

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum
Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. T. Meinertz

Wirkung von Valsartan und Fluvastatin auf den oxidativen Stress und die Synthese atherogener Zytokine bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Anna Henriette Fischer
aus Münster

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.11.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Jan Kähler

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachterin: PD Dr. Ralf Köster

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Beil

Diese Arbeit widme ich meiner Mutter

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	7
2. EINLEITUNG	9
2.1 Hintergrund	9
2.2 Koronare Herzkrankheit und Atherogenese	9
2.3 Inflammation, oxidativer Stress und deren Marker	10
2.3.1 Endothelin-1 als Marker für Inflammation.....	12
2.3.2 CD40 LIGAND als Inflammationsmarker	15
2.3.3 ICAM-1 als Marker für Inflammation.....	16
2.3.4 8-iso-Prostaglandin-F2 α als ein in vivo Marker für oxidativen Stress	17
2.4 Endothelfunktion	17
2.5 AT-1-Rezeptorblocker und Statine: Valsartan und Fluvastatin	19
2.5.1 AT-1-Rezeptorblocker Valsartan	19
2.5.2 HMG-CoA-Reduktasehemmer Fluvastatin	20
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	24
3.1.2 Ausschluss von Patienten aus der Studie.....	25
3.2 Ethische Aspekte	25
3.2.1 Patienteninformation und Einwilligungserklärung.....	26
3.2.2 Dokumentation	26
3.2.3 Probandenversicherung	26
3.3 Ablauf der Studie	26
3.3.1 Visite 1	28
3.3.2 Visite 2	28
3.3.3 Visite 3	29
3.3.4 Visite 4	29
3.3.5 Visite 5	30
3.4 Anamneseerhebung und klinische Untersuchung	30
3.5 Klinisch-chemische Blut- und Urinuntersuchungen	31
3.5.1 Quantitative Bestimmung der Big Endothelin-1 Proteinkonzentration.....	33
3.5.2 Bestimmung von CD40 Ligand.....	35
3.5.3 Quantitative Bestimmung der human soluble Intracellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1) Proteinkonzentration	36
3.5.4 Isoprostane im Urin.....	38
3.5.5 Weitere Laborparameter.....	41
3.6 Untersuchung der Endothelfunktion	42
3.6.1 Flow mediated Dilatation (FMD)- Flussabhängige Dilatation.....	42
3.6.2 Nitro mediatet Dilatation (NMD)- Endothelunabhängige Dilatation	44

3.7	Messung des 24-Stunden-Blutdruckes	45
3.8	Angewandte statistische Verfahren	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1.	Patientenkollektiv	47
4.1.1	Klinische Daten der untersuchten Patienten	47
4.2.	Beeinflussung der Endothel-Funktion durch Valsartan und Fluvastatin	48
4.2.1	Endothelabhängige Dilatation (FMD)	48
4.2.2	Endothelunabhängige Dialatation (NMD)	49
4.3	Auswirkung auf den durchschnittlichen systolischen und diastolischen Blutdruck unter medikamentöser Behandlung mit Valsartan und Fluvastatin	49
4.3.	Effekte von Valsartan und Fluvastatin auf die biochemischen Parameter	51
4.3.1	Beeinflussung der Blutfette (Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Triglyceride)	51
4.3.3	Auswirkungen auf den CD40-Liganden	58
4.3.4	Wirkungen auf Big- Endothelin-1	59
4.3.5	Effekte auf sICAM-1	60
4.3.6	Auswirkungen auf 8-iso-Prostaglandin F2a im Urin	61
5	DISKUSSION	62
5.1	Einfluss von Mono- oder Kombinationstherapie mit Valsartan und Fluvastatin auf die Endothelfunktion	62
5.2	Einfluss von Mono- oder Kombinationstherapie mit Valsartan und Fluvastatin auf die Synthese atherogener Zytokine	63
5.2.1	Endothelin-1	63
5.2.3	Isoprostane	65
5.2.3	CD40 Ligand	66
5.3	Einfluss von Mono- oder Kombinationstherapie mit Valsartan und Fluvastatin auf Blutfette	67
5.4	Limitation der Studie	67
5.5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	68
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	70
7	LITERATUR	72
8	DANKSAGUNG	81
9	LEBENS LAUF	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	82
11	ANHANG	84

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass AT1-Rezeptor-Blocker und HMGCoA-Inhibitoren über antioxidative Eigenschaften verfügen. Ein stimulierender Effekt von Angiotensin II auf die Synthese von Sauerstoffradikalen konnte ebenfalls beschrieben werden, allerdings liegen kaum Daten bezüglich der in der weiteren Reaktionskaskade folgenden Effekte vor. Dies beinhaltet z.B. die Effekte von Zytokinen, wie beispielsweise Endothelin-1 aber auch Enzymen, die eine Bedeutung in der Pathogenese der Atherosklerose haben wie z.B. die Myeloperoxidase.

In bisherigen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte unter Verwendung von A. mammaria Segmenten gezeigt werden, dass Angiotensin II die Synthese proatherogener Substanzen wie Endothelin-1 über eine Erhöhung der Sauerstoffradikalesynthese stimuliert.

Weiterhin konnte in vorausgegangenen Studien gezeigt werden, dass in Arteria mammaria interna-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit nach präoperativer Behandlung mit ACE-Hemmern, AT1-Rezeptorantagonisten bzw. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren eine verringerte Expression der endothelialen Rezeptoren für oxidiertes LDL ausgebildet haben. Das spricht für ein antiatherosklerotisches Potenzial dieser primär antihypertensiven und lipidsenkenden Therapeutika.¹

Die Hypothese der vorliegenden Untersuchung ist, dass sich das antioxidative Potenzial von AT1-Rezeptor-Blocker und HMGCoA-Inhibitoren quantitativ und qualitativ unterscheidet und nicht von der blutdrucksenkenden beziehungsweise der lipidsenkenden Wirkung abhängig ist. Die antioxidative Wirksamkeit von AT-1 Blockern und Statinen beruht auf der Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Bei AT1-Rezeptorantagonisten kommt es zu einer vollständigen Blockade der AT-1 Rezeptoren, welche die gesteigerte Radikalbildung durch Angiotensin II vermitteln. Der Einfluss der Statine beruht vor allem auf der verminderten Expression des AT1-Rezeptors und wichtiger NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und wirkt ebenfalls über die erhöhte Expression und Aktivität der Katalase direkt zellulär antioxidativ.

Die differenzierende Charakterisierung dieser Effekte ist von großer klinischer Bedeutung, da sie wesentlichen Aufschluss über die relevanten Mechanismen *in vivo* geben können. Weiterhin ist bisher unklar, ob beide Substanzgruppen in Kombination additive oder möglicherweise überadditive Effekte generieren.

In dieser Studie soll die antiatherogene Wirkung von Fluvastatin und Valsartan bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (KHK) überprüft werden. Als Surrogatparameter dienen hierbei Marker für vaskuläre Inflammation und oxidativen Stress sowie die endotheliale Funktion.

Primärer Endpunkt ist der Effekt von Valsartan und Fluvastatin auf die flussabhängige Unterarm-Arterien-Dilatation.

Sekundärer Endpunkte sind der Einfluss von Valsartan und Fluvastatin auf den oxidativen Stress, der bestimmt wird via Konzentration von Endothelin-1, CD40, ICAM-1 und Isoprostanen.

2. EINLEITUNG

2.1 Hintergrund

Nach wie vor stellen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems die häufigste Todesursache der westlichen Nationen dar. Im Jahr 2007 erlag fast jeder zweite Gestorbene (43,4 %), den Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems.² Hauptursachen für die Entwicklung atherogener Veränderungen der Gefäße sind Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Nikotinabusus.³

2.2 Koronare Herzkrankheit und Atherogenese

Durch die Einwirkung „atherogener Risikofaktoren“, wie die der ersten Ordnung (arterieller Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörungen, Nikotin und Diabetes mellitus) und der zweiten Ordnung (Übergewicht, Bewegungsarmut und Stress) kommt es unter Entstehung von oxidativem Stress zu Schädigungen des Endothels. Durch die extrazelluläre Akkumulation von oxidativ modifiziertem LDL-Cholesterin in der Intima, kommt es zur Einwanderung von Leukozyten in das Endothel und zum Beginn der Atherombildung.

Makrophagen nehmen oxidiertes LDL auf und werden zu sogenannten Schaumzellen. Durch die Migration und anschließender Proliferation von glatten Muskelzellen in das Atherom kommt es zur Fibrosierung- sowie konsekutiv zur Kalzifizierung des atherosklerotischen Plaque. Die Ruptur einer Plaque und das Freiwerden thrombogener Substanzen kann zum akuten Koronarsyndrom, Herzinfarkt oder Schlaganfall führen.⁴

Die Schädigung des Endothels während der Plaqueprogression und die somit entstehende Permeabilität für Lipoproteine und andere zirkulierende Stoffe im Plasma hat zur Folge, dass Endothelzellen aktiviert werden und vermehrt so genannte Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche exprimieren. Bestimmte Adhäsionsmoleküle, vor allem so genannte Selektine,

vermitteln zunächst den temporären Kontakt bestimmter Blutzellen wie Monozyten und T-Lymphozyten mit dem Endothel. Durch eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, „Vascular Adhesion Molecules“ (VCAMs) und „Intercellular Adhesion Molecules“ (ICAMs), kommt es zur festen Anheftung dieser Zellen an die Gefäßwand und schließlich deren Einwanderung in die Zellwand.⁵

Normales Attribut des aeroben Lebens ist die strukturelle Schädigung einer Vielzahl von Verbindungen durch Oxidation. Die oxidative Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies wird oxidativer Stress genannt.⁶

Heute weiß man, dass die Atherogenese als eine chronisch inflammatorische Erkrankung betrachtet werden kann. Die Entstehung von oxidativem Stress spielt hierbei eine große Rolle:

- zum einen bei der Initiation, - sowie bei der Progression der Atherosklerose.

Die aktuelle Hypothese geht davon aus, dass es bei Atheroskleroseentstehung zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti- inflammatorischen Faktoren zu Gunsten der ersteren gekommen ist.¹¹

2.3 Inflammation, oxidativer Stress und deren Marker

Inflammation ist das Resultat körpereigener Abwehr auf einen äußerlich oder innerlich ausgelösten Reiz. Deren Funktion ist es, einen gewebeschädigenden Reiz, wie er zum Beispiel auch in Gefäßen stattfindet, zu beseitigen.

Dabei findet eine komplexe Reaktion unter Beteiligung mehrerer Abwehrezellen (Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten/ Makrophagen und Dendritischen Zellen)^{12 13} aber auch Gefäßzellen (Endothelzellen und glatte Muskelzellen) statt. Thrombozyten spielen ebenfalls eine Rolle in entzündlichen Prozessen.¹⁴ Zudem haben verschiedene Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren einen Einfluss auf Entzündungsreaktionen.^{15 16 17}

Der Körper versucht durch anti- inflammatorische Mechanismen der Inflammation gegenzusteuern und somit die Integrität der Gefäßwand zu erhalten. Zu diesen anti-inflammatorischen Mechanismen gehören das Endothel, high density Lipoproteine (HDL), anti-adhäsive Faktoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TGF- β , Interleukin-10, Interleukin-1-Rezeptorantagonist und Interleukin-4.^{14 18} Durch diese Mechanismen entstehen messbare Marker im Organismus. Dazu gehören zum Beispiel Endothelin-1, CD- 40 Ligand und ICAM-1, welchen in dieser Studie vermehrt Beachtung geschenkt wurde.

Inflammation führt außerdem zu oxidativem Stress. Dieser entstehend durch Sauerstoffoxidation und der daraus resultierenden Produktion freier Radikale, wie zum Beispiel reaktiven Sauerstoffspezies.

Der menschliche Organismus unterliegt einem pausenlosen Angriff von reaktiven Sauerstoffspezies. Unter pathologischen Bedingungen ist die antioxidative Kapazität des Organismus nicht ausreichend, so dass übermäßiger oxidativer Stress zu schweren zellulären Schäden im ganzen Körper führt mit daraus resultierenden Erkrankungen.

Der quantitativen Erfassung von oxidativem Stress in vivo kommt daher eine besondere Bedeutung zu. In Abhängigkeit vom Ort der Entstehung des oxidativen Stresses kommen verschiedene endogen gebildete Substanzen als Marker und Indikatoren des oxidativen Stresses in Frage, wie zum Beispiel Superoxidanionen. Nach Aktivierung stellen verschiedene Zellen eine wichtige Quelle für Superoxidanionen dar. Makrophagen besitzen eine enzymatische Ausstattung zur Bildung von Superoxidanionen. Auch Endothelzellen können in Form einer NAD(P)-Oxidase selbst Superoxidanionen bilden.

Kürzlich zeigte sich, dass 8-Isoprostan ein chemisch stabiler quantitativer Marker für oxidativen Stress ist. Isoprostane sind spezifische Produkte der Lipid Peroxidation die sowohl im Serum als auch im Urin nachgewiesen werden können.¹⁹

Die Bestimmung von Markern für Inflammation und oxidativen Stress ist von großem Interesse. Sie sind Indikatoren, die man leicht messen kann, haben meist eine Aussagekraft im Bezug auf den Umfang beziehungsweise den Aktivitätsgrad der Erkrankung und sind oft gute Indikatoren für die Prognose und die Früherkennung eines erhöhten Risikos für Atherosklerose.

2.3.1 Endothelin-1 als Marker für Inflammation

Endothelin wurde erstmals 1985 beschrieben. Es ist eine vasokonstriktorische Substanz, die in Endothelzellen produziert wird und in vivo einen Einfluss auf das Gefäßbett besitzt.²⁰

Endothelin-1 stellt neben Angiotensin II den potentesten Vasokonstriktor dar.²¹ Es ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, dessen Wirkung sich an den glatten Muskelzellen der Gefäße sowie dem Gastrointestinaltrakt entfaltet. Als vasoaktiver, körpereigender Bestandteil dient es zur Regulierung des Blutdruckes.²²

Unter den vier bekannten menschlichen Isoformen Endothelin-1 (ET-1), -2 (ET-2) und -3 (ET-3), ist das ET-1 das am besten erforschte und zeichnet sich durch seine besonders potente Wirkung im Herz-Kreislauf System aus.²³

Seine Effekte vermittelt ET-1 über G-Protein-gekoppelte ET_A- und ET_B- Rezeptoren (Siehe Abb.1). Hypoxie, Ischämie oder Scherstress sind die wichtigsten Stimulantien zur Induktion der Transkription der Endothelin-1 messenger RNA (mRNA).²⁴

Weiterhin kann die Synthese durch pH-Wert-Änderung, Vasokonstriktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Adhäsionsmoleküle reguliert werden. Die Synthese von ET-1 kann durch Stickstoffmonoxid (NO), Prostazykline, atriales Natriuretisches Peptid (ANP) und Östrogene gehemmt werden. Das Vorläufer Peptid ist big ET-1.²⁵

Vaskuläre Endothelrezeptoren

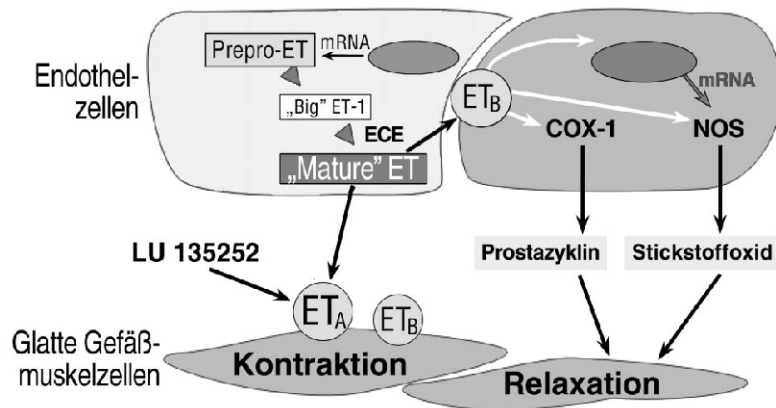


Abb. 1: Endothelinrezeptoren und Wirkung eines selektiven ET-Antagonisten.

(Bergler- Klein J, Pacher R. Journal für Kardiologie 2002; 9 (5): 168-175)

Die endotheliale ET_B-rezeptorabhängige Vasodilatation wird durch NO und Prostazyklin vermittelt. Der ET_B-Rezeptor besitzt eine duale Funktion und bewirkt an der glatten Muskelzelle auch eine Vasokonstriktion.²⁶

Bei Herzkreislauferkrankungen wie KHK und Herzinsuffizienz wird ein erhöhter Endothelinspiegel beobachtet.^{27 28 29}

Eine ausgeprägte Atherosklerose führt ebenfalls zu einem Anstieg der Serum-Endothelin-1-Spiegel und korreliert gut mit der Schwere der atherosklerotischen Läsion. Dieser Effekt könnte durch die endotheliale Dysfunktion bedingt sein.³⁰

Bei der koronaren Herzerkrankung korrelieren die ET-Plasmaspiegel mit der Progression der Koronarstenosen.³¹ Auch bei transmuralen Infarkten konnte eine Erhöhung der ET-1 Plasmaspiegel beobachtet werden.³² Ursächlich kann dafür die Hypoxie oder die Ischämie sein, die beide zu einer gesteigerten Synthese von ET-1 führen.

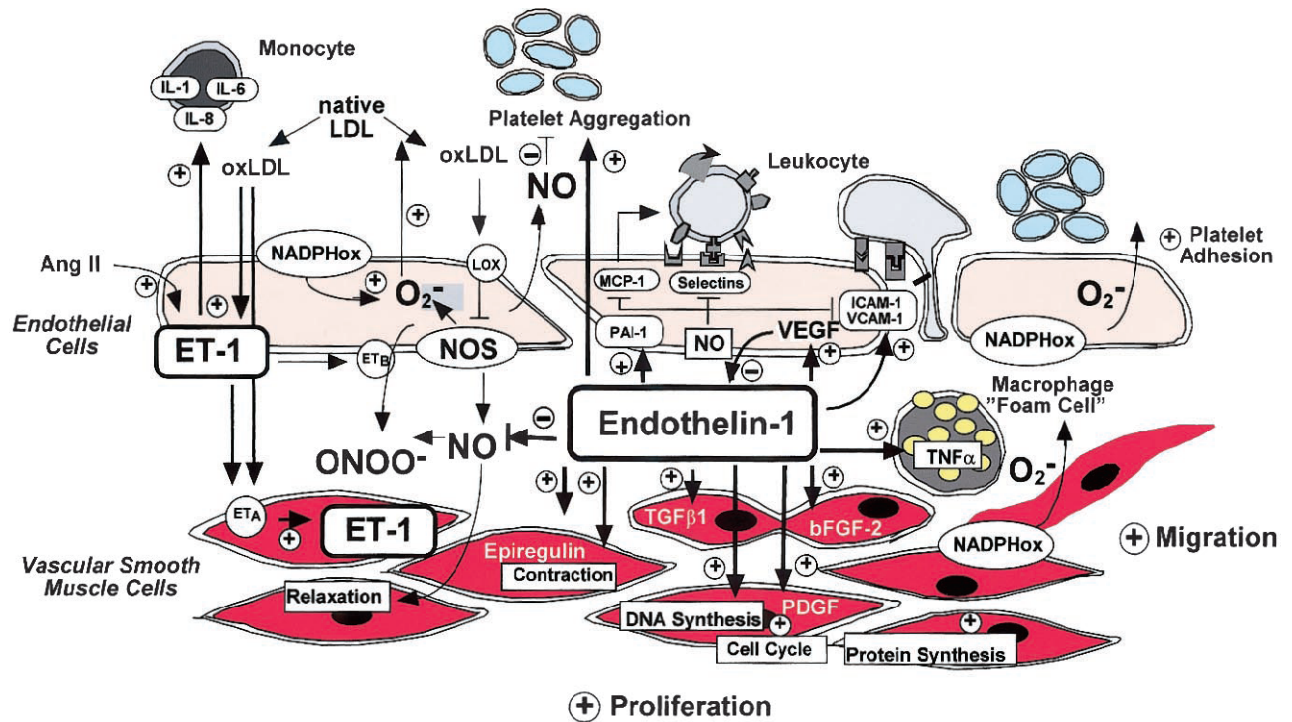


Abb. 2: Vaskuläre Effekte von ET-1 und-2 werden in endothelialen und glatten Muskelzellen als Antwort auf oxidiertes LDL, Angiotensin II (AngII) etc. generiert. Die ET_A -Rezeptoren vermitteln Kontraktion, Zellproliferation und Migration. ET-1 stimuliert die Expression von Interleukin (IL) und Tumor-Nekrose Faktor ($TNF\alpha$) in Monozyten, die Anhaftung von Leukozyten, Plättchenaggregation und die Expression von Adhäsionsmolekülen. ET-1 stimuliert die Produktion von Wachstumsfaktoren, DNA- und Proteinsynthese.²⁶

Endothelin steht auch unter der Regulation des Renin- Angiotensin- Systems (RAS).

Bei der arteriellen Hypertonie kommt es bedingt durch $AT II$ zu einer erhöhten Ausschüttung von ET-1. In Tiermodellen und am Menschen führte eine Reduktion des arteriellen Druckes mit ACE- Inhibitoren zu einer Normalisierung der ET-1 Reaktivität.³³

Es ist wahrscheinlich, dass Endotheline zu einer Aggravation des pathologischen Gefäßremodeling während arterieller Hypertonie beitragen.³⁴

2.3.2 CD40 LIGAND als Inflammationsmarker

CD40 Ligand, auch bekannt als CD154, gp39, TRAP (TNF-Related Activation Protein) oder TBAM (T-cell B-cell Activating Molecule) ist Mitglied der TNF-Superfamilie und ein multifunktionaler Ligand.³⁵

Unter physiologischen Bedingungen wird CD40 von T- Lymphozyten, des Weiteren von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen, Basophilen, Eosinophilen, Monozyten, dendritischen Zellen, Fibroblasten und Mastzellen gebildet. Es reguliert die Aktivität von B-Lymphozyten, sowie die Synthese von Antikörpern durch Stimulation der CD40 Rezeptoren.³⁶ Die CD40 Rezeptoren werden mit zahlreichen pathogenen Prozessen im Rahmen chronischer Entzündungskrankheiten (Autoimmunerkrankungen, neurodegenerative Prozesse, GvHD, Krebserkrankungen und Atherosklerose) in Verbindung gebracht.^{37 38} CD40 Ligand fördert darüber hinaus durch Rekrutierung von Leukozyten mit konsekutiver Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen den Abbau von Bindegewebe in atherosklerotischen Plaques, wodurch es zu einer Destabilisierung der Plaquestruktur kommt.^{39 40}

Bei CD40 Ligand handelt es sich um ein aus 261 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein.

Durch Proteolyse können lösliche Formen des Liganden entstehen. Aktivierte T-Zellen können beide Formen, sowohl die lösliche, als auch die membrangebundene Form exprimieren. Eine Stimulation durch Zytokine erhöht die Anzahl von CD40 L-Rezeptoren und die de novo-Synthese des entsprechenden Liganden auf bestimmten Zelltypen.

Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris konnten erhöhte CD40 Plasmaspiegel gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass in der Pathogenese der Atherosklerose und der Entstehung eines ACS der Interaktion von CD40 Rezeptoren und seinen Liganden eine wichtige Rolle zukommt. Erhöhte Plasmaspiegel korrelieren mit einem erhöhten Risiko für Komplikationen des Koronarsyndroms, beispielsweise einer beschleunigten Restenosierung.⁴¹

2.3.3 ICAM-1 als Marker für Inflammation

Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), auch bekannt als CD54, ist ein fast ubiquitär vorhandenes transmembranöses Glykoprotein. Es spielt eine zentrale Rolle in der Migration und Aktivierung von Leukozyten.⁴²

Humanes ICAM-1 besteht aus fünf Ig-ähnlichen extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne.⁴³ Eine lösliche Form von monomerem und dimerem ICAM-1 (sICAM-1) kann mittels proteolytischer Spaltung erzeugt werden.

Der hauptsächliche Bindungspartner von ICAM-1 sind Integrine der Leukozyten. Außerdem bindet ICAM-1 einige andere Liganden wie zum Beispiel Fibrinogen, Rhinoviren und Plasmodium falciparum- infizierte Erythrozyten.^{44 45 46 47 48}

Während inflammatorischen Prozessen wird ICAM-1 auf Endothel und Epithelzellen hochreguliert und vermittelt die Adhäsion und parazelluläre Migration aktivierter Leukozyten.⁴⁹ Diese Stimulation erfolgt beispielsweise durch IL-1, IFN γ und TNF α , aber auch durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Gebundenes ICAM-1 verlängert die Antigen-Präsentation von dendritischen Zellen, fördert T-Zell-Proliferation und Freisetzung von Zytokinen.⁵⁰

Lösliches ICAM-1 wurde in Serum, Liquor, Urin und bronchoalveolärer Lavage nachgewiesen. Seine Konzentration liegt, je nach Messmethode, bei ungefähr 100 – 400 ng/ml.⁵¹

Erhöhte Spiegel in diesen Flüssigkeiten sind eng an kardiovaskuläre Erkrankungen, oxidativen Stress, Diabetes mellitus Typ-2, Transplantatabstoßung und bestimmte maligne Erkrankungen gekoppelt.^{52 53 54 55 56 57 58 59}

ICAM-1 dient als etablierter Marker für vaskuläre Zellaktivität oder -defekte.⁶⁰

2.3.4 8-iso-Prostaglandin-F2 α als ein *in vivo* Marker für oxidativen Stress

Isoprostane gehören zur Familie der Prostaglandin-F2- Isomere und sind aktive Metaboliten des Arachnidonsäure-Metabolismus.⁶¹ 8-iso-Prostaglandin-F2 α wird von Zellmembranen gebildet und durch die Einwirkung von freien Sauerstoffradikalen, vermutlich durch einen Phospholipase-vermittelten Mechanismus freigesetzt, zirkuliert im Plasma und wird über den Urin ausgeschieden.⁶² Das 8-iso-Prostaglandin-F2 α initiiert eine periphere Vasokonstriktion und eine gesteigerte Plättchen-Aktivität.⁶³

Das hier untersuchte 8-iso-PGF2 α und sein Hauptmetabolit im menschlichen Urin, 2,3-Dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF2 α gilt sich als verlässlicher Parameter für die *in vivo*-Lipid-Peroxidation und ist somit ein relevanter Risikomarker für antioxidative Abwehr bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie.^{64 65} Es korreliert positiv mit dem Schweregrad der Krankheit.⁶⁶

Zur quantitativen Bestimmung von 8-iso-PGF 2 α wurde in dieser Studie die Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Methode (GC-MS-MS) verwendet. In vorausgehenden Studien konnte bereits der enge Zusammenhang zwischen *in vivo*- Lipid-Peroxidation und urinärer 8-iso-PGF 2 α -Ausscheidung gezeigt werden. Die Urinexkretion des Isoprostans 8-iso-prostaglandin-F2 α ist ein unabhängiger und sensitiver Marker für oxidativen Stress bei Patienten mit KHK.⁶⁷

2.4 Endothelfunktion

Auch die Wirkung von biomechanischen Kräften wie Schubspannung und Dehnung beeinflussen die Entstehung und Progression der Atherosklerose.⁶⁸ Die Prädilektionsstellen für Atherosklerose

befinden sich in elastischen Arterien an Gefäßabschnitten mit lokal erhöhter Dehnung und verringerter Schubspannung. Antiatherosklerotische Wirkungen laminarer Schubspannung sind u.a. die verstärkte endotheliale Bildung von Prostazyklin (PGI₂) und Stickstoffmonoxid (NO)⁶⁹

Endotheliale Dysfunktion, gemessen als flussvermittelte Dilatation mittels Ultraschall, gilt als frühe Manifestation der Atherosklerose und ist auch nachweisbar bei entzündlichen Erkrankungen wie systemischer Lupus Erythematosus, Rheumatoide Arthritis und Morbus Behçet.⁷⁰ Hohe LDL-Spiegel sind ebenfalls mit endothelialer Dysfunktion assoziiert.⁷¹

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine zentrale Rolle zur Aufrechterhaltung einer intakten Endothelfunktion und wird bei laminärer Schubspannung von Endothelzellen freigesetzt. NO ist ein flüchtiges Gas welches die Gefäßfunktion beeinflusst. Durch NO- Synthase (eNOS) wird L-Arginin zu Citrullin umgewandelt. Dabei wird NO freigesetzt und diffundiert dann in Richtung Gefäßlumen und Gefäßmuskelzellen. In den glatten Muskelzellen aktiviert NO die lösliche Guanylat-Zyklase, so dass zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) entsteht. Durch die erhöhte Konzentration von cGMP sinkt die intrazelluläre Calcium-Konzentration. Durch niedrige Calcium-Spiegel wird letztendlich die Gefäßkontraktion gehemmt und die Dilatation überwiegt.⁷²

NO ist also ein Vasodilatator. Zusätzlich hemmt es die Proliferation von glatten Muskelzellen, Plättchenaggregation und die Expression von Adhäsionsmolekülen, sowie Leukozyteninteraktionen.⁷³ (siehe Abb. 3)

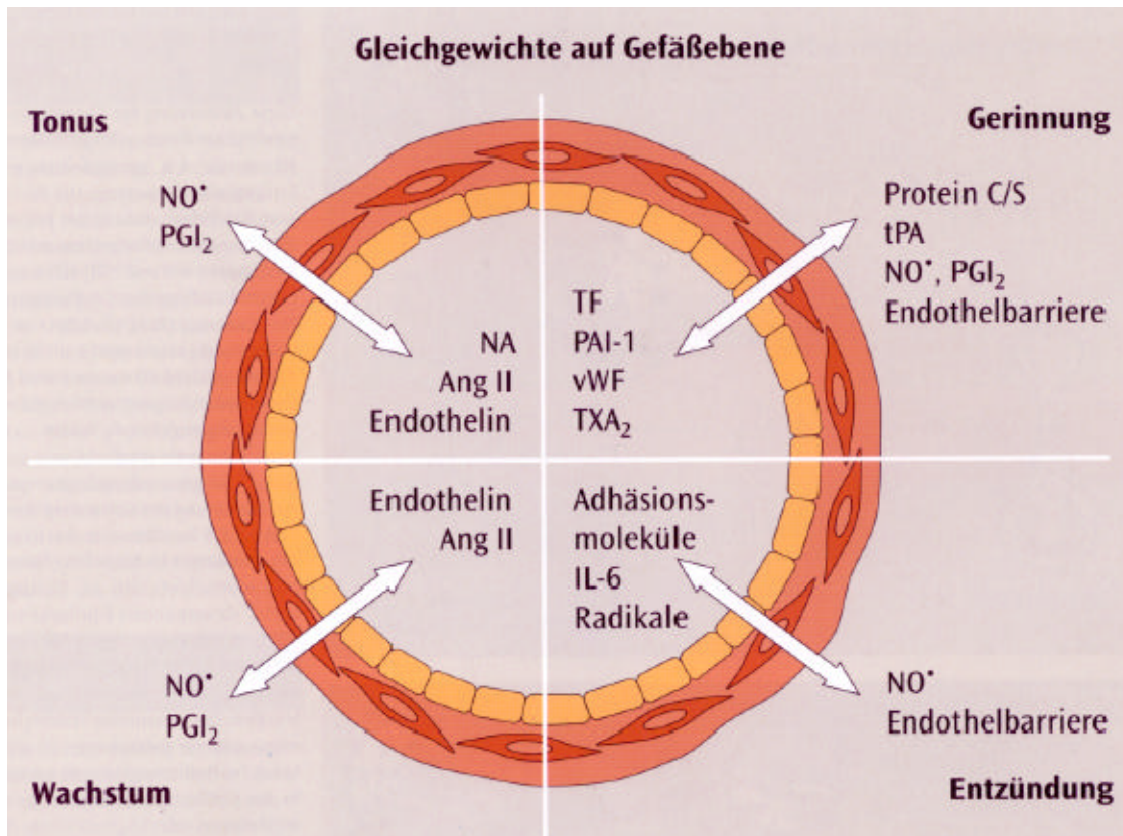


Abb. 3 : Endothel – verantwortlich für Gleichgewicht auf Gefäßebene

(aus: „Journal für Hypertonie“ 2004; (Sonderheft 1), 12-15. Pilz. Endothel- Endotheldysfunktion- Hypertonie.)

2.5 AT-1-Rezeptorblocker und Statine: Valsartan und Fluvastatin

2.5.1 AT-1-Rezeptorblocker Valsartan

AT₁-Antagonisten (Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten, AT₁-Rezeptorantagonisten, Angiotensin-Rezeptorblocker, „Sartane“ sind Arzneistoffe, die vorrangig zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt werden. Die Substanzgruppe ist eine Weiterentwicklung der ACE-Hemmer und seit 1996 auf dem Markt.

Valsartan gehört zu den Angiotensin-II-Antagonisten. Es wird oral gegeben und rasch resorbiert. Durch den selektiven Antagonismus an AT1-Rezeptoren werden die Angiotensin-II-antagonisierenden Effekte wie Vasodilatation, verminderte Aldosteronsekretion mit reduzierter Na⁺- und Wasserretention und dadurch folgende Blutdrucksenkung und Herzinsuffizienzverbesserung erreicht.¹¹⁰

In Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte unter Verwendung von A. mammaria Segmenten gezeigt werden, dass Angiotensin II die Synthese proatherogener Substanzen wie Endothelin-1 über eine Erhöhung der Sauerstoffradikalsynthese stimuliert. AT1-Rezeptor-Blocker und ACE-Hemmer haben antioxidative Eigenschaften, wie in verschiedenen serologischen, funktionellen sowie klinischen Tests gezeigt werden konnte.^{74 75}

In der Folge einer verminderten Stimulation von Angiotensin 1-Rezeptoren kommt es zu einer Reduktion von atherogenen Markern wie unter anderem Endothelin-1 oder Vascular Adhesion Molecule-1, was wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für den antioxidativen Effekt von AT1-Rezeptor-Blockern und ACE-Inhibitoren spielt. Dadurch könnte auch die in klinischen Studien nachgewiesene protektive Wirkung der ACE-Inhibitoren erklärt werden, da die Blutdrucksenkung allein im Vergleich zu anderen Substanzen diesen Effekt nicht erklären kann. Während bei ACE-Inhibitoren ein positiver Effekt durch die Steigerung der Bradykininkonzentrationen möglich scheint, kommt es bei AT1-Rezeptorantagonisten zu einer vollständigen Blockade der AT-1 Rezeptoren, welche die gesteigerte Radikalbildung durch Angiotensin II vermitteln.⁷⁶

2.5.2 HMG-CoA-Reduktasehemmer Fluvastatin

Fluvastatin zählt zu den HMG-CoA-Reduktasehemmern. Fluvastatin wird über das Enzym CYP2C9 metabolisiert. Es hemmt kompetitiv die HMG-CoA-Reduktase (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA). Dadurch wird die Cholesterinbiosynthese reduziert und kompensatorisch

die LDL- Rezeptordichte erhöht um den Cholesterinbedarf zu decken. Folglich wird das Plasma-LDL gesenkt.⁷⁷

HMG-CoA-Reduktasehemmer oder Statine sind ein weit verbreitetes Medikament bei Hyperlipidämie, um Initiation und Progression der Atherosklerose zu reduzieren. Statine haben einen hohen Effekt auf die Reduktion des LDLs und einen mäßigen auf die Erhöhung der HDL-Spiegels. Die Reduktion der Triglyceride ist direkt proportional zum basalen Triglyceridwert und dem Potential der LDL-Reduzierung des jeweiligen Statins.^{78 79}

Die vorteilhaften Effekte einer Statintherapie zur Lipidsenkung bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurden bereits in großen klinischen Studien demonstriert. Zudem gibt es Hinweise, dass es weitgehend unabhängig vom Lipidstatus plaquestabilisierend durch eine verbesserte Endothelfunktion- und Verringerung der Thrombozytenaktivität wirkt.⁸⁰

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Statine die Fähigkeit besitzen oxygenierte freie Radikale zu beseitigen. Dies wurde in zahlreichen Zelltypen wie Makrophagen, Neutrophilen, Vascular smooth muscle cells (VSMCs) und Endothelzellen (ECs) demonstriert.⁸¹

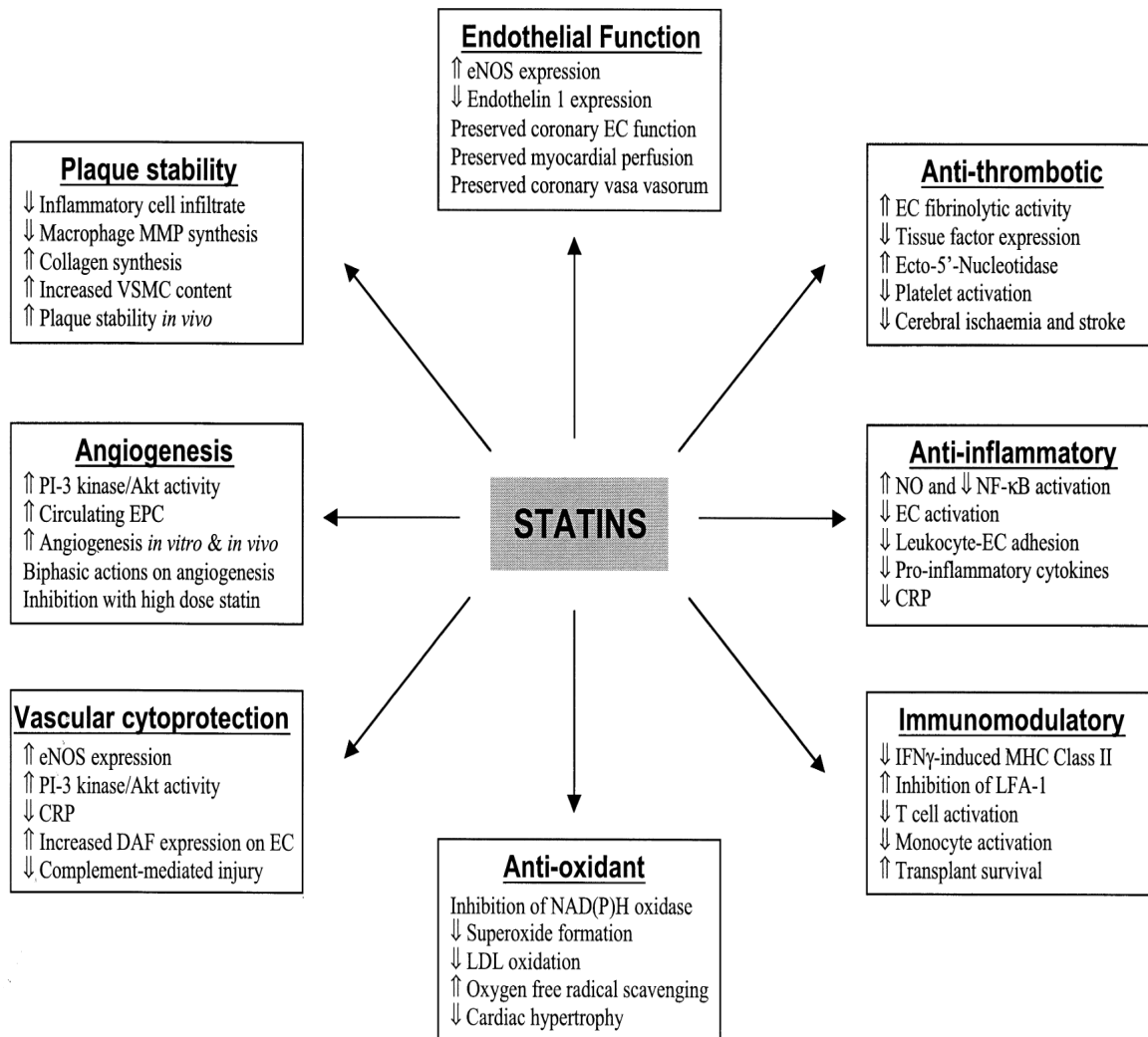


Abb. 4: Pleiotrophe Effekte von Statinen auf das Gefäßsystem: Es gibt eine Vielzahl an Effekten die untersucht wurden. Darunter anti- inflammatorische, immunmodulatorische, pro-angiogenetische und antithrombotische Eigenschaften. Viele von denen scheinen zumindest teilweise abhängig, von den Cholesterin-unabhängigen Wirkungen von Statinen.⁴³

Diese Effekte, zusammengefasst als „pleiotrope Effekte“, sind aktuell von großem wissenschaftlichem Interesse. Dennoch ist die Debatte um den Zusammenhang der klinisch sigifikanten Lipidsenkung und lipidunabhängigen Effekten weit davon entfernt, gelöst zu sein.⁸²

Einleitung

Die differenzierende Charakterisierung der Effekte durch Valsartan und Fluvastatin ist von besonderer klinischer Bedeutung, da sie wesentlichen Aufschluss über die relevanten Mechanismen in vivo geben können. Weiterhin ist bisher unklar, ob beide Substanzgruppen in Kombination additive oder möglicherweise überadditive Effekte generieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientenauswahl

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte aus dem Kollektiv der Patienten des Universitären Herzzentrums. Es wurden 21 konsekutive Patienten eingeschlossen.

3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Einschlusskriterien waren

- ein arterieller Hypertonus, der ausreichend mit einer Substanz einstellbar war.
- eine angiographisch dokumentierte koronare Ein- oder Mehrgefäß- Krankheit, die aktuell nicht interventionsbedürftig war.
- weibliche Probanden mussten jenseits der Menopause und männliche älter als 18 Jahre sein.
- eine schriftliche Einverständniserklärung des Patienten nach ausführlicher Aufklärung musste vorliegen.

Als Ausschlusskriterien galten

- eine Teilnahme an einer anderen Studie in den letzten 30 Tagen.
- eine Allergie auf eines der Studienmedikamente.
- schwere Lebererkrankungen.
- gleichzeitige Medikation mit Fibraten oder ein arterieller Hypertonus der eine Therapie mit zwei oder mehr antihypertensiven Medikamenten erforderlich machte.
- ein Serum LDL-Cholesterin Spiegel unter 90 mg/dl oder über 160 mg /dl.

- eine Hypercholesterinämie, die mit HMG-CoA-Inhibitoren behandelt wurde, wenn die Serum-LDL-Konzentrationen ohne Behandlung über 160 mg/dl lag.
- eine Vitamin-Einnahme.
- ein mentaler Zustand des Patienten, der es ihm nicht ermöglichte, die Bedeutung, Hintergründe und Konsequenzen der Studie zu verstehen.

3.1.2 Ausschluss von Patienten aus der Studie

Folgende Gründe erforderten den vorzeitigen Ausschluss bestimmter Patienten aus der Studie:

- Non-Compliance bezüglich der Medikamenteneinnahme.
- Therapiebeginn oder Fortsetzung mit einem anderen HMG-CoA-Inhibitor, Fibraten, ACE-Hemmer oder AT-1-Hemmer.
- Widerruf des Einverständnisses für die Studienteilnahme.
- Alkoholabusus.
- Anstieg der Serumtransaminasen (GOT/GPT) auf > 3-fache der oberen Norm.
- Anstieg der Serum-Kreatinins > 3-fache der oberen Norm.
- Symptome einer Myopathie oder pectanginöser Beschwerden.
- Auftreten schwerwiegender unerwünschter Wirkungen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Studienmedikation zurückzuführen waren.

3.2 Ethische Aspekte

Das Studienprotokoll wurde von der zuständigen Ethik- Kommission geprüft und genehmigt.

3.2.1 Patienteninformation und Einwilligungserklärung

Alle Probanden gaben nach einem Aufklärungsgespräch ihr schriftliches Einverständnis.

Die Patienteninformation und die Einwilligungserklärung finden sich in der Anlage

3.2.2 Dokumentation

Zur Anamneseerhebung wurden Dokumentationsbögen erstellt. Klinische Daten, Untersuchungsergebnisse und Laborwerte wurden den jeweiligen Patienten eindeutig zugeordnet und in einem abschließbaren Raum sicher gelagert. Die Analysedaten und Patientenakten werden insgesamt mindestens 15 Jahre nach Abschluss der Studie aufbewahrt.

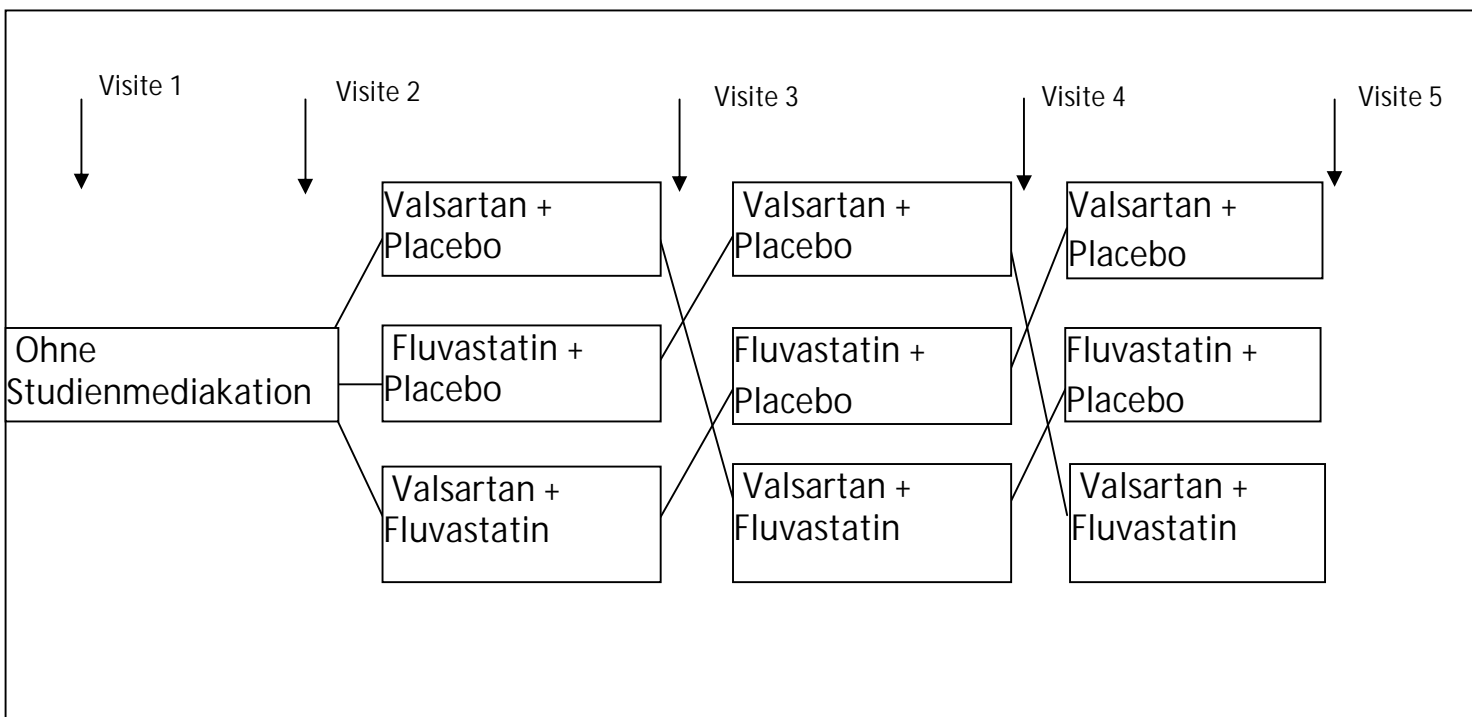
3.2.3 Probandenversicherung

Für die Studie wurde eine gesetzlich vorgeschriebene Versicherung abgeschlossen.

3.3 Ablauf der Studie

Die Studie wurde als randomisierte Doppel-Blind-Studie mit Cross-Over durchgeführt. Alle Patienten wurden bei Visite 1 in die Studie eingeschlossen und im Abstand von 4 Wochen zu

Studienuntersuchung wieder einbestellt. Insgesamt wurden pro Patient 5 Visiten durchgeführt. Ab Visite 2 wurde jedem Patienten die Studienmedikation aus der ihm zugeordneten Studienpackung ausgehändigt. Jede Packung enthielt 3 mal 2 Döschen mit jeweils 80mg Fluvastatin/Placebo und 180mg Valsartan/Placebo. So wurde sichergestellt, dass jeder Patient nach den ersten 4 Wochen ohne Statin, AT1-Blocker oder ACE-Hemmer für jeweils 4 Wochen entweder Fluvastatin, Valsartan oder die Kombination aus beiden Medikamenten erhielt.



3.3.1 Visite 1

Parameter bei Einschluss

Unmittelbar nach Studieneinschluss wurden die Patienten anamnestiziert, kardiale Risikofaktoren und die aktuelle Medikation dokumentiert und folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Ermittlung des Body mass index (BMI)
- Blutentnahme mit Kontrolle von
 - kleinem Blutbild, SGOT, SGPT, Kreatinin, Harnstoff-N, CRP.

Die laborchemischen Untersuchungen wurden vom Routinelabor der medizinischen Klinik durchgeführt.

3.3.2 Visite 2

Wiedervorstellung 4 Wochen nach Beginn der Aufnahme (nach alleiniger Einnahme bisheriger Antihypertensiva)

- Anamnese
 - Subjektives Befinden
 - Abfrage der aktuellen Medikation, eventuell zwischenzeitlich eingenommener Medikamente.
- Blutentnahme mit Kontrolle von

- kleinem Blutbild, SGOT, SGPT, Kreatinin, Harnstoff-N, CRP, Gesamt - Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyceride, Leukozytenaktivität
- Konzentrationen von
 - § Endothelin-1
 - § ICAM-1
 - § CD40-Ligand
- Urinuntersuchung: Isoprostane (8-iso-PGF 2 α)
- Messung des arteriellen Blutdrucks mittels 24h-Blutdruckmessung.
- Evaluation der flussabhängigen Dilatation der Unterarm-Arterie mittels Ultraschall,
- Aushändigung der nächsten Studienmedikation.

3.3.3 Visite 3

Wiedervorstellung nach weiteren 4 Wochen

- Anamnese, Blut- und Urinuntersuchung (siehe Visite 2).
- Messung des arteriellen Blutdrucks mittels 24h-Blutdruckmessung.
- Evaluation der flussabhängigen Dilatation der Unterarm-Arterie mittels Ultraschall.
- Wechsel auf die jeweils vorgesehene nächste Studienmedikation.

3.3.4 Visite 4

Wiedervorstellung nach weiteren 4 Wochen

- Anamnese, Blut- und Urinuntersuchung (siehe Visite 2 und 3).

- Messung des arteriellen Blutdrucks mittels 24h-Blutdruckmessung.
- Evaluation der flussabhängigen Dilatation der Unterarm-Arterie mittels Ultraschall.
- Wechsel auf die jeweils vorgesehene letzte Studienmedikation.

3.3.5 Visite 5

Wiedervorstellung nach weiteren 4 Wochen

- Anamnese, Blut- und Urinuntersuchung (siehe Visite 2, 3 und 4).
- Messung des arteriellen Blutdrucks mittels 24h-Blutdruckmessung.
- Evaluation der flussabhängigen Dilatation der Unterarm-Arterie mittels Ultraschall.
- Abschlussgespräch mit individueller Empfehlung und evtl. Umstellung der Dauermedikation.

3.4 Anamneseerhebung und klinische Untersuchung

Bei allen Patienten wurde eingangs eine ausführliche Anamnese- sowie ein körperlicher Untersuchungsbefund erhoben. Es folgte die Dokumentation der Krankheitsgeschichte, der kardialen Risikofaktoren und der Medikamenteneinnahme.

Ebenso erfolgte eine Ruheblutdruckmessung, eine Pulsbestimmung und die Berechnung des Body Mass Indexes aus aktuellem Körpergewicht und Körpergröße.

Es erfolgte die Dokumentation der kardialen Risikofaktoren wie Hypertonus, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und positiver Familienanamnese, sowie der kardialen Vorgeschichte zur Einteilung in NYHA-, Braunwald-, und CCS-Klassifikation.

3.5 Klinisch-chemische Blut- und Urinuntersuchungen

Allgemeines Prinzip des Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA)

Das Prinzip des ELISA beruht auf einer Sandwich Technik. Die Bestimmung erfolgte jeweils doppelt.

Der spezifische Sandwich ELISA verwendet einen auf Mikrotiterplatten beschichteten immunoaffinitäts-chromatographisch gereinigten polyklonalen Erstantikörper. Dieser polyklonale Antikörper ist spezifisch für den nachzuweisenden Liganden.

Ein monoklonaler Zweitantikörper bildet mit dem in der Probe vorhandenen Liganden und dem gebundenen Erstantikörper ein Sandwich. Nach einem Waschschrift, der alle nicht spezifisch gebundenen Substanzen entfernt, wird die Menge an gebundenem monoklonalen Antikörper bestimmt.

Diese entspricht der Menge in der verwendeten Probe des Patienten. Die Konzentration in der Probe ist direkt proportional zu der im ELISA-Photometer messbaren Farbentwicklung. Die Menge des gebildeten Farbstoffs wird photometrisch durch einen ELISA Reader (Labsystems Multiscan Bichromatic) bei definierter Wellenlänge gemessen. Zur Bestimmung der optischen Dichte erfolgt die photometrische Messung in einem Lesegerät für Mikroplatten bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Als Referenzwellenlänge wurde 620 nm gewählt.

Versuchsdurchführung

1. Assay Diluent: 10 min Rehydrieren des Antikörpers

2. Inkubation von Standard: 12 h quantitatives Binden des Proteins oder Probe an den Fängerantikörper
3. Inkubation von Konjugat: 1 h polyklonaler Antikörper mit „horseradish peroxidase“ Aktivität
4. Inkubation von Substrat :20 min Chromogen (z.B. Tetramethylbenzidin)
5. Inkubation von Amplifizier: 30 min Verstärkung der Farbreaktion
6. Inkubation von Stopplösung: Zum Stoppen der Farbreaktion
7. Bestimmung der Farbintensität im ELISA Reader bei definierter Wellenlänge
8. Umrechnen der OD in Konzentration des bestimmten Proteins entsprechend der Standardkurve.

Benötigte Materialien und Geräte

- ELISA Kit
- Multichannel Pipette für 50 – 300 µl (Finnpipette ® H50168, Labsystems)
- Pipettenspitzen (741065, Fa. Greiner)
- Mikrotiterplattenphotometer (SLT Spectra, Fa. Labinstruments): Meßwellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm
- Software für Messung (Easy-Fit, Version 7.17)
- Schüttelinkubator für 37 C (Th 15, Edmund Bühler)
- Vortexer (VF2 Fa. Janke & Kunkel IKA ® - Labortechnik)
- Schale für Waschpuffer (4870, Fa. Corning Incorporated)
- Multistep Pipette (Multipette® plus, Fa. Eppendorf)

- Pipettenspitze (Fa. Eppendorf)
- Lichtundurchlässige Abdeckung für Dunkelreaktion
- Zentrifuge (Rotina 35R, Fa. Hettich Zentrifugen)
- Coulter Mixer (Fa. Coulter Electronics Limited).

Messung der Extinktion und Erstellung der Kalibrationsgeraden

Zur Kalibration des Photometers wurden vor jeder Messreihe Messungen mit bekannten Konzentrationen gemacht. Aus diesen Daten wurde mittels MATLAB eine Kalibrationsgerade nach der Methode der Minimierung der Fehlerquadrate ermittelt.

3.5.1 Quantitative Bestimmung der Big Endothelin-1 Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Endothelin-1 erfolgte mittels kommerziell erwerbbaarem Big Endothelin ELISA Kit (Cat. No. BI-20072, Biomedica Gruppe Wien)

Versuchsdurchführung

Standard 1 bis 5 und Kontrollen wurden in jeweils 0,5ml destilliertem Wasser bei Raumtemperatur für gut 20min gemischt.

Das Waschpuffer Konzentrat wurde 1:10 verdünnt.

Big Endothelin-1 Stock wurden in 2 ml Zellkulturmedium bei Raumtemperatur für 30 min. gut gemischt.

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht.

50µl Standard, Proben und Kontrollen werden in Doppelbestimmung mit Ausnahme des Leerwertes in die Mikrotiterstreifen pipettiert. Dazu werden mit Ausnahme des Leerwertes 200µl Konjugat in alle Wells pipettiert. Die abgedeckten Streifen werden 4 Std. im Dunkeln inkubiert. Der Inhalt der Wells wird verworfen und 5 mal mit 300µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Reste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt.

Dann werden in alle Wells 200µl Substrat pipettiert. Weitere 30 min wird die Platte dann bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann werden 50µl Stopplösung in alle Wells pipettiert und gemischt. Die Extinktion wird unmittelbar bei 450 nm, mit 620 nm als Referenz gemessen.

Verwendete Reagenzien

Mikrotiterplatte- polyklonaler Schaf anti Big Endothelin-1 Antikörper, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen

Waschpuffer- 10fach konzentriert

Standards- Synthetisches humanes Big Endothelin-1 (1-38) in humanem Plasma

Kontrolle- Synthetisches humanes Big Endothelin (1-38) in humanem Plasma

Konjugat- monoklonaler anti Big Endothelin (1-38) Antikörper HRPO, gebrauchsfertig

Substrat- (TMB- Lösung), gebrauchsfertig

Stopplösung- H₂SO₄

Big Endothelin-1 Stock- Synthetisches humanes Big Endothelin-1 (1-38)

3.5.2 Bestimmung von CD40 Ligand

Die Bestimmung des CD40 Ligand erfolgte mittels kommerziell erwerbbaarem ELISA-Kit (Humaner sCD40 L-Immunoassay; Quantikine® (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA))

Versuchsdurchführung

Nach Vorbereitung aller Reagenzien, der Patientenplasmen sowie der Standardproben werden 100 µl einer Verdünnung in jedes Well pipettiert. Es folgen 100 µl der Standardlösungen sowie der Patientenplasmen.

Nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und auf einem horizontalen Mixer werden die Proben mit Hilfe einer Pipette aspiriert und die Wells vier Waschvorgängen mit Waschpuffer (400µl) unterzogen.

Anschließend werden 200 µl des Enzym-gekoppelten CD40L-Antikörpers in jedes Well gegeben und nach einer zweistündigen Inkubationszeit unter den oben aufgeführten Bedingungen wird der bereits beschriebene Aspirations- und Waschvorgang wiederholt.

Nun werden 200 µl der Substratlösung in die Wells pipettiert und unter Lichtschutz inkubiert. Nach 30 Minuten werden 50 µl einer Stopplösung hinzugegeben.

Zur Bestimmung der optischen Dichte erfolgt die photometrische Messung in einem Lesegerät für Mikroplatten bei einer Wellenlänge von 450 nm. Als Referenzwellenlänge wurde 620 nm gewählt. Zur Kalibration des Photometers wurden vor jeder Messreihe Messungen mit bekannten Konzentrationen gemacht.

Verwendete Reagenzien

CD40 Ligand Mikrotiterplatte (Part 890989) - 96 well Polystyren Mikroplatte (12 strips mit je 8 wells) markiert mit polyklonalem Antikörper gegen CD40 Ligand.

CD40 Ligand Konjugat (Part 890990) - 21 mL polyklonaler Antikörper gegen CD40 Ligand
Konjugiert an Meerrettich- Peroxidase.

CD40 Ligand Standard (Part 890991) - 40 ng rekombinierter menschlicher CD40 Ligand in Puffer

Assay Verdüner RD1-65 (Part 895527) - 12 mL eines gepufferten Proteinbasis

Calibrator Verdünnung RD5P Konzentrat (Part 895151) - 21 mL eines konzentrierten Puffers auf Proteinbasis

Waschpuffer Konzentrat (Part 895003) - 21 mL einer 25fach verdünnten Lösung eines gepufferten Surfactant

Color Reagenz A (Part 895000) - 12.5 mL Wasserstoffperoxid.

Color Reagenz B (Part 895001) - 12.5 mL Chromogen (Tetramethylbenzidin).

Stopplösung (Part 895032) - 6 mL H₂SO₄

Abdeckung - 4 Klebfolien.

3.5.3 Quantitative Bestimmung der human soluble Intracellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1) Proteinkonzentration

Die Bestimmung von ICAM-1 erfolgte mittels kommerziell erwerbbaarem ELISA-Kit (ICAM-1 Quantikine® Human Soluble ICAM-1 Immunoassay, Fa. R&D Systems GmbH)

Versuchsdurchführung

Alle Reagenzien und Proben wurden schonend auf Raumtemperatur aufgetaut.

Reagenzien wurden wie folgt zubereitet:

Waschpuffer Konzentrat: 20mal des Waschpuffer-Konzentrats wurden mit deionisiertem, destilliertem Wasser aufgelöst um 500ml Waschpuffer herzustellen.

Standards: Zur Wiederherstellung der sICAM-1 Standards wurden unmittelbar vor Gebrauch 1 ml deionisiertes Wasser beigefügt. Die Mischung wurde 10 Minuten später bis zur vollständigen Lösung der Substanzen schonend gemischt.

sICAM-1 Kontrolle: Unmittelbar vor Verwendung der Kontrolle wurde diese mit 500µl deionisiertem Wasser hergestellt und wie der Standard nach 10 Minuten gemischt. Die Kontrolle wurde daraufhin für unsere Versuche 50-fach verdünnt um in einen optimalen Messbereich zu kommen.

sICAM-1 Konjugat-Konzentrat: 250µl der Konjugat-Kontrolle wurden in das Gefäß der Konjugat-Verdünnung überführt und schonend vermischt.

Jedem Well der Mikrotiterplatte wurden 100 µl ICAM-1 Konjugat zugeführt.

Es wurden jeweils 100µl Standard, sICAM-1-Kontrolle oder Probe in jedes Well zugefügt und vermischt. Abgedeckt wurde die Platte für 1,5 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mittels automatischem Wascher alle Wells aspiriert und gewaschen. Dieser Prozess wurde insgesamt 6 mal durchgeführt. Jeder Waschgang wurde mit 300µl Waschpuffer durchgeführt. Nach der letzten Waschung und Aspiration wurden flüssige Restbestände vollständig mittels Ausklopfen entfernt und den Wells 100µl Substrat zugeführt. Für erneute 30 Minuten wurde die Platte abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden den Wells jeweils 100µl Stopp-Reagenz beigefügt.

Material

sICAM-1 Mikrotiterplatte - 96 well Polystyrol- Mikroplatte (12 Reihen mit je 8 Wells) markiert mit polyklonalem Antikörper gegen humanes sICAM-1.

sICAM-1 Ligand Konjugat - 12 mL polyklonaler Antikörper gegen sICAM-1 Ligand

Konjugiert an Meerrettich Peroxidase.

sICAM-1 Standard - 250 ng/Röhrchen rekombinierter menschlicher sICAM-1 Standard in Puffer Assay Verdünner (Röhrchen 1 bis 6)

Calibrator Verdünnung RD5-7 - 21 mL eines konzentrierten Puffers auf Proteinbasis

Waschpuffer Konzentrat - 21 mL einer 25fach verdünnten Lösung eines gepufferten Surfactant

Color Reagenz A - 12.5 ml Wasserstoffperoxid.

Color Reagenz B - 12.5 ml Chromogen (Tetramethylbenzidin).

Stopplösung - 6 ml H₂SO₄

Abdeckung - 4 Klebfolien.

3.5.4 Isoprostane im Urin

Spektrometrische Quantifizierung des 8-iso-prostaglandins F_{2α} und seines Metaboliten 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin F_{2α} in menschlichem Urin

Die quantitative Urinausscheidung von F₂-isoprostan 8-iso-prostaglandin (PG) F_{2α} und seinem Hauptmetaboliten, 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF_{2α}, wurden mittels Gaschromatographie-tandem mass spectrometry (GC-Tandem-MS-Methode) gemessen.

Biochemische Analyse

Um die Quantifizierung des Isoprostans und seines Metaboliten durchführen zu können, wurde zunächst die high-performance-liquid-chromatography (HPLC) und danach die Dünnschicht-Chromatographie angewendet. Aufgrund der Kombination der beiden Methoden wird die Bestimmung am zuverlässigsten aus dem menschlichen Urin vollzogen (Tandem-Methode).

Biologische Proben:

Der von unseren Probanden über 24 Stunden gesammelte Urin wurde in 5 ml-Gefäße pipettiert und bei -80°C tief gefroren.

Der Kreatinin-Wert wurde spektrophotometrisch mit einer automatischen Messmaschine bestimmt (Beckmann, Galway, Ireland). Die Einheit der Isoprostane wurde in pg/mg Kreatinin beschrieben, der Messbereich befand sich zwischen 100-900 pg/mg.

HPLC-System für Prostaglandine als freie Säuren.

Die HPLC-Trennung von Prostaglandinen wurde mit einem HPLC-System der Serie 1050 (Hewlett-Packard, Waldbronn) durchgeführt. Als stationäre Phase der Trennsäule (250 x 4,6 mm ID) wurde 100-5C18 Nucleosil, 5 μm Korngröße, (Macherey-Nagel) verwendet. Die freien Säuren wurden isokratisch mit 10 mM NaH_2PO_4 /Acetonitril/Isopropanol 67:21:12 (v/v), pH 3,5, bei einer Flussrate von 1,8 ml/min analysiert. Die Detektion erfolgte bei 205 nm.

Wurde das HPLC-System zur Aufreinigung von Urinproben eingesetzt, so wurde wie folgt verfahren: Nach der SPE der Urine wurden die Rückstände in 200 μl der mobilen Phase aufgenommen und mit dem HPLC-System chromatographiert. Eine 1,8-ml Fraktion mit der Retentionszeit von 8-iso-PGF 2α wurde gesammelt, 1:4 (v/v) mit Wasser verdünnt und auf pH 2-3 mit 2,5 M HCOOH angesäuert. 8-iso-PGF 2α wurde mit einer weiteren SPE extrahiert. Das Elutionsmittel der SPE wurde unter N_2 abgeblasen, der Rückstand mit PFB-Bromid zum PFB-Ester umgesetzt und weiter mit TLC aufgearbeitet.

HPLC-System für Prostaglandine als PFB-Ester

Für die HPLC-Trennung der PFB-Ester von Prostaglandinen wurde ein Hewlett-Packard HPLC-System der Serie 1050 verwendet. Als stationäre Phase der Trennsäule (250 x 4,6 mm ID) diente 100-5C18 Nucleosil, 5 µm Korngröße, von Macherey-Nagel. Die PFB-Ester wurden isokratisch mit Wasser/Acetonitril, 50:50 (v/v), bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Die Detektion erfolgte bei 235 nm.

Für quantitative Bestimmungen von Isoprostanen im menschlichen Urin wurde das beschriebene HPLC-System wie folgt eingesetzt: Die Urine wurden mit SPE extrahiert und zu den PFB-Estern umgesetzt. Die PFB-Ester wurden anschließend mit Eluent (Wasser/Acetonitril, 50:50 (v/v)) rekonstituiert und ein 100-µl Aliquot wurde mit der HPLC chromatographiert und fraktioniert gesammelt. Die Fraktion (2 ml) mit der gewünschten Retentionszeit wurde zweimal mit jeweils 2 ml Ethylacetat extrahiert.

Die vereinten Ethylacetat-Phasen wurden unter N₂ eingengt und die Rückstände zu den TMS-Ethern umgesetzt.

GC-MS-System für derivatisierte Prostaglandine

Die GC-MS- und GC-Tandem-MS-Analysen für Prostaglandine wurden mit einem *triplestage* Quadrupol Massenspektrometer TSQ 7000 (ThermoQuest TSQ 7000, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) verbunden mit einem Gaschromatographen Trace 2000 (Thermoquest) durchgeführt. Zur Probenaufgabe wurde ein Autosampler (AS 2000, CE Instruments, Austin, TX, USA) verwendet, zur gaschromatographischen Trennung eine Kapillarsäule Optima 17 (Macherey-Nagel) der Dimension 30 m x 0,25 mm ID mit einer Filmdicke von 0,25 µm.

Mit folgendem Temperaturprogramm wurde die Kapillarsäule erwärmt: 2 min bei 70 °C, Erhöhung der Temperatur auf 280 °C mit 25 °C/min und weitere Erhöhung auf 320 °C mit 4 °C/min. Helium war Trägergas bei konstantem Druck von 55 kPa. Interface, Injektor und Ionenquelle wurden konstant bei 280 °C, 290 °C und 180 °C gehalten. Unter EI-Bedingungen betrug die Ionisierungsenergie 70 eV. Unter NICI-Bedingungen betrug die Elektronenenergie 200 eV und der Elektronenstrom 600 µA. Methan diente der chemischen Ionisation in der

Ionenquelle bei einem Druck von 65 Pa. Kollisionsgas im zweiten Quadrupol war für GC-Tandem-MS-Messungen Argon mit 0,15 Pa Kollisionsdruck. Die Kollisionsenergie lag bei 25 eV. Zur Detektion der Ionen wurde jeweils eine Spannung von 1-2 kV am Sekundär-Elektronen-Multiplier angelegt.

Die Urinkonzentration von 8-iso-PGF_{2α} und 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF_{2α} wurde mittels GC-tandem MS unter Zugabe von internen Standards von 8-iso-PGF_{2α} und 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF_{2α} (1 ng/ml) bestimmt. Zur Analyse wurden die Übergänge von m/z 569 zu m/z 299 und von m/z 543 to m/z 273 für 8-iso-PGF_{2α} und 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF_{2α} entsprechend beobachtet. Die Validität der Methode ist an anderer Stelle nachgewiesen.⁸³

Die jeweiligen Urinkonzentrationen von 8-iso-PGF_{2α} und 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF_{2α} wurden anhand der Kreatininkonzentration korrigiert, um Differenzen durch unterschiedliche Nierenfunktionen auszuschließen.

3.5.5 Weitere Laborparameter

Es wurde bei allen Patienten ein kleines Blutbild erstellt. Die Plasmakonzentration von SGOT, SGPT, Kreatinin, Harnstoff-N, CRP, Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Alkalischer Phosphatase, Gamma-GT und Triglyceriden bestimmt.

Die Messungen wurden nach Standard Labormethoden im klinischen Labor der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf bestimmt.

3.6 Untersuchung der Endothelfunktion

3.6.1 Flow mediated Dilatation (FMD)- Flussabhängige Dilatation

Die Endothelfunktion wurde nicht-invasiv durch die sonographische Messung der flussabhängigen Dilatation der Arteria brachialis in Übereinstimmung mit aktuellen Leitlinien bestimmt.⁸⁴

Prinzip

Das Prinzip der flussabhängigen Dilatation beruht auf der Stimulation des Endothels durch Scherkräfte. Durch eine fünfminütige Okklusion der Arteria brachialis mittels Blutdruckmanschette wird eine Ischämie im Unterarm erzeugt, die zu einer Reduktion des peripheren Widerstandes des Unterarms durch Weitstellung der Widerstandsgefäße führt. Nach Ablassen der Okklusion entsteht eine Hyperämie, die durch eine Änderung der Wandschubspannung die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Prostazyklin aus dem Endothel stimuliert. Nach 60 Sekunden lässt sich diese Freisetzung als Vasodilatation messen.

Untersuchungsablauf

Um den Einfluss externer Störfaktoren zu minimieren, erfolgten die Untersuchungen in einem ruhigen, abgedunkelten Raum mit einer Temperatur zwischen 20-24°C. Während der gesamten Untersuchung lag der Patient in Rückenlage. Die Messungen wurden mit einem 12 MHz Linearschallkopf auf einem sonoline G50 Ultraschallsystem von Siemens durchgeführt. Nach einer 20 Minuten dauernden Ruhephase erfolgte die Messung des Ausgangsdiameters im zweidimensionalen B-Modus.

Hierzu wurde der Ultraschallkopf ungefähr 5 cm über der Ellenbeuge longitudinal positioniert. Es wurde besondere Sorgfalt bei der Auswahl der besten Schallkopfposition ausgeübt, um möglichst artefaktfreie und überlagerungsfreie Bilder der Gefäßwandstrukturen zu erzielen.

Zur Optimierung der Bildqualität erfolgte die Akquisition in der nSonoCT Real-Zeit Compound Bildgebung. Ziel der Schallkopfpositionierung war es, einen longitudinalen Schnitt im Zentrum der Arteria brachialis über die gesamte Bildbreite in gleicher Eindringtiefe abzubilden.

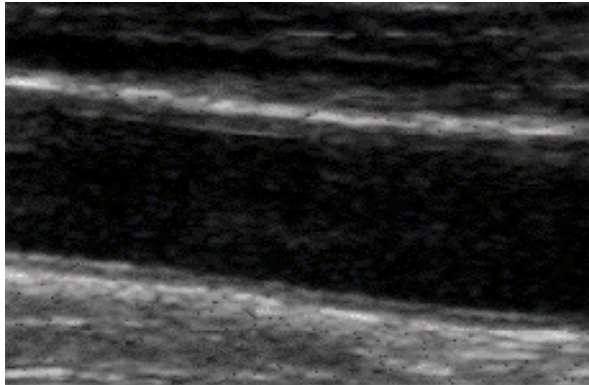


Abb. 5: Sonographische Darstellung der A. Brachialis⁸⁵

Zunächst wurden zweidimensionale Bilder mit einer Frequenz von 25 Bildern/Sekunde über einen Zeitraum von 5 Sekunden gespeichert, um den Ausgangsdiameter zu erfassen. Anschließend wurde die Blutflussgeschwindigkeit in Ruhe im gepulsten Dopplermodus dargestellt, wobei das Signal bei einem Winkel von 67° zum Gefäßlumen in einem

Dopplervolumen von 1,0 mm Tiefe im Zentrum der Arterie akquiriert wurde. Zur Erzeugung der Hyperämie wurde eine Blutdruckmanschette (Hokanson®) am Oberarm bis zu 50 mmHg über den systolischen Blutdruck oder auf mindestens 200 mmHg aufgepumpt.

Die arterielle Okklusion wurde für 5 Minuten beibehalten, wobei der Ultraschallkopf sorgfältig in der Ausgangsposition gehalten wurde. Nach fünf Minuten wurde der Manschettendruck zügig abgelassen und unmittelbar mit dem beginnenden Bluteinstrom wurde die Steigerung der Blutflussgeschwindigkeit durch Speicherung gepulster Dopplerbilder für 5 Sekunden in dem gleichen Gefäßareal wie bei der Ausgangsmessung erfasst. 60 Sekunden nach Ende der Okklusion wurden zweidimensionale Bilder der Arteria brachialis für 5 Sekunden aufgenommen. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass der dargestellte Gefäßabschnitt exakt dem Abschnitt der Ausgangsmessung entsprach.

3.6.2 Nitro mediatet Dilatation (NMD)- Endothelunabhängige Dilatation

Als Parameter der Funktion des Gefäßmuskels und der individuellen Compliance der Arteria brachialis wurde die Änderung des Gefäßdiameters nach Nitroglyzeringabe gemessen. Wenn keine Unverträglichkeiten gegenüber Nitroglyzerin vorlagen und der systolische Blutdruck über 100 mmHg lag, wurden nach einer Ruhezeit von 20 Minuten erneut der Ausgangsdiameter im 2D-Modus und die Blutflussgeschwindigkeit im gepulsten Dopplermodus erfasst. Dann wurde dem Patienten 2 Hub Nitroglyzerin (Nitrolingual®-Pumpspray, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG entsprechend 0,4 Milligramm bzw. 0,8 Milligramm Glyceroltrinitrat) sublingual gegeben.

Während der Nitrogabe musste wiederum darauf geachtet werden, den Ultraschallkopf in der Ausgangsposition zu belassen. Vier Minuten nach der Nitrogaben wurde der Gefäßdiameter im 2D-Modus und die Blutflussgeschwindigkeit im gepulsten Dopplermodus über 5 Sekunden erfasst. Alle Bilder wurden für spätere Analysen im DICOM Format aufgenommen und über ein Digitales Video Streaming (DVS) auf einer Multi Optical Disk (MOD) gespeichert.

Auswertung

Die Analyse des Gefäßdiameters erfolgte als Abstandsmessung zwischen der ventralen und dorsalen Intima-Mediagrenze. Zur Abstandsmessung wurde die kommerziell erhältliche Konturenerkennungssoftware (Brachial Analyser, Medical Imaging Application Ltd.) verwendet. Der Durchmesser der Arteria brachialis wurde in einem 5 bis 15 mm großen Segment vor und nach Erzeugung der reaktiven Hyperämie ausgewertet. Besondere Sorgfalt musste darauf gelegt werden, identische Bereiche auszuwerten, indem auf gleiche anatomische Strukturen geachtet wurde. Die flussabhängige Dilatation (FMD) wurde aus der prozentualen Änderung zwischen dem Ausgangsdurchmesser und der Antwort auf die Hyperämie ermittelt.

$$\text{FMD} = \frac{dn - dv}{dv} * 100$$

dn: Durchmesser des Gefäßes nach der Hyperämie

dv: Ausgangsdurchmesser des Gefäßes

Der Blutfluss der Arteria brachialis in Ruhe und während der reaktiven Hyperämie wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$Vf3 \cdot \left(\frac{d^2}{400} \right) \cdot HF$$

Vf3 = Fluss-Geschwindigkeits-Zeit-Integral der ersten 3 Schläge

d = Ausgangsdurchmesser des Gefäßes

HF = Herzfrequenz.

Die relative Änderung des Blutflusses während der reaktiven Hyperämie wurde als prozentuale Flussänderung im Vergleich zum Ausgangswert ausgedrückt.

Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit

Die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit der flussabhängigen Dilatation der Arteria brachialis ist von zahlreichen vorherigen Untersuchern validiert worden.⁸⁶ Die Reproduzierbarkeit der Konturenerkennungssoftware ist ebenfalls publiziert worden.^{87 88}

3.7 Messung des 24-Stunden-Blutdruckes

An allen Terminen wurde bei den Patienten eine 24-Stunden-Blutdruckmessung durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem automatischen Blutdruckmessgerät der Firma DIASYS Integra nach der allgemein etablierten Methode von Riva-Rocci (1896).

Die Messung erfolgte am Oberarm. Zwischen 08:00 Uhr und 21:00 Uhr erfolgten die Messungen im Abstand von 15 Minuten. Zwischen 21:00 Uhr und 08:00 erfolgten die Messungen mit einem

Abstand von 30 Minuten. Nach Ablauf der 24 Stunden fanden sich die Patienten wieder in unserer Klinik ein und die Messdaten wurden mit Hilfe der DIASYS Software übertragen.

3.8 Angewandte statistische Verfahren

Primärer Endpunkt der Studie war die Endothelfunktion.

Kontinuierliche Variablen wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnoff Tests auf Normalverteilung überprüft. Alle normalverteilten Parameter werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Auswertung des Einflusses der Behandlung auf den primären sowie die sekundären Endpunkte wurde das „Allgemeine lineare Modell“ herangezogen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nachfolgend mit Hilfe des Bonferroni Post-Hoc Test analysiert. Ein p-Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Alle Berechnungen erfolgten mit SPSS Version 15.0.

4 ERGEBNISSE

4.1. Patientenkollektiv

4.1.1 Klinische Daten der untersuchten Patienten

Patientendaten

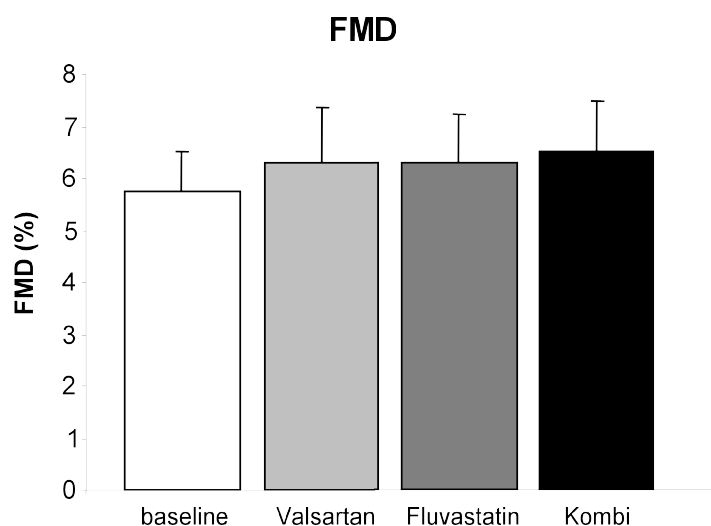
	männlich	weiblich
Alter	64,4 ±	65,7 ±
BMI	31,2 ±	29 ±
Hypertension	18	3
Diabetes mellitus	5	0
Positive Familienanamnese	12	1
Hypercholesterinämie	16	3
Nikotinabusus	7	0
Z.n. Myokardinfarkt	8	2
Anzahl der Patienten	18	3

4.2. Beeinflussung der Endothel-Funktion durch Valsartan und Fluvastatin

4.2.1 Endothelabhängige Dilatation (FMD)

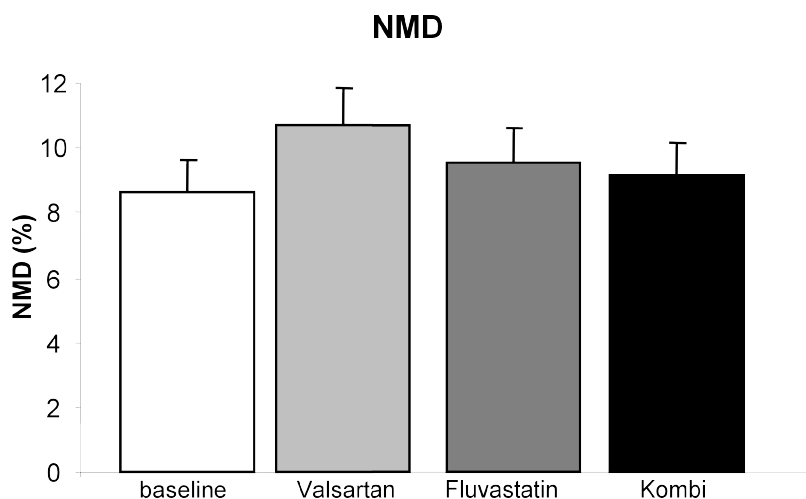
Der primäre Endpunkt der Studie war der Effekte von Fluvastatin und Valsartan, sowie einer Kombination beider Medikamente auf die flussabhängige Vasodilatation (Flow Mediated Dilatation, FMD). Die Vasodilatation wurde in % gemessen.

Als Ausgangswert (baseline), ohne Medikamenteneinnahme zeigte sich eine durchschnittliche flussabhängige Gefäßerweiterung von $5,7\% \pm 3,5\%$. Nach einer 4-wöchigen Behandlung mit Valsartan konnte eine Steigerung der flussabhängigen Gefäßerweiterung auf $6,3\% \pm 4,9\%$ des Ausgangswertes dokumentiert werden. Gleiche Werte ergab die alleinige Behandlung mit Fluvastatin ($6,3\% \pm 4,3\%$). Die Kombinationstherapie erzielte Dilatationssteigerungen auf $6,5\% \pm 4,4\%$. Der p-Wert beträgt 0,91. Somit sind die Unterschiede der endothelabhängigen Dilatation nicht signifikant.



4.2.2 Endothelunabhängige Dialatation (NMD)

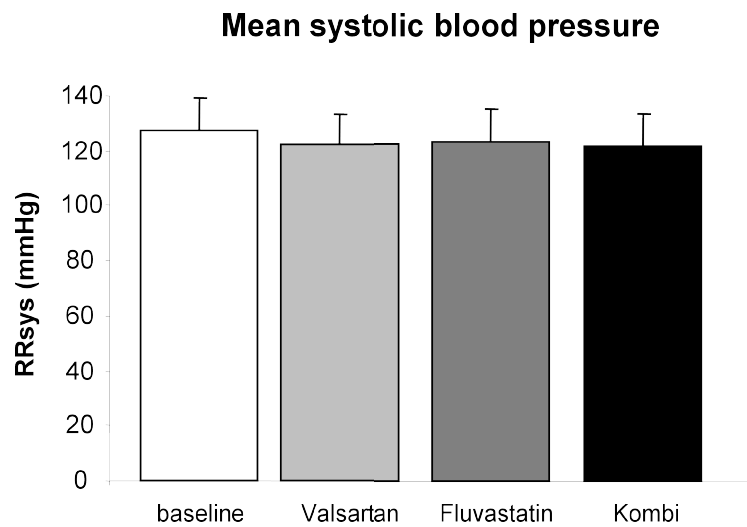
Die flussunabhängige Dilatation wurde nach sublingualer Nitroglycerin- Applikation ermittelt (NMD) und ergab als medikamentenunabhängiger Ausgangswert eine Erweiterung um $8,6\% \pm 4,2\%$ (baseline). Unter der Behandlung mit Valsartan wurden Werte von $10,7\% \pm 5,2\%$ gemessen. Die Änderung unter Fluvastatin betrug $9,6\% \pm 4,7\%$ und unter der Kombinationsbehandlung wurde der Durchschnittswert $9,2\% \pm 4,2\%$ gemessen. Das p beträgt 0.4 und ist nicht signifikant.



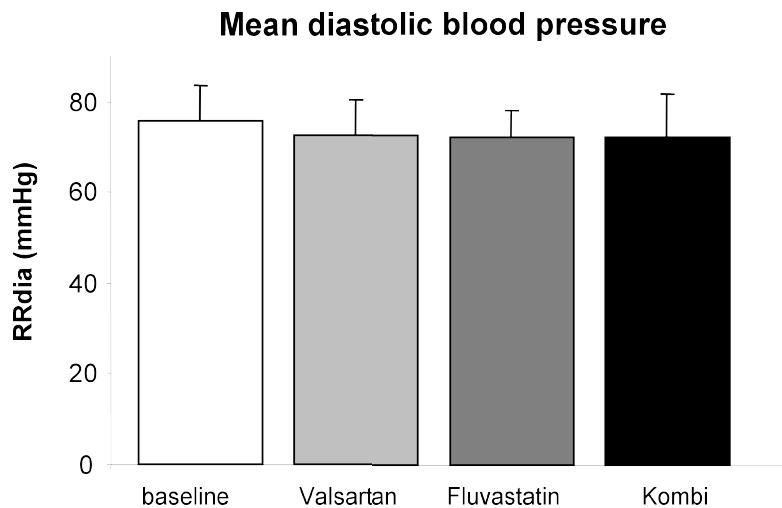
4.3 Auswirkung auf den durchschnittlichen systolischen und diastolischen Blutdruck unter medikamentöser Behandlung mit Valsartan und Fluvastatin

Weiterer Endpunkt war die Langzeitblutdruck Messung ohne, sowie unter Einzel- und Kombinationstherapie mit Valsartan und Fluvastatin.

Der durchschnittliche systolische Blutdruck betrug ohne Therapie $127\text{mmHg} \pm 15\text{mmHg}$. Valsartan sowie Fluvastatin vermochten in jeweiliger einzelner Gabe eine Senkung auf $122\text{mmHg} \pm 11\text{mmHg}$ bzw. $123\text{mmHg} \pm 9\text{mmHg}$ bewirken. Die Kombination brachte eine Senkung auf $121\text{mmHg} \pm 11\text{mmHg}$.



Der durchschnittliche diastolische Blutdruck betrug 76mmHg \pm 16mmHg. Unter Valsartan, Fluvastatin und deren Kombination wurde jeweils ein diastolischer Blutdruck von 72mmHg \pm 10mmHg gemessen.



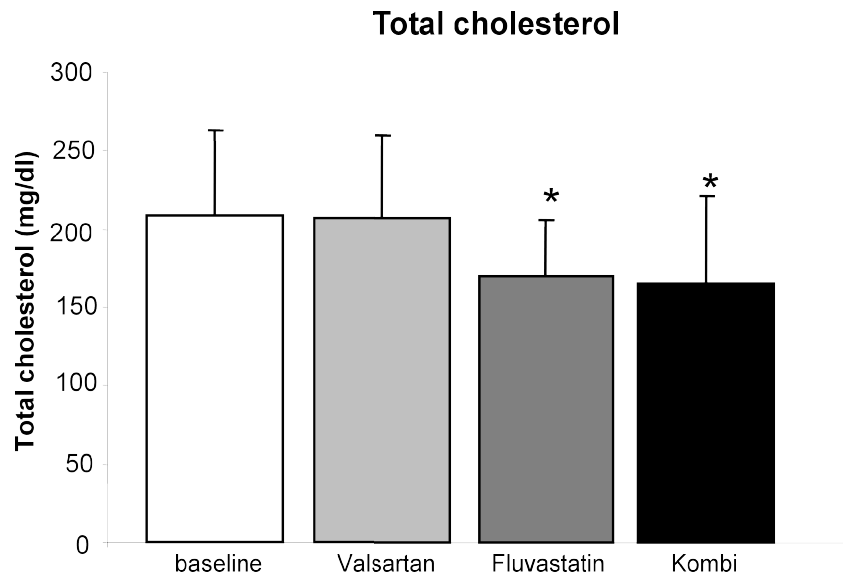
4.3. Effekte von Valsartan und Fluvastatin auf die biochemischen Parameter

4.3.1 Beeinflussung der Blutfette (Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Triglyceride)

Als weiterer kontrollierter Parameter der Studie diente die Bestimmung der Blutfette.

Gesamtcholesterin wurde anfänglich (baseline) mit einer Konzentration von 209 mg/dl \pm 53,8 mg/dl gemessen. Nach 4-wöchiger Gabe von Valsartan betrug dieser 207 mg/dl \pm 51,6 mg/dl. Die Gabe von Fluvastatin senkte das Gesamtcholesterin auf 170 mg/dl \pm 36,3 mg/dl ($P < 0,05$) und die Kombination von Valsartan und Fluvastatin erbrachte einen gesenkten Durchschnittswert von 166 mg/dl \pm 54,2 mg/dl ($P < 0,05$). Im linearen Modell waren somit die Gabe von Fluvastatin, wie

auch der Kombination aus Fluvastatin und Valsartan signifikant unterschiedlich im Vergleich zum medikamentenunabhängigen Ausgangswert und der alleinigen Gabe von Valsartan.



* $P < 0.05$ vs. baseline

Kontrastergebnisse (K-Matrix)

Treatment Einfacher Kontrast ^a		Abhängige Variable	
		Chol_total	
Stufe 2 gegen Stufe 1	Kontrastschätzer	-1,381	
	Hypothesenwert	0	
	Differenz (Schätzung - Hypothesen)	-1,381	
	Standardfehler	9,458	
	Signifikanz	,884	
	95% Konfidenzintervall für die Differenz	Untergrenze Obergrenze	-20,300 17,538
	Stufe 3 gegen Stufe 1	Kontrastschätzer	-39,286
Hypothesenwert		0	
Differenz (Schätzung - Hypothesen)		-39,286	
Standardfehler		9,458	
Signifikanz		,000	
95% Konfidenzintervall für die Differenz		Untergrenze Obergrenze	-58,205 -20,367
Stufe 4 gegen Stufe 1		Kontrastschätzer	-43,048
	Hypothesenwert	0	
	Differenz (Schätzung - Hypothesen)	-43,048	
	Standardfehler	9,458	
	Signifikanz	,000	
	95% Konfidenzintervall für die Differenz	Untergrenze Obergrenze	-61,967 -24,129

a. Referenzkategorie = 1

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Chol_total

LSD

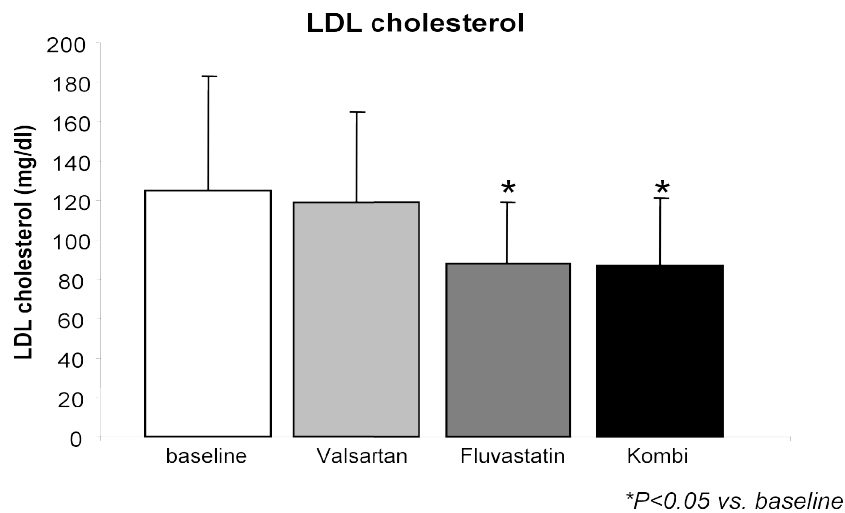
(I) Treatment	(J) Treatment	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	1,3810	9,45815	,884	-17,5382	20,3001
	3	39,2857*	9,45815	,000	20,3666	58,2048
	4	43,0476*	9,45815	,000	24,1285	61,9667
2	1	-1,3810	9,45815	,884	-20,3001	17,5382
	3	37,9048*	9,45815	,000	18,9857	56,8239
	4	41,6667*	9,45815	,000	22,7476	60,5858
3	1	-39,2857*	9,45815	,000	-58,2048	-20,3666
	2	-37,9048*	9,45815	,000	-56,8239	-18,9857
	4	3,7619	9,45815	,692	-15,1572	22,6810
4	1	-43,0476*	9,45815	,000	-61,9667	-24,1285
	2	-41,6667*	9,45815	,000	-60,5858	-22,7476
	3	-3,7619	9,45815	,692	-22,6810	15,1572

Basiert auf beobachteten Mittelwerten.

* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe ,05 signifikant.

Ähnliche Ergebnisse resultierten bei der Bestimmung des LDL-Cholesterins.

Als Ausgangswert ohne medikamentöse Beeinflussung wurden hier 125 mg/dl \pm 57,8 mg/dl gemessen. Valsartan vermochte diesen Wert auf 119 mg/dl \pm 46,1 mg/dl senken. Die alleinige Gabe von Fluvastatin erbrachte eine signifikante Senkung auf 88mg/dl \pm 30,7 mg/dl (p-Wert 0,001). Die Kombination beider Substanzen ergab einen LDL-Wert von 87 mg/dl \pm 37,9 mg/dl (p-Wert 0,001)



Kontrastergebnisse (K-Matrix)

Treatment Einfacher Kontrast ^a		Abhängige Variable	
		LDL	
Stufe 2 gegen Stufe 1	Kontrastschätzer		-5,714
	Hypothesenwert		0
	Differenz (Schätzung - Hypothesen)		-5,714
	Standardfehler		8,410
	Signifikanz		,499
	95% Konfidenzintervall für die Differenz	Untergrenze	-22,537
		Obergrenze	11,109
Stufe 3 gegen Stufe 1	Kontrastschätzer		-36,619
	Hypothesenwert		0
	Differenz (Schätzung - Hypothesen)		-36,619
	Standardfehler		8,410
	Signifikanz		,000
	95% Konfidenzintervall für die Differenz	Untergrenze	-53,442
		Obergrenze	-19,796
Stufe 4 gegen Stufe 1	Kontrastschätzer		-38,143
	Hypothesenwert		0
	Differenz (Schätzung - Hypothesen)		-38,143
	Standardfehler		8,410
	Signifikanz		,000
	95% Konfidenzintervall für die Differenz	Untergrenze	-54,966
		Obergrenze	-21,320

a. Referenzkategorie = 1

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: LDL

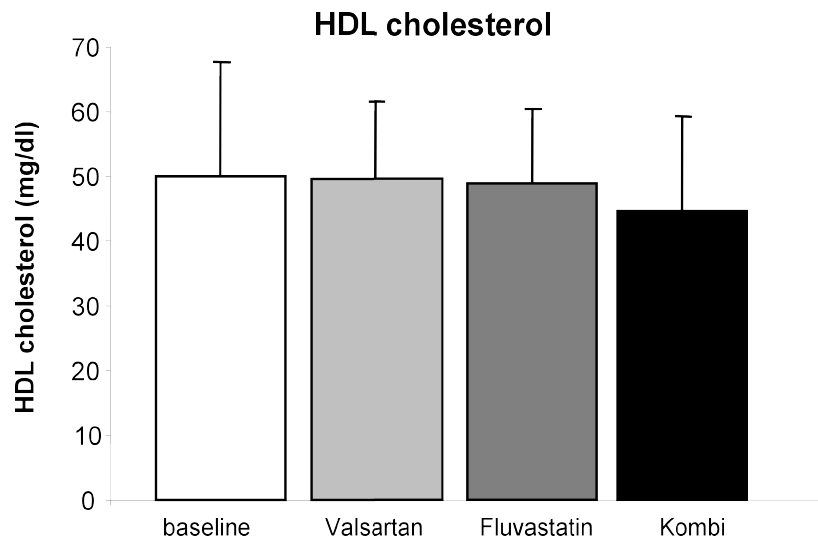
LSD

(I) Treatment	(J) Treatment	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	5,7143	8,41017	,499	-11,1086	22,5371
	3	36,6190*	8,41017	,000	19,7962	53,4419
	4	38,1429*	8,41017	,000	21,3200	54,9657
2	1	-5,7143	8,41017	,499	-22,5371	11,1086
	3	30,9048*	8,41017	,001	14,0819	47,7276
	4	32,4286*	8,41017	,000	15,6057	49,2514
3	1	-36,6190*	8,41017	,000	-53,4419	-19,7962
	2	-30,9048*	8,41017	,001	-47,7276	-14,0819
	4	1,5238	8,41017	,857	-15,2990	18,3467
4	1	-38,1429*	8,41017	,000	-54,9657	-21,3200
	2	-32,4286*	8,41017	,000	-49,2514	-15,6057
	3	-1,5238	8,41017	,857	-18,3467	15,2990

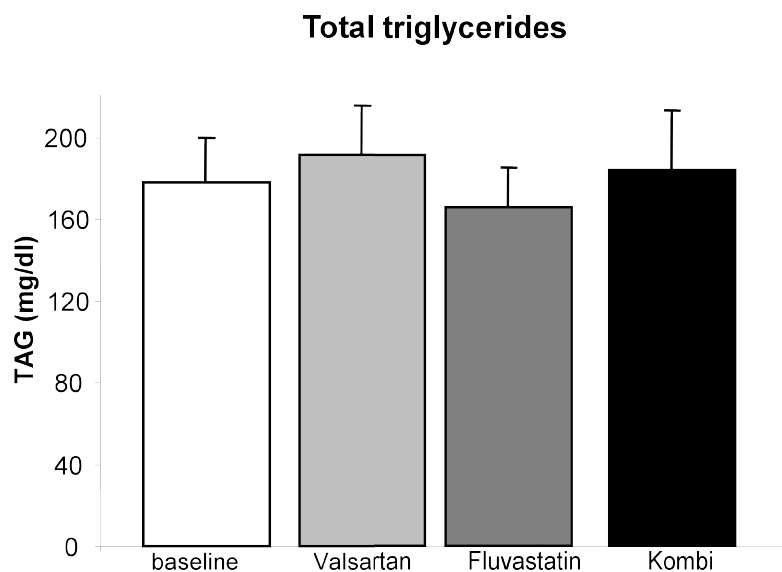
Basiert auf beobachteten Mittelwerten.

* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe ,05 signifikant.

Der Ausgangswert des HDL betrug $50 \text{ mg/dl} \pm 19,3 \text{ mg/dl}$. Nach alleiniger Valsartangabe sowie unter Fluvastatingabe und 4-wöchiger Kombinationstherapie zeigten sich keine signifikanten Änderungen.



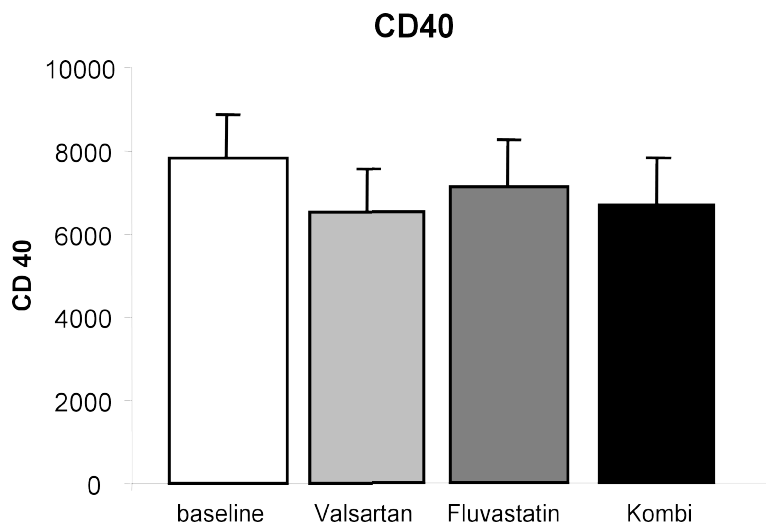
Die erste Bestimmung der Triglyceride erbrachte Werte von $178 \text{ mg/dl} \pm 56,7 \text{ mg/dl}$. Nach einer Behandlung mit Valsartan wurden die Triglyceride mit $191 \text{ mg/dl} \pm 51,8 \text{ mg/dl}$ gemessen. Alleinige Gabe von Fluvastatin erbrachte den Wert $166 \text{ mg/dl} \pm 50,4 \text{ mg/dl}$ und eine Kombination von Valsartan und Fluvastatin erbrachte $184 \text{ mg/dl} \pm 56,2 \text{ mg/dl}$. ($p=0,24$)



4.3.3 Auswirkungen auf den CD40-Liganden

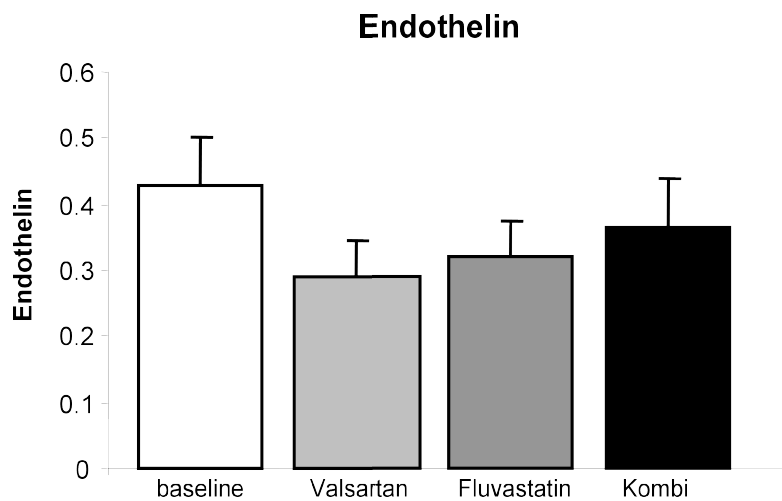
Weiterer Endpunkt der Studie war die Bestimmung von CD40 Ligand mittels ELISA.

Als Ausgangswert ohne antiatherogene Medikation wurde ein Mittelwert von 7863 pg/ml \pm 4742 pg/ml gemessen. Unter der Behandlung mit Valsartan wurden dieser auf 6521 pg/ml \pm 4700 pg/ml gesenkt. Fluvastatingabe erbrachte einen Wert von 7139 pg/ml \pm 5169 pg/ml und die Kombinationstherapie eine Senkung auf 6712 pg/ml \pm 5264 pg/ml. Der p-Wert betrug hier 0.088. Man sieht somit eine Tendenz, die jedoch nicht signifikant ist.



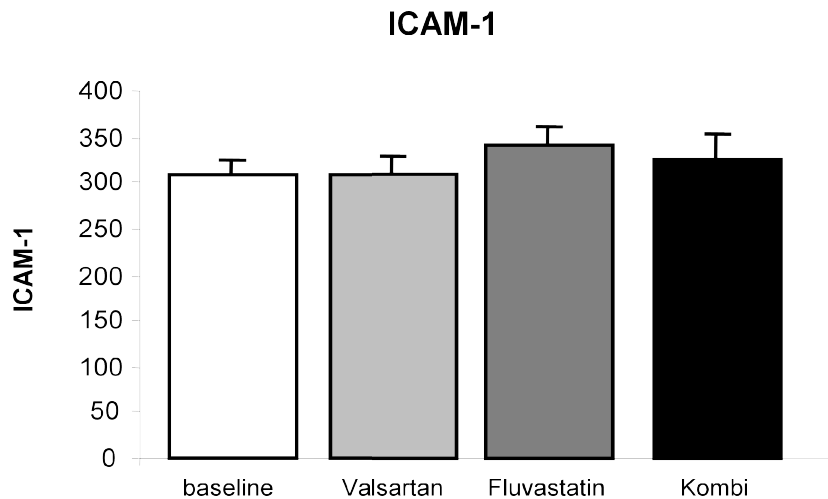
4.3.4 Wirkungen auf Big- Endothelin-1

Weitere Parameter für oxidativen Stress war die Bestimmung von Endothelin-1 im Serum mittels ELISA. Hier wurden durchschnittliche Ausgangswerte von $0.43 \text{ pg/ml} \pm 0.32 \text{ pg/ml}$ gemessen. Valsartangabe vermochte eine Senkung auf $0.29 \text{ pg/ml} \pm 0.25 \text{ pg/ml}$ zu bewirken, Fluvastatin auf $0.32 \text{ pg/ml} \pm 0.25 \text{ pg/ml}$ und die Kombination Fluvastatin/Valsartan ergab einen Wert von $0.36 \pm 0.32 \text{ pg/ml}$. Der p-Wert ist mit 0.08 nicht signifikant, zeigt aber eine Tendenz.



4.3.5 Effekte auf sICAM-1

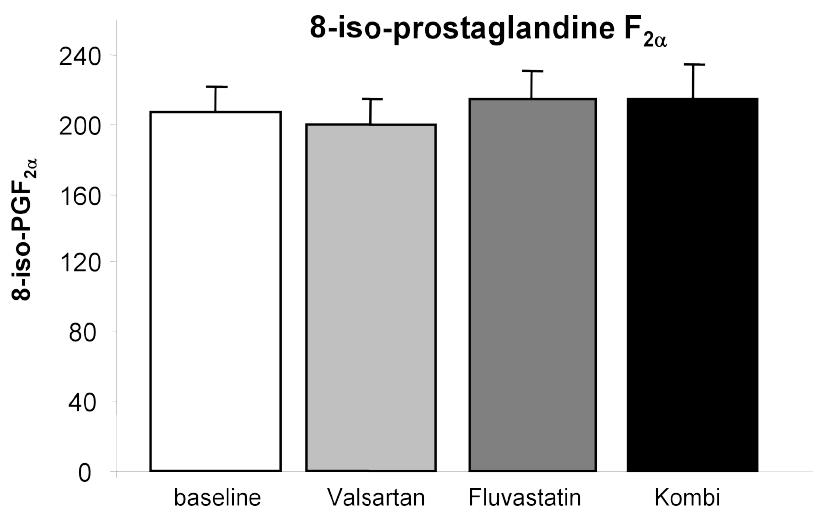
Ebenso erfolgte die laborchemische Messung des Markers ICAM-1 mittels ELISA. Hierbei wurde ein Ausgangswert von $308 \text{ ng/ml} \pm 73 \text{ ng/ml}$ bestimmt, der sich nach alleiniger Valsartangabe nicht änderte ($310 \text{ ng/ml} \pm 82 \text{ ng/ml}$). Unter Fluvastatin stieg er auf $339 \text{ ng/ml} \pm 103 \text{ ng/ml}$ und betrug nach Kombinationsgabe $323 \text{ ng/ml} \pm 141 \text{ ng/ml}$. Diese Resultate sind nicht signifikant (p-Wert 0.25).



4.3.6 Auswirkungen auf 8-iso-Prostaglandin F_{2α} im Urin

Letztlich diente ebenfalls 8-iso-Prostaglandin F_{2α} als Marker für oxidativen Stress im Urin. Die Bestimmung erfolgte mittels Kombination aus Dünnschicht-Chromatographie und Tandem Massenspektrometrie.

Ausgangswert hier war 207 pg/mg Kreatinin \pm 69 pg/mg Kreatinin. Valsartangabe ergab eine Messung von 200 pg/mg Kreatinin \pm 65 pg/mg Kreatinin. Aus der Medikation mit Fluvastatin resultierten 214 pg/mg Kreatinin \pm 90 pg/mg Kreatinin und die Kombinationsgabe erbrachte Werte von 215 pg/mg Kreatinin \pm 74 pg/mg Kreatinin. Der p-Wert beträgt 0.669. Die Resultate sind nicht signifikant.



5 DISKUSSION

5.1 Einfluss von Mono- oder Kombinationstherapie mit Valsartan und Fluvastatin auf die Endothelfunktion

In der vorliegenden Arbeit haben wir den Einfluss von Valsartan und Fluvastatin auf die NO-vermittelte Endothelfunktion mittels Ultraschalluntersuchung der A. brachialis untersucht. Bereits in vorausgehenden Studien konnte gezeigt werden, dass ACE- Hemmer und lipidsenkende Medikation die Endothelfunktion in den Koronargefäßen und peripheren Gefäßen positiv beeinflussen konnte.¹

Der Mechanismus durch die Effekte dieser Medikamente auf das Endothel ist bislang nicht vollständig geklärt. Jedoch weisen die Studienergebnisse mit tendenziell zunehmender Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass oxidativer Stress, die Produktion freier Radikale und die Synthese atherogener Zytokine eine maßgebende Mitschuld an endothelialer Dysfunktion tragen. Ein positiver Mechanismus von Statinen und ACE- sowie AT-II-Hemmern wird vermutlich durch die Verminderung der Synthese atherogener Zytokine ausgelöst.

Ziel dieser Studie war zu beurteilen, ob der AT-II-Rezeptor- Antagonist Valsartan und der HMG-CoA-Reduktasehemmer Fluvastatin als Monotherapie die Endothelfunktion zu verbessern vermag und ob beide als Kombinationstherapie angewandt überadditive Eigenschaften besitzen.

Ein positives Ergebnis hinsichtlich der hier aufgestellten Hypothese konnte in dieser Studie nicht verzeichnet werden. Es fand sowohl unter Monotherapie der einzelnen Medikamente, als auch in der Kombination keine relevante Verbesserung der flussvermittelten Dilatation statt.

5.2 Einfluss von Mono- oder Kombinationstherapie mit Valsartan und Fluvastatin auf die Synthese atherogener Zytokine

5.2.1 Endothelin-1

Endothelin-1 ist ein Peptidhormon, zu dessen Bildung und Freisetzung es in vielen körpereigenen Zellen, insbesondere in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße kommt. Über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt es seine Effekte.⁹¹

Die endogene Synthese wird aller Wahrscheinlichkeit nach durch die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies begünstigt. Eine Hochregulation in Zellen erfolgt nach Hypoxie, LDL-Oxidation und durch Zytokine.⁹²

Es gilt als potentester Vasokonstriktor und als pathogener Entstehungsfaktor für atherosklerotische Umbauvorgänge und Hypertonus. Erhöhte Endothelin-Spiegel sind bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen und pro-atherosklerotischen Krankheiten wie Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie messbar.⁹³

Darüber hinaus konnte in vorausgegangenen Studien bereits eine messbare Steigerung der Endothelin-1-Synthese vermittelt durch Angiotensin II gezeigt werden.⁹⁴ Daher ist davon auszugehen, dass AT-II-Rezeptor-Antagonisten einen positiven Einfluss auf oxidativen Stress und die Endothelin-1 Synthese nehmen.

Als Einflussgröße auf oxidativen Stress durch Valsartan und Fluvastatin haben wir Endothelin-1 auch in dieser Studie als Marker gewählt. Es galt zu überprüfen ob Valsartan und Fluvastatin die Hochregulation von Endothelin-1 signifikant reduzieren kann.

Unter einer jeweils 4-wöchigen Therapie der 21 Studienpatienten mit Valsartan, Fluvastatin und der Kombination beider Medikamente wurden keine signifikanten Änderungen der Endothelin-Plasmakonzentration gemessen. Es konnte allerdings eine Tendenz hinsichtlich einer Syntheseminderung beobachtet werden. (p-Wert: 0.08) Die besten Ergebnisse zeigten hier die Monotherapie mit Valsartan mit einer Senkung des Ausgangswertes von $0,43 \text{ pg/ml} \pm 0,3 \text{ pg/ml}$ auf $0,29 \text{ pg/ml} \pm 0,25 \text{ pg/ml}$.

5.2.2 ICAM-1

Das intrazelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 ist ein Transmembranprotein welches mit Leukozyten- und Endothelzellen assoziiert wird. Durch Induktion, etwa durch Zytokine erhöht sich die ICAM-1 Konzentration. Es dient Integrinen als Ligand und spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen immunologischen Vorgängen wie Leukozytenmigration und Aktivierung von T-Lymphozyten.⁹⁵

Erhöhte Serumspiegel wurden bei verschiedenen Infektionskrankheiten und Autoimmun Erkrankungen gemessen.⁹⁶

ICAM-1 hat sich als Marker für oxidativen Stress etabliert. In bisherigen Studien wurden erhöhte Spiegel mit kardiovaskulären Erkrankungen, Typ-II-Diabetes und arterieller Hypertonie assoziiert.⁹⁷

Der genaue pathophysiologische Regulationsmechanismus der Synthese von ICAM-1 ist an vielen Stellen weitgehend unverstanden. Der Einfluss von HMGCoA- Inhibitoren und AT-1-Rezeptoren ist in der Vergangenheit bereits untersucht worden. So konnten Romano et al. zeigen, dass Fluvastatin bei Patienten mit Hypercholesterinämie zu einer Senkung der ICAM-1 Plasmaspiegel führt.⁹⁸

Weiterhin wurde in vitro sowie in vivo eine Hochregulation von ICAM-1 durch Angiotensin-II- sowie dessen Hemmung durch AT-1-Rezeptor-Blockade festgestellt.⁹⁹

In dieser Studie wurde ICAM-1 ebenfalls auf Spiegelsenkung unter Fluvastatin und Valsartan untersucht. Eine Senkung durch Mono- oder Kombinationstherapie konnte allerdings nicht beobachtet werden.

5.2.3 Isoprostane

Da F2-Isoprostane als quantitativer Marker einer anti-oxidativen Therapie etabliert ist¹⁰⁰, haben wir die Konzentration von 8-iso-Prostaglandin F2 α mittels Tandem Massenspektrometrie im Urin unserer Studienpatienten untersucht.

Isoprostane sind Eicosanoide und entstehen während der Katalysierung ungesättigter Fettsäuren des Arachidonsäure-Zyklus. Sie verfügen über mediatorische Eigenschaften während entzündlicher Prozesse, zählen zu den potenten Vasokonstriktoren und dienen der Freisetzung von Cyclooxygenase-Produkten.¹⁰¹

Verschiedene experimentelle und klinische Daten legen nahe, dass F2-Isoprostane eine wichtige Rolle bei der Atherogenese spielen.^{100 101} Weiterhin konnten F2-Isoprostane als verlässliche Marker der Lipid-Peroxidation etabliert werden.¹⁰²

Zum Beispiel wurden bei Atherosklerose, inflammatorischen Gefäßprozessen und Ischämie / Reperfusion erhöhte Werte gemessen.¹⁰³ Dies sind pathophysiologische Bedingungen, die mit einer vermehrten Lipid-Peroxidation einhergehen.

Im tierexperimentellen Modell zeigten sich bedingt durch Angiotensin II-Infusionen erhöhte F2-Isoprostan-Plasma Spiegel. Dies ist als Hinweis zu werten, dass Angiotensin II oxidativen Stress verursacht.¹⁰⁴

Es wäre somit zu erwarten, dass eine Therapie mit AT-II-Rezeptor Antagonisten folglich die Isoprostan-Synthese reduziert.

In dieser Studie war bei der Konzentrationsmessung von 8-iso-Prostaglandin F2 α im Urin allenfalls eine Tendenz bei der Monotherapie mit Valsartan zu verzeichnen. Die Fluvastatintherapie und auch die Kombinationstherapie über jeweils 4 Wochen erbrachte keine Spiegelsenkung von 8-iso-Prostaglandin F2 α im Urin.

5.2.3 CD40 Ligand

Als weiteren Marker für oxidativen Stress haben wir den Serumgehalt von CD40 Ligand unserer Studienpatienten unter Valsartan- und Fluvastatintherapie bestimmt.

CD40 Ligand ist ein Oberflächenprotein das hauptsächlich auf T-Zellen, aber auch Gefäßendothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen, Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen, Fibroblasten und Mastzellen exprimiert wird.¹⁰⁵

Durch Proteolyse kann es in eine lösliche Form überführt werden. Es stimuliert in Anwesenheit von Zytokinen die Immunglobulinsekretion von B- Zellen. Die Rezeptorbindung an CD40 induziert B-Zell-Proliferation und vermittelt eine umfassende Breite an anderen immunologischen und inflammatorischen Prozessen.¹⁰⁶

Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung konnten erhöhte Konzentrationen von CD40 Ligand im Plasma nachgewiesen werden.¹⁰⁷ Erhöhte Spiegel von löslichem und membrangebundenem CD40L bei Patienten mit instabiler Angina pectoris deuten darauf hin, dass eine Interaktion zwischen CD40 und seinem Liganden eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose sowie beim Auftreten des akuten Koronarsyndroms spielen.¹⁰⁸

In bisherigen Studien wurde beobachtet, dass Angiotensin II Gefäßzellen stimuliert, vermehrt CD40/CD40L zu exprimieren.¹⁰⁹

Die Therapie mit dem AT-I- Rezeptor- Antagonisten Valsartan könnte folglich eine Reduktion der CD40-Synthese bedeuten.

Weitere Studienergebnisse postulierten, dass HMG-CoA Reduktase- Hemmer die CD40-Expression in menschlichen Endothelzellen reduzieren.¹¹⁰

In der von uns untersuchten Patientengruppe zeigten sich Tendenzen hinsichtlich einer reduzierten CD40- Ligand- Konzentration im Serum. Die Mono- oder Kombinationstherapie mit Fluvastatin und Valsartan erbrachte jedoch keine signifikante Reduzierung von CD- 40- Ligand. (p-Wert 0,09) Die niedrigsten Werte im Vergleich zur Ausgangssituation erzielte Valsartan.

5.3 Einfluss von Mono- oder Kombinationstherapie mit Valsartan und Fluvastatin auf Blutfette

Weiterer Untersuchungsparameter der Studie waren die Bestimmung des Cholesterinspiegels im Blut. Die Bestimmung des Gesamtcholesterins zeigte signifikante Spiegelsenkungen unter Fluvastatin und der Kombinationstherapie (p-Wert 0,001). Hierbei waren die Senkungen am ausgeprägtesten bei der Kombinationstherapie aus Valsartan und Fluvastatin.

Ähnliche Ergebnisse ergab die Messung des LDL-Cholesterins. Durch Monotherapie mit Fluvastatin, sowie der Kombination aus Valsartan und Fluvastatin wurden signifikante Spiegelsenkungen erreicht. (p- Wert 0.001)

5.4 Limitation der Studie

Ein wichtiger limitierender Faktor der Studie ist die geringe Patientenpopulation mit nur 21 Patienten.

Da das Kollektiv ausschließlich aus dem Universitären Herzzentrum stammte könnte eine Selektion hinsichtlich des erhöhten Schweregrad der Herzgefäßerkrankung im Gegensatz zu kleineren kardiologischen Zentren stattgefunden haben. Es ist durchaus vorstellbar, dass bei einem gewissen Schweregrad die positive Beeinflussung durch medikamentöse Therapie erst zu einem späteren Zeitpunkt oder einer höheren Dosis festzustellen ist.

Begleitmedikamente wurden ebenfalls dokumentiert, und Ausschlusskriterium war die Vitamin-Einnahme und die gleichzeitige Medikation mit Fibraten. Der Einfluss dieser Medikamente auf den oxidativen Stress und eine Verfälschung der Ergebnisse ist naheliegend. Welchen Einfluss aber weitere Medikamente unserer Patienten auf die von uns bestimmten Parameter haben, kann nach heutiger Studienlage nicht beurteilt werden.

Es konnte kein Effekt der Studienmedikation auf den Blutdruck festgestellt werden. Eventuell ist dies ein Hinweis darauf, dass die Behandlungsdauer zu kurz war, um bei den anderen Parametern klare Ergebnisse zu sehen.

Eine klare Limitation der Studie ist darüber hinaus, dass es keine wash-out Phase zwischen den verschiedenen Medikamenten gab. Dies trägt mit Sicherheit auch dazu bei, dass die beobachteten Effekte, insgesamt wenig aufschlussreich sind.

Die Compliance der Patienten ist ebenfalls ein limitierender Faktor der Studie. Eine Kontrolle der Einnahme der Studienmedikation konnte nur anamnestisch und durch die Rückgabe der Studienverpackung gemacht werden. Die Ergebnisse der Cholesterinspiegel legen jedoch nahe, dass eine korrekte Einnahme der Medikation stattgefunden hat.

Eine mögliche Einflussgröße ist eventuell auch die Lagerung der Proben gewesen. Bei der Einfrierung und Lagerung, sowie dem Auftauen und dem Handling der Proben wurde nach Vorschrift gehandelt und versucht, alle möglichen Störfaktoren zu minimieren. Eine Kontamination, oder verschiedene oxidative Prozesse durch den Zeitraum der Lagerung können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da der Zeitraum der Studie über mehrere Jahre angelegt war, könnten auch die verschieden lange Lagerung der Proben bis zur endgültigen Messung eine Verfälschung der Resultate mit sich gezogen haben.

Weiterhin könnte auch die Anzahl der Nebenerkrankungen eine Rolle spielen. Wissentlich, dass sowohl Rauchen, als auch Nebenfaktoren wie die körperliche Aktivität, die Ernährung und Adipositas einen Einfluss auf oxidativen Stress und die Synthese atherogener Zytokine haben, wurde dies in unserer Studie nicht berücksichtigt.

5.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass AT1-Rezeptor-Blocker und HMGCoA-Inhibitoren über antioxidative und antiatherogene Eigenschaften verfügen.

Die Beurteilung der antioxidativen und antiatherogenen Eigenschaften dieser beiden Substanzgruppen in vivo ist von großer klinischer Bedeutung.

Aus diesem Grund wurden 21 Patienten mit koronarer Herzkrankheit in diese randomisierte Doppelblind-Crossover-Studie mit einer zunächst 4 wöchigen singulären antihypertensiven Medikation ohne ACE-Hemmer, AT-II-Blocker oder Statin bzw. Fibrat- und darauffolgend einer jeweilig 4-wöchigen Therapie mit Valsartan oder Fluvastatin oder einer Kombinationstherapie aus Valsartan und Fluvastatin- eingeschlossen.

Vor jedem Wechsel der Medikation erfolgte eine Messung der flussabhängigen Dilatation der Arteria brachialis- sowie die Bestimmung von Plasmalipiden und den Markern Endothelin-1, CD40-Ligand und ICAM-1 im Serum und Isoprostan im Urin.

Außer bei der Messung der Blutfette konnten keine signifikanten Senkungen der o.g. Parameter beobachtet werden. Bei Endothelin-1 und CD40- Ligand sah man Tendenzen einer Spiegelsenkung durch Valsartan und Fluvastatin.

Positive Ergebnisse hinsichtlich der von uns postulierten Hypothese, dass Valsartan und Fluvastatin einen Einfluss auf oxidativen Stress und die Synthese atherogener Zytokine haben und ob beide Substanzgruppen in Kombination additive oder möglicherweise überadditive Effekte generieren, konnten in dieser Studie nicht verzeichnet werden.

Eine antioxidative Wirkung von AT1-Rezeptor-Blockern, ACE-Hemmern und HMGCoA-Inhibitoren konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden. Ziel dieser Studie war es, genauere Informationen über die beteiligten antioxidativen Mechanismen zu geben und somit einen Beitrag zur Erklärung der in der Klinik beobachteten positiven Effekte leisten zu können.

Da die Ergebnisse dieser Studie keine definitiven Anhaltspunkte geben konnten, müssen weitere Studien folgen um eine genauere Differenzierung der antioxidativen Mechanismen dieser Medikamente aufzuschlüsseln.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ANP	Atrial natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
AT	Angiotensin
BMI	Body Mass Index
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CD	Cluster of Differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C- reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVS	Digitales Video Streaming
EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA E	ethylene diamine Tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
ET	Endothelin
FMD	Flow Mediated Dilatation
GMP	Guanosin- Monophosphat
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat- Transaminase
GvHD	Graft versus Host Disease
HDL	High density Lipoprotein
HMGC _o A	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
HTMP	1mM5-hydroxy-tempo
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit

LDL	Low density Lipoprotein
LOX	Oxidierter LDL Rezeptor
MCP	Monozyte chemoattractant protein
MOD	Multi Optical Disc
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Reduzierte Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthetase
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ²⁻	Superoxidanion
ONOO-	Peroxynitrit
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PBF	Para-Hydroxybenzoesäure
PGF 2 α	Prostaglandin 2 α
RA	Rheumatoide Arthritis
RAS	Renin Angiotensin System
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
TGF	Transforming Growth Factor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
t-PA	Tissue plasminogen activator
TRAP	TNF-Related Activation Protein
TBAM	T-cell B-cell Activating Molecule
U	Unit
VCAM	Vascular Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	Vascular smooth muscle cells
XO	Xanthin-Oxidase

7 LITERATUR

- ¹ Morawietz, Henning: Mechanosensitive Genexpression und oxidativer Streß in Gefäßzellen: Bedeutung für die Atherosklerose. Halle, Univ., Math.-Nat.-Tech. Fak., 2001
- ² Statistisches Bundesamt, Wiesbaden (<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt,templateId=renderPrint.psml>)
- ³ Kapitel IX der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-10);(Stat.Bundesamt,Wiesbaden)
- ⁴ Kardiologie compact. Thieme Verlag. Mewis, Riessen, Spyridopoulos. Auflage 2. S.132.
- ⁵ Dr. med. Armin Imhof, Prof. Dr. med. Wolfgang Koenig: Atherosklerose als inflammatorischer Prozess; Aerzteblatt Heft 3. 17. Januar 2003. S.117-128
- ⁶ Helmut Sies, 1986
- ⁷ Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340. S.115-126.
- ⁸ Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. Lancet 1999;353(Suppl II):S115-119.
- ⁹ Gryglewski et al. 1986. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature 320, S.454 - 456
- ¹⁰ Heitzer et al. (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease
- ¹¹ The role of inflammatory stress in acute coronary syndrome. SHEN Cheng-xing, CHEN Hao-zhu, GE Jun-bo. CMJ 2004;Vol.117 No.1: S.133-139
- ¹² Greaves DR, Gordon S. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. Trends Immunol 2001;22. S.180-181.
- ¹³ Bobryshev YV. Can dendritic cells be exploited for therapeutic intervention in atherosclerosis Atherosclerosis 2001;154.S.511-512.
- ¹⁴ Aukrust P, Waehre T, Damas JK, et al. Inflammatory role of platelets in acute coronary syndromes. Heart 2001;86.S.605-606.

- ¹⁵ Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, et al. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA* 2001;286. S.2107-2113.
- ¹⁶ Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, et al. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999;100 S.793-798.
- ¹⁷ Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 1999;85:S.17-24.
- ¹⁸ Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002;53. S.31-47.
- ¹⁹ Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo Authors: Roberts L.J.1; Morrow J.D.Source: *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 28, Number 4, 15 February 2000, S. 505-513
- ²⁰ Hickey, K.A., et al., Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol*, 1985.
- ²¹ Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415
- ²² Yanagisawa, M., et al., A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988. 332(6163): S. 411-415.
- ²³ Janes RW, Peapus DH, Wallace BA. The crystal structure of human endothelin. *Nat Struct Biol.* 1994 May;1(5)S.311-319.
- ²⁴ Levin, E.R., Endothelins. *N Engl J Med*, 1995. 333(6): S. 356-63.
- ²⁵ Endothelial Dysfunktion and Atherosclerosis: Endothelin Receptor Antagonists as Novel Therapeutics, Barton 2000
- ²⁶ Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*, 2002
- ²⁷ Kähler, J., et al., [Endothelins in cardiovascular diseases]. *Z Kardiol*, 1997.86(6): S. 406-16
- ²⁸ Krum, H., et al., Role of endothelin in the exercise intolerance of chronic heart failure. *Am J Cardiol*, 1995. 75(17): S. 1282-3.

- ²⁹ Pacher, R., et al., Plasma big endothelin-1 concentrations in congestive heart failure patients with or without systemic hypertension. *Am J Cardiol*, 1993. 71(15): S. 1293-9.
- ³⁰ Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998;339. S.321–8.
- ³¹ Zouridakis EG, Schwartzman R, Garcia-Moll X, Cox ID, Fredericks S, Holl DW, Kaski JC. Increased plasma endothelin levels in angina patients with rapid coronary artery disease progression. *Eur Heart J* 2001; 22. S.1578–84.
- ³² Bergler-Klein J, Pacher R, Berger R, Bojic A, Stanek B. Neurohumoral and hemodynamic effects of the selective endothelin antagonist LU 135252 in advanced heart failure. Abstracts from Scientific Sessions 2000 of the American Heart Association; *Circulation* 2000; S.102–592.
- ³³ Gattis WA. RITZ-4 Trial. Presented at American Heart Association Scientific Sessions 2001.
- ³⁴ Nakamichi, K., et al., Different distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary tissues revealed by the novel selective ligands BQ-123 and [Ala^{1,3,11,15}]ET-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 182(1): S. 144-50.
- ³⁵ Schönbeck U, Libby P (January 2001). "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad". *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (1): S.4–43.
- ³⁶ Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey et al. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J Biol Chem* 1996;271: S.5965-596
- ³⁷ Involvement of CD40 Ligand-CD40 and CTLA4-B7 Pathways in Murine Acute Graft-Versus-Host Disease Induced by Allogeneic T Cells Lacking CD281 .(Kiyoshi Saito et al.) *The Journal of Immunology*, 1998, 160: S.4225-4231.
- ³⁸ Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ et al. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nature Medicine* 1999;5. S.1313-1316.
- ³⁹ Mach F, Schoenbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis* 1998; 137. S.89-95.
- ⁴⁰ Schoenbeck U, Mach F, Sukhova GK et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res* 1997;81. S.448-454 .
- ⁴¹ Smith-Norowitz TA, Shani J, Weiser W et al. Lymphocyte activation in angina pectoris. *Clin immunol* 1999; 93. S.168-175

- ⁴² Hogg, N. et al. (1991) *Chem. Immunol.* 50:98. Witkowska, A.M. and M.H. Borawska (2004) *Eur. Zytokine Netw.* 15. S.91.
- ⁴³ Staunton, D.E. et al. (1988) *Cell* 52:925. Reilly, P.L. et al. (1995) demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and Integrin Supergene Families *J. Immunol.* 155. S.529
- ⁴⁴ Rosenstein, Y. et al. (1991) Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* 354. S.233.
- ⁴⁵ Pluskota, E. and S.E. D'Souza (2000) Fibrinogen interactions with ICAM-1 (CD54) regulates endothelial cell survival. *Eur. J. Biochem.* 267. S.4693.
- ⁴⁶ McCourt, P.A.G. et al. Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. (1994) *J. Biol. Chem.* 269. S.30081.
- ⁴⁷ Kirchberger, S. et al. (2006). Macrophages in host resistance to lymphoma metastasis in vivo *Immunobiology* 211. S.537.
- ⁴⁸ Chakravorty S.J. and A. Craig (2005). The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur J. Cell Biol.* 84. S.15.
- ⁴⁹ Lentsch, A. B. and P. A. Ward. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* 190: S.343-348, 2000
- ⁵⁰ Lebedeva, T. et al. (2005). ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 17:251. Camacho, S.A. et al. (2001) *Nat. Immunol.* 2. S.523.
- ⁵¹ ROTHLEIN et al. 1991. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *The Journal of Immunology*, Vol 147, Issue 11. S.3788-3793.
- ⁵² Benson, V. et al. (2007) *Curr. Mol. Med.* 7:219. Hoogeveen, R.C. et al. (2007) *Diabetologia* 50. S.36.
- ⁵³ Covarrubias, M. et al. (2007). Plasma intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am. J. Transplant.* 7. S.2573.
- ⁵⁴ Cottone, S. et al. (2007). Influence of metabolic syndrome on hypertension-related target organ damage. *J. Hypertens.* 25. S.423.
- ⁵⁵ Brake, D.K. et al. (2006) ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291. S.1232.

- ⁵⁶ Madej, A. et al. (2005). **Plasma concentrations of adhesion molecules and chemokines in patients with essential hypertension** *Pharmacol. Rep.* 57.S.878.
- ⁵⁷ El-Gohary, A.M. et al. (2004). **Soluble ICAM-1 in patients with chronic hepatitis C infection: a prognostic marker of disease activity.** *Egypt. J. Immunol.* 11. S.109.
- ⁵⁸ Christiansen, I. et al. (1996). **Elevated serum levels of soluble ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphomass correlate with tumor burden, disease activity and other prognostic markers** *Br. J. Haematol.* 92: S. 639-46.
- ⁵⁹ Kang, X. et al. (2005). **Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes.** *World J. Gastroenterol.* 11. S.4250.
- ⁶⁰ Gho, Y.S. et al. (1999). **Angiogenic Activity of Human Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1.** *Cancer Res.* 59:5128. Constans, J. and C. Conri (2006). **Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease.** *Clin. Chim. Acta* 368. S.33.
- ⁶¹ Liu T, Stern A, Roberts LJ, Morrow JD. **The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid.** *J Biomed Sci* 1999; 6. S. 226–235.
- ⁶² Awad JA, Morrow JD, Takahashi K, Roberts LJ II. **Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F₂-isoprostane) metabolites in human urine and plasma.** *J Biol Chem.* 1993;268. S.4161-4169.
- ⁶³ Priya Kunapuli, John A. Lawson, Joshua A. Rokach, Judy L. Meinkoth¶, and Garret A. FitzGerald. **Prostaglandin F₂α (PGF₂α) and the Isoprostane, 8,12-iso-Isoprostane F₂α-III, Induce Cardiomyocyte Hypertrophy.** *J Biol Chem*, Vol. 273, 1998.
- ⁶⁴ Devaraj S, Hirany SV, Burk RF, Jialal I. **Divergence between LDL oxidative susceptibility and urinary F(2)-isoprostanes as measures of oxidative stress in type 2 diabetes.** *Clin Chem* 2001; 47. S.1974–1979.
- ⁶⁵ Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Corradi M, van Rensen L, Geddes DM, et al. **Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis.** *Thorax* 2000; 55S. 205–209.
- ⁶⁶ Cristina Vassalle, Nicoletta Botto, Maria Grazia Andreassi, Sergio Berti and Andrea Biagini. **Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease.** *Coronary Artery Disease* 2003, 14. S.213–218

- ⁶⁷ Dissertation. Karstensen. FEB07(UHZ) Clopidogrel verbessert die Endothel-Funktion und die Bioverfügbarkeit von NO durch anti-oxidative und anti-inflammatorische Effekte bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung
- ⁶⁸ Davies, P.F. (1995): Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* 75: S.519-560
- ⁶⁹ Frangos et al., 1985, Pohl et al., 1986, Nishida et al. 1992.
- ⁷⁰ Justin C . Mason. 2003. Statins and theirs role in vascular protection. *Clinical Science* 105. S. 251-266.
- ⁷¹ Dart, A.M. and Chin-Dusting, J.P. (1996) Lipids and the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 43, S.308-322.
- ⁷² Moncada S. The L- Arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992;145.S. 201-27.
- ⁷³ Laroux, F.S., Lefer, D.J., Kawachi, S. et al.(2000) Role of nitric oxid in the regulation af acute and chronic inflammation. *Antioxid. Redox Signaling* 2, S. 391-396.
- ⁷⁴ Lan Wu, MD et al. 2001. Roles of Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation Associated With Selective Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade With Valsartan in the Improvement of Inflammation-Induced Vascular Injury. *Circulation*; 104. S. 2716-2721.
- ⁷⁵ Paresh Dandona et al. 2003 Angiotensin II Rezeptor Blocker Valsartan suppresses Reactive Oxygen Species Generation in Leukocytes, Neclear Factor- κ B, in Mononuclear Cells of normal Subjects: Evidence of an anti-inflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab* 88.S.4496-4501.
- ⁷⁶ Wu L, Iwai M, Nakagami H, Li Z, Chen R, Suzuki J, Akishita M, de Gasparo M, Horiuchi M. Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation* 2001 Nov 27 ;104 (22):2716 -21 2001; 104. S.2716-2721.
- ⁷⁷ Thomas Karow. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 12. Auflage.2009.S 456.
- ⁷⁸ Bakker-Arkema RG, Davidson MH, Goldstein RJ, Davignon J, Isaacsohn JL, Weiss SR, Keilson LM, Brown WV, Miller VT, Shurzinske LJ, Black DM. Efficacy and safety of a new HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in patients with hypertriglyceridemia. *JAMA.* 1996;275. S.128–133.

- ⁷⁹ Stein EA, Lane M, Laskarzewski P. Comparison of statins in hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol.* 1998;81. S.66B–69B
- ⁸⁰ David J. Maron et al. Current Perspectives on Statins. *Circulation.* 2000;101. S.207
- ⁸¹ Day, A.p. et al. (1997) Effect of simvastatin therapy on cell membrane cholesterol content and membrane function as assessed by polymononuclear cell NADPH oxidase activity. *Ann. Clin. Biochem.* 34. S. 269-275.
- ⁸² LaRosa, J.C. 2001.Pleiotropic effects of statins and their clinical significance. *Am. J. of Cardiology.* 88. S.291-293
- ⁸³ Edzard Schwedhelm et al. Urinary 8-iso-Prostaglandin F2 as a Risk Marker in Patients With Coronary Heart Disease. A Matched Case-Control Study. *Circulation.* 2004;109. S.843-848.
- ⁸⁴ Coretti MC et al, Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow mediated vasodilatation of the brachial artery, *J Am Coll Cardiol* 2002. 39. S. 257-265
- ⁸⁵ Über den Einfluss einer Glykoprotein Iib/IIIa- Rezeptorblockade auf die flussabhängige Dilatation der Arteria brachialis bei perkutaner Koronarintervention. Dissertation Ostad.Hamburg 2004.
- ⁸⁶ Corretti et al. 1995, Levine et al. 1996, Sorensen et al. 1995
- ⁸⁷Vgl.:Über den Einfluss einer Glykoprotein Iib/IIIa-Rezeptorblockade auf die flussabhängige Dilatation der Arteria brachialis bei perkutaner Koronarintervention, Diss. Ostad, HH 2004)
- ⁸⁸ Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1995;332. S.481–487.
- ⁸⁹ Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, et al. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med.* 1995;332.S. 488–493.
- ⁹⁰ Agapitov AV, Haynes WG (March 2002). "Role of endothelin in cardiovascular disease". *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 3 (1). S. 1–15.
- ⁹¹ Yanagisawa M et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1990 Mar 8;344(6262). S. 411-415.

- ⁹² Endothelin-1 and Endothelin Receptor Antagonists as Potential Cardiovascular Therapeutic Agents. Posted: 02/21/2002; Pharmacotherapy. 2002;22(1) © 2002 Pharmacotherapy Publications
- ⁹³ Jan Kähler et al. Endothelin-1 mRNA and protein in vascular wall cells is increased by reactive oxygen species. *Clinical Science* (2002). S 103
- ⁹⁴ Rothlein, R; Dustin, ML; Marlin, SD; Springer, TA (Aug 1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *Journal of Immunology* 137 (4):S. 1270–1274
- ⁹⁵ Seth et al. 1991; Rieckmann et al. 1994
- ⁹⁶ Benson, V. et al. (2007) *Curr. Mol. Med.* 7:219; Hoogeveen, R.C. et al. (2007) *Diabetologia* 50:36; Cottone, S. et al. (2007) *J. Hypertens.* 25. S.423.
- ⁹⁷ Romano M., Mezzetti A., Marulli C., et al. Fluvastatin reduces soluble P-selectin and ICAM-1 levels in hypercholesterolemic patients: role of nitric oxide. *J Invest Med* (2000) 48. S.183–189
- ⁹⁸ L. Pastore et al. Angiotensin II Stimulates Intercellular Adhesion Molecule-1v(ICAM-1) Expression by Human Vascular Endothelial Cells and Increases Soluble ICAM-1 Release In Vivo. *Circulation* 1999;100. S.1646-1652
- ⁹⁹ Jean-Luc Cracowskia. *Vascular Biology of the Isoprostanes.* *J Vasc Res* 2001.38. S.93–103
- ¹⁰⁰ Morrow JD, Roberts LJ (1996). The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.* 51 (1). S. 1–9
- ¹⁰¹ Roberts LJ, Morrow JD: Measurement of F₂- isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000;28. S.505–513.
- ¹⁰² Reilly MP, Delanty N, Roy L, Rokach J, Callaghan PO, Crean P, Lawson JA, Fitzgerald GA. Increased formation of the isoprostanes IPF₂-I and 8-epi-prostaglandin F₂· in acute coronary angioplasty: Evidence for oxidant stress during coronary reperfusion in humans. *Circulation* 1997;96. S. 3314–3320.
- ¹⁰³ Reckelhoff JF et al. Subpressor doses of angiotensin II increase plasma F(2)-isoprostanes in rats. *Hypertension.* 2000 Jan;35(1 Pt 2). S.476-479.
- ¹⁰⁴ Mach, F. et al. (1997) Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implications for CD40–CD40 ligand signaling in atherosclerosis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94. S.1931.

- ¹⁰⁵ Grewal, I.S. and R.A. Flavell (1997). The CD40 ligand. At the center of the immune universe? *Immunol. Res.* 16. p59.
- ¹⁰⁶ Smith-Norowitz TA, Shani J, Weiser W et al. Lymphocyte activation in angina pectoris. *Clin immunol* 1999; 93. S. 168-175
- ¹⁰⁷ Aukrust, P. et al. Enhanced Levels of Soluble and Membrane-Bound CD40 Ligand in Patients With Unstable Angina. *Circulation* 100. (1999). S. 614.
- ¹⁰⁸ Souza Heraldo et al. Angiotensin II modulates CD40 expression in vascular smooth muscle cells. *Clinical science* 2009;116(5):423-31.
- ¹⁰⁹ Mulhaupt et al. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. 2003. *Cardiovascular research.* vol. 59, Nr.3, S. 755-766
- ¹¹⁰ Criscione L et al. Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin II AT1-receptor subtype. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 761-71

8 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Thomas Meinertz danke ich dafür, dass er mir eine Dissertation in seiner Abteilung ermöglichte.

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Jan Kähler für die Überlassung des Themas und die nette und engagierte Unterstützung bei der klinischen Durchführung und seine fachlichen und persönlichen Anregungen.

Ebenso danke ich Dres. Tanja und Volker Rudolph und Dorit Knappe für die kontinuierliche Beratung, Verbesserungen und Motivation.

Sabine Werth und Hartwig Wieboldt danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft, Geduld und die freundliche Arbeitsatmosphäre während der Versuchsdurchführung.

Dank gilt natürlich ebenso den zahlreichen Patienten, die sich vertrauensvoll in unsere Obhut begeben haben und ohne die es nicht möglich gewesen wäre diese Studie zu realisieren.

Bei meinen Freunden Anne, Peer, Jonas, Ulrike und Oliver bedanke ich mich für die moralische Unterstützung und für die schöne Zeit während des Studiums und den letzten acht Jahren in Hamburg.

Zuletzt danke ich meiner Mutter die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht hat und mich während der Promotion stets mit Anteilnahme und Interesse begleitet hat.

10 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.



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für
Innere Medizin
Abteilung für Kardiologie
Prof. Dr. Thomas Meinertz
Direktor

Martinistraße 52
20246 Hamburg
www.uke.uni-hamburg.de
meinertz@uke.uni-hamburg.de
Tel. 040 - 42803 3972
Fax. 040 - 42803 2967

Patientenaufklärung

zur klinischen Studie

„Wirkung von Valsartan und Fluvastatin auf den oxidativen Stress und die Synthese artherogener Zytokine bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung“

Liebe Patientin, lieber Patient

Die Medizin ist ein Gebiet, das einer ständigen Weiterentwicklung unterliegt, die gewährleistet, dass immer bessere Methoden zur Behandlung der einzelnen Krankheitsbilder zur Verfügung stehen. Die erzielten Fortschritte werden dabei in entscheidendem Maße durch klinische Studien erzielt.

Eine unabdingbare Voraussetzung für die Durchführung solcher Studien ist die Bereitschaft von Patienten daran teilzunehmen. Die Ihnen hier vorgestellte Studie hat zum Ziel, zu einem besseren Verständnis der koronaren Herzkrankheit beizutragen und somit auch neue Wege der Therapie auf diesem Gebiet zu eröffnen.

Die Studie basiert auf der Theorie, dass bei der Progression der koronaren Herzkrankung eine im Körper ablaufende Entzündungsreaktion einen bedeutenden Anteil hat. Die Aktivität der Entzündung ist zum einen anhand mehrerer Parameter im Blut sowie im Urin nachweisbar, zum anderen erlaubt die Untersuchung der Endothelfunktion anhand von Ultraschall- und Blutdruckmessungen einen Rückschluss auf die Entzündungsaktivität. Es wird vermutet, dass es mit Hilfe von bestimmten Medikamenten (z.B. AT-1-Blocker oder HMG-CoA-Inhibitoren) möglich ist, die Entzündungsaktivität zu vermindern. Dadurch könnte möglicherweise die Progression der Arteriosklerose eingedämmt werden.

Zu diesem Zweck ist bei Ihnen die Gabe verschiedener Medikamente nach einem speziellen Schema vorgesehen. Alle verwendeten Medikamente sind bereits seit langer Zeit im klinischen Alltag in Gebrauch, somit sind sowohl die Wirkungen als auch die Nebenwirkungen hinreichend bekannt. Die verabreichten Dosen entsprechen ebenfalls denen im klinischen Alltag verwendeten.

Nach dem Zufallsprinzip wird für Sie ein Medikamentengabe-Schema ausgewählt. Nach unserem Studienprotokoll ist vorgesehen, dass Sie über 16 Wochen jeweils für 4 Wochen **ein** beziehungsweise eine Kombination aus **zwei** Medikamenten in üblicher Dosierung zusätzlich zu Ihrem Antihypertensivum einnehmen.

Bei den Medikamenten handelt es sich um:

1) Valsartan (*minimal 2 x 80 mg, maximal 2x 160 mg*): ein AT-1-Blocker mit nach bisherigen Erkenntnissen vorwiegend antihypertensiver Wirkung. Die möglichen Nebenwirkungen sind Hypotonie, Schwindel (**3,6%**), Hyperkaliämie (**4,4%**) sowie eine Verschlechterung einer bereits bestehenden Nierenfunktionsstörung (**<1%**). Bei der gleichzeitigen Einnahme eines anderen Antihypertensivums kann es zu einer verstärkten Blutdruck-senkenden Wirkung kommen. **Zu einem Anstieg der Serum-Kalium-Konzentration kann es bei gleichzeitiger Verabreichung von Kalium-sparenden Diuretika, Kaliumpräparaten bzw. Kalium-haltigen Salzersatzmitteln kommen.**

2) Fluvastatin (**40 mg**): ein HMG-CoA-Inhibitor mit nach bisherigen Erkenntnissen vorwiegend Cholesterin und Triglycerin senkender Wirkung. Die möglichen Nebenwirkungen sind Kopfschmerzen und Müdigkeit (**1%**), gastrointestinale Beschwerden (**1%**), Hautausschlag (**0,01%**), Gelenk- und Muskelschmerzen (**1% bzw. 0,01%**), reversible Hepatitis (**0,001%**) sowie Transaminasen- und CK-Anstieg (**<1%**), und. **Bei gleichzeitiger Einnahme von Immunsuppressiva, Gemfibrozil, Nicotinsäure oder Erythromycin wurden vermehrt Myopathien beobachtet.**

Während der ersten 4 Wochen erhalten Sie zunächst nur Ihr Antihypertensivum, in den folgenden 4 Wochen zusätzlich 1. Fluvastatin, 2. Valsartan oder 3. beide Substanzen. Nach vier Wochen wird die Therapie dann auf die nächste Kombination umgestellt bis Sie nach 3 x 4 Wochen alle drei Medikationen erhalten haben. **In dem Zeitraum, in dem die Medikation keinen Cholesterinsenker enthält, ist die Therapie gemäß aktueller Studienlage vermeintlich suboptimal.**

Zu Beginn der Studie sowie jeweils nach 4 Wochen werden Sie bei einem ambulanten Besuch zunächst zu Ihrem Befinden befragt und es wird bei Ihnen Blut sowie Urin zur Untersuchung verschiedener Parameter entnommen. Darüber hinaus erfolgt eine 24h Blutdruckmessung sowie eine Ultraschalluntersuchung der Armarterie. Weiterhin erhalten Sie bei diesen Besuchen die Medikation für die kommenden 4 Wochen und ausreichend Zeit, etwaige Fragen zu klären.

Nach Abschluss der Studie werden Sie je nach Ihrem Wunsch auf Ihre vorherige Medikation oder auf eine Studienmedikation, unter der Sie sich am besten gefühlt haben, eingestellt.

Freiwilligkeit

Die Teilnahme an dieser Untersuchung ist freiwillig. Auch nachdem Sie die Untersuchung begonnen haben, können Sie Ihre Teilnahme jederzeit und ohne Angabe von Gründen beenden. Sollten Sie die Untersuchung abbrechen, entstehen daraus keine Nachteile für Ihre Behandlung. Sie erhalten dann selbstverständlich weiter die bei Ihrer Erkrankung übliche Therapie.

Vertrauliche Behandlung der Daten/ Datenschutz:

Alle in der Untersuchung erhobenen Daten werden, den gesetzlichen Bestimmungen und der ärztlichen Schweigepflicht entsprechend, vertraulich behandelt. Um eine ordnungsgemäße Durchführung der Untersuchung zu gewährleisten, schließt Ihre Teilnahme eine mögliche Einsichtnahme Ihrer Unterlagen durch autorisierte Studienbetreuer, sowie eventuell Behördenvertreter ein. Durch die Unterschrift unter diese Patienteneinwilligung geben Sie dem Arzt die Erlaubnis, Ihre Daten den oben genannten Personen zugänglich zu machen. Diese Personen werden nur davon Gebrauch machen, um ihren Verpflichtungen im Rahmen der Studie nachzukommen. Alle notwendigen Maßnahmen werden ergriffen, um sicherzustellen, dass diese Dokumente nicht zu anderen Zwecken benutzt werden, es sei denn, dass gesetzliche Bestimmungen dieses vorschreiben.

- 1) *Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen der klinischen Prüfung bzw. wissenschaftlichen Studie meine personenbezogenen Daten / Krankheitsdaten aufgezeichnet und anonymisiert (d. h. ohne Namensnennung)*
 - a) *an den genannten Auftraggeber der Studie zu ihrer wissenschaftlichen Auswertung sowie*
 - b) *an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie weitergegeben werden.*

Die Verarbeitung und Nutzung meiner anonymisierten Daten erfolgt auf Fragebögen und elektronischen Datenträgern für die Dauer vonJahren.

- 2) *Außerdem bin ich damit einverstanden, dass ein autorisierter und zur Verschwiegenheit verpflichteter Beauftragter des Auftraggebers oder der zuständigen Überwachungsbehörde in meine dem Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten Einsicht nimmt, sowie dies für die Überprüfung der Studie notwendig ist.*
- 3) *Wenn ich meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie widerrufe, werden meine bereits gespeicherten Daten gelöscht.*

Versicherungsschutz:

Für alle Patienten besteht der für klinische Prüfungen gesetzlich vorgeschriebene Versicherungsschutz.

Bei der klinischen Prüfung eines Arzneimittels/eines Medizinproduktes sind die Versuchspersonen nach Maßgabe der dafür geltenden Allgemeinen Versicherungsbedingungen/P versichert. Der Versicherungsschutz erstreckt sich auf alle Gesundheitsschädigungen, die innerhalb von drei Jahren als Folge von den angewendeten Arzneimitteln eintreten, die im Zusammenhang mit der Prüfung am Körper der Versuchsperson durchgeführt werden.

Ersetzt wird der Vermögensschaden, der durch die Gesundheitsschädigung herbeigeführt wird; im Falle des Todes werden die in § 844 BGB bestimmten Leistungen erbracht. Der Umfang der Versicherung für eine Versuchsperson beträgt 500.000 Euro.

Ausgeschlossen von der Versicherung sind Schädigungen oder Verschlimmerungen bereits bestehender Leidenszustände, die auch ohne Teilnahme an der klinischen Prüfung eingetreten wären oder fortbeständen, genetische Schädigungen sowie Schädigungen, die darauf beruhen, dass die Versuchsperson vorsätzlich ausdrücklichen Anweisungen bei der klinischen Prüfung zuwider gehandelt hat.

Um den Versicherungsschutz nicht zu gefährden, muss die Versuchsperson folgendes beachten:

- Während der klinischen Prüfung darf sich die Versuchsperson einer anderen medizinischen Behandlung nur im Einvernehmen mit PD. Dr. med. J. Kähler unterziehen. Dies gilt nicht in einem medizinischen Notfall. Der Prüfarzt ist von der Notfallbehandlung nachträglich unverzüglich zu unterrichten.
- Eine Gesundheitsschädigung, die als Folge der klinischen Prüfung eingetreten sein kann, muss die Versuchsperson der *Allianz-Versicherung, Grpßer Burstah 3 in 20457 Hamburg, Tel.: 040-3617-9000* unter Angabe der Police-Nummer des Versicherungsscheines –GHA 30/0446/3728706/220- unverzüglich anzeigen. Beim etwaigen Eintritt des Todes ist dies dem Versicherungsunternehmen durch die Rechtsnachfolger (Erben) der Versuchsperson telegraphisch binnen 48 Stunden mitzuteilen.

- Die Versuchsperson muss alle zweckmäßigen Maßnahmen treffen, die der Aufklärung der Ursache oder des Umfangs eines Schadens sowie dessen Minderung dienen.
- Verletzt die Versuchsperson vorsätzlich oder grob fahrlässig eine nach Eintritt des Schadens von ihr zu erfüllende Obliegenheit, ist der Versicherer von der Verpflichtung zur Leistung frei. Bei grob fahrlässiger Verletzung besteht die Leistungspflicht weiter, sofern die Verletzung ohne Einfluss auf die Feststellung des Versicherungsfalles oder des Leistungsumfanges geblieben ist.

Ich bin einverstanden, an dieser Studie einschließlich der dabei notwendigen ärztlichen Untersuchungen teilzunehmen.

Die Hinweise, die mir der Prüfarzt für die Zeit während und nach der Prüfung gibt, werde ich sorgfältig beachten, da nur unter diesen Bedingungen eine Teilnahme an dieser Untersuchung sinnvoll ist.

Ich nehme freiwillig an dieser Prüfung teil und weiß, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme ohne Nachteil für mich zurückziehen kann.

Ich hatte Gelegenheit das Merkblatt zu lesen und dazu Fragen zu stellen. Im abschließenden Aufklärungsgespräch konnte ich alle mich interessierenden Fragen stellen.

Ich habe ein weiteres Exemplar dieser Einwilligung mit den Versicherungsbedingungen und der Patienteninformation erhalten

Name, Vorname des Patienten _____

Datum, Unterschrift des aufklärenden Arztes

Datum, Unterschrift des Patienten/in