung der Xanthinoxidase durch Oxypurinol verbesserte die Endothelfunktion von Kaninchen mit Hypercholesterinämie (Ohara et al., 1993, White et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Xanthinoxidase die Vasodilatation über eine Hemmung der NO-abhängigen cGMP-Bildung in den glatten Muskelzellen beeinträchtigt (Houston et al., 1997).

Die tierexperimentellen Befunde konnten auch in einer Reihe von klinischen Studien am Menschen bestätigt werden, so erhöht Allopurinol den NO-abhängigen Blutfluß bei Rauchern (Guthikonda et al., 2003). Allopurinolgabe verbesserte die acetylcholinabhängige Relaxation im Unterarm bei Pat. mit Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie (Butler et al., 2000). Hierzu wurden Diabetiker mit arterieller Hypertonie über einen Monat mit Allopurinol p. o. behandelt und der Vorderarmfluss in Abhängigkeit von endothelabhängigen Vasodilatoren bestimmt, Allopurinol verbesserte bei diesen Patienten die Endothelfunktion um 30% auf das Niveau gesunder Probanden.

In einer anderen Arbeit wurde der Akuteffekt von Oxypurinol auf den Unterarmblutfluß von Pat. mit Hyperlipoproteinämie untersucht (Cardillo et al., 1997). Während die Gabe von Oxypurinol keinen Effekt auf den Unterarmblutfluß bei Kontrollprobanden hatte, zeigten Pat. mit Hypercholesterinämie nach Oxypurinolinfusion eine signifikante Verbesserung der endothelabhängigen Relaxation auf Azetylcholin.

Weiterhin wurden auch Untersuchungen zu potentiell kardioprotektiven Effekten von Allopurinol durchgeführt: In einer Studie, die Pat. vor aortokoronarer Bypassoperation einschloss (Castelli et al., 1995), zeigten mit Allopurinol behandelte Patienten eine bessere Erholung der Herzminutenvolumens bei erniedrigter XO Aktivität im Serum. Der Mechanismus dieses protektiven Effektes der Inhibition der Xanthinoxidase bleibt jedoch unklar, am ehesten spielt hierbei die Inhibition eines lokalen gewebständigen Stickstoffmonoxid-Signalsystems eine Rolle, welches die Kontraktilität des Herzmuskels kontrolliert (Balligand et al., 1993; Ingwall et al., 1998).

In diesem Zusammenhang mehren sich Hinweise über eine Rolle der endothelialen Dysfunktion bei chronischer Herzinsuffizienz: auch hier scheint die Xanthinoxidase einen erheblichen Anteil an der pathologisch gestörten Endothelfunktion zu haben, die Hemmung der Xanthinoxidase mit Allopurinol führte zu einer deutlichen Verbesserung in diesem Patientenkollektiv (Farquarson et al., 2002).

2.6. Klinische Evidenz für die Endothelfunktion

Zur Bestimmung der Endothelfunktion als klinischer Parameter haben sich verschiedene invasive und nichtinvasive Techniken durchgesetzt. Eine Möglichkeit ist die Stimulation des Endothels mit Acetylcholin. Die Reaktion des Gefäßes kann durch verschiedene Methoden bestimmt werden, einerseits z. B. durch Vermessung der Gefäßweiten (mean luminal diameter), im Falle der Koronarien mittels quantitativer Koronarangiographie (QCA) (Ludmer et al, 1986). Eine weitere Methode ist die invasive Messung der Flussreserve, das bedeutet die Veränderung des Blutflusses unter verschiedenen Bedingungen mittels eines in der Koronararterie platzierten Dopplerdrahtes (Wilson et al., 1985).

Eine nichtinvasive Methode ist die Bestimmung der flußabhängigen Dilatation der Unterarmarterien, hier wird mittels Dopplersonographie die Weite eines peripheren Gefäßes vor und nach Stopp der Durchblutung mittels Kompression der zuführenden Gefäße gemessen (Celermajer et al., 1992).

2.7. Koronare Gefäßversorgung und myokardiale Durchblutung

Die koronare Zirkulation nimmt im Organismus eine Sonderstellung ein, da sie das Herz als zentralem Teil des Kreislaufs perfundiert. In der Koronarzirkulation herrschen einige besondere Verhältnisse: das linksventrikuläre Myokard extrahiert normalerweise circa 75% des durch die Koronararterien transportierten Blutes, daraus resultiert eine koronarvenöse Sauerstoffpartialdruck von 18 mmHg. Daher bleibt nur eine geringe Möglichkeit die Sauerstoffextraktion zu steigern. Da myokardiale Muskelzellen nur eine begrenzte Möglichkeit der anaeroben Energiegewinnung haben, muß jeder Anstieg des Sauerstoffbedarfes mit einem Anstieg des Sauerstoffangebotes über eine Zunahme des koronaren Blutflusses einhergehen.

Eine Besonderheit des koronaren Gefäßsystems liegt in seiner Einbettung in den Herzmuskel. Dadurch unterliegt der Koronarfluß den phasischen linksventrikulären Druckschwankungen: in der Systole resultiert ein geringer und in der Diastole ein hoher Fluß. Der Gewebsdruck in den inneren Schichten des Myokards ist höher als der koronarvenöse Druck, das bedeutet das der Druckgradient für den subendokardialen Fluß dem koronararteriellen Druck minus dem linksventrikulären Druck entspricht. In der Systole sind der koronararterielle Druck und der linksventrikuläre Druck ungefähr gleich, es resultiert also kein Fluß. Während der Diastole nach Schluß der Aortenklappe ist der linksventrikuläre Druck niedrig und der Druckgradient führt zu einem hohen Koronarfluß (Suga, 1990).

Eine weitere Besonderheit der koronaren Zirkulation ist die lokale metabolische Kontrolle der Gewebsdurchblutung. Durch steigenden Sauerstoffbedarf werden Metabolite, wie zum Beispiel Adenosin freigesetzt, welche zu einer Zunahme des Koronarflusses führen (Yada et al., 1999). Koronare Endothelzellen können, wie in den vorigen Abschnitten beschrieben, als Antwort auf pulsatilen Shear-stress Stickstoffmonoxid produzieren. Dies führt wie in anderen Gefäßgebieten zu einer Vasodilatation, ein Mechanismus der insbesondere in den epikardialen koronaren Leitungsgefäßen ausgeprägt ist. Durch diesen Mechanismus führt stromabwärts gelegene arterioläre Vasodilatation zu einer stromaufwärts gelegenen arteriellen Dilatation. Der koronare Gesamtwiderstand wird entsprechend dem vorherrschenden metabolischen Bedarf auf Arteriolenenebene reguliert und der stromaufwärts gelegene Gefäßdurchmesser wird entsprechend des endothelialen Shear-stress angepasst.

2.8. Fragestellung der Arbeit

Unter Einbeziehung der oben genannten Prämissen wird die Hypothese geprüft, ob eine Hemmung der Xanthinoxidase die koronare und periphere Endothelfunktion bei Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung, erhaltener linksventrikulärer Funktion und Harnsäurespiegel im physiologischen Bereich zu einer Verbesserung der koronaren und peripheren Endothelfunktion führt.

Zu diesem Zweck wurde der Einfluß von Oxypurinol, einem Hemmstoff der Xanthinoxidase, auf den minimalen koronaren Lumendiameter (MLD) und den koronaren Blutfluss als Antwort auf eine Gabe von Acetylcholin sowie die flußabhängige Vasodilatation der Brachialarterie vor und nach intravenöser Infusion von Oxypurinol untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign

Die Studie wurde als prospektive offene Studie mit 20 Patienten angelegt. Im Rahmen des von der Ethik-Kommission der Hamburger Ärztekammer genehmigten Protokolles gaben alle Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung („informed consent“) in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki. Die Untersuchung wurde als offene prospektive nicht-randomisierte Studie angelegt, welche Patienten mit einer angiographisch gesicherten koronaren Herzerkrankung (definiert als Vorliegen generalisierter Wandveränderungen oder einer signifikanten Stenose in ein oder zwei Koronararterienästen mit geplanter PTCA, Stentimplantation oder anderer perkutaner Eingriffe) bei erhaltener linksventrikulärer systolischer Ruhefunktion einschloß, d. h. es musste bei den Patienten in einer diagnostischen Koronarangiographie, die zum Zeitpunkt des Studienbeginns nicht mehr als zwei Wochen zurückliegen sollte, ein Koronarbefund vorliegen, bei dem an wenigstens einem Gefäß eine PTCA, Stentimplantation oder ein anderer perkutaner Eingriff erforderlich ist. Die Messungen im Rahmen der Studie erfolgten dann nach stattgehabter Koronarintervention, um eine Behandlung auch bei Abbrüchen im Rahmen der Studie sicherzustellen. Alternativ konnten Patienten eingeschlossen werden, bei denen in einer diagnostischen Koronarangiographie eine koronare Herzkrankheit mit generalisierten Wandveränderungen nachgewiesen wurde. Die Patienten wurden vor Durchführung der Koronarangiographie über Bedeutung und Umfang der Studie aufgeklärt. Die Durchführung des Acetylcholin-Tests sowie die Infusion von Oxypurinol gemäß Studienprotokoll erfolgte dann innerhalb der gleichen Katheteruntersuchung. Vor der Messung wurden Serumproben aus einer peripheren Vene entnommen. Im Anschluss wurde Oxypurinol infundiert und die Relaxation der Arterie sowie die koronare Flussreserve auf Acetylcholin erneut bestimmt und abschließend erneut eine Serumprobe peripher venös entnommen.

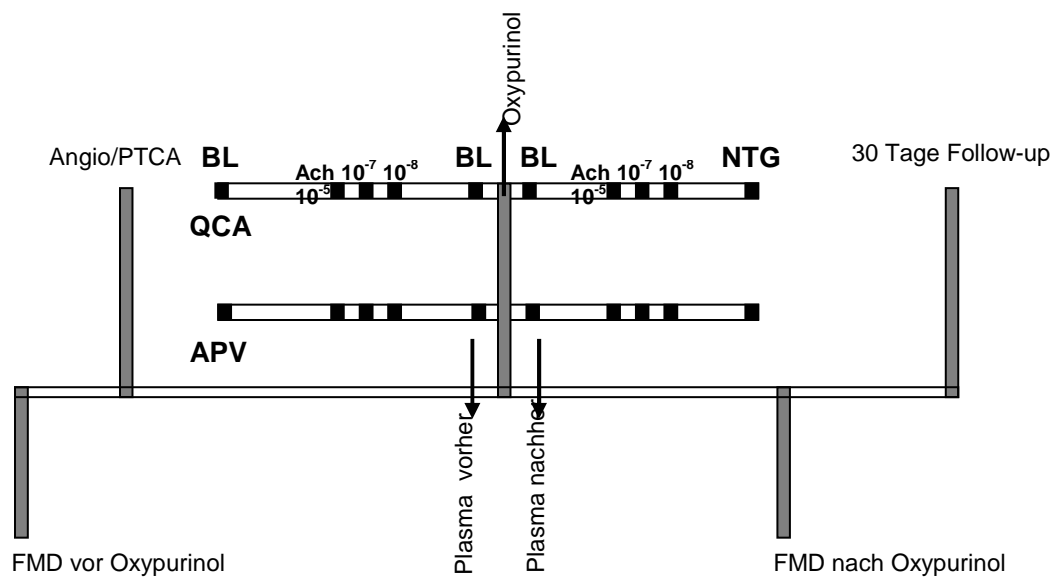


Abb. 8: Ablauf der Untersuchung.

3.2. Studienpopulation

Patienten beiderlei Geschlechtes, welche zur Aufnahme in die Klinik für Kardiologie des Herzzentrums des Universitätsklinikums Eppendorf kamen, wurden bezüglich der Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie überprüft. Die Patienten wurden vor der Studie über das Ausmaß und die Risiken der Untersuchung aufgeklärt, ein schriftliches Einverständnis lag vor. Durch den aufnehmenden Arzt erfolgte die Anamneseerhebung sowie eine internistische Untersuchung. Vor der Untersuchung und vor Entlassung wurde ein Ruhe-EKG sowie Blut für eine Routinelaboranalyse abgenommen (Kreatinin, Harnstoff, Kalium werden vor der Intervention und bei Entlassung bestimmt. C-reaktives Protein, Glucose, Harnsäure, Folsäure, Cholesterin gesamt, HDL-Cholesterin, Triglyceride werden bei Besuch 1 und 5 bestimmt. LDL- Cholesterin wird durch die Friedewald-Formel errechnet ($\text{LDL-Konzentration} = \text{Cholesterin gesamt} - (\text{HDL} + \text{Triglyceride} / 5)$)).

3.2.1. Einschlusskriterien

Angiographisch dokumentierte koronare Herzerkrankung mit

- a) generalisierten Wandveränderungen (Stenosen <40%) und/ oder
- b) dem Vorliegen einer signifikanten Läsion mit Indikation zur perkutanen Koronarintervention in einem oder zwei Koronararterienästen.

Vorliegen einer angiographisch nicht verschlossenen Koronararterie mit minimalen Läsionen (Stenosen <40%). Es muss sich bei dieser Arterie (=Zielarterie) um einen Ast der linken Koronararterie handeln.

Die Patienten mussten über 18 Jahre alt sein, das schriftliche Einverständnis der Patienten für die Teilnahme an der Studie mußte vorliegen.

3.2.2. Ausschlusskriterien

In Bezug auf die medizinische Vorgeschichte:

- Myokardinfarkt innerhalb zwei Wochen vor der Studie
- (Ausnahme: Patienten mit einem Non-Q-Wave-Infarkt können nach Ermessen des Untersuchenden eingeschlossen werden).
- Instabile Angina pectoris, es sei denn, die zugrundeliegenden Läsionen sind durch den aktuellen Eingriff stabilisiert worden.

- aortokoronare Bypassoperation innerhalb von 4 Wochen vor Studieneintritt
- Schlaganfall oder periphere Revaskularisierung innerhalb 12 Wochen vor der Studie.
- Hyperurikämie (Harnsäure >7,3 mg/dl)
- Bekannte Intoleranz gegenüber Oxypurinol bzw. Allopurinol
- Chronische Lebererkrankung
- Klinisch signifikante Herzklappenerkrankung.
- Hypertroph obstruktive Kardiomyopathie
- Anhaltende ventrikuläre Arrhythmien
- Synkope innerhalb von vier Wochen vor der Studie
- Schwere Atemwegserkrankung
- Bekannte Hypothyreose
- Bekannte Hyperthyreose
- Kontrastmittelallergie
- Das Vorliegen einer weiteren die Lebenserwartung einschränkenden Erkrankung (die koronare Herzerkrankung ausgeschlossen).
- Organtransplantation in der Vorgeschichte

In Bezug auf aktuell eingenommene Medikamente:

- Einnahme von Allopurinol-Präparaten in den letzten 2 Wochen vor Studieneinschluss
- Intravenöse Heparinisierung innerhalb der letzten 24h vor Einschluss

In Bezug auf aktuelle Symptome oder Befunde:

- Klinisch signifikante Herzinsuffizienz, basierend auf dem Vorhandensein einer Auswurffraktion des linken Ventrikels von <40% (gemessen mit LV-Angiographie oder Echokardiographie).
- Symptome von orthostatischer Hypotonie oder einem systolischen Blutdruck in der Rückenlage von < 80 mmHg.
- Systolischer Blutdruck > 200 mmHg und/oder diastolischer Blutdruck > 115 mm Hg trotz blutdrucksenkender Therapie.

- Nierenschädigung mit Serumkreatininspiegeln von $>1,2$ mg/dl, oder bekanntes nephrotisches Syndrom.
- ALAT (Alaninaminotransferase) oder ASAT (Aspartataminotransferase) $>1,5$ mal über dem oberen Normalwert.

Verschiedenes:

- Bei Frauen: Schwangerschaft, Stillen oder Schwangerschaftsrisiko (zeugungsfähige Frauen, die eine akzeptable Verhütungsmethode anwenden, können eingeschlossen werden).
- Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Studie.
- Therapie mit einem sich in der Untersuchungsphase befindlichen Produkt in einem Zeitraum von 30 Tagen vor der Studie.

3.2.3. Beobachtungszeitraum

Die Überprüfung der Patienten auf Eignung für den Einschluss in die Studie erfolgte in einem Zeitraum bis zu 14 Tagen vor der geplanten Intervention. Dieses galt insbesondere für die diagnostische Koronarangiographie. Das Screening konnte jedoch auch am gleichen Tag erfolgen.

Während der Behandlungsphase im Herzkatheterlabor und in den ersten 24 Stunden nach Oxypurinol-Infusion erfolgte eine enge Überwachung jedes Patienten.

Alle Patienten, die zu irgendeinem Zeitpunkt ein Studienmedikament eingenommen hatten, mußten für einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen nachbeobachtet werden. Die Nachkontrolle erfolgte durch eine Wiedervorstellung in der Ambulanz der Klinik für Kardiologie und Angiologie oder durch eine telefonische Kontaktaufnahme. Patienten mit unerwünschten Ereignissen und/oder unerwünschten Medikamentenwirkungen wurden in kurzfristigeren Abständen nach Maßgabe des Studienleiters nachbeobachtet.

3.3. Studienmedikation

Oxypurinol wurde durch die Apotheke des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf für die i. v. - Administration zubereitet.

Die Prüfsubstanz Oxypurinol wurde in Containern verpackt und zur Infusion in 5% Dextrose aufgelöst und mit Natriumhydroxid auf einen pH von 9.7 gebracht.

3.4. Herzkatheteruntersuchung

Bei der diagnostischen Linksherzkatheteruntersuchung in der Technik nach Judkins wird die Arteria femoralis unterhalb des Leistenbandes nach lokaler Anästhesie punktiert. Mittels Seldinger-Technik wird eine Schleuse in die Arterie eingebracht, über diese wiederum dann der Führungskatheter mit einliegendem Führungsdraht. Unter Durchleuchtung wird nun der Katheter bis in die Aortenwurzel vorgeschoben. Unter Zuhilfenahme verschiedenster unterschiedlich geformter Katheter können hier nun mehrere Untersuchungen durchgeführt werden, unter anderem die Darstellung des linken Ventrikels (Laevokardiographie), die angiographische Darstellung der Koronarien mittels Kontrastinjektion, bzw. hiervon ausgehend auch ggf. eine perkutane Intervention der Koronarien sowie die intrakoronaren Flußmessungen.

Nach Injektion eines Kontrastmittels können Serien von Röntgenaufnahmen in verschiedenen Projektionen angefertigt werden. Das Bildmaterial wird nun digital aufgezeichnet und anschließend im DICOM-Format auf einer CD zur weiteren Bildverarbeitung abgespeichert.

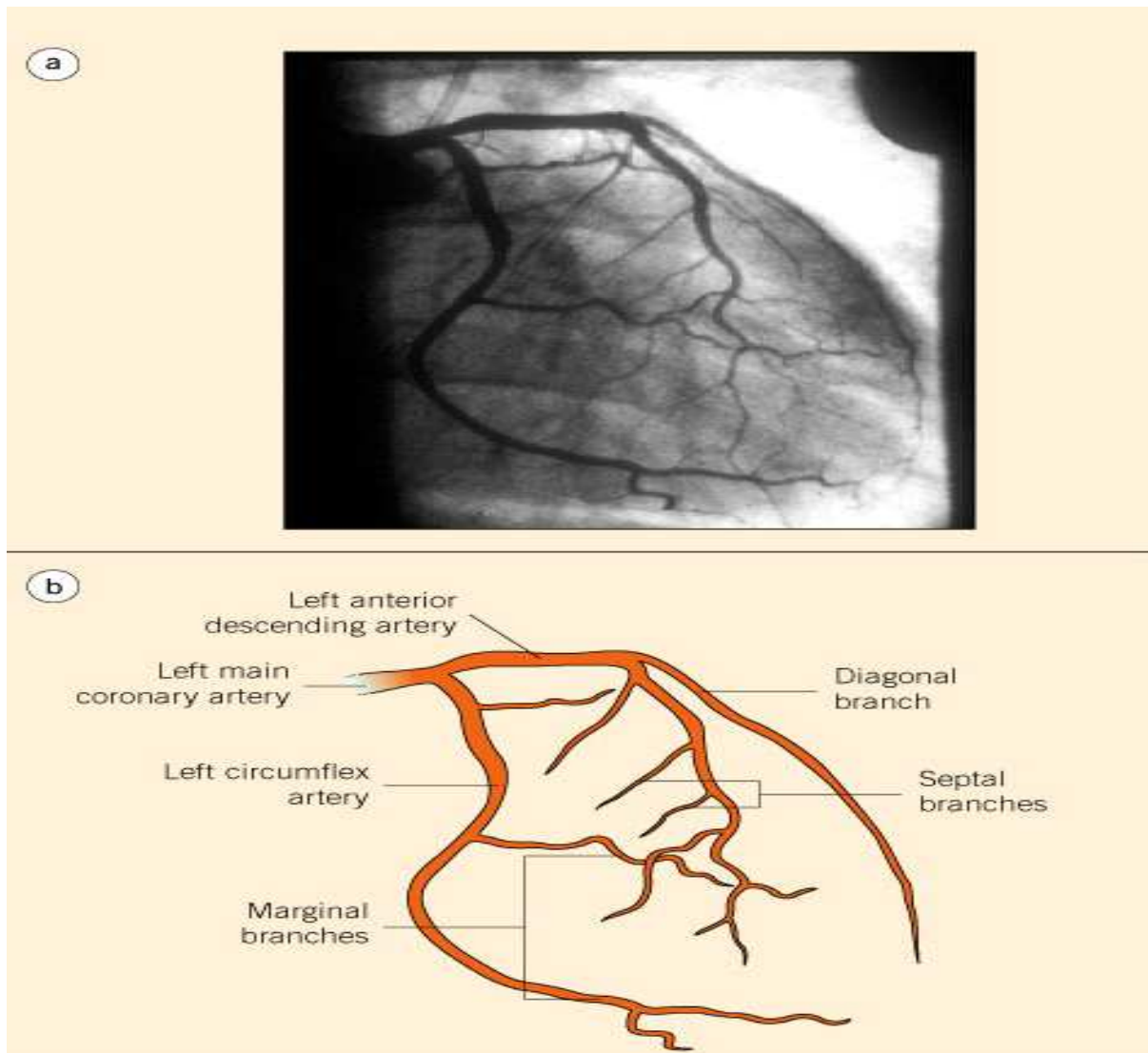


Abbildung 9:

a: Angiogramm der linken Koronararterie (LCA = left coronary artery).

b. Schema der linken Koronararterie mit ihren Ästen (*Left main coronary artery* = Hauptstamm der linken Koronararterie. *Left anterior descending* = Ramus interventricularis anterior. *Diagonal branch* = Ramus diagonalis. *Septal brach* = Ramus septalis. *Left circumflex artery* = Ramus circumflexus. *Marginal branch* = Ramus marginalis) (Kussmaul, 2003).

3.4.1. Laevokardiographie

Zur Darstellung des linken Ventrikels wird ein spezieller, mit seitlichen Öffnungen versehender sogenannter Pigtail-Katheter über die Aortenklappe bis in die Spitze des linken Ventrikels eingebracht. Nach Registrierung der linksventrikulären Druckkurve und Bestimmung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes wird nun über ein Injektionssystem rasch eine größere Menge Kontrastmittel in das Kavum des linken Ventrikels eingebracht. Nach Aufnahme einer mehrere Herzzyklen dauernden Serie von Bildern wird über digitale Vermessung der Ventrikelkonturen das linksventrikuläre endsystolische Volumen (ESV) und das enddiastolische Volumen (EDV) ermittelt. Hierbei wird der linke Ventrikel als halbkegelförmig angenommen, eine Berechnung des Volumens ist dann über die Beziehung

$$V = 1/6 * \pi * D^2 * L.$$

Aus dem Verhältnis von EDV und ESV ergibt sich die prozentuale Ejektionsfraktion.

$$EF = (EDV/ESV) * 100$$

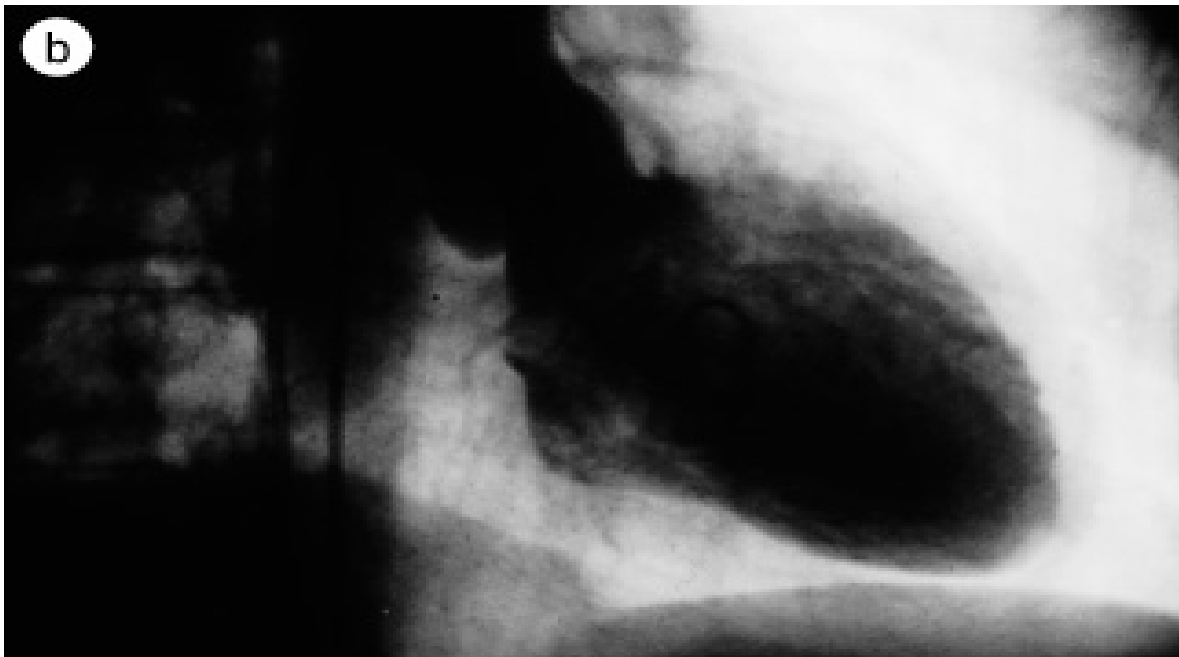


Abb. 10: Laevokardiogramm, enddiastolisch in RAO-Projektion (Kussmaul, 2003).

3.4.2. Koronarangiographie

Zur Koronarangiographie wird ein entsprechender Judkins-Katheter in das Ostium des Hauptstammes der linken Koronaranterie platziert. Vor der Untersuchung erhielten die Patienten eine systemische Antikoagulation mit 7500 IE unfraktioniertem Heparin i.v. zur Prophylaxe thrombembolischer Komplikationen. Nach Darstellung der Kranzarterie mittels Kontrastmittelinjektion wurde nun ein 3F-Infusionskatheter und ein 0.018-in-Doppler-Draht (Cardiometrics, Mountain View, CA, USA) über den liegenden Führungsdraht in den proximalen Abschnitt des Ramus interventrikularis anterior (32%) oder in den Ramus circumflexus (68%) eingebracht.

Bei Vorliegen einer interventionsbedürftigen Stenose wurde diese vor Durchführung des Acetylcholin-Test, der Oxypurinol-Infusion und anschließend erneuten Acetylcholin-Test behandelt, hierbei wurde auf die Gabe von vasoaktiven Substanzen, Nitroglycerin oder GPIIb/IIIa-Hemmern verzichtet.

Die Zielarterie zeichnet sich dadurch aus, dass sie keine Stenosen über 40% des Gefäßdiameters aufweist und nicht für eine Angioplastie vorgesehen ist. Die koronare Flussmessung erfolgt mittels eines Doppler Führungsdrahtes (Flowire®, Cardiometrics). Der Draht wird vorsichtig in die nicht höhergradig stenosierte Koronararterie vorgeschoben und so positioniert, dass ein optimales Doppler Signal abgeleitet werden kann (Doucette et al., 1992). Lag die basale Flussgeschwindigkeit unter 8cm/s oder war die Qualität des Signals ungenügend, wurde der Patient von der Messung ausgeschlossen und ausschließlich die quantitative koronare Angiographie durchgeführt.

Die Röntgenanlage wird in die Position gebracht, die die beste Darstellung der Zielarterie ermöglicht. Die vertikale und horizontale Einstellung der Röntgenanlage wird im Fallberichtsformular schriftlich festgehalten. Anschließend wird Kontrastmittel in die Zielarterie injiziert und ein Angiogramm erstellt. Nachfolgend wird über den Infusionskatheter Acetylcholin nach einem festen Protokoll in steigender Dosis (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L) für jeweils drei Minuten infundiert (ENCORE Investigators, 2003). Am Ende jeder Dosierung wird während der Kontrastmittelinjektion ein Angiogramm erstellt sowie kontinuierlich der Koronarfluss dopplersonographisch mittels Flussdraht bestimmt. Nach einer Wartezeit von fünf Minuten wird ein erneutes Angiogramm als Baselinemessung erstellt. Über die folgenden 15 Minuten wird Oxypurinol intravenös infundiert. Anschließend wird Acetylcholin und Nitroglycerin wie oben beschrieben injiziert. Sechzig Sekunden nach Gabe von 200 µg Nitroglycerin in die Zielarterie wird

ein abschließendes Angiogramm erstellt. Die koronare Flussmessung wird nach jeder intrakoronaren Infusion von Acetylcholin (ACh) sowie nach Applikation von Nitroglycerin aufgezeichnet. Die koronare Flussreserve wird berechnet durch die Kalkulation des Quotienten von maximalem zu Ausgangs-Flussgeschwindigkeit. Die ermittelten Angiogramme werden zur weiteren Bildverarbeitung mit der quantitativen Koronarangiographie im DICOM-Format auf CD gespeichert.

Vor und nach Oxypurinolinfusion wird über eine periphere Vene Blut entnommen (insgesamt 20 ml).



Abb. 11: Angiogramm der LCA vor und nach Infusion von Acetylcholin.

Dargestellt ist der im RCX liegende Infusionskatheter, links vor Infusion von ACh, rechts nach Infusion von ACh. Nach Infusion ist eine deutlich grösseres Lumen sichtbar (siehe Pfeil), der gezeigte Patient bietet eine Vasodilatation auf ACh-Stimulation.

Die Patienten werden wie folgt behandelt:

Oxypurinol 13,4 mg/min, infundiert über eine periphere Vene mit 1ml/min über 15 Minuten;

Dosis: 200mg/Patient

Rationale:

Die intravenöse Dosis von Allopurinol, die laut dem „Physician`s desk reference appliziert werden sollte, liegt bei 600mg. In der für Deutschland geltenden aus dem Holländischen übersetzten Fachinformation beträgt die Dosis für Allopurinol 1000mg. 1000 mg intravenös appliziertes Allopurinol werden durch direkte Oxidation zu 1118 mg Oxypurinol metabolisiert. Allopurinol wird zu Oxypurinol mit einer Halbwertszeit

von 1 Stunde zu Oxypurinol konvertiert, die Halbwertszeit von Oxypurinol beträgt 24 Stunden.

Eine 1000mg Infusion von Allopurinol führt zu einer Plasmakonzentration von ca. 17 μ g/ml Oxypurinol zum Ende der Infusionszeit von 30 Minuten, mit einem Maximum von Oxypurinol von 21 μ g/ml 4 Stunden später. Entsprechend führt eine 15 minütige Infusion von 200 mg Oxypurinol zu einer Plasmakonzentration von 4-5 μ g/ml am Infusionsende.

3.4.3. Quantitative Koronarangiographie

Alle Angiogramme wurden von einem geblindeten Untersucher auf einer Siemens Workstation zur computerisierten quantitativen Koronarangiographie mit automatischer Konturerkennung ausgewertet.

Die Daten der gespeicherten Angiogramme werden eingelesen, für die Auswertung wurde die Siemens Quantcor QCA Software V4.0 benutzt, Anpassungen wurden soweit erforderlich manuell vorgenommen. Vor Messung der Angiogramme erfolgt jeweils eine Kalibrierung des Systems über die Kathetergröße.

Als Grundlage der automatischen Mustererkennung dient die variierende Signalintensität der Bildpixel. Zunächst erfolgt manuell die Markierung der Gefäßmittellinie. Dann werden automatisch vom Gerät senkrecht hierzu gelegene Scanlinien generiert, auf denen wiederum der Kontrast der Pixel für die Erkennung der Konturzeichnung verantwortlich ist.

Da der Kontrast der Bildpunkte für die Konturerkennung maßgeblich ist, können verschiedene Faktoren den Erfolg der automatischen Erkennung beeinträchtigen, insbesondere projektionsbedingte Überlagerungen durch Gefäße, Aufzweigungen und Abgänge, Verkalkungen oder Artefakte durch Flußphänomene des Kontrastmittels. Es werden nur Bilder mit optimaler Kontrastierung zur Verabreichung herangezogen, in einzelnen Fällen erfolgt eine manuelle Anpassung.

Als Zielgröße zur Bestimmung des Durchmesser dient die engste Stelle des Gefäßes, im folgenden als MLD (minimal lumen diameter) bezeichnet. Unter Einbeziehung der benachbarten Gefäßsegmente ermittelt die Software eine Rekonstruktion des Gefäßes, anhand welcher der MLD bestimmt wird.

Die Zielarterie wird proximal beginnend in 5mm-Segmente bis zu einem Maximum von zehn Segmenten (= 5cm) eingeteilt. Es werden die Durchmesser für alle Segmente in den einzelnen Angiographien vermessen. Das Segment mit der geringsten Vasodilatation auf Ach bzw. mit der stärksten Vasokonstriktion auf Acetylcholin (SMAV= Site of maximal abnormal vasoactivity) wird in die Auswertung übernommen und verglichen mit dem Gefäßdurchmesser dieses Segmentes nach Oxypurinolbehandlung. Die primäre Messgröße ist die Änderung des SMAV-Diameters der SMAV als Reaktion auf die maximal tolerierte Acetylcholinkonzentration in %.

3.4.4. Intrakoronare Flußmessung mit dem Doppler-Draht

Als weiteres Verfahren zur Abschätzung einer vaskulären Funktion wird die intrakoronare Flußmessung eingesetzt. Mit dieser Methode kann im klinischen Alltag zum Beispiel eine weitere Quantifizierung koronarer Stenose bzw. eine Abschätzung der Signifikanz getroffen werden (Di Mauro, 1993, de Schwerder, 1994; Newby, 2000).

Zur intrakoronaren Flußmessung wird ein Meßdraht über den liegenden Führungskatheter in das entsprechende Gefäßsegment eingebracht, der sogenannte Dopplerdraht oder flowwire. Es handelt sich hierbei um einen flexiblen Meßdraht, an dessen Ende ein kleiner Ultraschallkopf integriert ist. Auf piezoelektrischem Wege wird nun ein Kegel von Schall mit einer Frequenz von 12 MHz generiert, welcher über eine Tiefe von circa 5 mm die Flußmessungen erlaubt (Doucette, 1992; Di Mario, 1993).

Die vom strömenden Blut reflektierten Schallwellen werden aufgezeichnet und verstärkt. Über die Integration der geschwindigkeitsabhängigen Frequenzverschiebung des vom strömenden Blut reflektierten Schalles über die Zeit kann eine Bestimmung der mittleren Flußgeschwindigkeit APV (average peak velocity erfolgen).

Mittels der quantitativen Koronarangiographie wird der MLD (mean luminal diameter) des Meßsegmentes gemessen. Aus dem Gefäßdiameter lässt sich unter der Annahme eines kreisrunden Gefäßquerschnittes die Fläche des durchströmten Gefäßquerschnittes berechnen. Aus der Querschnittsfläche CSA (cross-sectional area) kann nun der koronare Blutfluss errechnet werden (nach Haager, 1999).

$$QBF = CSA \times APV \times 0.5 \text{ (in ml/min)}$$

Bei der Vermessung des Gefäßabschnittes des Meßvolumens gelten auch hier die gleichen Voraussetzungen für die Bildqualität.

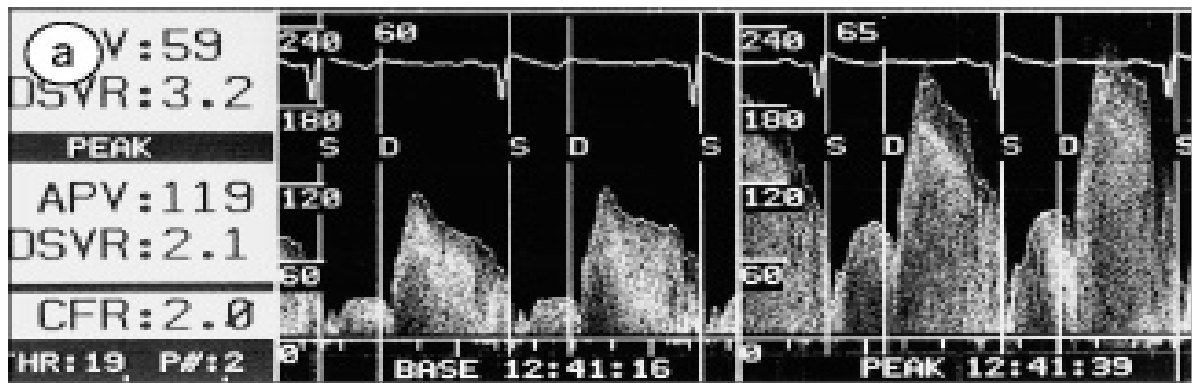


Abb. 12: Intrakoronare Flussmessungen. In diesem Beispiel rechts Flussmessung unter Ruhebedingungen mit einer durchschnittlichen Spitzengeschwindigkeit (APV = average peak velocity) von 59 m/s, links eine Flussmessung nach Provokation mit einer APV von 119 m/s, es ergibt sich nominell eine koronare Flussreserve (CFR = coronary flow reserve) von 2.0 (Kusmaul, 2003).

Die Analyse des minimalen Lumendurchmessers wurde zum Ausgangszeitpunkt, nach der Acetylcholinbelastung, vor und nach Oxypurinol-Infusion und nach Applikation von intrakoronarem Nitroglycerin durchgeführt.

Der intrakoronare Fluss wird während der gesamten Messung digital erfasst und postinterventionell mit den verschiedenen Acetylcholin-Gaben korreliert. Das Flussprofil vor und nach Gabe von Oxypurinol wird abschließend verglichen.

3.5. Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität und der Plasma-Spiegel von Oxypurinol, Xanthin, Hypoxanthin und Urat

Die Bestimmung der Xanthinoxidase-Aktivität im Plasma erfolgte durch Messung der Harnsäurebildung mittels einer HPLC mit Diodenarray-Registrierung. Ein chromatographisches Elutionsschema über 5 mm C18-Säulen wurde zur Bestimmung der Ausgangswerte von Xanthin, Urat und Oxypurinol entworfen. Das Schema setzt sich aus einer 30-minütigen isokratischen Elution mit einer Lösung aus KH_2PO_4 :MethanolAcetonitril:Tetrahydrofuran im Verhältnis 97.9:1:1:0.1 zusammen, die Flußrate wird bei 1 ml/min konstant gehalten, die Temperatur bei 30° C. Ein 8-kanaliger elektrochemischer CoulArray-Detektor (ESA Chelmsford, USA) mit einem angelegten Potential von 0, 120, 220, 300, 575, 700, 800 und 900 mV wurde für die Analyse benutzt. Nach jeder fünften Probe wurde eine festgelegte Mischung aus Oxypurinol, Xanthin und Urat als interner Standard zum Vergleich mit den Patientenproben gemessen. Jede Probe wurde doppelt bestimmt, der Mittelwert berechnet und so für die statistische Auswertung benutzt. Um den confounding – Effekt der Plasma-Uricase-Aktivität zu unterdrücken, wurden die Proben mit festgelegten Urat-Mengen versetzt, eine erneute Analyse der Proben ergab keinen nennenswerten Verlust an Urat über die Zeit.

3.6. Bestimmung der fluabhangigen Dilatation am Unterarm

Die endothelabhängige fluvermittelte Dilatation der Brachialarterie wurde entsprechend den Leitlinien zur ultraschalluntersuchung der Endothelabhängigen Vasodilatation (Corretti et al., 2002) nichtinvasiv mittels 2-Dimensionaler Ultraschalluntersuchung bestimmt. Bilder der rechten Brachialarterie und gepulste Doppler-Flugeschwindigkeitssignale wurden mit einem ATL 7.5 bis 12 mHz Linearschallkopf auf einem ATL HDI5000 Ultraschallsystem (Philips, Hamburg) aufgenommen. Der Messung der Ausgangswerte des Durchmessers der Brachialarterie und der gepulsten Dopplergeschwindigkeiten folgte eine fünfminütige Phase der Okklusion. Hierzu wurde eine 3.5-inch weite Blutdruckmanschette (D.E. Hokanson, Washington, USA) entweder auf 50 mmHg über dem systolischen Blutdruck oder auf über 200 mmHg am Oberarm aufgeblasen. Die arterielle Okklusion wurde für 5 Minuten aufrechterhalten, unter Beibehaltung der Position des Schallkopfes. Dann wurde die Manschette abgelassen, und gepulste Dopplersignale der Flugeschwindigkeit für 5 Sekunden aufgezeichnet. 60 Sekunden nach dem Ablassen der Manschette wurden erneut 2-dimensionale Aufnahmen der Brachialarterie für 5 Sekunden aufgezeichnet. (Warnholtz et al., 2005). Die Bilder wurden im DICOM-Format für die spätere Auswertung gespeichert.

Der Durchmesser der Brachialarterie wurde in einem 5-15 mm langen Segment vor und nach der Induktion der reaktiven Hyperämie gemessen. Der Durchmesser wurde mit einer automatischen Konturerkennungssoftware (Brachial Analyzer, Medical Imaging Aplication, Iowa) vermessen. Aus insgesamt 5 Messungen wurde ein Durchschnittswert für den Durchmesser bestimmt. Die sogenannte fluabhangige Dilatation (FMD = flow-mediated dilation) wurde als prozentuelle Veränderung des Durchmessers der Brachialarterie berechnet. Der Blutflu in der Brachialarterie in Ruhe und nach Erzeugung der reaktiven Hyperämie wurde durch Mittelung des Flugeschwindigkeitsintegrals der ersten 3 Schläge über die Zeit bestimmt. Die relative Änderung des Blutflusses während der reaktiven Hyperämie wurde als prozentuale Steigerung des Blutflusses vom Ausgangswert bestimmt. Die Bildauswertung erfolgte geblindet. Zur Bestimmung der inter- und intraindividuellen Variabilität wurden 20 gesunde freiwillige Probanden zweimal in geblindeter Form untersucht. Die lineare Regressionsanalyse zeigte einen Korrelationskoeffizienten von 0.99. Der durchschnittliche Unterschied zwischen 2 Messungen betrug 0.034 ± 0.008 mm ($0.8 \pm 0.2\%$ des Gefadurchmessers). Um die Variabilität zwischen 2

Untersuchungen zu bestimmen, wurden 10 gesunde freiwillige Probanden zweimal untersucht. Der durchschnittliche Unterschied zwischen 2 Messungen durch denselben Untersucher betrug 0.07 ± 0.06 mm für den Ausgangswert des Gefäßdurchmessers und $0.56 \pm 0.57\%$ für die flußabhängige Dilatation (FMD).

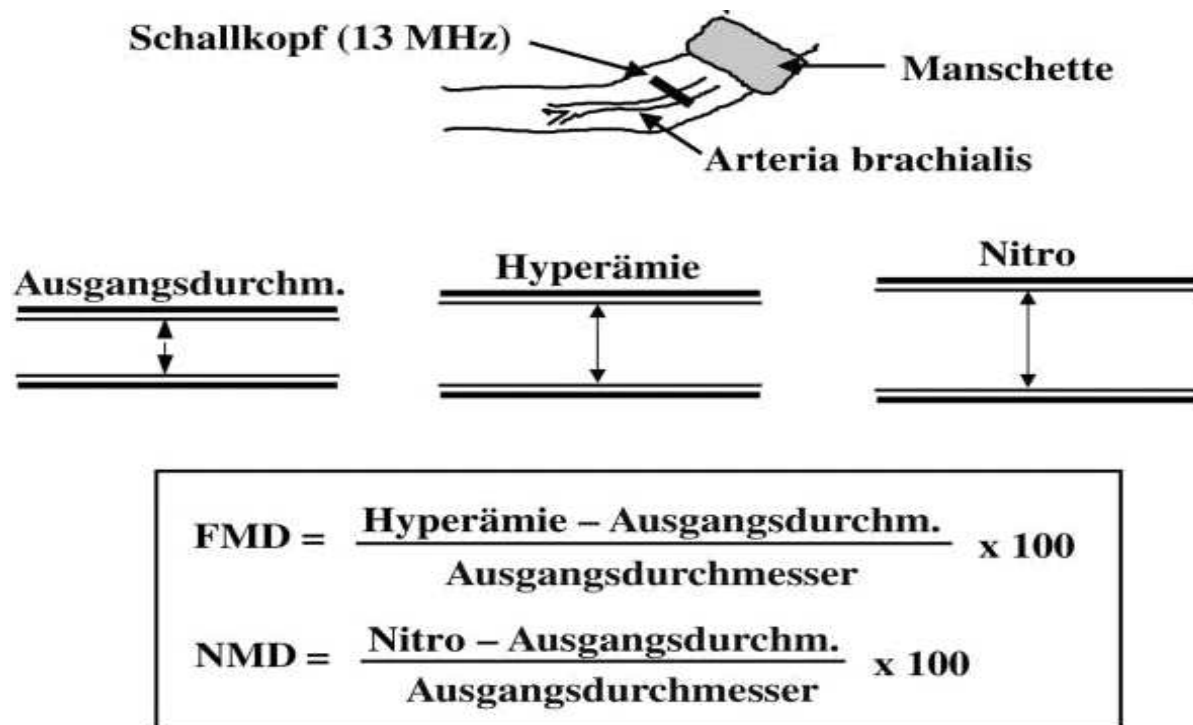


Abb.13: Flussabhängige Dilatation (FMD = flow-mediated dilation). Zunahme des Durchmessers der Arterie nach 5-minütiger Stauung über den systolischen Blutdruck. Als Vergleich kann eine Zunahme des Durchmessers nach Gabe von Nitroglycerin herangezogen werden (einem endothelunabhängigen Vasodilatator).

3.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Studie erfolgt nach dem Abschluss aller Untersuchungen. Sie wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mathematik und Datenverarbeitung in der Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. J. Berger) mit dem statistischen Analysepaket SPSS® durchgeführt. Die Ergebnisse der Auswertung wurden in einem biometrischen Abschlußbericht festgehalten.

Die Behandlungsgruppenvergleichbarkeit wird für die nach Wirksamkeit ausgewählte Patientenpopulation unter Berücksichtigung demographischer Kriterien und des Zielkriteriums zu Testbeginn geprüft.

Der primäre Endpunkt ist die Änderung der Reaktion der Koronargefäße auf 10^{-5} mol/L Azetylcholin. Wenn Azetylcholin aufgrund zu starker Vasokonstriktion nicht gegeben werden kann, wird die Reaktion auf die am höchsten tolerierte Azetylcholinkonzentration bei Ausgangsmessung und nach Oxypurinolinfusion verglichen (z.B. 10^{-6} mit 10^{-6} mol/L bzw. 10^{-7} mit 10^{-7} mol/L). Es werden zweiseitige t-Tests (die jeweils zwei Behandlungen vergleichen) abgeleitet, um die zwei verschiedenen Behandlungsgruppen miteinander vergleichen zu können.

4. Ergebnisse

4.1. Patienten

In die Studie wurden 18 Patienten eingeschlossen, welche das Protokoll abschlossen und für eine Analyse zur Verfügung standen. Ursprünglich wurden 22 Patienten untersucht, vier dieser Patienten mussten jedoch ausgeschlossen werden, einer zog seine Einverständniserklärung zurück, und bei drei Patienten führte eine Dislokation oder Fehlpositionierung des Katheters zu ihrem Ausschluß.

Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 65 ± 10 Jahre. Siebzehn Patienten (96 %) waren männlichen Geschlechts. In der Patientengruppe bestand eine hohe Prävalenz der Risikofaktoren, welche eine endotheliale Dysfunktion bedingen: jeweils 85 % wiesen als kardiovaskulären Risikofaktor eine arterielle Hypertonie oder eine Hypercholesterinämie auf, drei Patienten waren Diabetiker und ein Drittel der Patienten aktive Raucher.

Im Rahmen einer antihypertensiven Therapie wurden 76 % der Patienten mit einem ACE-Hemmer oder einem Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker behandelt, ebenfalls 76 % der Patienten erhielten im Rahmen der Sekundärprophylaxe der KHK bzw. im Rahmen einer lipidsenkenden Therapie einen CSE-Hemmer.

Direkt vasoaktive Medikamente wie zum Beispiel Nitrate oder Kalziumantagonisten wurden 24 Stunden vor der Untersuchung pausiert.

Von den achtzehn Patienten, welche das Studienprotokoll durchliefen, zeigten fünf eine Vasodilatation auf die Acetylcholingabe (Gruppe I). Die anderen dreizehn Patienten boten eine Vasokonstriktion, davon elf Patienten auf die höchste Dosis vom 10^{-5} μM , bei zweien war die vasokonstriktive Reaktion auf die Acetylcholingabe bereits in der mittleren Konzentration so ausgeprägt, dass auf eine weitere Steigerung verzichtet wurde.

Charakteristikum	
Alter (Jahre)	65 ± 8
Geschlecht männlich	96 % (17)
Ejektionsfraktion	62 ±15 %
Arterielle Hypertonie	86 % (15)
Hypercholesterinämie	86 % (15)
Diabetes mellitus	18 (3)
Raucher	32 % (6)
LDL-Cholesterin (mg/dl)	126 ± 26
HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (n)	76 %(14)
ACE-Hemmer (n)	68 % (15)
AT-1 Rezeptor-Antagonisten	9 % (2)

Tabelle 1. Klinische Charakterisierung der Patienten (n = 18)

4.2. Sicherheit

Die Applikation der Studienmedikation wurde von allen Patienten gut toleriert, eine unerwünschte Nebenwirkung trat nicht auf. Ein Patient musste innerhalb der 30-Tages-Frist erneut einer Koronarangiographie unterzogen werden, jedoch ohne die Notwendigkeit einer folgenden koronaren Revaskularisation.

4.3. Plasmaspiegel von Oxypurinol und der Purinmetabolite

Nach Infusion von Oxypurinol stieg der Plasmaspiegel von $0.03 \pm 0.03 \mu\text{M}$ bis auf $114.4 \pm 34.2 \mu\text{M}$ (siehe Tabelle, $p < 0.01$). Entsprechend war die Aktivität der Xanthinoxidase im Plasma um 63% reduziert, sie fiel von 0.051 ± 0.01 auf $0.019 \pm 0.005 \mu\text{U}/\text{mg}$ Protein ($p < 0.02$, siehe Abbildung). Die beiden Patientengruppen unterschieden sich weder in der Ausgangsaktivität der Xanthinoxidase noch im Ausmaß der Hemmung der Oxidase durch Oxypurinol. Die Xanthin- und Uratspiegel nach der Infusion von Oxypurinol unverändert ($p > 0.05$), der Hypoxanthin-Spiegel stieg signifikant ($p < 0.001$, siehe Tabelle).

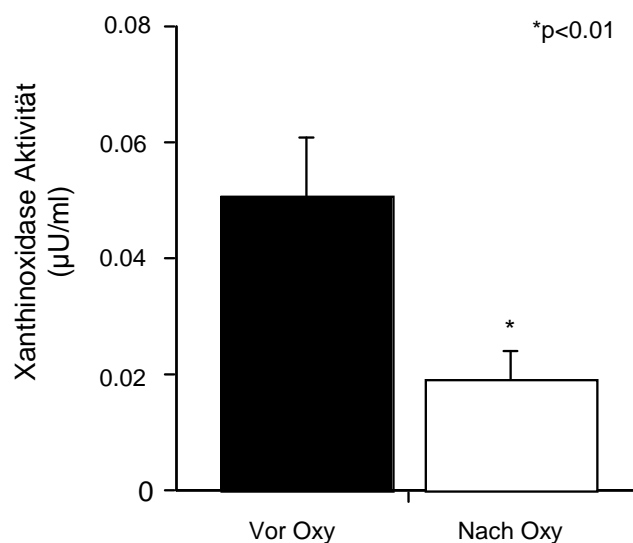


Abb. 14: Analyse der Xanthinoxidase-Aktivität.

Nach Gabe von Oxypurinol fällt die Aktivität der XOR im Plasma um 63% von $0,051 \pm 0.001$ auf $0.019 \pm 0.005 \mu\text{U}/\text{mg}$ Protein ($*p < 0.01$). Die Daten der 18 Patienten werden als Mittelwert + Standardabweichung (SD) gezeigt.

	Vor Oxypurinol	Nach Oxypurinol	
Harnsäure (µM)	233 ± 9.8	240 ± 10	p<0.05
Xanthin (µM)	0.47 ± 0.1	0.5 ± 0.1	n.s.
Hypoxanthin (µM)	3.6 ± 0.3	6.3 ± 0.7	p<0.001
Oxypurinol (µM)	0.03 ± 0.02	118.2 ± 36.7	p<0.001

Tabelle 2. Plasmaspiegel von Oxypurinol und Spiegel der Purinmetabolite vor und nach der Oxypurinol-Infusion. Daten der n=18 Patienten als Mittelwert ± Standardabweichung.

4.4. Quantitative Koronarangiographie

In der Gruppe der Patienten mit Vasokonstriktion als Reaktion auf die Acetylcholingabe konnte die Infusion von Oxypurinol die Vasokonstriktion deutlich reduzieren, die acetylcholinabhängige Vasokonstriktion sank von $-23 \pm 4\%$ auf $-15 \pm 4\%$ prozentualer Veränderung zum Ausgangswert ($p < 0.05$).

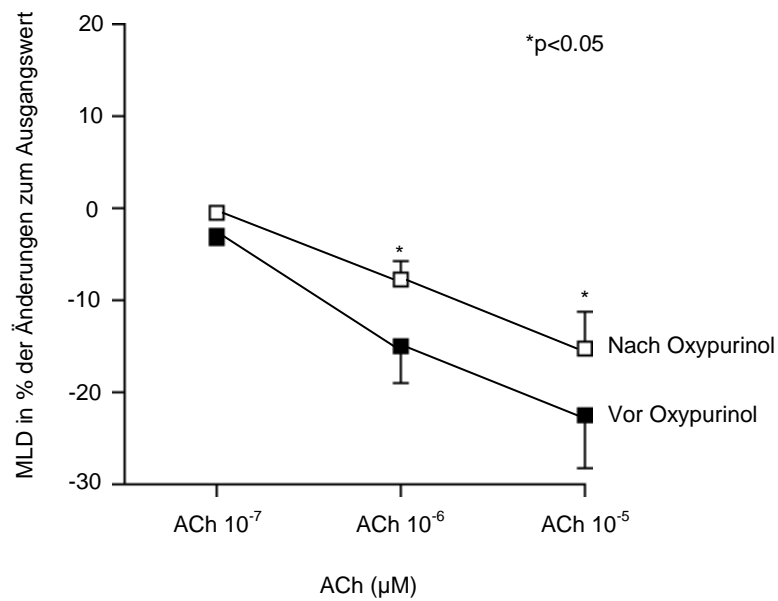


Abb. 15: Veränderung des minimalen Durchmessers des Lumens (MLD) bei Patienten mit gestörter Endothelfunktion unter Acetylcholin vor und nach Gabe von Oxypurinol. Gezeigt werden die Änderungen des MLD von -23 ± 4 auf $-15 \pm 4\%$, angegeben als rel. Änderung des MLD zum Ausgangswert ($p < 0.05$).

In der Gruppe der Patienten mit intakter Endothelfunktion, d. h. mit einer Vasodilatation hatte die Oxypurinolgabe keinen Effekt auf die actylcholinabhängige Vasoreaktivität, hier war ein nichtsignifikanter Anstieg von $+2.8 \pm 4.2$ auf $+5.2 \pm 0.7\%$ der Veränderung des MLD (minimalen Lumendurchmessers) zum Ausgangswert zu vermerken ($p > 0.05$). Oxypurinol hatte keinen Effekt auf die Ausgangswerte der Lumendurchmesser, ebenso wenig auf die Reaktion nach Gabe des endothelunabhängigen Vasodilatators Nitroglycerin ($3.4 \pm 1.8\%$ auf $1.9 \pm 1.22\%$, $p > 0.05$).

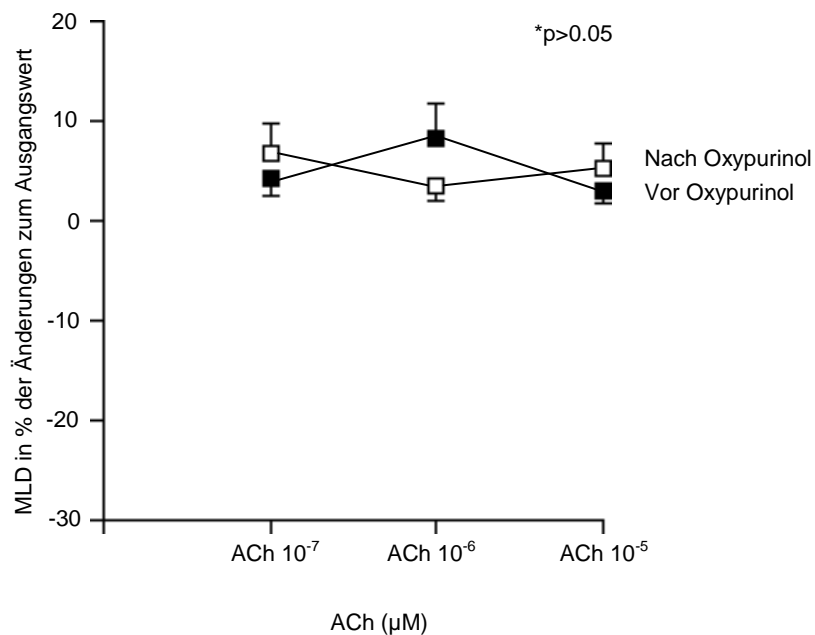


Abb. 16: Veränderung des minimalen Durchmessers des Lumens (MLD) bei Patienten mit primär intakter Endothelfunktion, d. h. Vasodilatation unter ACh-Gabe. Veränderung des MLD von $+2.8 \pm 4.2$ auf $+5.2 \pm 0.7\%$, angegeben als rel. Änderung des MLD zum Ausgangswert ($p > 0.05$).

4.5. Intrakoronare Flußmessungen

Der Anstieg der koronaren Blutflüsse nach Gabe von Acetylcholin war in der Gruppe mit endothelialer Dysfunktion nach Oxypurinol-Infusion signifikant, es ließ sich eine Zunahme des Anstiegs von $16 \pm 17\%$ auf $62 \pm 18\%$ ($p < 0.05$) der Veränderungen zum Ausgangswert feststellen.

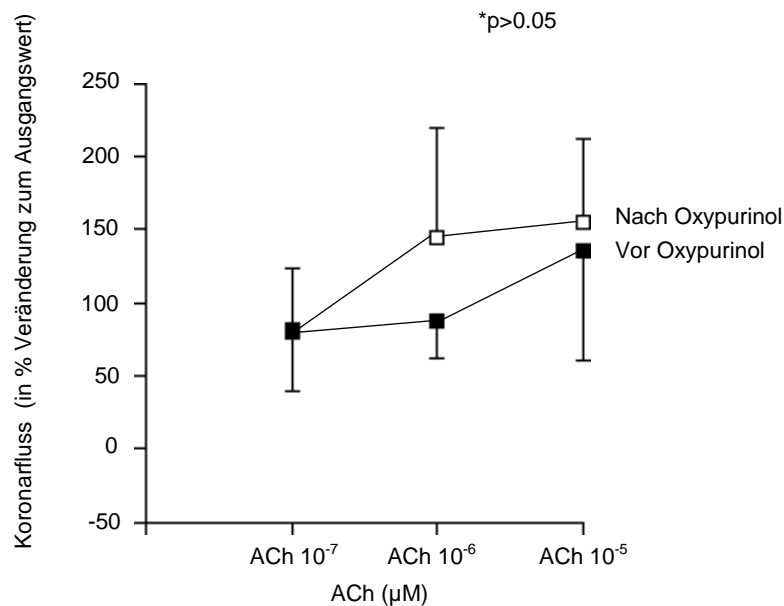


Abb. 17: Änderung des koronaren Blutflusses (CBF) bei Patienten mit erhaltener Endothelfunktion auf Acetylcholin vor und nach Gabe von Oxypurinol. Nachgewiesen wurde eine Änderung des koronaren Blutflusses von $135 \pm 75\%$ auf $154 \pm 61\%$, angegeben als relative Änderung des Blutflusses vom Ausgangswert ($p > 0.05$).

In der Gruppe mit dilatativem Reaktionsmuster nach Acetylcholingabe zeigte sich ebenfalls nur ein nichtsignifikanter Anstieg von 135 ± 75 auf $154 \pm 61\%$ Änderung zum Ausgangswert ($p > 0.05$). Die basalen Flußraten vor und nach Infusion bzw. die Änderung der Flußgeschwindigkeiten wurden durch Oxypurinolgabe ebenfalls nicht beeinflusst.

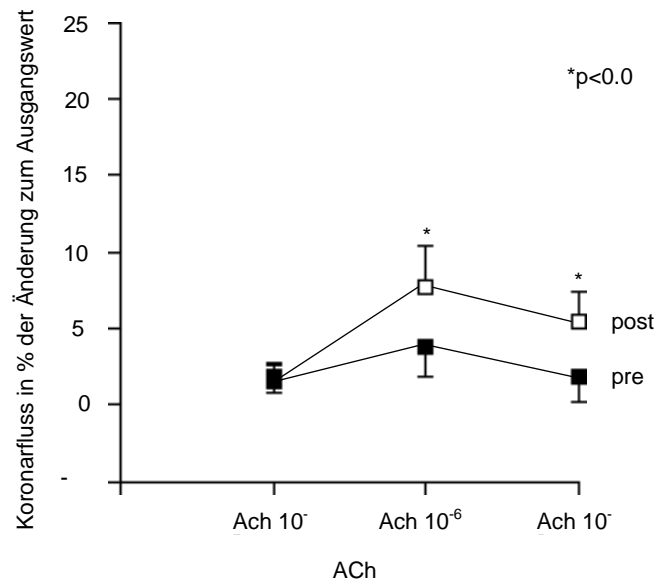


Abb. 18: Änderung des koronaren Blutflusses (CBF) bei Patienten mit gestörter Endothelfunktion auf Acetylcholin und nach Gabe von Oxypurinol . Nachgewiesen wurde eine Änderung des koronaren Blutflusses von $16 \pm 17\%$ auf $62 \pm 18\%$, angegeben als rel. Änderung des Blutflusses vom Ausgangswert ($p < 0.05$).

4.6. Fluss-abhängige Dilatation am Unterarm

Bei acht aufeinander folgenden Patienten wurde eine Messung des Unterarmblutflusses und die Bestimmung der reaktiven Hyperämie vor und nach der koronaren Intervention durchgeführt. Hier war eine signifikante Zunahme der flußabhängigen Dilatation nach Oxypurinolgabe von $5.1 \pm 1.5\%$ auf $7.6 \pm 1.5\%$ festzustellen ($p < 0.05$).

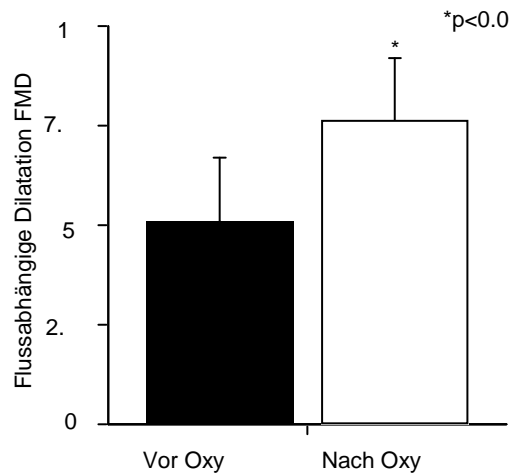


Abb. 19: Nichtinvasive Bestimmung der priheren Endothelfunktion vor und nach Gabe von Oxypurinol . Die Fluss-abhängige Dilatation (FMD) am Unterarm wurde bei 8 konsekutiven Patienten vor und unmittelbar nach der koronaren Untersuchung durchgeführt. Die Fluss-abhängige Dilatation am Unterarm stieg nach akuter Oxypurinolgabe von $5.1 \pm 1.5\%$ auf $7.6 \pm 1.5\%$ ($p < 0.01$).

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung, erhaltender linksventrikulärer Ruhefunktion und nicht erhöhten Harnsäure-Spiegeln im Blut die Infusion von Oxypurinol

1. die Acetylcholin-induzierte Vasokonstriktion der Leitungsgefäße vermindert,
2. die myokardiale Perfusion steigert und
3. die periphere endotheliale Funktion verbessert.

Insbesondere lässt sich folgern, dass reaktive Sauerstoff-Spezies, welche von der Xanthinoxidase erzeugt werden, an der eingeschränkten koronaren und peripheren Endothelfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung beteiligt sind. Eine Hemmung der Xanthinoxidase über eine systemische Gabe von Oxypurinol konnte die Acetylcholin-induzierte Vasokonstriktion bei den entsprechenden Patienten reduzieren und so die myokardiale Perfusion verbessern.

Die Xanthinoxidase lässt sich im Plasma und im Gefäßendothel von Patienten mit koronarer Herzerkrankung in großen Mengen nachweisen (Spiekermann et al., 2003). Weiterhin wird unter Bedingungen wie sie bei der koronaren Herzerkrankung in oder an atherosklerotischen Plaques vorliegen, eine verstärkte Genexpression der Xanthinoxidase nachgewiesen, so zum Beispiel als Antwort auf eine Hypoxie (Terada et al., 1997) oder eine (für höhergradige Koronarstenosen typische) Flußbeschleunigung (McNally et al., 2003).

In atherosklerotischen Plaques konnte eine bis zu 6-fach erhöhte Konzentration an Harnsäure nachgewiesen werden (Patetsios et al., 2001), dies kann als Hinweis für eine lokal deutlich gesteigerte Enzymaktivität gewertet werden, welche unabhängig von systemischen Spiegeln der Xanthinoxidase auch zu lokal erhöhten Mengen an ROS führen könnte. Weiterhin konnte eine direkte Rolle für die XOR bei der koronaren Herzerkrankung gezeigt werden, die gemessene XOR-Aktivität ist in erkrankten Gefäßen um mehr als 200% erhöht und korreliert negativ mit der endothelabhängigen Vasodilatation (Landmesser et al., 2002). Die endothelgebundene und endothelnahe Verteilung des Enzyms und das oxidative Milieu, welches durch seine Metabolite generiert wird, kann so zum Katabolismus des vaskulären NO beitragen.

In klinischen Studien konnte die Wirkung einer Hemmung der Xanthinoxidase auf den Blutfluß in peripheren Gefäßen gezeigt werden, unter anderem für Patienten mit Hypercholesterinämie (Cardillo et al., 1997), Kardiomyopathie (Farquharson et al., 2002), Rauchern (Guthikonda et al., 2003) und Diabetikern (Butler et al., 2000). Diese Studien zeigten jedoch nur einen Effekt der Hemmung auf die systemische Zirkulation, der Nachweis einer klinisch signifikanten Beteiligung der Xanthinoxidase an der endothelialen Dysfunktion der koronaren Gefäße konnte bisher nicht erbracht werden. Die hier berichteten Ergebnisse weisen auf eine Rolle der Xanthinoxidase und ihrer Produkte am Abbau von NO in der koronaren Zirkulation hin. Die Infusion von Oxypurinol verbessert über die Hemmung der Xanthinoxidase einerseits die acetylcholininduzierte Vasokonstriktion der Leitungsgefäße, andererseits lässt sich eine deutliche Verbesserung der kardialen Perfusion ermitteln. Dies weist auch auf eine Lokalisierung der Xanthinoxidase in der Mikrozirkulation hin, wo sie eine kritische Rolle in der Regulation des koronaren und systemischen Widerstandes spielt.

5.1. Patientenkollektiv

Durch die spezifische Auswahl der Einschlusskriterien wurde eine gewisse Homogenität im untersuchten Kollektiv hinsichtlich der Ausprägung der koronaren Herzerkrankung erreicht:

Bei einem mittleren Alter der Probanden von 65 ± 8 Jahren war eine relativ homogene Altersstruktur gesichert. Bis auf eine Ausnahme wurden nur männliche Probanden in die Studie eingeschlossen. Da die Endothelfunktion hinsichtlich Alter und Geschlecht variiert (Chauhan, 1996; Celermajer 1994b), sind jedoch die Ergebnisse zur Beurteilung beim weiblichen Geschlecht aufgrund der geringen Fallzahl ungeeignet.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren waren im untersuchten Kollektiv, wie zu erwarten, häufig anzutreffen, insbesondere die arterielle Hypertonie und die Hypercholesterinämie war in jeweils 86% der Fälle nachzuweisen. Andere typische Risikofaktoren wie Diabetes mellitus sowie Nikotinabusus waren in geringerer Ausprägung vorhanden. Somit war neben der bekanntermaßen mit einer endothelialen Dysfunktion assoziierten koronaren Herzerkrankung auch weitere klassische Risikofaktoren für eine gestörte endotheliale Funktion in hohem Maße im untersuchten Kollektiv vertreten.

Mit einer Häufigkeit von insgesamt 75% erhielten die Patienten bezüglich ihrer Grunderkrankung entweder einen ACE-Hemmer oder einen Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten im Rahmen der Behandlung ihrer arteriellen Hypertonie bzw. einen CSE-Hemmer zur Therapie der Hypercholesterinämie. Eine Vorbehandlung gemäß der aktuellen Richtlinien zur Therapie der koronaren Herzerkrankung (Dietz et al., 2003) war also bei einem Großteil der Patienten gegeben. Insbesondere war durch die medikamentöse Behandlung mit diesen Medikamenten bei einem Großteil der Patienten bereits eine pharmakologische Intervention zur Normalisierung gestörter Endothelfunktion erfolgt.

Hypercholesterinämie ist eine weitere bedeutende Ursache für gestörte Endothelfunktion, seit langem werden CSE-Hemmer in der Therapie der Hypercholesterinämie und der Sekundärprophylaxe der koronaren Herzerkrankung eingesetzt. CSE-Hemmer entfalten ihre Wirkung über eine Senkung der LDL-Lipoproteine und insbesondere über eine Senkung der oxidierten LDL-Fraktion. Das LDL und insbesondere die oxidierte Anteile haben einen direkten negativen Effekt

auf die Endothelfunktion. Über eine gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies führen diese zu einer reduzierten Bioverfügbarkeit (Ohara et al., 1993; Mügge et al., 1994; Warnholtz et al., 1999), ein Effekt der sich durch Gabe von Antioxidantien wie z. B. Probucol hemmen lässt (Keaney et al., 1995).

Klinisch ist der Effekt einer CSE-Hemmer-Therapie auch bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung nachgewiesen (Egashira et al., 1994). Statine induzieren eine höhere Expression der endothelialen NO-Synthetase (Laufs et al., 1998) und steigern die Aktivität des exprimierten Enzymes (Kureishi et al., 2000). Weiterhin hemmen CSE-Hemmer die Aktivierung der endothelialen NAD(P)H-Oxidase und senken somit den oxidativen Streß der Gefäßwand direkt durch verminderte ROS-Produktion (Wassmann et al., 2001). Über eine Reduktion der AT₁-Rezeptor-Expression und -Aktivität wird die außerdem Angiotensin-II-vermittelte ROS-Bildung zusätzlich gehemmt (Nickenig et al., 1999).

Interessanterweise zeigte infundiertes Oxypurinol in dieser Studie immer noch einen vasodilatatorischen Effekt, obwohl der Großteil der Patienten eine Behandlung mit ACE-Hemmern und CSE-Hemmern erhielt. Diese Pharmaka können bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung die Bioverfügbarkeit von endotheliale NO erhöhen, indem sie die Spiegel vaskulärer freier Radikale senken die Freisetzung von NO stimulieren. Diese Fähigkeit lässt sich auch klinisch anhand einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion nachweisen (Anderson et al., 1995; Mancini et al., 1996). So könnte letztlich die Hemmung der Xanthinoxidase einen unabhängigen und additiv wirksamen Mechanismus darstellen, um die Bioverfügbarkeit von vaskulärem NO bei koronarer Herzkrankheit zu steigern.

5.2. Methodenkritik

5.2.1. Quantitative Koronarangiographie

Schon kurz nach dem tierexperimentellen Nachweis der endothelabhängigen Relaxation durch Furchgott wurde das Prinzip auch für Untersuchungen am Menschen angewandt, bei der Untersuchung der koronaren Endothelfunktion gilt die intrakoronare Injektion von Acetylcholin mit anschließender Vermessung der epikardialen Leitungsgefäße als Goldstandard zur Ermittlung einer endothelialen Dysfunktion (Ludmer et al., 1986).

Eine Einschränkung der Endothelfunktion ist bereits in frühen Stadien der Atherosklerose nachweisbar (Reddy et al., 1994), hierbei ist bei Progression der koronaren Atherosklerose zunächst eine zunehmende Einschränkung der Vasodilatation auf Acetylcholingabe und im Verlauf eine reduzierte flussabhängige endothelvermittelte Vasodilatation zu bemerken (Zeiber et al., 1991a). Die endotheliale Dysfunktion der koronaren Leitungsgefäße ist bei allen Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung nachweisbar, hier korreliert das Ausmaß mit der Anzahl der Faktoren.

Bei Patienten mit normalen Koronararterien führt körperliche Belastung, mentaler Stress oder Kälte („cold pressure test“) über den Mechanismus der flußabhängigen Dilatation zu einer Erweiterung epikardialer Koronarien (Zeiber et al., 1989). Im Gegensatz hierzu lässt sich bei Patienten mit atherosklerotischen Veränderungen der Koronarien eine paradoxe Vasokonstriktion als Antwort auf diese Stimuli nachweisen (Gordon et al., 1989; Yeung et al., 1991). Der Grad der Vasokonstriktion wird in der Literatur mit circa 25-30% beschrieben (Gage et al., 1986) – als solches kann diese paradoxe Reaktion nicht zu hämodynamisch wirksamen Einengungen und somit zu signifikanten Veränderungen der koronaren Durchblutung führen. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung lässt sich eine große Subgruppe mit angiographisch nachgewiesenen Stenosen im Bereich von 40-50%, welche also unter normalen Bedingungen nicht hämodynamisch wirksam wären. Unter diesen Patienten leidet aber ein Teil trotzdem unter Angina pectoris bei o. g. Bedingungen. Ein Erklärung hierfür ist, dass sich unter Belastungsbedingungen auf die fixierte atherosklerotische Stenose noch ein dynamischer Anteil, bedingt durch die paradoxe Vasokonstriktion im Rahmen der endothelialen Dysfunktion addiert und in der Summe zu einer

signifikanten Flußlimitierung und somit zur Reduktion des epikardialen koronaren Blutflusses führt. Die Gruppe der Patienten mit endothelialer Dysfunktion in der vorliegenden Studie zeigte als Ausgangswert eine Vasokonstriktion von $-23\pm 4\%$ auf Acetylcholin, entsprechend der Größenordnung der endothelialen Dysfunktion in anderen Studien (Gage et al., 1986). Oxypurinol führte hier zu einer signifikanten Verbesserung, nach Infusion war die Reaktion nur mit $-15\pm 4\%$ im Extremfall nahezu um $2/3$ gebessert. Ein Einfluß auf die Wirkung des endothelunabhängigen Dilatators Nitroglycerin zeigte sich nicht, dieser ist aufgrund des Mechanismus auch nicht zu erwarten: Nitroglycerin führt über eine endothelunabhängige Abspaltung von größeren Mengen an NO zu einer direkten Vasodilatation, freigesetztes NO entsteht direkt am Ort seiner Wirkung und entzieht sich aufgrund der freigesetzten Menge einem Abbau durch reaktive Sauerstoffspezies. Es scheint also, dass die XO-generierten ROS bei diesen Patienten zumindest für einen Teil der paradoxen Vasokonstriktion als Reaktion auf die Acetylcholingabe verantwortlich ist, und dass eine Hemmung der XO zu einer signifikanten Verbesserung der endothelialen Funktion führt. Dieses Wirkprinzip wäre klinisch nutzbar für eine symptomatische antianginöse Therapie insbesondere natürlich für die oben genannten Patienten mit nicht-signifikanten Koronarstenosen. Somit ist konnte die Infusion von Oxypurinol die Vasokonstriktion deutlich reduzieren, die acetylcholinabhängige Vasokonstriktion sank von auf prozentualer Veränderung zum Ausgangswert ($p < 0.05$). In der Gruppe der Patienten mit intakter Endothelfunktion, d. h. Vasodilatation hatte die Oxypurinolgabe keinen Effekt auf die acetylcholinabhängige Vasoreaktivität, hier war ein nichtsignifikanter Anstieg von $+2.8\pm 4.2$ auf $+5.2\pm 0.7\%$ der Veränderung des MLD (minimalen Lumendurchmessers) zum Ausgangswert zu vermerken ($p > 0.05$). Oxypurinol hatte keinen Effekt auf die Ausgangswerte der Lumendurchmesser, ebenso wenig auf die Reaktion nach Gabe des endothelunabhängigen Vasodilatators Nitroglycerin ($3.4\pm 1.8\%$ auf $1.9\pm 1.22\%$, $p > 0.05$).

5.2.2. Intrakoronare Flußmessungen

Der Tonus der koronaren Mikrozirkulation, und somit die regionale Myokardperfusion wird von mehreren Faktoren reguliert, neben Prostaglandinen, Adenosin und dem EDHF ist hier vor allem NO an der Regulation beteiligt (Duffy et al., 1999). Die Endothelfunktion der koronaren Mikrozirkulation ist bereits bei Patienten mit beginnender koronarer Herzerkrankung eingeschränkt (Zeicher et al., 1991b), die reduzierte Perfusion des Myokards kann direkt auf eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO in der Mikrozirkulation zurückgeführt werden (Quyyumi et al., 1995a; Quyyumi et al., 1995 b). Ein Defizit der myokardialen Perfusion über eine Störung der Endothelfunktion der koronaren Leitungsgefäße hinaus konnte sowohl szintigraphisch (Hasdai et al., 1997) als auch magnetresonanztomographisch nachgewiesen werden (Selvanayagam et al., 2005). In Abwesenheit von epikardialen Stenosen wird circa 85% des Gesamtgefäßwiderstandes des koronaren Gefäßsystems von der Mikrozirkulation bestimmt, das heißt Störungen der Mikrozirkulation können zu ausgeprägten Durchblutungsstörungen führen (Marcus et al., 1990).

Aus dem beobachteten signifikanten Anstieg der koronaren Blutflüsse in der Gruppe der Patienten mit endothelialer Dysfunktion in der vorliegenden Studie von $16\pm 17\%$ auf $62\pm 18\%$ ($p < 0.05$) der Veränderungen zum Ausgangswert lassen sich 2 Folgerungen ziehen:

Zunächst führt die Infusion von Oxypurinol zu einer deutlichen Verbesserung des koronaren Flusses und somit zu einer verbesserten Myokardperfusion, d. h. die im Rahmen der Erkrankung reduzierte Antwort auf metabolische Belastungen (z. B. im Rahmen einer reaktiven Hyperämie bei gesteigerter Belastung) wird zu einem guten Teil normalisiert. Dieser Effekt ist auch hier zusätzlich zur bereits bestehenden Beeinflussung der Endothelfunktion durch die Co-Medikation mit ACE-Hemmern und CSE-Hemmern nachweisbar, welche ebenfalls die koronare Mikrozirkulation positiv beeinflussen (Haefeli et al., 1997; Mansur et al., 1999).

Weiterhin kann aus den vorgelegten Ergebnissen eine Rolle der Xanthinoxidase für die gestörte Regulation der koronaren Mikrozirkulation bei koronarer Herzerkrankung abgeleitet werden, XOR-generierte ROS scheinen an der verminderten Bioverfügbarkeit von NO auch hier beteiligt zu sein. Eine Beteiligung der Xanthinoxidase an diesem Prozess war bisher nicht beschrieben worden. Da NO in der Mikrozirkulation auch über eine Modulation der Freisetzung von Thromboxan und

Serotonin die Plättchenaggregation inhibiert (Giolino et al., 1991), kann über eine Rolle der therapeutischen XO-Hemmung im Rahmen akuter Koronarsyndrome spekuliert werden (Diodati et al., 1998).

Beeinträchtigungen der koronaren Mikrozirkulation konnten im Rahmen mehrerer klinischer Syndrome nachgewiesen werden. Bei Patienten mit belastungsabhängiger Angina pectoris wurde eine ausgeprägte Störung der koronaren Widerstandsgefäße gezeigt (Zeiger et al., 1995), bei nur geringgradigen Stenosen der epikardialen Gefäße waren hier in der Thallium-Szintigraphie deutliche myokardiale Perfusionsdefizite darstellbar. Über eine direkte Beeinflussung der mikrozirkulatorischen Vasomotorik könnte Oxypurinol hier einen Beitrag zur symptomatischen Therapie bei diesen Patienten leisten.

Bei einer Subgruppe von Patienten mit typischer Angina und normalen Koronararterien (dem sogenannten Syndrom X) konnte ebenfalls eine mikrovaskuläre endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden (Quyyumi et al., 1992), auch hier wäre im Rahmen eines therapeutischen Regimes additiv zur Therapie mit ACE-Hemmern oder CSE-Hemmern eine Rolle für die therapeutische Hemmung der Xanthinoxidase denkbar.

Neben der Endotheldysfunktion der epikardialen Leitungsgefäße hat sich zuletzt auch eine Störung der koronaren Mikrozirkulation als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse gezeigt, Patienten mit koronarer Herzerkrankung und eingeschränkter Zunahme des acetylcholininduzierten Blutflusses zeigten eine deutlich erhöhte Mortalität und Morbidität, d. h. die Progression der koronaren Herzerkrankung als auch die Entwicklung von Komplikationen wie dem akuten Myokardinfarkt war vermehrt (Al Suwaidi et al., 2000; Murakami et al., 1998, Britten et al., 2004). In diesen Studien wiesen die Patienten mit dem geringsten Anstieg des koronaren Blutflusses die höchsten Komplikationsraten auf und konnten somit als Risikopopulation identifiziert werden. Im Sinne dieser Studien wäre die Gruppe der Patienten dieser Studie mit reaktiver Vasokonstriktion ebenfalls in diese Hoch-Risiko-Population einzuordnen, es ist anzunehmen, dass diese Patienten von einer therapeutischen Intervention am meisten profitieren würden.

Ob eine verbesserte Perfusion durch Hemmung der Xanthinoxidase auch zu einer verbesserten Prognose der betroffenen Patienten führt, bleibt hypothetisch, ist aber bisher noch für keine Intervention im Bereich der Mikrozirkulation gezeigt worden. Letztlich bietet die Hemmung der XO bei Patienten mit normalen Harnsäurespiegeln

aber die Möglichkeit, eine isolierte Intervention der endothelialen Dysfunktion ohne confounding-Effekte durch Mitbeeinflussung anderer Systeme.

5.2.3. Fluss-abhängige Dilatation am Unterarm

Zur nichtinvasiven Bestimmung der Endothelfunktion an peripheren Gefäßen wird die Fluss-abhängige Dilatation der Brachialarterie untersucht. Im Gegensatz zu anderen Verfahren erfolgt hier einerseits die Messung mittels Ultraschall nichtinvasiv, andererseits fungiert als Provokation der Endothelvermittelten ein physikalischer Stimulus, welcher im Gegensatz zur pharmakologischen Stimulation ebenfalls nichtinvasiv appliziert werden kann. Durch Insufflation einer Blutdruckmanschette am Oberarm über den systolischen Druck hinaus wird eine Ischämie im Stromgebiet der Arteria brachialis erzeugt. Über eine ischämisch getriggerte Dilatation der Widerstandsgefäße führt dies nach Deflation der Manschette und wiederhergestelltem Zufluß zu einem gesteigerten Blutfluß im zuführenden Leitungsgefäß. Der gesteigerte Blutfluß führt Endothelabhängig zur Dilatation des betreffenden Gefäßes. Als Mechanismus muss ein gesteigerter Shear-Stress angenommen werden, welcher letztlich über eine intrazelluläre Anhebung der Kalziumkonzentration zur Stimulation der Endothelialen NO-Synthetase und so zur Ausschüttung von NO führt (Busse et al., 1993; Corson et al., 1996; Dimmeler et al., 1999). Diese NO-Freisetzung lässt sich durch den kompetitiven Hemmstoff der NO-Synthese L-NMMA komplett blockieren (Joannides et al., 1995).

Die Bestimmung der flussabhängigen Dilatation (FMD) ist ein seit Jahren etabliertes nichtinvasives Verfahren in der Diagnostik der Endothelialen Dysfunktion (Celermajer et al., 1992). Eine Einschränkung der FMD konnte für alle klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen werden: arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus (Arcaro et al., 2002; Kawano et al., 1999), Hypercholesterinämie (Celermajer et al., 1994) und Nikotinabusus (Celermajer et al., 1993) gehen mit einer reduzierten flussabhängigen Dilatation einher, insbesondere aber ist bei bestehender koronarer Herzerkrankung neben der koronaren auch die periphere Endothelfunktion eingeschränkt. Zwischen Schweregrad der Endothelfunktionsstörung und Ausprägung des kardiovaskulären Risikofaktors besteht ein direkter Zusammenhang, vor allem aber korreliert das Ausmaß der FMD mit dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung (Anderson et al., 1995; Neunteufl et al., 1997).

Bei Gesunden werden im allgemeinen Werte von 8-10 % FMD beschrieben, Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren zeigen Werte < 8%. Bei den hier untersuchten Patienten zeigte sich eine Fluß-abhängige Dilatation von $5.1 \pm 1.5\%$, wie zu erwarten also deutlich im pathologischen Bereich. Nach Oxypurinolinfusion konnte

ein signifikanter Anstieg auf $7.6\pm 1.5\%$ festgestellt werden, d. h. die periphere Endothelfunktion wurde nahezu normalisiert. Eine eingeschränkte periphere Endothelfunktion ist bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung ein eigenständiger Risikofaktor in Bezug auf kardiovaskuläre Ereignisse (Britten et al., 2004) und ist der eingeschränkten koronaren Endothelfunktion in dieser Funktion als Prädiktor der Prognose ebenbürtig (Takase et al., 2006). Medikamentöse Beeinflussungen der Endothelfunktion mittels ACE-Hemmern (Mancini et al., 1996) und CSE-Hemmern (Pitt et al., 1999) , aber auch nichtmedikamentöse Interventionen wie z. B. Ausdauertraining (Schuler et al., 1992), welche die endotheliale Funktion verbessern, korrelieren mit einer Verbesserung der Prognose der betroffenen Patienten. In diesem Licht erscheint die beobachtete Verbesserung der endothelialen Funktion durch Infusion von Oxypurinol ein vielversprechendes Therapieprinzip zur sekundären Mortalität von Patienten mit koronarer Herzerkrankung.

5.2.4. Korrelation der biochemischen Parameter

Nach der Infusion von Oxypurinol wurde die plasmatische Aktivität der Xanthinoxidase um 63 % reduziert. In Kombination mit den gemessenen Gefäßveränderungen wird der Beitrag der durch die Xanthinoxidase generierten Sauerstoffspezies noch unterschätzt: Durch Infusion höherer Dosen von Oxypurinol würde eine ausgeprägtere Hemmung der Xanthinoxidase erzielt werden und somit auch eine stärkere Beeinflussung der koronaren Vasomotilität. Dieses Konzept wird noch unterstützt durch die Eigenschaft der Xanthinoxidase, in gebundener Form im Verhältnis zu freier Xanthinoxidase noch größere Konzentrationen von Oxypurinol zur Inhibierung zu brauchen (Kelley et al., 2004). Weiterhin erhielten alle Patienten im Rahmen der Studie Heparin, welches zur Ablösung eines Teils der gefäßgebundenen Xanthinoxidase in das Plasma der Patienten führt (Landmesser et al., 2002). Somit könnte der Xanthinoxidase-abhängige NO-Katabolismus der Gefäßwand in Abwesenheit von Heparin noch ausgeprägter sein.

5.3. Ausblick

Die vorgelegte Studie wird durch ihre geringe Größe und das nichtrandomisierte und unverblindete Design limitiert. Trotzdem können in Anbetracht der deutlichen Verbesserung der koronaren Endothelfunktion in einer kleinen Population von Patienten, welche (a) mit leitliniengerechter Medikation behandelt wurden, (b) im Rahmen der Studie Heparin erhielten und (c) nach Infusion von der genannten Dosis Oxypurinol nur eine submaximale Hemmung der Xanthinoxidase erreichten, zwei Folgerungen gezogen werden: erstens haben die von der Xanthinoxidase erzeugten reaktiven Sauerstoffspezies einen Anteil an der Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und zweitens kann durch Hemmung der Xanthinoxidase ein Teil der normalen koronaren Endothelfunktion wiederhergestellt werden. Aus dem Nachweis einer Akutwirkung auf die makro- und mikrovaskuläre koronare Vasomotorik kann im Análogoschluß zum Mechanismus der Statine und Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten/ACE-Hemmer ein neues Wirkprinzip in der symptomatischen Therapie abgeleitet werden, andererseits ist eine Beeinflussung des koronaren Risikos in bestimmten Risikopopulationen (eben jenen Patienten mit eingeschränkter Endothelfunktion), ebenfalls in Analogie zu den großen medikamentösen Interventionsstudien mit ACE-Hemmern (Yusuf et al., 2000; Fox et al., 2003) und CSE-Hemmern (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994; Sacks et al., 1996; LIPID Study Group, 1998; Collins et al., 2002) als Wirkprinzip ableitbar. Unter diesem Blickwinkel würde eine entsprechend große randomisierte doppelblinde Studie mit Patienten den Stellenwert einer adäquaten und langfristigen Hemmung der Xanthinoxidase im Rahmen einer Strategie zur Therapie der koronaren Herzerkrankung klären, die beschriebene Studie kann hier nur als „proof of principle“ im Sinne einer „feasibility study“ in Vorleistung treten. In Anbetracht der großen sozioökonomischen Bedeutung der koronaren Herzerkrankung und der persönlichen Belastung des einzelnen Patienten wäre ein solches Therapieprinzip mit eingeführten, in ihren Nebenwirkungen klar definierten Wirkstoffen sicherlich zu begrüßen.

6. Zusammenfassung

Die koronare Endotheldysfunktion ist pathogenetisches Prinzip und Surrogatmarker mit starker prognostischer Bedeutung bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Als grundlegender Mechanismus liegt ein superoxidabhängiger Katabolismus von NO zugrunde. Die Bildung dieser reaktiven Sauerstoffspezies wird durch mehrere Enzymsysteme vermittelt, unter anderem durch die Xanthinoxidase, einem Molybdoenzym, welches von Endothelzellen exprimiert und gebunden wird. Durch die Xanthinoxidase werden im Rahmen der Oxidation von Purinen reaktive Sauerstoffspezies gebildet, welche mit dem endothelial gebildeten NO reagieren und so dessen Bioverfügbarkeit reduzieren. Ob die Xanthinoxidase an der Endotheldysfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt. Mit dieser Studie sollte untersucht werden, ob die Hemmung der Xanthinoxidase durch Oxypurinol die koronare und periphere Endotheldysfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und normalen Harnsäurespiegeln verbessert.

Methoden und Ergebnisse: Im Rahmen der Studie wurde bei 18 Patienten (65 ± 8 Jahre, 17 davon männlichen Geschlechts) mit angiographisch dokumentierter koronarer Herzerkrankung, erhaltener systolischer LV-Funktion und normalen Harnsäurespiegeln die koronare und periphere Endothelfunktion untersucht. Die Patienten erhielten steigende Dosen von intrakoronarem Acetylcholin (ACh, 10^{-7} to $10^{-5} \mu\text{M}$) als Provokationstest der Endothelfunktion. Der minimale lumenale Durchmesser und der koronare Blutfluss des Zielgefäßes (eines Astes der linken Koronararterie ohne signifikante Stenosen) wurden vor und nach der intravenösen Gabe von 200 mg Oxypurinol erfasst. Die Oxypurinolgabe reduzierte die Xanthinoxidase-Aktivität im Serum um 63% (0.051 ± 0.001 auf $0.019 \pm 0.005 \mu\text{U}/\text{mg Protein}$; $p < 0.01$). Von den 18 Patienten reagierten 5 mit einer Vasodilatation auf die höchste applizierte Acetylcholin-Dosis (Gruppe I), wohingegen Acetylcholin bei 13 Patienten zu einer Vasokonstriktion führte. In der Gruppe I blieb die Steigerung des MLD auch nach Oxypurinolgabe konstant (von $2.8 \pm 4.2\%$ auf $5.2 \pm 0.7\%$ auf Gabe von $10^{-5} \mu\text{M}$ Acetylcholin, $p > 0.05$) und die Zunahme des koronaren Blutflusses wurde durch Gabe von Oxypurinol nicht gesteigert (von $135 \pm 75\%$ auf $154 \pm 61\%$ auf Gabe von $10^{-5} \mu\text{M}$ Acetylcholin, $p > 0.05$). In der Gruppe II konnte die Gabe von Oxypurinol die Acetylcholin-induzierte Vasokonstriktion deutlich reduzieren (von $-23 \pm 4\%$ auf $-15 \pm 4\%$ unter $10^{-5} \mu\text{M}$ Acetylcholin, $p < 0.05$) und erhöhte den koronaren Blutfluss ebenfalls

signifikant (von $16\pm 17\%$ auf $62\pm 18\%$ unter $10^{-5}\mu\text{M}$ Acetylcholin, $p<0.05$). Die endotheliale Funktion der Unterarmgefäße wurde durch Messung der flußabhängigen Dilatation (FMD) bei 8 konsekutiven Patienten bestimmt, die FMD verbesserte sich signifikant als Reaktion auf die Oxypurinolgabe (von 5.1 ± 1.5 auf $7.6\pm 1.5\%$, $p<0.05$). Als Schlussfolgerung lässt sich ziehen, dass die Hemmung der Xanthinoxidase durch Oxypurinol die koronare und periphere Endotheldysfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und normalen Harnsäurespiegeln verbessert. Die Xanthinoxidase scheint an der reduzierten vaskulären Bioverfügbarkeit bei koronarer Herzerkrankung beteiligt zu sein, und eine Hemmung ihrer Aktivität könnte ein additives Therapiekonzept bei koronarer Herzerkrankung darstellen. Das genaue Ausmaß bleibt in weiteren Studien zu prüfen.

7. Literaturverzeichnis

Abadeh S, Case PC, Harrison R (1993) Purification of xanthine oxidase from human heart. *Biochem Soc Trans* 21: 99S.

Abadeh S, Killacky J, Benboubetra M, Harrison R (1992) Purification and partial characterization of xanthine oxidase from human milk. *Biochim Biophys Acta* 1117: 25-32.

Alp NJ, Channon KM (2004) Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 413-420.

Al Suwaidi J, Hamasaki S, Higano ST, Velianou JL, Araujo NA, Lerman A (2000) Long term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101: 948-954.

Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, Noda K, Nishino T, Nishino T (1990) Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. *J Biol Chem* 265: 14170-14175.

Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delegrange D, Lieberman EH, Ganz P, Creager A, Yeung AC, Selwyn AP (1995) Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation. *J Am Coll Cardiol* 26: 1235-1241.

Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, Bonadonna RC (2002) Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation* 105: 576-582.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl. Acad Sci USA* 74: 3203-3207.

Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parkes DA, Thompson JA, Tousson A, Gladwin MT, Patel RP, Tarpey MM, Batinic-Haberle I, White CR, Freemann BA (2001) Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15215-15220.

Assoian RK, Marcantonio EE (1996) The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 98: 2436-2439.

Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T (1993) Control of cardiac smooth muscle cell function by an endogenous nitric oxide signalling system. *Proc Natl Acad Sci* 90: 347-351.

Balligand JL, Kelly RA, Smith TW (1997) Cardiac endothelium and tissue growth. *Prog Cardiovasc Dis* 39: 351-60.

Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, Runge MS (2001) p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest* 108: 1513-1522.

Beckman JS, Koppenol, WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: 1424-1437.

Blann AD, Lip GY (1998) Endothelial integrity, soluble adhesion molecules and platelet markers in type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 15: 634-642.

Boren J, Gustafsson M, Skalen K, Flood C, Innerarity TL (2000) Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11: 451-456.

Bouloumie A, Bauersachs J, Linz W, Scholkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R (1997) Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension* 30: 934-941.

Braunwald E (1997) Shattuck lecture - cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 337:1360-1369.

Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682-685.

Britten M, Zeiher AM, Schächinger VM (2004) Microvascular dysfunction in angiographically normal or mildly diseased coronary arteries predicts adverse cardiovascular long-term outcome. *Coron Artery Dis* 15: 259-264.

Brookes SJ (1993) Neuronal nitric oxide in the gut. *J Gastroenterol Hepatol* 8: 590-603.

Brown MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 52: 223-261.

Brown JM, Terada LS, Grosso MA, Whitmann GJ, Velasco SE, Patt A, Harken AH, Repine JE (1988) Xanthine oxidase produces hydrogen peroxide which contributes to reperfusion injury of ischemic, isolated, perfused rat hearts. *J Clin Invest* 81: 1297-1301.

Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 257: 401-403.

Busse R, Mülsch A (1990a) Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 275 : 87-90.

Busse R, Mülsch A (1990b) Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 265 : 133-136.

Busse R, Fleming A, Heckler M (1993) Signal transduction in endothelium-dependent vasodilation. *Eur Heart J* 14: 12-19.

Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD (2000) Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension* 35:746-751.

Calver A, Collier J, Vallance P (1992) Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 90 : 2548-2554.

Cameron JS, Simmonds HA (1987) Use and abuse of allopurinol. *Br Med J* 294 : 1504.

Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Quyyumi AA, Panza JA (1997) Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 30:57-63.

Castelli P, Condemi AM, Brambillasca C, Fundaro P, Botta M, Lemma M, Vanelli P, Santoli C, Gatti S, Riva E (1995) Improvement of cardiac function by allopurinol in patients undergoing cardiac surgery. *J Cardiovasc Pharmacol* 25: 119-125.

Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelthaler DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE (1992) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and young adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340: 1111-1115.

Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE (1993) Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 88: 2149-2155.

Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE (1994a) Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 24: 1468-1474.

Celermajer SD, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE (1994b) Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 24: 471-476.

Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R (1981) Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol* 89: 379-383.

Channon KM, Qian H, Neplioueva V, Blazing MA, Olmez E, Shetty GA, Youngblood SA, Pawlowski J, McMahon T, Stamler JS, George SE (1998) In vivo gene transfer of nitric oxide synthase enhances vasomotor function in carotid arteries from normal and cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 98: 1905-1911.

Chauhan A, More RS, Mullins PA, Taylor G, Petch C, Schofield PM (1996) Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 28: 1796-1804.

Clarkson P, Adams MR, Powe AJ, Donald AE, McCredie R, Robinson J, McCarthy SN, Keech A, Celermajer DS, Deanfield JE (1996) L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* 97: 1989-1994.

Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R for the heart Protection Study Collaborative Group (2002) MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 5964 people with diabetes: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 360: 7-22.

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 (2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 39: 257-265.

Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79: 984-991.

Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ (1990) Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 86: 228-234.

Cybulski MI, Gimbrone MA (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251: 788-791.

Cybulski MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS (2001) A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107: 1255-1262.

Davies MJ (1996) Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 94: 2013-2020.

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavastish TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96: 60-68.

De Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ (1992) Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85: 2284-2290.

Della Corte E, Gozetti G, Novello F, Stirpe F (1969) Properties of the xanthine oxidase from human liver. *Biochim Biophys Acta* 191: 164-166.

Dietz R, Rauch B (2003) Leitlinie zur Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzerkrankung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung. *Z Kardiol* 92: 501-521.

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

Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM, Quyyumi AA (1998) Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation* 98: 17-24.

Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD (1998) The combined role of P- and E-Selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102: 145-152.

Doyle MP, Hoekstra JW (1981) Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem* 25: 2676-2677.

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H (1991) Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. *Lancet* 338: 1546-1550.

Duffy SJ, Castle SF, Harper RW, Meredith IT (1999) Contribution of vasodilator prostanoids and nitric oxide to resting blood flow, metabolic vasodilation and flow-mediated dilation in human coronary circulation. *Circulation* 100: 1951-1957.

Egashira K, Kirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Inou T, Takeshita A (1994) Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation* 89: 2519-2524.

Falk E, Shah P, Fuster V (1995) Coronary plaque disruption. *Circulation* 92: 657-671.

Fleming I, Busse R (1999) Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 43: 532-541.

Fox K.M. for the EUROPA Investigators (2003) Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease:

randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 362: 782-788.

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

Gage JE, Hess OM, Murakami T, Ritter M, Grimm J, Krayenbühl HP (1986) Vasoconstriction of stenotic coronary arteries during dynamic exercise in patients with classical angina pectoris: reversibility by nitroglycerine. *Circulation* 73: 865-876.

Garg UC, Hassid A (1989) Nitric-oxide generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1774-1777.

Gimbrone MA(1995) Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 75: 67B-70B.

Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 104: 503-516.

Golino P, Piscione F, Willerson JT, Cappelli-Bigazzi J, Focaccio A, Villari B, Indolfi C, Russolillo E, Condorelli M, Chiariello M (1991) Divergent effects of serotonin on coronary artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med* 324: 641-648.

Gordon JB, Ganz P, Nabel EG, Fish RD, Zebede J, Mudge GH, Alexander RW, Selwyn AP (1989) Atherosclerosis influences the vasomotor response of epicardial coronary arteries to exercise. *J Clin Invest* 83: 1946-1952.

Gow AJ, Stamler JS (2001) Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 391: 169-173.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501.

Groves P, Kurz S, Just H, Drexler H (1995) Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. *Circulation* 92: 3424-3430.

Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG (2003) Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation* 107: 416-421.

Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM (2000) Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86: E85-E90.

Haefeli WE, Linder L, Lüscher TF (1997) Quinaprilat induces arterial vasodilation mediated by nitric oxide in humans. *Hypertension* 30: 912-917.

Hansson GK (1995) Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 8: 301-311.

Hansson GK und Nilsson J (2003) Pathogenesis of atherosclerosis. In: Crawford MH, DiMarco JP, Paulus WJ (ed.) *Cardiology*, Mosby, Edinburgh London New York, 2nd ed.

Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: 1685-1695.

Hartwell DW, Wagner DD (1999) New discoveries with mice mutants in endothelial and platelet selectins. *Thromb Haemost* 82:850-857.

Hasdai D, Gibbons RJ, Holmes DR, Higano ST, Lerman A (1997) Coronary endothelial dysfunction is associated with myocardial perfusion defects. *Circulation* 96: 3390-3395.

He P, Zeng M, Curry FE (1997) Effect of nitric oxide synthase inhibitors on basal microvessel permeability and endothelial cell $[Ca^{2+}]_i$. *Am J Physiol* 273: H747-H755.

Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Münzel T (2000a) Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res* 86: E36-E41.

Heitzer T, Albers S, Krohn K, Meinertz T (2000b) Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 43: 1435-1438.

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

Hille R, Nishino T (1995) Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 9: 995-1003.

Hornig B, Kohler C, Drexler H (1997) Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation* 95: 1115-1118.

Hornig B, Landmesser U, Kohler C, Ahlersmann D, Spiekermann S, Christoph A, Tatge H, Drexler H (2001) Comparative effect of ACE inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease.: role of superoxide dismutase. *Circulation* 103: 799-805.

Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA (1999) Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* 274: 4985-4994.

Huang PI, Huang Z, Mashimo H, Block KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242.

Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269.

Ignarro, L.J. 2000. Introduction and Overview. In *Nitric oxide. Biology and Pathobiology*. L.J. Ignarro, Hrsg. San Diego: Academic Press. 3-22.

Ingwall JS, Kelly RA (1998) Nitric oxide, myocardial oxygen consumption and ATP synthesis. *Circ Res* 83: 1067-1068.

Jarasch ED, Bruder G, Heid HW (1986) Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand* 548: 39-46.

Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW (1981) Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 25: 67-82.

Joannides R, Haefeli WE, Lindner L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF (1995) Nitric Oxide is responsible for flow-dependent dilation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91: 1314-1319.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986) Regional accumulation of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6: 131-138.

Kawano H, Motoyama T, Hirashimal, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H (1999) Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 34: 146-154.

Keaney JF, Xu A, Cunningham D, Jackson T, Frei B, Vita JA (1995) Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J Clin Invest* 95: 2520-2529.

Kelley EE, Trostchansky A, Rubbo H, Freeman BA, Radi R, Tarpey MM (2004) Binding of xanthine oxidase to glycosaminoglycans limits inhibition by oxypurinol. *J Biol Chem* 279: 37231-37234.

Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA (1999) Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* 33: 1353-1358.

Krenitsky TA, Tuttle JV, Cattau EL, Wang P (1974) A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp Biochem Physiol B* 49: 687-703.

Kubes P, Kurose I, Granger DN (1994) NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not p-selectin-dependent rolling in postischemic venules. *Am J Physiol* 267: H931-937.

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K (2000) The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6: 1004-1010.

Kussmaul WG (2003) Invasive diagnosis of ischemic heart disease. In: Crawford MH, DiMarco JP, Paulus WJ (ed.) *Cardiology*, Mosby, Edinburgh London New York, 2nd ed.

Lancaster JR (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produce nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8137-8141.

Landmesser U, Harrison DG (2001) Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: ox marks the spot. *Circulation* 104: 2638-2640.

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H (2002) Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in

patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 106: 3073-3078.

Laufs u Fata V, Plutzky J, Liao J (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97: 1129-1135.

Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PI, Scalia R (1999) Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric-oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 276: H1943-1950.

Leonard EJ, Yoshimura T (1990) Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 11: 97-101.

Li H, Förstermann, U (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190: 244-254.

Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.

Liew FY, Cox FE (1991) Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today* 12: A17-21.

Linder N, Rapola J, Raivio KO (1999) Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory Invest* 79: 967-974.

Lipton SA, Singel DJ, Stamler JS (1994) Nitric oxide in the nervous system. *Prog Brain Res* 103: 359-364.

Long-term intervention with Pravastatin in ischemic heart failure (LIPID) Study Group (1998) Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 339: 1349-1357.

Ludmer P.L., Selwyn A.P., Shook T.L., Wayne R.R., Mudge G.H., Alexander R.W., Ganz P (1986) Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315: 1046-1051.

Lundberg JM (1993) New aspects on airway innervation. *Pharmacol Toxicol* 72: S21-S27.

Mancini GBF, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucill AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Lüscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard ACG, Pepine C, Pitt B (1996) Angiotensin converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in Patients with coronary artery disease. *Circulation* 94: 258-265.

Mansur AP, Serrano CV, Nicolau JC, Cesar LA, Ramires JA (1999) Effect of cholesterol lowering treatment on positive exercise tests in patients with hypercholesterolemia and normal coronary angiograms. *Heart* 82: 689-693.

Marcus ML, Chilian WM, Kanatsuka H, Dellsperger KC, Eastham CI, Lamping KG (1990) Understanding the coronary circulation through studies at the microvascular level. *Circulation* 82: 1-7.

Marshall HE, Hess DT, Stamler JS (2004) S-nitrosylation: physiological regulation of NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8841-8842.

McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H, Harrison DG (2003) Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2290-2297.

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

Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S (1996) cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide:

confirmation using an inhibitor of the soluble guanylat cyclase. Proc Natl Acad Sci USA 93: 1480-1485.

Mügge A, Brandes RP, Boger RH, Dwenger A, Bode-Boger S, Kienke S, Frölich JC, Lichtlen PR (1994) Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rats. J Cardiovasc Pharmacol 24: 994-998.

Murray CJ, Lopez AD (1997) Global mortality, disability and the distribution of risk factors: Global burden of disease study. Lancet 349: 1436-1442.

Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F (1997) Systemic endothelial dysfunction related to the extent and severity of coronary artery disease. Atherosclerosis 129:111-118.

Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wolfl G, Kostner K, Maurer G, Weidinger F (2000) Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. Am J Cardiol 86: 207-210.

Nickenig G, Baumer AT, Temur Y, Kebben D, Jockenhövel F, Böhm M (1999) Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. Circulation 100: 2131-2134.

Nickenig G, Stablein A, Wassmann S, Wyen C, Müller C, Böhm M (2000) Acute effects of ACE inhibition on coronary endothelial dysfunction. J Renin Angiotensin Aldosterone System 1: 361-364.

Niemann-Jonsson A, Dimayuga P, Jovinge S, Calara F, Ares MP, Fredrikson GN, Nilsson J (2000) Accumulation of LDL in rat arteries is associated with activation of tumor necrosis factor-alpha expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:2205-2211.

Nordestgaard BG (1996) The vascular endothelial barrier – selective retention of lipoproteins. Curr Opin Lipidol 7: 269-273.

O'Driscoll G, Green D, Taylor RR (1997) Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, improves endothelial function within 1one month. *Circulation* 95: 1126-1131.

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91: 2546-2551.

Palkama T (1991) Induction of interleukin-1 production by ligands binding to the scavenger receptor in human monocytes and the THP-1 cell line. *Immunology* 74: 432-438.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE (1990) Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27.

Parks DA, Granger DN (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 548: 87-99.

Patetsios P, Song M, Shutze WP, Pappas C, Rodino W, Ramirez JA, Panetta TF (2001) Identification of uric acid and xanthine oxidase in atherosclerotic plaque. *Am J Cardiol* 88: 188-191.

Pfeffer K, Hueckstaedt T, Hoidal JR (1994) Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells: cytokine and steroid regulation. *J Immunol* 153: 1789-1797.

Pitt B , Waters D, Brown WV, van Boven AJ, Schwartz L, Title LM, Eisenberg D, Shurzinske L, McCormick LS (1999) Aggressive lipid lowering therapy compared with angioplasty in stable coronary artery disease. Atorvastatin versus revascularization treatment investigators. *N Engl J Med* 341: 70-76.

Poss WB, Hueckstaedt T, Panus PC, Freeman BA, Hoidal JR (1996) Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia. *Am J Physiol* 270: L941-L946.

Prasad A, Halcox JP, Waclawin MA, Quyyumi AA (2001) Angiotensin type 1 receptor antagonism reverses abnormal coronary vasomotion in atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 38: 1089-1095.

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

Quyyumi AA, Cannon RO, Panza JA, Diodati JG, Epstein SE (1992) Endothelial dysfunction in patients with chest pain and normal coronary arteries. *Circulation* 86: 1864-1871.

Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO (1995a) Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation* 92: 320-326.

Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO (1995b) Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 95: 1747-1745.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* 96: 1513-1519.

Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ (1990) Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344: 254-257.

Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JM (1994) Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 23: 833-843.

Reilly MP, Pratico D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA (1998) Increases formation of distinct F2 isoprostane in hypercholesterolemia. *Circulation* 98: 2822-2828.

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

Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC (1998) Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101: 731-736.

Sacks FM, Pfeffer MA, Lemuel AM, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun VV, Davis BR, Braunwald E (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with coronary heart disease and normal cholesterol levels. *N Engl J Med* 335: 1001-1009.

Saito T, Nishino T (1989) Differences in redox and kinetic properties between NAD-dependent and O₂-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem* 264: 10015-10022.

Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344: 1383-1389.

Schuler G, Hambrecht R, Schlierf G, Niebauer J, Hauer K, Neumann J, Hoberg E, Drinkmann A, Bacher F, Grunze M et al. (1992) Regular physical exercise and low fat diet. Effects on progression of coronary artery disease. *Circulation* 86: 1-11.

Selvanayagam JB, Jerosch-Herold M, Porto I, Sheridan D, Cheng AS, Petersen SE, Searle N, Channon KM, Banning AP, Neubauer JS (2005) Resting myocardial blood flow is impaired in hibernating myocardium: a magnetic resonance study of quantitative perfusion assessment. *Circulation* 112: 3289-3296.

Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M. Prelesional events in atherogenesis: accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* 123: 109-125.

Sobey CG, Dalipram RA, Dusting GJ, Woodman OL (1992) Impaired endothelium-dependent relaxation of dog coronary arteries after myocardial infarction and reperfusion: prevention by amlodipin, propranolol and allopurinol. *Br J Pharmacol* 105: 557-562.

Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE (1994) Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein (a) level. *J Clin Invest* 93: 50-55.

Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez G, Tatge H, Reepschlager N, Hornig B, Drexler H, Harrison DG (2003) Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 107: 1383-1389.

Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994) A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. A report of the committee on Vascular lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89: 2462-2478.

Steinberg D (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272: 20963-20966.

Stirpe F, Della Corte E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase – conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863.

Stuehr DJ, Marletta MA (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7738-7742.

Sudhir K, MacGregor JS, Gupta M, Barbant SD, Redberg R, Yock PG, Chatterjee K (1993) Effect of selective angiotensin II receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition on the coronary vasculature in vivo. Intravascular two-dimensional and Doppler ultrasound studies. *Circulation* 87: 931-938.

Suga HH (1990) Ventricular energetics. *Physiol Rev* 70: 247-277.

Takase B, Hamabe A, Satomura K, Akima T, Uehata A, Matsui T, Ohsuzu F, Ishihara M, Kurita A (2006) Comparable prognostic value of vasodilator response to acetylcholine in brachial and coronary arteries for predicting long-term cardiovascular events in suspected coronary artery disease. *Circ J* 70: 49-56.

Tamai O, Masuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T (1997) Single LDL apheresis improves endothelium dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 95: 76-82.

Terada LS, Piermattei D, Shibao GN, McManaman JL, Wright RM (1997) Hypoxia regulates xanthine dehydrogenase activity at pre- and posttranslational levels. *Arch Biochem Biophys* 348: 163-168.

Theilmeyer G, Chan JR, Zalpour C, Anderson B, Wang BY, Wolf A, Tsao PS, Cooke JP (1997) Adhesiveness of mononuclear cells in hypercholesterolemic humans is normalized by dietary L-arginine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 3557-3564.

Tiefenbacher CP, Bleeke P, Vahl C, Amann K, Vogt A, Kübler W (2000) Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation* 102: 2172-2179.

Titheradge MA (1999) Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1141: 437-455.

Thomas DD, Liu X, Kantrow S, Lancaster JR Jr. (2001) The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 355-360.

Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP (1996) Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 94: 1682-1689.

Tsao PS, Theilmeier G, Singer AH, Leung LL, Cooke JP (1994) L-arginine attenuates platelet reactivity in hypercholerolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 14: 1529-1533.

Usada N, Reddy MK, Hashimoto T, Rao MS, Reddy JK (1988) Tissue specificity and species differences in the distribution of urate oxidase in peroxisomes. *Laboratory Invest* 58: 100-111.

Vallance P, Collier J, Moncada S (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in men. *Lancet* 322: 997-1000.

Vallance P, Moncada S (1991) Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 337: 777-778.

Van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE (1989) Atherosclerotic lesions in humans: in situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 61: 166-170.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9220-9225.

Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachem JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selvy AP, Ganz P (1990) Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 81: 491-497.

Vita JA, Keaney JF (2002) Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 106: 640-642.

von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ (1995) Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1137-1141.

von der Leyen HE, Dzau VJ (2000) Therapeutic potential of nitric oxide synthase gene manipulation. *Circulation* 103: 2760-2765.

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Müntzel T (1999) Increased NADH-oxidase mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the rennin-angiotensin system. *Circulation* 99: 2027-2033.

Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Müller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rosen R, Böhm M, Nickenig G (2000) HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 37: 1450-1457.

Waud WR, Rajagopalan KV (1976) The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O). *Arch Biochem Biophys* 172: 365-379.

Werns SW, Walton JA, Hsia HH, Nabel EG, Sanz ML, Pitt B (1989) Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation* 79: 287-291.

White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, Parks DA, Tarpey MM, Freeman BA (1996) Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8745-8749.

Wilson RF, Laughlin DE, Ackell PH, Chilian WM, Holida MD, Hartley CJ, Armstrong ML, Marcus ML, White CW (1985) Transluminal subselective measurement of coronary artery blood flow velocity and vasodilator reserve in man. *Circulation* 72: 82-92.

Yada T, Richmond KN, Van Bibber R, Kroll K, Feigl EO (1999) Role of adenosine in local metabolic coronary vasodilation. *Am J Physiol* 276: H1425-1433.

Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, Vita JA, Ryan TJ, Ganz P, Selwyn AP (1991) The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med* 325: 1551-1556.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G for the Heart outcomes prevention evaluation study Investigators (2000) Effects of an Angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 342: 145-153.

Zeicher AM, Drexler H, Wollschlaeger H, Saurbier B, Just H (1989) Coronary vasomotion in response to sympathetic stimulation in humans: importance of the functional integrity of the endothelium. *J Am Coll Cardiol* 14: 1181-1190.

Zeicher AM, Drexler H, Wollschlaeger H, Just H (1991a) Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 83: 391-401.

Zeiber AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H (1991b) Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 84: 1984-1992.

Zeiber AM, Schächinger V, Minners J (1995) Long-term smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 92: 1094-1100.

Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP, Marletta MA (1999) a molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14753-14758.

Zhuo M, Small SA, Kandel ER, Hawkins RD (1993) Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 260: 1946-1950.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. R. Köster sowie Herrn Privatdozent Dr. med. S. Baldus für die Überlassung des Themas. Ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die prompten und klar formulierten Anleitungen und Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. T. Meinertz danke ich für die Möglichkeit einer Dissertation an der Klinik für Kardiologie .

Bei Herrn Professor Dr. med. J. Berger und dem Team des Institutes für Mathematik und Datenverarbeitung in der Medizin bedanke ich mich für die Beratung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Schließlich danke ich meinen Eltern Hedda Koss und Dipl. Ing. Klaus Koss für die jahrelange Unterstützung in jeder Hinsicht. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

9. Lebenslauf

Klaus Gustav Koss

Schwerinstr. 57

40476 Düsseldorf

11.03.1973 geboren in München

Schulbildung

1979-1983 Grundschule an der Jahnstraße, Unterhaching

1983-1992 Gymnasium Unterhaching

1992 Abitur

Hochschulausbildung

1992-1994 Studium der Physik, Chemie und Anglistik an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

1994-1996 Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität, Budapest

1993 Ärztliche Vorprüfung

1996-2000 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig

1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2000-2001 Studium der Humanmedizin, Praktisches Jahr, an der Friedrich-Wilhelms-Universität, Münster

2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

2002 Arzt im Praktikum, Klinik für Kardiologie und Angiologie der Friedrich-Wilhelms-Universität, Münster

2002-2003 Arzt im Praktikum, Klinik für Kardiologie und Angiologie der Universität Hamburg

2003 Assistenzarzt, Klinik für Kardiologie, Herzzentrum Segeberg

2004-2006 Assistenzarzt, Klinik für Kardiologie, Helios Klinikum Wuppertal

2007 Assistenzarzt, Klinik für Innere Medizin, EVK Mettmann

2008 Assistenzarzt, Klinik für Kardiologie, Helios Klinikum Wuppertal

10. Erklärung

Eidesstattliche Versicherung:

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

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

Unterschrift:

(Klaus G. Koss)