

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Professor Dr. med. Rainer H. Böger

Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation und Plättchenaggregation durch die Kombination aus Simvastatin und L-Arginin

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Nina Scheel
aus Norden

Hamburg, 2012

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 20.08.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Böger

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. S. Debus

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. K. Sydow

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Das Endothel und Stickstoffmonoxid (NO)	4
1.2	Der endogene NOS-Inhibitor asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin (ADMA)	5
1.3	Schlussfolgerung zur pathophysiologischen Bedeutung von ADMA	7
1.4	HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine)	7
1.5	Zielsetzung dieser Studie	10

2. Methoden

2.1	Patienten und Studienprotokoll	11
2.2	Endothel-abhängige Vasodilatation der A. brachialis	13
2.3	Ablauf der Ultraschallmessung	13
2.4	Auswertung der Ultraschallbilder	14
2.5	Thrombozytenaggregation	14
2.5.1	Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP)	15
2.5.2	Gewinnung von plättchenarmem Plasma (PPP)	15
2.5.3	Vorbereitung der Plättchenagonisten	15
2.5.4	Messung der Thrombozytenaggregation	16
2.6	Messung von ADMA, SDMA und L-Arginin im Plasma	17
2.7	Weitere biochemische Untersuchungen	18
2.8	Messung von Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) im Urin	18
2.8.1	Herstellung des internen Standards	19
2.8.2	Aufbereitung und Messung der Proben	19
2.9	Fallzahlschätzung und Statistik	20

3	Ergebnisse	
3.1	Die Effekte von Simvastatin, L-Arginin und deren Kombination auf die endothelabhängige Vasodilatation	21
3.2	ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Plasma-Konzentrationen	23
3.3	Lipoproteine und Klinische Chemie	23
3.4	Thrombozytenaggregation	24
3.5	C-reaktives Protein	28
3.6	c-GMP und 8-iso-PGF-Ausscheidung im Urin	28
4	Diskussion	
	Diskussion	30
5	Zusammenfassung	
	Zusammenfassung	35
6	Literaturverzeichnis	
	Literaturverzeichnis	36
7	Anhang	
	Material	42
	Chemikalien und Gase	42
	Verbrauchsmaterial	42
	Laborgeräte	43
	Computerprogramme	44
	Lebenslauf	45
	Erklärung	46
	Danksagung	47

1 Einleitung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist in Deutschland die häufigste Todesursache. 5-10% der Männer und 2-5% der Frauen sind von dieser Erkrankung der Herzkranzgefäße betroffen - mit steigender Tendenz. Die hohe Inzidenz der KHK und die von ihr ausgehende Bedrohung führen sowohl in der Laienpresse als auch in Fachjournalen zu häufigen Berichten. Sie entsteht auf dem Boden einer Arteriosklerose, für deren Genese ein Hypertonus, Nikotinabusus, Stoffwechselleiden (z.B. Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus) verantwortlich sind.

Aber auch konstitutionelle und Alterungsfaktoren und auch die Lebensweise (z.B. lipidreiche Ernährung, Bewegungsmangel) tragen zu pathologischen Veränderungen der Koronararterien bei. Es gab Ende der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts die Vermutung, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen einer Infektion durch *Chlamydia pneumoniae* und der Entstehung einer Arteriosklerose besteht [1]. Dies konnte allerdings in kontrollierten klinischen Studien mit Antibiotika-Gabe nicht gesichert werden.

1.1 Das Endothel und Stickstoffmonoxid (NO)

Da diese Gefäßerkrankung zuerst und vornehmlich die Intima, die innerste Gefäßschicht, betrifft, ist es wichtig, auf ihre Besonderheiten näher einzugehen. Sie wird von länglichen Endothelzellen gebildet, die vornehmlich in Richtung des Blutstroms ausgerichtet sind. Diese Zellen dichten die Gefäße nach innen ab, kontrollieren den Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gefäßwand und sind zur Sekretion verschiedener humoraler Faktoren fähig. Zu den kontinuierlich abgegebenen Substanzen zählt NO (Stickstoffmonoxid), das 1980 von R. Furchgott als EDRF (endothelium derived relaxing factor) entdeckt wurde [2]. R. Furchgott erhielt dafür 1998 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Wie der einstige Begriff EDRF bereits ausdrückt, ist NO für die Gefäßerweiterung unverzichtbar, die unter anderen bei der Blutdruckregulation eine wichtige Rolle spielt. Seine Wirkung vermittelt NO über eine Aktivierung der zellulären Guanylylzyklase. Unter der Einwirkung der Guanylylzyklase entsteht cGMP, welches eine membrangebundene Phosphokinase aktiviert. Diese Phosphokinase

aktiviert eine ebenfalls membrangebundene ATPase, wodurch Kalzium aus der glatten Muskelzelle nach außen gepumpt wird. Dies ist der wesentliche Mechanismus der relaxierenden Wirkung von NO. Daneben hat NO zahlreiche anti-arteriosklerotische Eigenschaften, wie die Hemmung der Thrombozytenaggregation, die Hemmung der Monozyten- und Leukozytenadhäsion am Gefäßbett und eine Begrenzung des glatten Gefäßmuskelwachstums. Außerdem bewirkt es eine Reduktion der Superoxidradikalfreisetzung, welche an zahlreichen inflammatorischen und zytotoxischen Prozessen beteiligt ist. Daneben vermindert NO die Oxidation von LDL-Partikeln. Diese zahlreichen Funktionen in der vaskulären Homöostase haben zu der Bezeichnung „endogenes anti-arteriosklerotisches Molekül“ geführt [3]. NO wird aus der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin mit Hilfe des Enzyms Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) produziert. Dieses Enzym kommt in drei Isoformen vor. Im zentralen und peripheren Nervensystem wurde die konstitutiv exprimierte NOS I isoliert, in aktivierten Makrophagen die induzierbare NOS II und am Endothel die NOS III oder eNOS, welche konstitutiv NO freilässt.

Im Kontext dieser Arbeit ist vor allem die eNOS hervorzuheben. Aufgrund seiner chemischen Natur als Radikal hat Stickstoffmonoxid eine Halbwertszeit von 3-5 Sekunden. Es reagiert mit einer Vielzahl anderer chemischer Verbindungen und wird schließlich oxidativ zu Nitrit und Nitrat inaktiviert, welche beide über die Niere ausgeschieden werden.

1.2 Der endogene NOS-Inhibitor asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin (ADMA)

Die NO-Synthese aus L-Arginin kann durch Analoge von L-Arginin gehemmt werden. Die bekanntesten Hemmstoffe sind das N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA, „Methylarginin“) und das N-Nitro-L-Arginin (L-NNA, „Nitroarginin“). Anfang der 90er Jahre wurde von Vallance et al. [4] beschrieben, dass L-Arginin-Analoga auch als endogene Substanzen in menschlichem Plasma und Urin nachzuweisen sind. Zu diesen Verbindungen zählen das asymmetrische Dimethyl-L-Arginin (ADMA) und sein biologisch inaktives Stereoisomer symmetrisches Dimethyl-L-Arginin (SDMA). Diese beiden Dimethylarginine entstehen im Körper als natürliches Produkt bei der Proteolyse methylierter Proteine.

Die Forschergruppe um Vallance et al. konnte zeigen, dass ADMA in vitro zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Hemmung der NO-Bildungsrate führt [4]. Dieses Phänomen lässt sich durch die inhibitorische Fähigkeit von ADMA gegenüber allen drei NOS-Isoformen erklären. ADMA kann die NOS-Bioaktivität sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen beeinträchtigen. Humane Endothelzellen können in vitro ADMA und SDMA synthetisieren, sodass man annehmen kann, dass ADMA die NOS-Aktivität autokrin reguliert. Signifikant höhere ADMA-Spiegel findet man aber auch in Anwesenheit von nativem LDL- oder oxidiertem LDL-Cholesterin [5]. Somit könnten erhöhte ADMA-Konzentrationen für einen Teil der negativen Wirkung von LDL auf die Endothelfunktion verantwortlich sein.

Ähnlich veränderte ADMA-Konzentrationen findet man auch bei kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen, wie z.B. bei Arteriosklerose, Hypertonie, Hyperhomocysteinämie, chronischer Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus und Rauchen. Allen diesen Erkrankungen ist eine endotheliale Dysfunktion gemeinsam.

Sowohl ADMA als auch SDMA werden als wasserlösliche Substanzen über die Nieren ausgeschieden. Aufgrund dieser Tatsache kann man sich gut vorstellen, warum Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz signifikant höhere ADMA-Plasmakonzentrationen aufweisen. Vallance et al. berichteten über diesen Befund bereits in ihrer initialen Veröffentlichung [4].

Eine wichtige Bedeutung von ADMA, nicht jedoch von SDMA, kommt dem Enzym Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) zu. Die DDAH spaltet die endogenen NOS-Inhibitoren ADMA und L-NMMA (N-Monomethyl-L-Arginin) zu L-Citrullin und Dimethylamin bzw. Monomethylamin. In einigen Geweben, in denen eine NOS-Expression nachgewiesen werden konnte, zeigte sich gleichzeitig auch eine Expression der DDAH [6]. Die pharmakologische Hemmung dieses Enzyms durch den Inhibitor S-2-Amino-4(3-Methylguanidino)-Butansäure (4124W) ließ die ADMA-Konzentrationen bei kultivierten Endothelzellen deutlich ansteigen. Zusätzlich wurde die NO-vermittelte endothelabhängige Vasodilatation von Blutgefäßen abgeschwächt [7]. Diese experimentellen Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die DDAH bei der Regulation von ADMA eine zentrale Rolle spielt und damit unerlässlich für die NO-Bioaktivität ist.

1.3 Schlussfolgerung zur pathophysiologischen Bedeutung von ADMA

Das Fazit über ADMA, das man aus den klinischen und experimentellen Studien der letzten Jahre ziehen kann, ist, dass ADMA ein Risikomarker für eine endotheliale Dysfunktion ist. Wie bereits erwähnt, sind die ADMA-Konzentrationen nicht nur bei verschiedenen kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen erhöht, sondern auch bei klinisch und histopathologisch symptomfreien Patienten mit Hypercholesterinämie. Diese Beobachtung machten Böger et al. bei ihren frühesten Untersuchungen [5].

Die Zukunft wird zeigen, ob diese Ergebnisse auch zum Nutzen von Patienten oder in der medizinischen Vorsorge angewendet werden können. Eine bereits heute bestehende Möglichkeit, die ungünstigen Effekte von ADMA auf das Herz-Kreislauf-System zu antagonisieren, ist die Gabe von exogenem L-Arginin [3]. Sowohl an hypercholesterinämischen Kaninchen als auch an Patienten mit Hypercholesterinämie und Hypertonie konnte die Gabe von L-Arginin die vasomotorische Dysfunktion verbessern und die vasodilatatorische Antwort auf cholinerge Agonisten (z.B. Metacholin, Acetylcholin) wiederherstellen [8]. Versuche an kultivierten Endothelzellen unterstützen diese Beobachtungen und die Rolle von ADMA in diesem Zusammenhang [8].

1.4 HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine)

In der Therapie der diätresistenten Hypercholesterinämie sind die HMG-CoA-Reduktasehemmer (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymA-Reduktasehemmer) Mittel der Wahl. Sie wirken vorzugsweise durch Aufnahme in die Leber, wo sie die HMG-CoA-Reduktase als geschwindigkeitsbegrenzendes Enzym der Cholesterinsynthese hemmen. Mit der Aufhebung der Cholesterin-vermittelten Suppression des LDL-Rezeptorgens steigt die Synthese von LDL-Rezeptoren, die dann vermehrt LDL aus dem Blut in die Leberzellen einschleusen und dadurch das Serumcholesterin senken. In Abhängigkeit von der Dosis werden das Gesamtcholesterin um 25-40%, das LDL-Cholesterin um 35-40% und die Triglyceride um 10-25% gesenkt. Das HDL-Cholesterin wird um 5-10% erhöht. Bei koronarkranken Patienten mit Hypercholesterinämie wurden kardiale Letalität und Gesamtmortalität durch eine sechsjährige Therapie mit Simvastatin deutlich gesenkt

(Scandinavian Simvastatin Survival Study 1994). Als HMG-CoA-Reduktasehemmer beeinflussen die Statine auch die Stoffwechselprodukte der Mevalonsäure, wie die Isoprenoide, die Geranoide und Farnesoide. Zahlreiche Proteine erhalten erst in Form von Farnesyl- oder Geranylpyrophosphaten ihre Funktionseignung. Dies ist für die verschiedensten biologischen Prozesse von Bedeutung, wie z.B. die Zelldifferenzierung und Zellproliferation. Auf diese Wechselwirkungen sind einige der direkten antiarteriosklerotischen Statineffekte zurückzuführen.

Eine Arbeit von Laufs et al. [9] hat gezeigt, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine) die Genexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) verstärken. Dieser Vorgang geschieht durch posttranslationale Modifizierung von Rho Proteinen. Auch bei Simvastatin wurde dieser Effekt beobachtet [9], und man nimmt an, dass er eine wichtige Rolle bei der kardioprotektiven Wirkung von Statinen spielt [10]. Die Hochregulierung der eNOS-mRNA ist das Ergebnis einer erhöhten Stabilität der eNOS-mRNA in Anwesenheit von Statinen. Die verstärkte Expression dieses Enzyms könnte auch zur gesteigerten endothelabhängigen, NO-vermittelten Vasodilatation beitragen, wie sie unter Statin-Therapie bei verschiedenen Tiermodellen mit Hypercholesterinämie [11-13] und hypercholesterinämischen Patienten [14,15] gefunden wurde.

Allerdings zeigte sich nicht in allen Studien, die mit Simvastatin durchgeführt wurden, eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation. So zeigten beispielsweise Vita et al. [16] in einer sechsmonatigen Untersuchung mit 40 mg/Tag Simvastatin, dass sich zwar das LDL-Cholesterin signifikant verminderte, es jedoch zu keinem Fortschritt in der endothel-vermittelten Erweiterung von koronaren Mikrogefäßen kam. Ein Ausbleiben dieses Effektes wurde auch unter Therapie mit anderen Statinen beobachtet [17]. Der Grund für diese mangelnde positive Wirkung von Statinen auf das Gefäßendothel in einigen Studien war lange unklar.

Die Arbeitsgruppe um Janatuinen et al. [18] berichtete 2003, dass eine Steigerung des myokardialen Blutflusses unter Pravastatin maßgeblich von der zirkulierenden Konzentration des endogenen eNOS-Inhibitors ADMA abhängt [19]. Versuchsteilnehmer dieser Studie mit ADMA-Werten unterhalb des Mittelwertes (0,3 µmol/l in dieser Untersuchung) profitierten von einer Besserung des myokardialen Blutflusses nach Statin-Therapie, wohingegen Probanden mit ADMA-Konzentrationen oberhalb des Studien-Mittelwertes diesen Effekt nicht zeigten.

Diese interessante Beobachtung lässt vermuten, dass die Hochregulierung der eNOS bei Individuen mit erhöhten ADMA-Spiegeln ohne funktionale Konsequenzen bleibt, da das Enzym durch den endogenen Inhibitor ADMA in seiner Aktivität (zumindest teilweise) gehemmt wird [20]. Wenn diese Vorstellung richtig ist, sollte eine Verdrängung des Inhibitors durch eine übermäßige Zufuhr des natürlichen Enzym-Substrates, nämlich L-Arginin, die nützliche Wirkung der Statine auf die Endothelfunktion wiederherstellen.

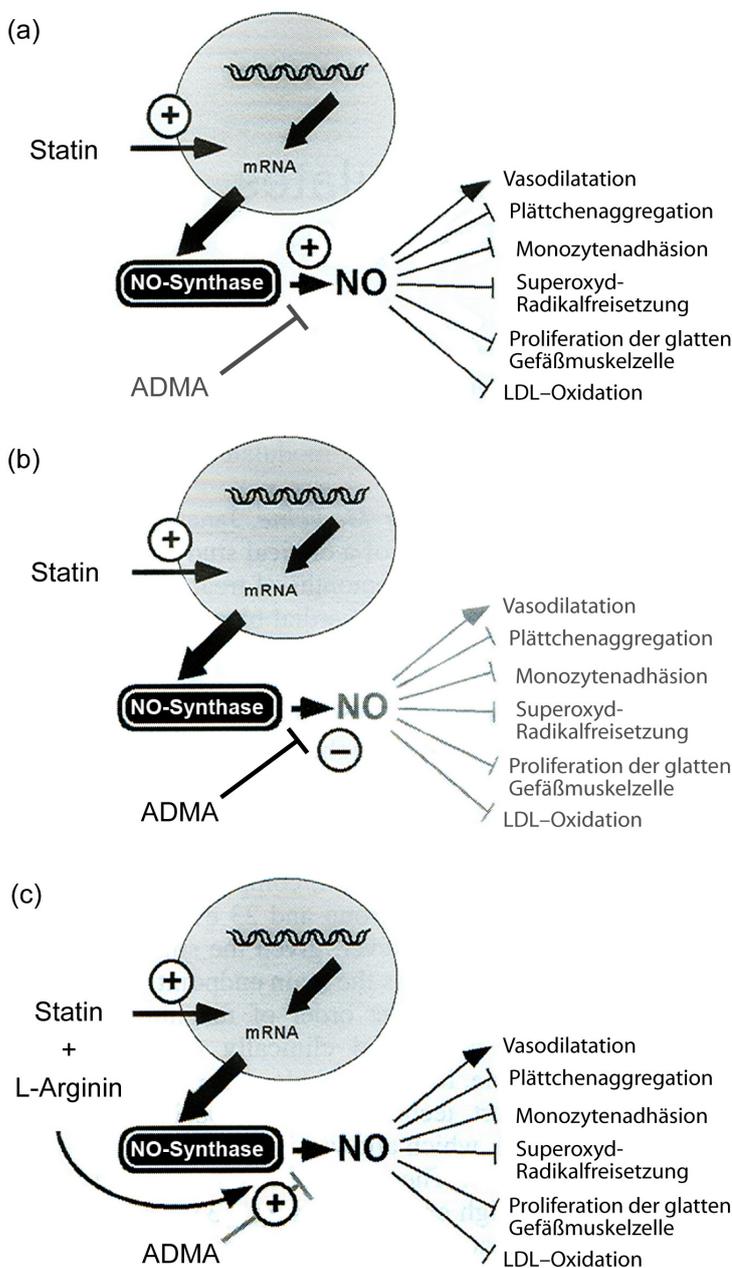


Abb. 1a:

„Die verstärkte Genexpression der NO-Synthase durch Statine führt bei Individuen mit niedrigen ADMA-Konzentrationen zu einer vermehrten vaskulären NO-Produktion und Verstärkung ihrer vielzähligen biologischen Effekte.“

Abb. 1b:

Bei Individuen mit erhöhten ADMA-Spiegeln führt die verstärkte Genexpression der NO-Synthase durch Statine zu keiner vermehrten NO-vermittelten Gefäßfunktion, da die NO-Synthase kompetitiv durch ADMA blockiert wird.

Abb. 1c:

Wenn diese Hypothese richtig ist, könnten die Statin-vermittelten Effekte auf die NO-Produktion bei Personen mit erhöhten ADMA-Konzentrationen durch L-Arginin-Supplimentierung wiederhergestellt werden“.

(Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) modulates endothelial function – therapeutic implications. *Vascular Medicine* 2003; 8; 150.)

1.5 Zielsetzung dieser Studie

Diese Arbeit wurde mit der Absicht entworfen, folgende Hypothese zu überprüfen:

Bei Individuen mit erhöhten ADMA-Spiegeln wird die Wirkung von Simvastatin auf die endothel-abhängige Vasodilatation durch die orale Zugabe von L-Arginin verstärkt. Aus diesem Grund sollte die Kombination aus Simvastatin und L-Arginin im Hinblick auf die endothel-vermittelte Gefäßerweiterung der Therapie mit Simvastatin alleine überlegen sein.

2 Methoden

2.1 Patienten und Studienprotokoll

Diese monozentrische randomisierte Studie schloss 15 Patienten ein und gliederte sich in drei Phasen. Einschlusskriterien waren klinisch gesunde Männer und Frauen zwischen 45 und 85 Jahren mit erhöhten ADMA-Konzentrationen, die nicht an kardiovaskulären oder anderen akuten oder chronischen Krankheiten litten.

Bei insgesamt 98 Personen wurden die ADMA-Plasmakonzentrationen gemessen. Individuen mit erhöhten Werten über der 75. Perzentile wurden bei Vorliegen eines schriftlichen Einverständnisses in die Studie eingeschlossen. Die mittleren (\pm SD) ADMA-Konzentrationen in der gesamten Population betragen 0.41 ± 0.10 $\mu\text{mol/l}$, die der 15 Studienteilnehmer 0.56 ± 0.06 $\mu\text{mol/l}$. Die demographischen und anthropometrischen Eigenschaften der Versuchsteilnehmer sind in der Tabelle in Abbildung 1 beschrieben.

Alle Personen erschienen morgens am Tag 1 zu einer Einschlussuntersuchung inklusive Routine-Laborwertuntersuchung, bei der Blut- und Urinproben abgegeben wurden. Die Blutproben wurden für die ADMA-Analyse bei 2000 g und 4°C für 4 Minuten zentrifugiert. Plasma- und Urinmengen wurden aliquotiert und bis zur Aufbereitung bei -20°C aufbewahrt.

Die Patienten unterliefen daneben eine Ultraschalluntersuchung (siehe 2.2) der endothel-abhängigen und der endothel-unabhängigen Vasodilatation und erhielten die Studienmedikation für die nächsten 3 Wochen. Diese wurde randomisiert zugeteilt und bestand entweder aus Simvastatin (p.o., 40 mg/Tag; Merck, Sharp und Dohme, München), L-Arginin (L-Arginin SR; p.o. 2x 1,5 g /Tag; eNOS Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA, USA), oder der Kombination aus Simvastatin und L-Arginin.

Nach 21 Tagen der Medikamenteneinnahme fanden sich die Probanden wieder in der Klinik ein und unterzogen sich den gleichen Untersuchungen wie an Tag 1. Anschließend erfolgte eine so genannte Wash-out-Phase, in der die Teilnehmer drei Wochen lang keine Prüfmedikation einnahmen.

	Patienten
N	15
Geschlecht (m/w)	11 / 4
Alter (Jahre)	59,6 (4,2)
Größe (cm)	171,7 (6,7)
Gewicht (kg)	74,2 (11,6)
Raucher (n) #	1
Diabetes mellitus (n) #	0
Arterielle Hypertonie (n) #	0
Hypercholesterinämie (n) #	12
Übergewichtigkeit (n) #	3
Systolischer Blutdruck (mm Hg)	140,4 (17,6)
Diastolischer Blutdruck (mm Hg)	83,3 (7,0)
Herzfrequenz (1/min)	70,5 (10,9)

*Tabelle 1: Demographische und anthropometrische Daten.
Daten sind Mittelwerte oder absolute Zahlen.
mehr als ein Risikofaktor könnte auf einen Patienten zutreffen*

Am Tag 42, d.h. nach weiteren drei Wochen, wurde die zweite Studienmedikation für die nächsten 21 Tage ausgegeben, ebenfalls zufällig festgelegt.

Am Tag 63 schloss sich eine Wiederholung der Untersuchungsabläufe vom ersten Studientag an, um anschließend eine dreiwöchige Wash-out-Phase einzulegen.

Die Ausgabe der letzten Prüfpräparate folgte einer wiederholten Testung aller Studienparameter inklusive Ultraschallanalyse der A. brachialis vor und nach jeder Behandlung. Die Einnahme-Effekte wurden vor jeder Behandlungsperiode in Bezug zu den individuellen Baseline-Werten gesetzt.

Die letzte Dosis Simvastatin wurde am Abend vor der Untersuchung der Studienparameter eingenommen, die letzte Dosis L-Arginin am Morgen des Studientages.

Die zuständige Ethikkommission hat dem Studienkonzept zugestimmt, und die Untersuchung erfolgte nach den rechtlichen Prinzipien der Deklaration von Helsinki und der den Grundsätzen der International Conference on Harmonisation: Note for Guidance on Good Clinical Practice, CPMP/ICH/135/405.

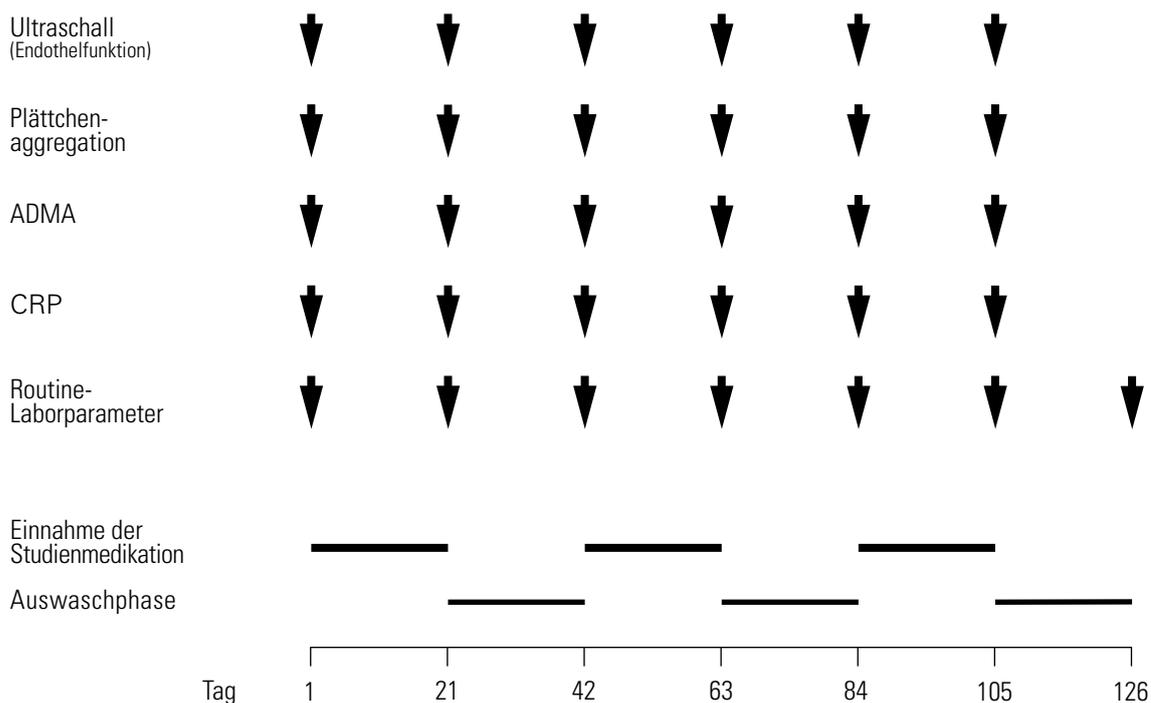


Abb. 2: Studiendesign und -ablauf

2.2 Endothel-abhängige Vasodilatation der Arteria brachialis

Die Messung der endothel-abhängigen Vasodilatation erfolgte durch Duplex-Sonographie der A. brachialis (Böger et al., 1998). Mit dieser Methode misst man die Gefäßerweiterung der A. brachialis im Anschluss an eine mehrminütige Okklusion mittels Blutdruckmanschette. Die provozierte Ischämie hat eine reaktive Vasodilatation zur Folge, die man mit dem Ultraschall nachvollziehen kann. Das temporäre Abbinden der Arterie führt über eine Steigerung der endothel-eigenen NO-Produktion zur nachfolgenden Gefäßweitstellung.

Um Störgrößen der vasomotorischen Kapazität gering zu halten, wurde eine Nahrungs- sowie Genussmittelkarenz (Kaffee, Nikotin) und das Weglassen NO-wirksamer Medikamente für mindestens 8 Stunden eingehalten. Die Reduktion von physischen und psychischen Einflüssen wurde durch Nutzung eines ruhigen, temperierten Raumes und Ultraschallmessung am liegenden Patienten erreicht.

Zur Untersuchung wurde die A. brachialis im Längsschnitt im Bereich der rechten Ellenbeuge aufgesucht. Wichtig war dabei eine gute optische Abgrenzbarkeit der Gefäßwand zwischen Intima und Media. Der anfänglich gewählte Gefäßabschnitt wurde für die weiteren Messungen beibehalten und die Ultraschallbilder mittels Super-VHS-Kassette für die Auswertung am Computer aufgezeichnet.

2.3 Ablauf der Ultraschallmessung

Für die Festlegung der endothel-abhängigen Vasodilatation wurde eine Baselinebestimmung (Baseline 1) der A. brachialis unter Ruhebedingungen durchgeführt. Anschließend wurde der Blutfluss im Gefäß mit einer Blutdruckmanschette für 5 Minuten auf suprasystolische Blutdruckwerte unterbunden (Cuff-Okklusion). Danach wurde der Druck in der Manschette abgelassen (Cuff-Release) und die hyperämie-induzierte Vasodilatation für 3 Minuten dokumentiert. Hinterher wurde eine 10-minütige Ruhepause eingehalten, um den Ruhetonus des Gefäßes wiederherzustellen. Zur Bestimmung der endothel-unabhängigen Vasodilatation erfolgte wieder eine Baselinebestimmung (Baseline 2) und anschließend die Applikation von 0,4 mg Glyceroltrinitrat (GTN) sublingual. Die GTN-induzierte Gefäß-erweiterung wurde für 5 Minuten registriert.

2.4 Auswertung der Ultraschallbilder

Die Verarbeitung und Analyse der Ultraschallbilder erfolgte durch ein computer-gestütztes Bildanalyseprogramm (Vascular Imaging, Inc. Iowa City, IA, USA). 30 Sekunden jeder Messeinheit (Baseline 1, flussabhängige Vasodilatation, Baseline 2, flussunabhängige Vasodilatation) wurden in das Programm eingespielt und in 300 Einzelbilder unterteilt (10 Bilder / Sekunde). Für die Bestimmung der flussab-

hängigen Vasodilatation wurde der Zeitraum eine Minute nach dem Ablassen der Blutdruckmanschette gewählt, für die Bestimmung der flussunabhängigen Vasodilatation wurde drei Minuten nach GTN-Gabe gemessen. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass dies die Zeitpunkte der jeweils maximalen Reaktionen sind. Die 300 Einzelbilder wurden in das Programm Brachial Analyzer DICOM übertragen. Mit Hilfe dieser Software konnten der Gefäßdurchmesser und seine Veränderungen festgehalten werden. Die Auswertung bezog jeweils die Intima-Media-Grenzen der längs angeschnittenen Gefäßwand als Grenze in ihre Berechnungen ein. Die Breite des Messfensters wurde auf 1 cm normiert. Aus den 300 Einzelbildern entstanden so 300 Werte, welche die Veränderungen des Gefäßdurchmessers während der Messungen wiedergaben. Die täglichen Schwankungen des Arterien durchmessers betragen nach dieser Methode 4,75%. Die Variabilität in der fluss-induzierten Vasodilatation betrug 18,4%.

2.5 Thrombozyten-Aggregation

Die Messung der Thrombozyten-Aggregation wurde nach dem Verfahren von Born und Cross [22] in plättchenreichem Plasma (PRP) durchgeführt. Bei diesem Analyseverfahren ist die Tatsache von Bedeutung, dass die Zellzahl einer Zellsuspension für deren optische Dichte verantwortlich ist. Kommt es in der Thrombozyten-Aufschwemmung zu einer Aggregation, so nimmt die Zahl der Zellen ab und gegenläufig nimmt die Lichttransmission zu. Diesen Vorgang kann man photometrisch festhalten. Die Bestimmung der Plättchen-Anhäufung erfolgte durch Zugabe der gerinnungsfördernden Substanzen ADP und Kollagen zu PRP. Für die jeweilige Eichung der Messapparatur diente plättchenreiches Plasma vor Zugabe der beiden Thrombozyten-Agonisten, um den Nullwert der Lichttransmission festzulegen. Plättchenarmes Plasma (PPP) diente zur Darstellung der uneingeschränkten, 100%igen Lichttransmission.

2.5.1 Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP)

10 ml Zitratblut wurden bei Raumtemperatur bei 200 g für 15 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase, gebildet vom PRP, wurde anschließend in ein 10 ml-Röhr-

chen überführt. Von dieser Suspension gingen 250 µl in die Messung ein, der Rest wurde für die Gewinnung von plättchenarmen Plasma benutzt.

2.5.2 Gewinnung von plättchenarmem Plasma (PPP)

Der Rest des PRP wurde bei Raumtemperatur und 2000 g 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase, gebildet von plättchenarmen Plasma, in ein 10 ml-Röhrchen pipetiert und die untere Phase verworfen.

2.5.3 Vorbereitung der Plättchenagonisten

Zum Auslösen des Aggregationsvorgangs im PRP musste ein Plättchenagonist zugesetzt werden. Dafür wurden ADP- bzw. Kollagenlösungen auf Eis gekühlt hergestellt.

Herstellung der Kollagenlösung:

Die Konzentration dieses Induktors im plättchenreichen Plasma betrug 1 mg/l. Dafür wurden Kollagenreagenz und Horn-Puffer im Verhältnis 1:10 eingesetzt.

Herstellung der ADP-Lösung:

Für ADP wurde eine Konzentration von 2 µl/l im PRP gewählt. Hierfür wurden ADP-Lösung und 0,9 %ige Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 gemischt.

2.5.4 Messung der Thrombozyten-Aggregation

Vor jeder Messung wurde das Aggregometer mit dem zu aggregierenden Patientenplasma geeicht. Hierfür wurden je 250 µl plättchenreiches bzw. -armes Plasma in einer Küvette bei 37°C für 5 Minuten inkubiert und danach in den Strahlengang gebracht. Nun wurde die Aggregation durch das Hinzufügen der Induktoren ausgelöst. Die Messung der Plättchen-Aggregation erfolgte für 240

Sekunden, wobei die Zellsuspension konstant bei 1000 Umdrehungen/Minute gerührt wurde. Jede Zählung erfolgte in Doppelbestimmung bei kontinuierlicher Aufzeichnung. Anhand des dargestellten Kurvenverlaufes konnten die maximale Aggregation (%), die maximale Steigung (%/min), die Zeit bis zur maximalen Steigung (Lag Time, [sec]) und die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt werden.

2.6 Messung von ADMA, SDMA und L-Arginin im Plasma

Die Plasma-Konzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin wurden nach einer validierten HPLC-Methode (Böger et al. 1998) nach Aufreinigung der Proben durch CBA-Kartuschen quantifiziert. Das gewonnene EDTA-Blut wurde für 10 Minuten bei 4500 R/min zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Für die Aufarbeitung der Proben wurden 500 µl Patientenplasma mit dem internen Standard Homoarginin (10 µM) und Aqua bidest. auf ein Volumen von 1000 µl aufgefüllt. Daneben wurde ein externer Standard aus L-Arginin (50 µM), Homoarginin (10 µM), ADMA (1 µM) und SDMA (1 µM) zusammengestellt. Eine Aufreinigung der zu untersuchenden Proben erfolgte wie oben beschrieben durch CBA-Kartuschen (siehe 2.3). Die gewonnenen Trockenrückstände wurden in 400 µl Wasser aufgenommen, gründlich gevortext und über Nacht bei 4°C inkubiert. 100 µl der Lösung wurden am nächsten Tag in Autosamplergefäße pipettiert und zur Messung in die HPLC gebracht.

Zuerst wurden die Proben für 30 Sekunden mit o-Pthaldialdehyd (OPA) inkubiert. Dieser Schritt entspricht einer Vorsäulenderivatisierung. Anschließend erfolgte die Autoinjektion von 5 µl Probenlösung. Die gebildeten Eluate wurden mit dem Eluenten A isokratisch bei einem Fluss von 1 ml/min mit einer Phenylsäule aufgetrennt und über den Fluoreszenzdetektor bei 340 nm und 453 nm bestimmt. Die Konzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin wurden unter Kenntnis der entsprechenden Retentionszeit anhand der Peak-Höhen-Verhältnisse von Standard und Proben errechnet

Qualitätskontrollseren wurden im Laufe der Studie regelmäßig analysiert. Durch das Peak-Höhen-Verhältnis von Homoarginin in den Standards und Proben konnte man die Recovery (= Wiederfindungsrate) der einzelnen Proben ermitteln. Die

Intraassay-Variabilität und die Interassay-Variabilität für ADMA betragen 1,65 % bzw. 2,49 %, die für SDMA 1,85 % bzw. 3,91 % und die für L-Arginin 1,71 % bzw. 2,97 %. Das Detektionslimit der Methode lag bei 0,04 $\mu\text{mol/l}$.

2.7 Weitere biochemische Untersuchungen

Laborparameter wie das Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Triglyceride, Serumkreatinin und Harnsäure wurden durch standardisierte und validierte Methoden bestimmt. Die Serumkonzentrationen des C-reaktiven Proteins wurden durch einen hoch sensitiven nephelometrischen Assay ermittelt (Dade Behring, Deutschland). Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) wurde die Ausscheidung von cGMP im Urin gemessen und in Bezug zu den Kreatinin-Spiegeln im Urin gesetzt (Böger et al. 1997). 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso-PGF $_{2\alpha}$) ist ein Marker für oxidativen Stress (Schwedhelm et al. 2003). Dessen Urinausscheidung wurde mittels GC-MS quantifiziert (Schwedhelm et al. 2003).

2.8 Messung von Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) im Urin

Die Bestimmung der NO-Bioaktivität erfolgte durch Messung dessen oxidativer Metabolite NO, Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) mit Hilfe der GC-MS. Dazu wurden die Metabolite derivatisiert, wobei das endogene Nitrat und Nitrit und ihre ^{15}N -markierten Analoga ^{15}N -Nitrat und ^{15}N -Nitrit in einer Acetonlösung durch Pentafluorbenzylbromid (PFB) zu PFB- NO_2 , PFB- $^{15}\text{NO}_2$, PFB- NO_3 und PFB- $^{15}\text{NO}_3$ umgesetzt wurden.

Der bedeutende Vorteil dieser Methode ist, dass zeit- und methodenaufwendige Versuchsanordnungen entfallen und die Reduktion von Nitrat zu Nitrit nicht mehr notwendig ist. Ein weiterer Nutzen dieses Vorgehens besteht darin, dass die zeit- und arbeitsintensive Reduktion von Nitrat zu Nitrit entfällt und S-Nitro- von S-Nitroso-Glutathion unterschieden werden kann. Diese beiden Metaboliten weisen gleichartige chromatographische und spektrometrische Funktionen auf.

2.8.1 Herstellung des internen Standards

Erzeugung von ^{15}N -Nitrit:

Für die Messung der beiden NO-Metabolite Nitrat und Nitrit wurde eine 80 μmolare ^{15}N -Nitrit-Lösung verwendet. Aus der 1000fach konzentrierten ^{15}N -Nitrit-Stammlösung wurde über eine Verdünnungsreihe in zwei Schritten die gewünschte 80 μmolare ^{15}N -Nitrit-Lösung gewonnen: 50 μl Stammlösung ad 4950 μl Aqua dest. ergeben eine 800 μmolare ^{15}N -Nitrit-Lösung. 500 μl dieser Verdünnung ad 4500 μl Aqua dest. erbringen die gewünschte 80 μmolare Lösung des internen Standards.

Erzeugung von ^{15}N -Nitrat:

Für die Messung von ^{15}N -Nitrat wurde eine 800 μmolare Lösung verwendet. Von der 100fach konzentrierten Stammlösung wurden 500 μl mit 4500 μl Aqua dest. verdünnt, um die gewünschte Lösung zu erhalten.

2.8.2 Aufbereitung und Messung der Proben

Von dem Patientenurin wurden 100 μl mit 10 μl ^{15}N -Nitrat (800 μmolar), 10 μl ^{15}N -Nitrit (80 μmolar), 500 μl Aceton und 10 μl PFB-Bromid versetzt. Das Substanzgemisch wurde in einem Autosamplergefäß gevortext und für eine Stunde bei 50°C inkubiert. Hinterher wurden die Proben unter Stickstoff auf ein Volumen von 100 μl eingeeengt. Anschließend wurden 300 μl Toluol zugesetzt und das Ganze eine Minute gevortext. Für die gewünschte Phasentrennung wurden die Proben bei 2000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. 120 μl der oberen Toluol-Phase wurden in Autosamplergefäße mit Mikroinsert (0,1 ml) überführt und mit weiteren 120 μl Toluol auf ein Gesamtvolumen von 240 μl verdünnt.

Die Untersuchung der Proben geschah mittels der GC-MS. Es wurde eine Kapillarsäule des Typs DB-5 MS (30m x 0,25mm I.D., 0,25 μm Filmdicke) verwendet. Als Trägergas diente Helium (70 kPa). Das nachfolgende Ofentemperaturprogramm wurde für die GC-Säule eingesetzt: 2 Minuten bei 70°C, Erhöhung der Temperatur in Schritten von 5°C/min auf 100°C, gefolgt von Schritten von 30°C/min auf 310°C. Als Ionisierungsgas im Massenspektrometer kam Methan unter NICI (negative ion chemical ionization)-Bedingungen. Die Temperaturen im Massenspek-

trometer betragen konstant 180°C an der Ionenquelle, 280°C an der Transferline und 200°C am Injektor. Der Elektronenstrom und die Elektronenenergie wurden auf 300 μ A bzw. 230 eV festgelegt. Die Elektronen-Multiplier-Spannung betrug 1,2 kV. Das Injektionsvolumen wurde auf 1 μ l im splitless-Modus eingestellt. Als Zielkonstante wurde das Peakflächenverhältnis aus gemessenem internen Standard dividiert durch die gemessene endogene Konzentration der NO-Metaboliten herangezogen. Dieses Peakflächenverhältnis wurde mit dem verwendeten internen Standard [μ mol/l] multipliziert.

2.9 Fallzahlschätzung und Statistik

Für die Rekrutierung des Patientenkollektivs haben wir uns an einer früheren klinischen Untersuchung orientiert, die den Nutzen von AT1-Rezeptor-Antagonisten auf die endothelabhängige Vasodilatation untersucht hat (Schiffrin et al. 2000). In dieser Arbeit waren 10 vs. 9 Probanden ausreichend, um statistisch signifikante Abweichungen abzuleiten. Unter der Hypothese einer entsprechenden Schwankung der Messwerte um den Mittelwert bei diesen Patienten wurden 15 Probanden ausgewählt. Die statistische Auswertung fand mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) statt. Die Gegenüberstellung der Basalwerte der einzelnen Therapieabschnitte erfolgte mit dem „Fisher’s protected least significant difference Test“. Der Vergleich der Therapieeffekte in den einzelnen Behandlungsabschnitten geschah mittels ANOVA und anschließendem Scheffé f-Test für wiederkehrende Messungen. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant zugrundegelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Effekte von Simvastatin, L-Arginin und deren Kombination auf die endothelabhängige Vasodilatation

Simvastatin alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die endothelabhängige Vasodilatation ($6,08 \pm 0,94\%$ vs. $6,16 \pm 1,21\%$ bei der Baseline-Untersuchung; $p = \text{n.s.}$). L-Arginin SR verstärkte die endothelabhängige Vasodilatation signifikant ($8,19 \pm 0,87\%$ vs. $4,88 \pm 0,79\%$ bei der Baseline-Untersuchung; $p < 0,05$).

Der größte Unterschied der hier beschriebenen Gefäßerweiterung wurde jedoch durch die Kombination aus Simvastatin und L-Arginin SR ($9,89 \pm 1,51\%$ vs. $5,32 \pm 0,84\%$ bei der Baseline-Bestimmung; siehe Abb. 3 auf Seite 22) erreicht. Das Resultat aus der Kombination der beiden Substanzen war auch signifikant höher als die Wirkung von Simvastatin ($p = 0,024$) oder L-Arginin SR ($p = 0,048$) alleine. Es gab keine bedeutsamen Unterschiede im Durchmesser der A. brachialis vor und nach jeder Behandlung oder zwischen den einzelnen Gruppen (Simvastatin, $4,73 \pm 0,17$ mm zu $4,79 \pm 0,17$ mm; L-Arginin SR, $4,60 \pm 0,16$ mm zu $4,59 \pm 0,14$ mm; Kombination aus Simvastatin und L-Arginin SR, $4,75 \pm 0,19$ mm zu $4,74 \pm 0,17$ mm; alle $p = \text{n.s.}$). Es konnten keine signifikanten Nachwirkungen der einzelnen Substanzen nachgewiesen werden. Die endothelunabhängige Vasodilatation – durch Glyceroltrinitrat getriggert – wurde durch keine der drei Medikationen signifikant beeinflusst (siehe Abbildung 4).

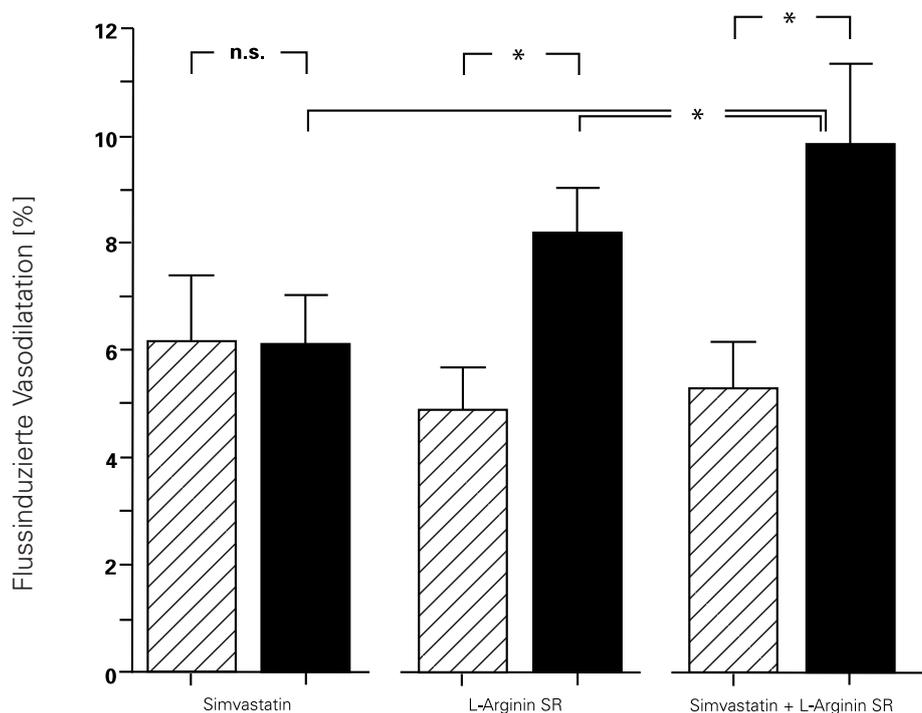


Abb. 3: Endothelabhängige Vasodilatation in der A. brachialis vor und nach dreiwöchiger Behandlung mit Simvastatin, L-Arginin SR oder deren Kombination bei Patienten mit erhöhten ADMA-Konzentrationen. Aufzeichnung mittels High-resolution Ultraschall. * $p < 0,05$ vs. vorher

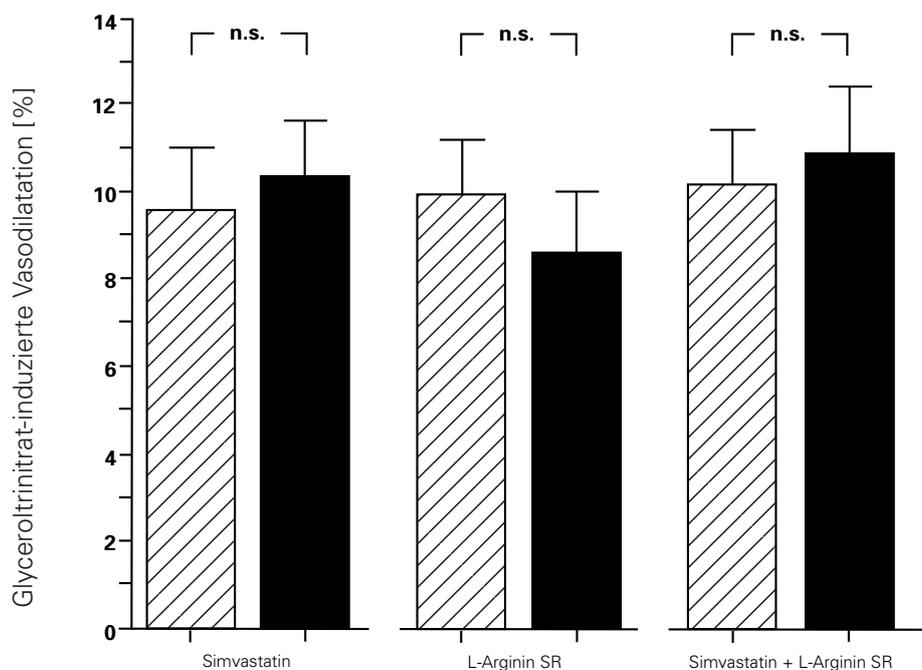


Abb. 4: Endothelunabhängige Vasodilatation in der A. brachialis vor und nach dreiwöchiger Behandlung mit Simvastatin, L-Arginin und deren Kombination bei Patienten mit erhöhten ADMA-Konzentrationen. Aufzeichnung mittels High-resolution Ultraschall. * $p < 0,05$

3.2 ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Plasma-Konzentrationen

Die ADMA-Konzentrationen wurden weder durch die Simvastatin- noch durch die L-Arginin SR-Therapie charakteristisch verändert. Während der Supplementierung mit L-Arginin SR stiegen jedoch die Plasma-Spiegel dieser Aminosäure signifikant an, was sich in einem erhöhten L-Arginin/ADMA Verhältnis wieder spiegelte. Die SDMA-Plasma-Konzentrationen blieben während der gesamten Studie unverändert.

Variable	Simvastatin		L-Arginin SR		Kombination	
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher
ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	0,59 (0,03)	0,59 (0,03)	0,61 (0,03)	0,61 (0,04)	0,61 (0,03)	0,61 (0,03)
SDMA ($\mu\text{mol/l}$)	0,47 (0,04)	0,52 (0,04)	0,52 (0,04)	0,50 (0,08)	0,48 (0,04)	0,43 (0,04)
L-Arginin ($\mu\text{mol/l}$)	47,4 (3,9)	48,5 (4,1)	49,7 (4,5)	60,7 (6,1)*	50,8 (4,8)	61,4 (6,0)*
L-Arginin/ ADMA-Ver- hältnis	81 (5)	83 (7)	82 (8)	103 (9)*	84 (8)	103 (11)*

Tabelle 2: ADMA-, SDMA-, L-Arginin-Plasma-Konzentrationen. Daten sind Mittelwerte.
* $p < 0,05$ vs. vorher

3.3 Lipoproteine und Klinische Chemie

Unter der Therapie mit Simvastatin kam es zu einer signifikanten Senkung des LDL-Cholesterins um $42 \pm 4\%$ und $47 \pm 2\%$, alleine oder in der Kombination mit L-Arginin SR verabreicht (Tabelle 6, S. 29). L-Arginin SR hatte keinen bedeutsamen Einfluss auf das Lipoprotein-Profil. Unter der Therapie mit Simvastatin alleine oder der Kombination mit der Aminosäure kam es zu einem leichten Anstieg von CK, AST und ALT, jedoch ohne physiologisch kritische Werte zu erreichen. Zwei Patienten litten außerdem unter Muskelschmerzen. Bei fünf Studienteilnehmern kam es unter L-Arginin-Supplementierung alleine oder in Kombination zu weichen Stühlen oder Flatulenz. Die Studienmedikation wurde bei keinem der Patienten unterbrochen.

3.4 Thrombozytenaggregation

Die Thrombozyten sowie das Gefäßendothel produzieren Stickstoffmonoxyd (NO). Dies ist ein potenter körpereigener Thrombozytenaggregationshemmer. Werden die Thrombozyten durch plättcheneigene Mediatoren, wie z.B. Adenosinmonophosphat (ADP) aktiviert, reagiert das Endothel darauf mit einer gesteigerten NO-Freisetzung, die einer übermäßigen Plättchenaggregation entgegenwirkt.

Die durch ADP oder Kollagen induzierte Plättchen-Aggregation wurde weder durch Simvastatin, noch durch L-Arginin SR und deren kombinierte Verabreichung relevant beeinflusst (siehe Tabellen S. 25-27).

Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation und Plättchenaggregation durch die Kombination aus Statin und NO

Auswertung der Plättchenaggregation Agens: L-Arginin

Induktor: Kollagen

vor Behandlung					nach Behandlung				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC	Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1					1				
2	74,9	91	53,4	169	2	73,7	81,6	42,5	187,3
3					3	70,1	85	49,7	169,3
5	70,9	81,8	77,1	143,4	5	6	10	86,8	2,2
6	78,1	84,9	49,5	203	6	72,9	64,8	50	165,1
7	68,2	54,9	49,2	159,9	7	78	67,1	51,4	186,1
8	76,4	91,4	62,7	172,1	8	66,4	81,2	50,7	142,8
9	79,1	111,2	60,7	190	9	69,2	82,6	53,2	163,2
10	87,2	126,4	46,8	205,4	10	70,3	101,5	49,3	167
11	77,6	94,2	55,6	175,5	11	68,6	86,7	55,4	155,9
12	68,9	61,6	54,9	159,5	12	68,4	72,5	57,1	157,8
13	73,5	74,6	79,2	146,4	13				
14	85	87,1	72,8	183,5	14	72,7	71,4	67,3	161,2
15	70	90,3	54,3	166,9	15	72,2	86,2	59,6	148,8
16					16				
Mittelwert	75,8	87,5	59,7	172,9	Mittelwert	65,7	74,2	56,1	150,6
SD	6,1	19,3	11,1	19,9	SD	19,0	22,6	11,5	48,5
N	12	12	12	12	N	12	12	12	12

Induktor: ADP

vor Behandlung					nach Behandlung				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC	Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1					1				
2	68,1	73,6	14,3	175,9	2	67,6	80,6	14,2	197,8
3					3	79,9	61,7	14,8	213,3
5	68,4	84,4	14	188,2	5	40,2	70,4	17,2	37,3
6	67,2	76,5	18	176,7	6	54,2	63,8	14	149,3
7	66,4	60	18,7	174,7	7	76,8	68,7	16,7	195,4
8	71,9	69,5	16,4	174,7	8	74,7	85,9	15,7	198,5
9	78,9	115,6	16,3	233,1	9	63,9	90,8	16,5	181,9
10	81,9	81,6	12,6	224,9	10	87	90,7	14,6	238,4
11	74,9	75,2	18,3	186,6	11	85,3	75,4	15,2	219,3
12	44,1	60	16,2	115,8	12	28,5	48,1	15,8	46,1
13	35,3	63,6	19,7	84,9	13				
14	34,5	57,3	15,6	42,3	14	14,7	38,4	16,4	4,1
15	75,6	70,5	11,9	193,7	15	56,3	55,3	13,5	140,7
16					16				
Mittelwert	63,9	74,0	16,0	164,5	Mittelwert	60,8	69,2	15,4	151,8
SD	16,5	15,7	2,4	56,0	SD	23,0	16,7	1,2	79,3
N	12	12	12	12	N	12	12	12	12

Induktor: Kollagen

behandlungsinduzierter Unterschied				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1				
2	-1,2	-9,4	-10,9	18,3
3				
5	-64,9	-71,8	9,7	-141,2
6	-5,2	-20,1	0,5	-37,9
7	9,8	12,2	2,2	26,2
8	-10	-10,2	-12	-29,3
9	-9,9	-28,6	-7,5	-26,8
10	-16,9	-24,9	2,5	-38,4
11	-9	-7,5	-0,2	-19,6
12	-0,5	10,9	2,2	-1,7
13				
14	-12,3	-15,7	-5,5	-22,3
15	2,2	-4,1	5,3	-18,1
16				
Mittelwert	-10,7	-15,4	-1,2	-26,4
SD	19,5	22,7	6,9	43,6
N	11	11	11	11

Induktor: ADP

behandlungsinduzierter Unterschied				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1				
2	-0,5	7	-0,1	21,9
3				
5	-28,2	-14	3,2	-150,9
6	-13	-12,7	-4	-29,4
7	10,4	8,7	-2	20,7
8	2,8	16,4	-0,7	23,8
9	-15	-24,8	0,2	-51,2
10	5,1	9,1	2	13,5
11	10,4	0,2	-3,1	32,7
12	-15,6	-11,9	-0,4	-69,7
13				
14	-19,8	-18,9	0,8	-38,2
15	-19,3	-15,2	1,6	-53
16				
Mittelwert	-7,5	-5,1	-0,2	-25,4
SD	13,5	13,8	2,2	55,7
N	11	11	11	11

Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation und Plättchenaggregation durch die Kombination aus Statin und NO

Auswertung der Plättchenaggregation Agens: Simvastatin

Induktor: Kollagen

vor Behandlung					nach Behandlung				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC	Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1	77,3	102,6	49,6	192,3	1	56,2	65,1	59,8	130,6
2	79	103,8	50	195,4	2	71	70,5	58	143,9
3	76,6	88,9	53,9	180,9	3	77,1	80	55,3	185,3
5	61,5	65,7	64,9	126,6	5	70,8	76,5	50,1	173,9
6	69,6	63,6	51,2	157,7	6	65,5	79,8	52,7	166,9
7	70,5	73,9	34,4	171,5	7	66,2	67	36,1	163,2
8	71,5	91,7	56,7	172,9	8	73,8	93,9	57,3	182
9	75	75,5	43,2	172,1	9	72,3	65	45,9	171,4
10	76,4	104,4	53,2	162,1	10				
11	64,2	69,2	54,9	157,8	11	74,9	82	55,2	179,2
12	69,3	83,1	68,3	145,3	12	68,3	56,2	49,9	153,4
13	58,8	63,6	69,4	120,1	13	66,9	67,9	77,8	141,6
14	53,9	60,5	120,3	78,7	14	63,3	69,6	80,3	123,6
15	78,2	113,3	56,8	159,9	15				
16	70,5	114,2	63,8	156,4	16	63,8	89,9	51,5	155,6
Mittelwert	70,2	84,9	59,4	156,6	Mittelwert	68,5	74,1	56,1	159,3
SD	7,6	19,1	19,2	30,0	SD	5,7	10,7	11,9	19,8
N	15	15	15	15	N	13	13	13	13

Induktor: ADP

vor Behandlung					nach Behandlung				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC	Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1	63,2	62	15,4	168,7	1	8,6	28	12,8	2,3
2	87	110,5	16,6	152,5	2	63,8	71,2	16,3	175,4
3	87,9	70,1	13,7	222	3	64,3	65	16,5	171,5
5	67,5	87,6	18,1	182,6	5	84,8	102,6	14,8	225,9
6	76,3	81,2	11,5	218,9	6	67,6	75,5	13,9	179
7	70,4	71,5	9,8	192,8	7	71,7	71,8	9,7	208,7
8	71,1	77,4	37,9	152,1	8	79,7	83,65	15,8	211,36
9	84,8	107,2	17,1	245,3	9	58,6	77,5	14,4	165,9
10	80,9	93,7	13,6	225,2	10				
11	50,9	64,7	17,2	138,6	11	77,1	75,8	15,2	199,2
12	21,9	55,1	17	6,5	12	20,7	45,95	11,1	35,4
13	40,8	63,5	18,6	102,1	13	25,1	53,2	16,3	10,7
14	33,4	66,3	18,8	65,4	14	60,4	74,1	16,3	163,9
15	76,1	87,9	14,6	219,2	15				
16	79,9	87,8	14,8	231	16	81,2	86,3	15	218,7
Mittelwert	64,8	78,2	37,5	153,8	Mittelwert	58,6	70,0	14,5	151,4
SD	20,1	23,2	25,3	59,9	SD	24,8	18,9	2,1	80,0
N	33	33	33	33	N	13	13	13	13

Induktor: Kollagen

behandlungsinduzierter Unterschied				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1	-21,1	-37,5	10,2	-61,7
2	-8	-33,3	8	-51,5
3	0,5	-8,9	1,4	4,4
5	9,3	10,8	-14,8	47,3
6	-4,1	16,2	1,5	9,2
7	-4,3	-6,9	1,7	-8,3
8	2,3	2,2	0,6	9,1
9	-2,7	-10,5	2,7	-0,7
10				
11	10,7	12,8	0,3	21,4
12	-1	-26,9	-18,4	8,1
13	8,1	4,3	8,4	21,5
14	9,4	9,1	-40	44,9
15				
16	-6,7	-24,3	-12,3	-0,8
Mittelwert	-0,6	-7,1	-3,9	3,3
SD	8,9	18,4	14,0	31,4
N	13	13	13	13

Induktor: ADP

behandlungsinduzierter Unterschied				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1	-68,7	-74,6	-36,8	-190
2	-23,2	-39,3	-0,3	22,9
3	-23,6	-5,1	2,8	-50,5
5	17,3	15	-3,3	43,3
6	-8,7	-5,7	2,4	-39,9
7	1,3	0,3	-0,1	15,9
8	8,6	6,25	-22,1	59,26
9	-28,2	-29,7	-2,7	-79,4
10				
11	28,2	11,1	-2	60,6
12	-1,2	-9,15	-5,9	28,9
13	-15,7	-10,3	-2,3	-91,4
14	27	7,8	-2,5	98,5
15				
16	1,3	-1,5	0,2	-12,3
Mittelwert	-6,7	-10,4	-5,6	-10,3
SD	26,0	24,6	11,3	78,6
N	13	13	13	13

Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation und Plättchenaggregation durch die Kombination aus Statin und NO

Auswertung der Plättchenaggregation Agens: L-Arginin + Simvastatin

Induktor: Kollagen

vor Behandlung					nach Behandlung				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC	Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1	63	75,1	80	126,4	1				
2	77,2	75,6	46,2	191,2	2				
3	70,4	76,4	45,2	177,6	3	84,6	86,6	62,8	200,5
5	24,1	31,7	71,6	17,1	5	75,2	100	55,6	176,2
6	75,3	69,9	50,1	166,9	6	29,2	35,2	73,8	35,5
7	73,2	65,9	34,6	186,5	7	77,1	82,3	29,3	204,9
8	79,8	94	56,2	181,8	8	80,3	96,4	72,1	174,3
9	67,7	72,2	50,4	159,8	9	82	101	47,5	193,9
10					10	76,3	85,8	39,5	201,6
11	58,9	67,2	47,3	121,1	11	61	69,7	49	156,2
12	70,9	74,7	63,8	137,8	12	72,2	70,9	58,3	177,2
13					13				
14	52,4	42,8	136,2	62,9	14	67	76,8	90,6	120,6
15	49,8	66,7	49,6	102,6	15	66,8	88,1	49,9	136,9
16	76,3	102,9	66,5	181,3	16	78	108	58,9	177,2
Mittelwert	64,5	70,4	61,4	139,5	Mittelwert	70,8	83,4	57,3	160,1
SD	15,4	18,3	25,7	53,0	SD	14,8	19,3	16,4	47,9
N	13	13	13	13	N	12	12	12	12

Induktor: ADP

vor Behandlung					nach Behandlung				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC	Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1	42,5	71,2	19,4	130,2	1				
2	77,1	88,3	14,3	213,9	2				
3	70,9	57,4	12	194,8	3	68,5	72,2	15,6	184,6
5	44,1	89,7	14,7	26,8	5	73,5	73,5	13,2	188,9
6	58,1	76,6	16,3	165,2	6	50,7	95,2	17,3	48,7
7	64,1	63,4	11	169,6	7	101,8	107,7	8,7	289,5
8	71,4	63,1	13,8	158,6	8	68,1	65,6	16,2	170,6
9	64	72,6	14,3	178,5	9	82,3	106,1	17	225,7
10					10	71,4	69,4	10,5	208
11	53	45,1	16,7	120,3	11	59,9	61,2	14,2	152,6
12	19,8	45,9	15	15,4	12	22	47,8	13,3	9
13					13				
14	16,5	44,9	15,9	6,6	14	71,5	86,7	17,2	188,2
15	50,8	51,9	15,9	135,9	15	72,8	72,7	12	194,3
16	69,3	58,1	15,4	181,7	16	69,3	81,3	14,4	158,9
Mittelwert	54,0	63,7	15,0	130,6	Mittelwert	67,7	78,3	14,1	168,3
SD	19,1	15,3	2,1	70,1	SD	18,8	18,0	2,7	74,7
N	13	13	13	13	N	12	12	12	12

Induktor: Kollagen

behandlungsinduzierter Unterschied				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1				
2				
3	14,2	10,2	17,6	22,9
5	51,1	68,3	-16	159,1
6	-46,1	-34,7	23,7	-131,4
7	3,9	16,4	-5,3	18,4
8	0,5	2,4	15,9	-7,5
9	14,3	28,8	-2,9	34,1
10				
11	2,1	2,5	1,7	35,1
12	1,3	-3,8	-5,5	5,1
13				
14	14,6	34	-45,6	57,7
15	17	21,4	0,3	34,3
16	1,7	5,1	-7,6	-4,1
Mittelwert	6,8	13,7	-2,2	20,3
SD	22,7	25,8	18,8	67,7
N	11	11	11	11

Induktor: ADP

behandlungsinduzierter Unterschied				
Probanden-Nr.	max. Aggregation	max. Gradient	Zeitp. des max. Gradienten	AUC
1				
2				
3	-2,4	14,8	3,6	-10,2
5	29,4	-16,2	-1,5	162,1
6	-7,4	18,6	1	-116,5
7	37,7	44,3	-2,3	119,9
8	-3,3	2,5	2,4	12
9	18,3	33,5	2,7	47,2
10				
11	6,9	16,1	-2,5	32,3
12	2,2	1,9	-1,7	-6,4
13				
14	55	41,8	1,3	181,6
15	22	20,8	-3,9	58,4
16	0	23,2	-1	-22,8
Mittelwert	14,4	18,3	-0,2	41,6
SD	19,9	17,9	2,5	87,0
N	11	11	11	11

3.5 C-reaktives Protein

Das hoch-sensitive C-reaktive Protein, welches zu den Akute-Phase-Proteinen gehört und als unspezifische Antwort auf u.a. entzündliche Prozesse gebildet wird, wurde in seiner Konzentration weder durch die Behandlung mit Simvastatin ($1,6 \pm 0,2$ vs. $1,9 \pm 0,3$ mg/l bei der Baseline-Untersuchung), noch durch L-Arginin SR ($2,2 \pm 0,7$ vs. $2,6 \pm 0,8$ mg/l) beeinflusst. Bei der kombinierten Therapie aus Statin und Aminosäure kam es jedoch zu einem signifikanten Abfall des C-reaktiven Proteins ($1,9 \pm 0,3$ v.s. $2,7 \pm 1,3$ mg/l; $p < 0,05$).

3.6 c-GMP- und 8-iso-PGF-Ausscheidung im Urin

Das zyklische Guanosinmonophosphat (c-GMP) ist ein zyklisches Nukleotid, welches als Second Messenger unter anderem durch eine Entspannung der glatten Muskulatur zur Vasodilatation führt.

Die Urin-Ausscheidung von c-GMP veränderte sich unter den verschiedenen Therapieformen nicht signifikant. Jedoch kam es unter kombinierter Gabe der beiden oben beschriebenen Substanzen zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg des c-GMP-Spiegels im Urin. Ebenfalls unter Einnahme beider Medikamente gleichzeitig, kam es zu einer leichten, nicht signifikanten Abnahme der 8-iso-PGF-Ausscheidung.

8-iso-PGF ist ein durch Lipidperoxidation entstandenes Isoprostan. Dieser Vorgang wird durch freie Radikale induziert. Dessen Ausscheidung im Urin ist ein Marker für oxidativen Stress.

Im Gegensatz dazu kam es unter Substitution mit Simvastatin oder L-Arginin SR alleine zu keiner Veränderung der beiden Substanzen im Urin (siehe Tabelle 6 auf Seite 29).

Variable	Simvastatin		L-Arginin SR		Kombination	
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	258,1 (7,4)	181,7 (6,1)*	256,0 (6,2)	244,1 (6,9)	256,9 (6,1)	167,9 (3,8)
LDL-Cholesterin (mg/dl)	168,5 (7,7)	94,5 (5,7)*	169,6 (4,9)	157,6 (6,8)	165,4 (5,5)	86,7 (4,0)*
HDL-Cholesterin (mg/dl)	56,8 (5,1)	58,0 (5,3)	54,3 (4,2)	54,1 (5,3)	55,7 (4,9)	58,5 (4,9)
Triglyceride (mg/dl)	165,1 (20,0)	140,2 (24,3)	161,1 (22,5)	162,0 (23,1)	178,2 (18,6)	113,7 (13,9)
CK-Aktivität (U/l)	80,3 (11,2)	100,9 (9,6)	85,4 (12,8)	91,5 (11,2)	89,3 (14,6)	119,3 (18,6)
AST-Aktivität (U/l)	21,0 (2,4)	27,5 (3,1)	23,3 (3,5)	22,7 (2,6)	21,4 (1,8)	24,5 (2,0)
ALT-Aktivität (U/l)	24,3 (4,6)	32,9 (6,3)	28,4 (7,2)	27,7 (6,5)	22,7 (3,0)	27,5 (3,4)
Serum-Kreatinin (mg/dl)	0,89 (0,03)	0,93 (0,05)	0,90 (0,04)	0,87 (0,03)	0,89 (0,03)	0,89 (0,03)
Urin-cGMP (nmol/mmol Kreatinin)	25,7 (2,7)	25,3 (4,1)	26,5 (3,4)	23,7 (2,6)	24,0 (3,6)	27,5 (3,5)
Urin-8-iso-PGF2_ (pg/mg Kreatinin)	245,9 (42,9)	239,9 (34,8)	238,6 (30,0)	224,2 (29,6)	259,0 (25,1)	224,3 (23,8)

Tabelle 6: Lipoprotein-Profile und Marker der Organfunktion. Daten sind Mittelwerte.
* $p < 0,05$ vs. vorher

4 Diskussion

Die Hauptaussage dieser Studie ist, dass die orale Zuführung von L-Arginin zusammen mit Simvastatin die endothelabhängige Vasodilatation bei Patienten mit erhöhten ADMA-Spiegeln verbessert. Im Gegensatz dazu übt Simvastatin alleine keinen signifikanten Einfluss auf diese Variable aus. Darüber hinaus ist die endothelabhängige Gefäßerweiterung, die durch die L-Arginin/Simvastatin-Kombination erreicht wird, bedeutend größer als die durch L-Arginin alleine. Für die Verbesserung des endothelvermittelten Blutflusses durch Statine macht man hauptsächlich eine Hochregulierung der endothelialen NO-Synthase verantwortlich [9]. Eben dieser Mechanismus wird auch bei der Besserung der endothelialen Dysfunktion durch Simvastatin oder Pravastatin bei hypercholesterolämischen Kaninchen [29], bei herztransplantierten Individuen [30] und der wiederhergestellten Gehstrecke bei pAVK-Patienten unter Atorvastatin-Therapie [31] vermutet.

Jedoch haben nicht alle Studien einheitlich eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation gezeigt. Es gibt Untersuchungen zu verschiedenen Statinen an unterschiedlichen Patienten-Populationen, die keine Steigerung zeigten [16, 17, 32, 33]. Im Augenblick gibt es für diese Beobachtung noch keine Erklärung auf molekularer Ebene.

Ein interessanter Angriffspunkt könnte durch eine Untersuchung von Janatuinen et al. [18] entstehen: sie fanden heraus, dass eine sechsmonatige Therapie mit 40 mg/d Pravastatin nur bei Patienten mit ADMA-Spiegeln unter $0,3 \mu\text{mol/l}$ einen erhöhten myokardialen Blutfluss erzielte. Da ADMA ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase ist, kommt es durch Hochregulierung der endothelialen NO-Synthase unter Statin-Therapie nicht zu einer gesteigerten NO-Synthase Aktivität (eigentlich eine allgemeingültige Annahme bei der Wirkung von Statinen auf die eNOS Expression), wenn das Enzym durch erhöhte ADMA-Spiegel blockiert wird. In diesem Zusammenhang kommt es zwar zu einer Hochregulierung der eNOS Expression durch Statine, aber das Genprodukt ist inaktiv. Es resultiert die beobachtete unveränderte Gefäßfunktion. Unter der Annahme, dass ADMA eine Rolle in der Regulation der Enzymaktivität spielt, kann bei Patienten mit niedrigen ADMA-Spiegeln eine Hochregulation der eNOS Expression zu einer gesteiger-

ten Enzymaktivität führen. Dieses molekulare Konzept könnte die verschiedenen Statin-Effekte auf die endothelabhängige Vasodilatation bei unterschiedlichen Patienten-Populationen erklären [20].

Für unsere Studie haben wir Patienten mit einem erhöhten ADMA-Spiegel gesucht, um die therapeutische Bedeutung folgender Hypothese zu prüfen: wenn ADMA, ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase, das durch Statine hochregulierte Enzym eNOS davon abhält, aktiv zu sein, dann sollte durch Verdrängung des Inhibitors durch hohe Dosen des natürlichen Substrats L-Arginin eine signifikante Steigerung der durch Statine hervorgerufenen endothelabhängigen Vasodilatation möglich sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dies in der Tat. Jeder Studienteilnehmer wurde mit den drei Substraten Simvastatin, L-Arginin und der Kombination aus beiden behandelt. Aus diesem Grund diente jeder Patient/in als seine bzw. ihre eigene Kontrolle. Unsere Daten zeigten eindeutig, dass die kombinierte Anwendung aus Statin und L-Arginin SR die stärkste endothelvermittelte Vasodilatation hervorrief, wohingegen Simvastatin alleine zu keinem signifikanten Anstieg dieses Parameters in der Studienpopulation mit erhöhten ADMA-Spiegeln führte. Darüber hinaus erzielte das in Kombination verabreichte Medikament im Vergleich zur Aminosäure alleine eine leichte, aber signifikante Verbesserung der endothelmedierten Gefäßweitstellung. Diese zusätzliche Beobachtung ist eine weitere Bestätigung für die Hypothese, dass die Hochregulierung der eNOS Expression zusammen mit der Ergänzung ihres natürlichen Substrats die Endothelfunktion bei Patienten mit erhöhten ADMA-Spiegeln verbessert.

Eine frühere Studie hat gezeigt, dass L-Arginin den zerebralen Blutfluss über einen eNOS-abhängigen Weg in Mäusen, die permanent mit Simvastatin behandelt wurden, erhöht [34]. Ferner wurde die Verbindung aus L-Arginin (7 g/Tag) und Simvastatin (20 mg/Tag) in einer Untersuchung an 25 hypercholesterinämischen Individuen geprüft [35]. Es zeichnete sich eine Tendenz in Richtung einer verbesserten endothel-abhängigen Vasodilatation ab, wenn die beiden Substanzen in Kombination anstatt Simvastatin alleine verabreicht wurden. Diese Beobachtung erreichte jedoch keine statistische Relevanz, vermutlich, weil nur an 10 von 25 Probanden Ultraschalluntersuchungen durchgeführt wurden und die Gefäßdurchmesser manuell festgehalten wurden. Im Gegensatz dazu wurde bei unserer Arbeit eine computergestützte Software zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers herangezogen, wie es nach aktuellen Richtlinien empfohlen wird [36].

Die Probanden wurden in die Untersuchung eingeschlossen, wenn sich ihr ADMA-Spiegel im oberen Viertel der Gruppe von 98 gesunden älteren Individuen befand. Aus diesem Grund waren ihre ADMA-Spiegel relativ hoch, aber nicht unbedingt über dem Normalwert liegend. Der biochemische Mechanismus, der zu den hohen ADMA-Werten in dieser Studie führt, wurde noch nicht entschlüsselt. Eine mögliche Erklärung könnte eine verminderte Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH), dem ADMA inaktivierenden Enzym [37], sein, da eine verminderte renale Ausscheidung aufgrund der Berechnung der Kreatinin-Clearance keine Rolle spielte. Die spezielle Verabreichungsform des retardierten L-Arginins (L-Arginin SR), welches bei dieser Arbeit verwendet wurde, könnte zu den günstigen Effekten der Behandlung beigetragen haben. Und zwar resultiert diese in einer signifikanten Verlängerung der Halbwertszeit der Aminosäure, die ansonsten nur eine Stunde betrüge [38]. Unveröffentlichte Daten lassen den Schluss zu, dass die Halbwertszeit des L-Arginins SR sechs Stunden betragen könnte (E. Ron, Ph.D., persönliche Mitteilung, 2005). Auf diesem Wege könnte die Exposition des Gefäßsystems mit hohen L-Arginin-Spiegeln bedeutend verlängert werden, und dadurch auch die Möglichkeit, die nachteiligen Auswirkungen auf die NO-Synthase zu antagonisieren.

Wir könnten die Wirkung von Simvastatin auf die endothel-abhängige Vasodilatation unterschätzt haben, da die Versuchsteilnehmer unserer Studie nicht speziell wegen einer Hypercholesterinämie ausgewählt wurden. Dennoch hatten 12 der 15 Probanden Serum-LDL-Spiegel über 160 mg/dl, und kein Patient besaß Serum-LDL-Werte unter 130 mg/dl. Dieser Befund könnte zu einer häufigen Koinzidenz zwischen erhöhten ADMA-Spiegeln und hohen Cholesterin-Werten in der Bevölkerung passen. Daraus könnte man schließen, dass viele hypercholesterinämische Patienten, die mit Statinen behandelt werden, ebenfalls ADMA-Werte über dem Durchschnitt zeigen. Böger et al. berichteten in einer früheren Untersuchung von hypercholesterinämischen Patienten, die auch bei klinischer Unauffälligkeit erhöhte ADMA-Spiegel aufwiesen, welches zur endothelialen Dysfunktion in einer Art und Weise beiträgt, die durch L-Arginin rückgängig gemacht werden kann [23]. Überdurchschnittliche ADMA-Konzentrationen wurden in unserer Studie, genauso wie in anderen [18, 35], nicht durch die Statin-Therapie beeinflusst. Aus dieser Beobachtung könnte sich die Schlussfolgerung ableiten, dass eine Erhöhung von ADMA unabhängig vom LDL-Cholesterin auftritt und dass dieser eNOS-Inhibitor nicht durch molekulare Modulationswege der Statine, wie z.B. den Rho-Kinase-Weg, beeinflusst wird [39].

ADMA wurde in mehreren prospektiven klinischen Studien als neuer kardiovaskulärer Risikofaktor identifiziert: Zoccali et al. [40] fanden eine signifikante, dreifach erhöhte Inzidenz kardiovaskulärer Komplikationen und der Gesamtmortalität bei Hämodialyse-Patienten, deren ADMA-Konzentrationen im obersten Viertel ihrer Probanden lagen. Valkonen et al. [41] wiesen in ihrer Studie nach, dass Individuen mit einem ADMA-Wert im oberen Viertel eine 3,9-fache signifikante Erhöhung von akuten kardiovaskulären Ereignissen hatten. Eine weitere prospektive Studie von Nijveldt et al. [42] ergab eine 17-fach höhere Gesamtmortalität bei intensivpflichtigen Patienten mit ADMA-Spiegeln im oberen Viertel. Schließlich haben Lu et al. [43] eine signifikante Beziehung zwischen ADMA-Konzentrationen im obersten Drittel und häufigeren ernsten kardiovaskulären Zwischenfällen bei Patienten nach koronarer Revaskularisation gefunden.

Unsere Studie hat Limitationen: durch die relativ geringe Probandenzahl und die kurze Dauer der Untersuchung konnten klinische Ereignisse nicht erfasst werden. Dennoch war diese Arbeit aussagekräftig genug, um eine signifikante, klinisch relevante Besserung der endothel-abhängigen Vasodilatation aufzudecken. Die fluss-induzierte Vasodilatation, die wir stellvertretend für die endothel-vermittelte Gefäßweitung mittels der oben genannten Methode (Blutdruckmanschette am Oberarm) dargestellt haben, ist nicht vollständig NO-abhängig [36, 44, 45]. Darum könnten einige Wirkungen auf die endothel-abhängige NO-Bildung, die durch pharmakologische Interaktion aufgrund nicht NO-vermittelter Vasodilatation entstehen, die Sensitivität für die Erkennung von Veränderungen im Hauptendpunkt reduziert haben. Die durch L-Arginin alleine oder in Kombination mit Simvastatin hervorgerufene signifikante Änderung der fluss-induzierten Vasodilatation zeigt, dass die Methodik dieser Studie sensitiv genug war, um klinisch relevante Modifikationen in der Endothelfunktion aufzudecken. Letztlich haben wir jedoch keine verfügbaren Daten aus dieser Arbeit zur Verfügung, die beweisen, dass exogen zugeführtes L-Arginin in einer signifikanten Erhöhung des intrazellulären L-Arginin-Spiegels mündet. Dennoch konnte die Arbeitsgruppe um Böger et al. mittels Isotopenmarkierung belegen, dass exogen zugegebenes L-Arginin nahezu vollständig sowohl bei hypercholesterinämischen, als auch bei gesunden Tieren in die Zellen aufgenommen wird [46].

Zusammenfassend enthält diese Studie Beweise, dass der endogene NOS-Inhibitor ADMA nicht nur ein neuer unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor ist, sondern auch die Fähigkeit der Statine, die Endothelfunktion zu verbessern

beeinflusst. Da man annimmt, dass diese besondere Aufgabe der Statine zur Abschwächung von Morbidität und Mortalität bei Behandlung mit dieser Substanzklasse beiträgt, sollten die ADMA-Konzentrationen vor einer Statin-Therapie gemessen werden, und eine Substitution mit L-Arginin SR bei Patienten mit erhöhten ADMA-Werten erwogen werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Hypothese überprüft, ob die Kombination aus Simvastatin und L-Arginin die endothelabhängige Vasodilatation bei Individuen mit erhöhten ADMA-Spiegeln verstärkt.

Zusammenfassend macht diese klinische Studie deutlich, dass der unabhängige kardiovaskuläre Risikofaktor ADMA [40, 43, 47, 48], ein endogener Inhibitor der NO-Synthase, in hoher Konzentration auch den positiven Effekt der Statine auf die Vasodilatation vermindert.

Da man annehmen kann, dass Morbidität und Mortalität durch den vasodilatierenden Effekt der Statine positiv beeinflusst werden, erscheinen weitere Studien sinnvoll. Es bleibt beispielsweise zu klären, ob eine Messung des ADMA-Spiegels vor Einleitung einer Statin-Therapie und gegebenenfalls Nahrungsergänzung mit L-Arginin bei Patienten mit erhöhten ADMA-Spiegeln sinnvoll wäre.

6 Literaturverzeichnis

[1.] Bühling KJ, Lepenies J, Witt K, Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. Urban & Fischer 2000; 101.

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

[3.] Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC. The L-arginine – nitric oxide pathway: Role in atherosclerosis and therapeutic implications. Atherosclerosis 1996; 127: 1-11.

[4.] Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. Lancet 1992; 339: 572-575.

[5.] Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. LDL Cholesterol upregulates synthesis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human endothelial cells. Involvement of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases. Circ Res 2000; 87: 99-105.

[6.] Murray-Rust J, Leiper J, Mc-Allister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, Vallance P, Mc Donald K. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Nature Struct Biol 2001; 8: 679-683.S

[7.] MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Br J Pharmacol 1996; 119: 1533-1540.

[8.] Maher TJ. L-arginine continuing education module. New hope natural media 2000; 4.

[9.] Laufs U, La F, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. Circulation 1998; 97:1129-1135.

- [10.] Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998; 95:8880-8885.
- [11.] Bates K, Ruggeroli CE, Goldman S, Gaballa MA. Simvastatin restores endothelial NO-mediated vasorelaxation in large arteries after myocardial infarction. *Am. J. Physiol.* 2002; 283: H768-H775.
- [12.] Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, Hoffmeyer M, Rimmer DM 3rd, Trocha SD, Huang PL, Smith MB, Lefer AM, Lefer DJ. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001; 103: 2598-2603.
- [13.] Wilson SH, Simari RD, Best PJ, Peterson TE, Lerman LO, Aviram M, Nath KA, Holmes DR Jr, Lerman A. Simvastatin preserves coronary endothelial function in hypercholesterolemia in the absence of lipid lowering. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 122-128.
- [14.] Leung WH, Lau CP, Wong CK. Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic patients. *Lancet* 1993; 341: 1496-1500.
- [15.] Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW. Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 481-487.
- [16.] Vita JA, Yeung AC, Winniford M, Hodgson JM, Treasure CB, Klein JL, Werns S, Kern M, Plotkin D, Shih WJ, Mitchel Y, Ganz P. Effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelial vasomotor function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 846-851.
- [17.] Van Venrooij FV, van de Ree MA, Bots ML, Stolk RP, Huisman MV, Banga JD. Aggressive lipid lowering does not improve endothelial function in type 2 diabetes: the Diabetes Atorvastatin Lipid Intervention (DALI) Study: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Diab. Care* 2002; 25: 1211-1216.

- [18.] Janatuinen T, Laakso J, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimäki T, Raitakari OT, Knuuti J. Plasma asymmetric dimethylarginine modifies the effect of pravastatin on myocardial blood flow in young adults. *Vasc. Med.* 2003; 8: 185-189.
- [19.] Böger RH. The emerging role of ADMA as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc. Res.* 2003; 59: 824-833.
- [20.] Böger RH, Asymmetric dimethylarginine (ADMA) modulates endothelial function – therapeutic implications [Editorial]. *Vasc. Med.* 2003; 8: 149-151.
- [21.] Böger RH, Bode-Böger SM, Schröder P, Frölich JC. Increased prostacyclin production during exercise in untrained and trained men: effect of low-dose aspirin. *J. Appl. Physiol.* 1995, 78: 1832-1838.
- [22.] Born, GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 1963; 168: 178-195.
- [23.] Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tangphao O, Tsao PS, Chan JR, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98: 1842-1847.
- [24.] Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997, 95: 2068-2074.
- [25.] Schwedhelm E, Tsikas D, Durand T, Gutzki FM, Guy A, Rossi JC, Frölich JC. Tandem mass spectrometric quantification of 8-iso-prostaglandin F₂ and its metabolite 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin F₂ in human urine. *J Chromatogr B* 2000; 744: 99-112.
- [26.] Schwedhelm E, Böger RH. Application of gas chromatography – tandem mass spectrometry for analysis of isoprostane excretion: their role in cardiovascular diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41: 1552-1561.
- [27.] Schwedhelm E, Bartling A, Lenzen H, Tsikas D, Maas R, Brümmer J, Gutzki FM, Berger J, Frölich JC, Böger RH. Urinary 8-iso-prostaglandin F₂ is a risk

marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control study. *Circulation* 2004; 109: 843-848.

[28.] Ribeiro Jorge PA, Osaki MR, de Almeida E. Rapid reversal of endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits treated with simvastatin and pravastatin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1997; 24: 948-953.

[29.] O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, HMG-CoA reductase inhibitor, improves endothelial function within one month. *Circulation* 1997; 95: 1126-1131.

[30.] Weis M, Pehlivanli S, Meiser BM, von Scheidt W. Simvastatin treatment is associated with improvement in coronary endothelial function and decreased cytokine activation in patients after heart transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38: 814-818.

[31.] Mohler ER, Hiatt WR, Creager MA. Cholesterol reduction with atorvastatin improves walking distance in patients with peripheral arterial disease. *Circulation* 2003; 108: 1481-1486.

[32.] Sheu WHH, Juang BL, Chen YT, Lee WJ. Endothelial dysfunction is not reversed by simvastatin in type 2 diabetic patients with hypercholesterolemia. *Diab. Care* 1999; 22: 1224-1225.

[33.] van de Ree MA, Huisman MV, de Man FH, van der Vijver JC, Meinders AE, Blauw GJ. Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes mellitus and the lack of effect of simvastatin. *Cardiovasc. Res.* 2001; 52: 299-305.

[34.] Yamada M, Huang Z, Dalkara T, Endres M, Laufs U, Waeber C, Huang PL, Liao JK, Moskowitz MA. Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 2000; 20: 709-717.

[35.] Pereira EC, Bertolami MC, Faludi AA, Salemi M, Bersch D, Abballa DSP. Effects of simvastatin and L-arginine on vasodilation, nitric oxide metabolites and endogenous NOS inhibitors in hypercholesterolemic subjects. *Free Rad. Res.* 2003; 307: 529-536.

- [36.] Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39: 257-265.
- [37.] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalysing the direct conversion of NG, NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 148: 671-677.
- [38.] Bode-Böger SM, Böger RH, Galland A, Junker W, Tsikas D, Frölich JC. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of the effects of intravenous and oral L-arginine on nitric oxide formation and peripheral hemodynamics in healthy human subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998; 46: 489-497.
- [39.] Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1712-1719.
- [40.] Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich JC, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end-stage renal disease (ESRD). *Lancet* 2001; 358: 211-2117.
- [41.] Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetric dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358: 2127-8.
- [42.] Nijveldt RJ, Teerlink T, van der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor for ICU mortality. *Clin. Nutr.* 2003; 22: 23-30.
- [43.] Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur. Heart J.* 2003; 24: 1912-1919.

[44.] Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91: 1314-1319.

[45.] Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am. J. Physiol.* 1995; 268: H1397-H1404.

[46.] Böger RH, Tsikas D, Bode-Böger SM, Phivtong-Ngam L, Schwedhelm E, Fröhlich JC. Hypercholesterolemia impairs basal nitric oxide synthase turnover rate: a study investigating the conversion of L-[guanidino-¹⁵N₂]-arginine to ¹⁵N-labeled nitrate by gas chromatography-mass-spectrometry. *Nitric Oxide* 2004; 11: 1-8.

[47.] Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene study. *CircRes* 2005; 97: e53-9.

[48.] Maas R, Dentz L, Schwedhelm E, et al. Elevated plasma levels of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine (ADMA) predict adverse events in patients undergoing noncardiac surgery. *Crit Care Med* 2006. In press.

7 Anhang

Material: Chemikalien und Gase

Aceton	Merck (Darmstadt)
ADP (Adenosindiphosphat)	Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg)
Argon-Gas (5,0) für GC-MS	Linde (Hannover)
Helium-Gas (5,0) für GC-MS	Linde (Hannover)
Horn-Puffer	NYCOMED Austria (Linz, Österreich)
Kochsalzlösung, isoton	Baxter (Unterschleißheim)
Kollagen	NYCOMED Austria (Linz, Österreich)
Methan-Gas (5,0) für die GC-MS	Linde (Hannover)
Natrium [¹⁵ N]nitrat (98,5% ¹⁵ N)	MSD Isotopes MFC (Montreal, Canada)
Natrium [¹⁵ N]nitrat (98,5% ¹⁵ N)	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA)
PFB-Bromid (Pentafluorobenzylbromid)	Sigma (Deisenhof)
Toluol	Sigma (Deisenhof)

Verbrauchsmaterial

ADMA® -Kit	DLD Diagnostik (Hamburg)
Autosamplergefäße mit Bördelverschluss	GC-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)
Autosamplergefäße mit Schnappdeckelverschluss	GC-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)
Blutentnahmeröhrchen (Monovetten)	B. Braun (Melsungen)
Butterfly	B. Braun (Melsungen)

Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Röhrchen (15, 50 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
„Limited volume inserts“ 0,3 ml	Brown (Wertheim)
Miko-Küvetten mit Rührfisch 1,0 x 4,0	Biochemica (Flacht)
Nitrolingual-Spray	Pohl-Boskamp (Hohenlockstedt)
Polypropylen-Röhrchen 5 ml	Greiner (Frickenhausen)
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
Spitzen	B. Braun (Melsungen)
Stauschlauch	B. Braun (Melsungen)
Sterican-Kanülen	B. Braun (Melsungen)
Ultraschallkontaktgel	Caser & Loretz (Hilden)
Ultrazentrifugenröhrchen 30 ml	Sorvall (Newton, USA)
Wasser, doppelt destilliert (Aqua bidest.)	hauseigene Wasseraufbereitungs- anlage (Millipore, Schwalbach)

Laborgeräte

Aggregometer „Labor APACT“	Labor GmbH (Ahrensburg)
Analysewaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Blutdruckmanschette Typ Tyco	Welch Allyn (Arden, USA)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Digitalwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
GC-MS (CP-3800; 1200 Quadrupole MS)	Varian (Walnut Creek, USA)
Kapillarsäule DB-5 MS (30mm x 0,25mm I.D., 0,25 µm Filmdicke)	J.&W. Scientific (Ran. Cordova, USA)

Kühltruhe (-20°C, -80°C)	Kryotec (Hamburg)
Pulse Trace-Gerät	Micro Medical Limited (Rochster, England)
Serologische Pipetten (1, 2, 10, 25 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Evaporator „Turbo Vap LV“	Zymark
Sonographiegerät „SONOLINE Sienna“	Siemens (München, Berlin)
Thermoblock „Bioblock 890436G“	Bioblock Scientific (Illkirch Cedex, USA)
VHS-Videogerät Typ NVHS 830	Panasonic (Hamburg)
VHS-Videokassetten	Fuji (Kleve)
Vortexer	Heidolph (Kelheim)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Eschborn)
Zentrifuge „Centrifuge 5415R“	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge „Rotina 35R“	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

Computerprogramme

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

Lebenslauf

Geburtsdatum:	08.09.1978	
Geburtsort:	Norden	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig, 1 Kind	
Schulbildung:	1985 - 1989	Grundschule (Kaulbergschule), Bamberg
	1989 - 1998	E.T.A.-Hoffmann-Gymnasium, Bamberg
	1998	Abitur
Studium:	1999-2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
	03 / 2001	Physikum
	03 / 2002	1. Staatsexamen
	09 / 2004	2. Staatsexamen
	11 / 2005	3. Staatsexamen und Approbation
Promotion:	2003 - 2009	Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität Hamburg;
Berufstätigkeit:	05/06 - 06/09	Assistenzärztin Medizinische Klinik St.-Josef-Krankenhaus, Essen-Kupferdreh
	07/09 - 03/11	Assistenzärztin Angiologie, Innere Medizin Knappschaftskrankenhaus, Bottrop
	seit 04 / 2011	Mutterschutz / Elternzeit

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 habe 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.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R.H. Böger möchte ich für die Chance, diese Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie durchzuführen, danken.

Diese Dissertation entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R.H. Böger, dem ich besonders für die umfassende und fortwährende großzügige Unterstützung sowie die kritische und unverzügliche Korrektur dieser Arbeit danken möchte.

Besonders den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe Anna Steenpaß, Cornelia Wörmann, Mariola Kastner, Elisabeth Silberhorn, Dr. Jennifer Albsmeier, Dr. Friedrich Schulze, Dr. Edzard Schwedhelm und Dr. Renke Maas für das hervorragende Arbeitsklima sowie die permanente Hilfsbereitschaft danken.

Meinen Eltern, Brigitte und Jürgen Scheel sowie meinen Großeltern danke ich herzlich für die uneingeschränkte Unterstützung.