

**Einfluss einer akuten und
chronischen Gabe von Fluvastatin
auf die endotheliale Dysfunktion
bei der Hyperlipoproteinämie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nike Grubert

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. M. Kelm

Korreferent: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Tag der mündlichen Prüfung: 03.Juni.2004

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1998 bis Juli 2003 im Kardiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. H.-D. Höltje vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	5
2.1	Lipide	7
2.1.1	Aufbau, Funktion und Zusammensetzung	7
2.2	Das Endothel	9
2.2.1	Die Physiologie der endothelialen Funktion	9
2.2.2	Die endotheliale Dysfunktion	10
2.3	Atherosklerose	11
2.3.1	Physiologischer Aufbau einer Arterie	11
2.3.2	Pathophysiologie der Atherosklerose	12
2.3.3	Klinische Relevanz der Atherosklerose	13
2.3.4	Therapeutische Möglichkeiten	14
2.3.5	Statine- Stand der Forschung	17
2.3.5.1	LDL-Oxidation	22
2.3.5.2	Endothelfunktion	22
2.3.5.3	Entzündungsreaktionen	24
2.3.5.4	Zellproliferation, Migration und Apoptose	25
2.3.5.5	Plaquestabilität	25
2.3.5.6	Koagulation	26
2.3.6	Vaskulärer NO-Stoffwechsel	27
2.3.7	Fragestellung dieser Arbeit	28
3	Material und Methoden	29
3.1	Chemikalien	31
3.2	Versuchstiere und Behandlungsprotokoll	32
3.2.1	Kaninchen-Haltung	35
3.3	Hepes-Puffer	35
3.4	Blutanalysen	36
3.4.1	Blutanalysen in der Literatur	38
3.5	Untersuchungen an isolierten Aortensegmenten	39
3.6	Histopathologische Untersuchungen an isolierten Aortensegmenten	42
3.7	Untersuchungen an isoliert perfundierten Herzen	43
3.8	Biochemische Analysen	48
3.9	Statistik	51

4	Ergebnisse	53
4.1	Stoffwechseluntersuchungen	55
4.1.1	Serumlipidwerte	55
4.1.2	Elektrolyte	58
4.1.3	Transaminasen	59
4.1.4	Kreatinkinase	60
4.2	Auswertungen der Untersuchungen der isolierten Aortenringe	62
4.2.1	Endothelabhängiger Vasodilatator Acetylcholin	63
4.2.1.1	Acetylcholin: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität der isolierten Aorta	68
4.2.2	Endothelunabhängiger Vasodilatator Glyceroltrinitrat	73
4.2.2.1	Glyceroltrinitrat: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität der isolierten Aorta	78
4.3	Histopathologie	82
4.3.1	Plaquequantifizierung	83
4.3.1.1	Vergleiche der Plaqueausdehnung	85
4.3.2	Intima-Media-Dicke	86
4.3.2.1	Vergleich der Intima-Media-Dicke	88
4.4	Auswertungen der Untersuchungen der isoliert perfundierten Herzen	89
4.4.1	Endothelabhängiger Vasodilatator Acetylcholin	90
4.4.1.1	Acetylcholin: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität des isoliert perfundierten Herzens	91
4.4.2	Endothelunabhängiger Vasodilatator Glyceroltrinitrat	96
4.4.2.1	Glyceroltrinitrat: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität des isoliert perfundierten Herzens	98
4.4.3	HMG-CoA Reduktasehemmer Fluvastatin	102
4.4.3.1	Fluvastatin: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität des isoliert perfundierten Herzens	104
4.5	Biochemische Analysen des NO-Stoffwechsels	108
4.5.1	Konzentration an Nitrit im Plasma	108
4.5.1.1	Vergleiche der Konzentration von Nitrit im Plasma	110
4.6	Zusammenfassung	114
5	Diskussion	115
5.1	Stoffwechseluntersuchungen	117
5.2	Aorta	118

5.3	Histopathologie	122
5.4	Herz	123
5.5	NO-Stoffwechsel	126
5.6	Studienlimitation	129
5.7	Ausblick	130
6	Zusammenfassung	131
7	Literaturverzeichnis	135
	Anhang	155
	Danksagung	157
	Lebenslauf	159

1 Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
AVK	arterielle Verschlusskrankheit
CF	Koronarer Fluss (coronary flow)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphate)
CK	Kreatinkinase (creatine kinase)
CPP	koronarer Perfusionsdruck (coronary perfusion pressure)
CSE	Cholesterolsynthese
CVR	koronarvaskulärer Widerstand (coronary vascular resistance)
Δ CVR	Differenz des koronar vaskulären Widerstands vor und nach der Behandlung mit einem Pharmakon
EC ₅₀	Konzentration, welche den halbmaximalen Effekt hervorruft (effective concentration)
EDRF	endothelium derived relaxing factor
FIA	Fluss-Injektions-Analyse (flow injection analysis)
FPP	Farnesylpyrophosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GTN	Glyceroltrinitrat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HDL	Lipoproteine hoher Dichte (high density lipoproteins)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethan-sulfonsäure
Hg	Quecksilber
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie (high pressure liquid chromatography)
i.m.	intramuskulär
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule)
IMT	Intima-Media-Dicke (intima-media-thickness)
KHK	Koronare Herzerkrankung

LDL	Lipoproteine niedriger Dichte (low density lipoproteins)
LVP	linksventrikulärer Druck (left ventricular pressure)
MCP	Monozyten chemotaktisches Protein (monocyte chemotactic protein)
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NZW	New Zealand White
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (plasminogen activator inhibitor-1)
PK	Proteinkinase
RSNO	Nitrosothiol
sGC	lösliche Guanylatcyclase (soluble guanylate cyclase)
tPA	Gewebsplasminogen Aktivator (tissue plasminogen activator)
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (vascular cell adhesion molecule)
VLDL	Lipoproteine sehr niedriger Dichte (very low density lipoproteins)
vs.	versus
WHHL	Watanabe Heritable Hyperlipidemic

2 Einleitung

2.1 Lipide

2.1.1 Aufbau, Funktion und Zusammensetzung

Die Bezeichnung Lipide fasst unterschiedliche Verbindungen zusammen, welche für den Stoffwechsel essentiell sind. Einige dienen als strukturelle Komponenten von Membranen, während andere Speicherformen von Nährstoffen darstellen. Zu den Lipiden zählen Triglyceride und Phospholipide sowie Cholesterol. Allen gemeinsam ist die schlechte Wasserlöslichkeit. Daher benötigen sie einen speziellen Transportmechanismus im Körper. Sie werden im Blut nicht in freier Form, sondern im Inneren von hydrophilen Mizellen befördert. Diese entstehen durch Bindung von Lipiden an unterschiedliche Trägerproteine, so genannte Apoproteine, und werden als Lipoproteine bezeichnet [1;2].

Die Lipoproteine werden in verschiedene Dichteklassen unterteilt. Sie zeigen ein unterschiedliches Verhalten bei der Ultrazentrifugation (bzw. bei der Elektrophorese). Die unterschiedliche Dichte der Lipoproteine begründet sich in ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung:

Zusammensetzung in [%]	Chylomikronen	Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL)	Lipoproteine niedriger Dichte (LDL)	Lipoproteine hoher Dichte (HDL)
Apolipoproteine	0,8–2,5	8-12	20-24	40-60
Phospholipide	4-9	16-20	20-24	20-37
Cholesterol	0,5-1	6-8	7-9	2-7
Cholesterolester	1-2,5	12-14	35-40	5-10
Triglyceride	87-94	45-55	8-12	1-5

Quelle: [3]

Die Triglyceride sind die Energieträger. Das Cholesterol dient als Strukturmolekül der Zellmembran und Ausgangsmolekül für die Steroidhormon- und Gallensäuresynthese. Das Cholesterol und damit auch das LDL, als Lipoprotein mit dem größten Cholesterolgehalt, ist die in der Pathogenese der Atherosklerose wichtigste Verbindung. Die endogene Cholesterolsynthese (1-2 g/Tag) ist wesentlich größer als die Zufuhr mit der Nahrung (ca. 0,7 g/Tag).

Bei der Resorption der Fette werden von der Darmmucosa Chylomikronen gebildet. Sie dienen zum Transport der resorbierten Fette und gelangen über die Lymphbahn ins Blut, wo sie schnell durch Lipoprotein-Lipasen abgebaut werden.

Von der Leber synthetisierte Fette werden als Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL) in den Kreislauf sezerniert. Sie transportieren hauptsächlich im Organismus selbst produzierte Neutralfette. Ca. 40 % der VLDL werden in Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) umgewandelt. Die LDL sind die wichtigste Transportform für das Cholesterol. Die Versorgung extrahepatischer Gewebe mit Cholesterol und die direkte Einlagerung des Cholesterols in die Wände der Gefäße erklärt die atherogene Bedeutung der LDL. Lipoproteine hoher Dichte (HDL), die in der Leber und aus Chylomikronen gebildet werden, können dagegen Cholesterol aus den Zellen aufnehmen und zur Leber transportieren, wo es metabolisiert wird. Dem HDL wird ein Schutzeffekt bei der Atherosklerose zugesprochen.

2.2 Das Endothel

2.2.1 Die Physiologie der endothelialen Funktion

Ursprünglich wurde angenommen, dass das Endothel als Barriere einfach nur das strömende Blut von dem umgebenden Gewebe trennt. Erst durch die Entdeckung der Tatsache, dass die Prostaglandine nicht nur, wie ursprünglich angenommen, in der Prostata gebildet und in Samenflüssigkeit und Geschlechtsdrüsen freigesetzt werden, sondern in fast allen Organen nachweisbar und für eine Veränderung des Gefäßtonus verantwortlich sind, führte zu einer Veränderung des bis bestehenden Bildes vom Endothel. Furchgott und Zawadzki zeigten im Jahr 1980, dass ein intaktes Endothel entscheidend für eine Freisetzung des EDRF (endothelium derived relaxing factor) ist. Sie erklärten, dass die Unversehrtheit des Endothels eine zwingende Voraussetzung für die Acetylcholin induzierte Vasodilatation ist [4]. Im Sommer 1986 postulierte Ignarro auf einer Konferenz der Mayo Clinic in Rochester, Minnesota, zum ersten Mal, dass der von Furchgott und Zawadzki beschriebene EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist. Mittlerweile steht fest, dass NO (und L-Citrullin) aus L-Arginin mit Hilfe der NO-Synthase (NOS) synthetisiert wird [5].

NO stellt eine der potentesten relaxierenden Substanzen dar, die über die Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC) der glatten Muskelzellen mit nachfolgender Erhöhung des cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) und letzten Endes über eine Senkung der freien intrazellulären Calciumkonzentration zur Vasodilatation führt.

Der Gefäßtonus wird über eine basale kontinuierliche NO-Freisetzung moduliert. Auf diese Weise stellt das endotheliale NO-System hinsichtlich der Tonusregulation von Gefäßen einen Gegenspieler zum sympathischen Nervensystem und Renin-Angiotensin-System dar. Tatsächlich kommt es nach Hemmung der endothelialen NOS durch L-Arginin-Analoga zu einem drastischen Anstieg des systemischen, aber auch des Koronarwiderstandes. Neben dieser relaxierenden Wirkung ist NO ein potenter Hemmstoff der Plättchenaggregation und -adhäsion und entfaltet

dabei zusammen mit Prostacyclin einen synergistischen Effekt. Zusätzlich hemmt NO die Adhäsion von Leukozyten an der Endotheloberfläche über eine Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen. Weiterhin scheint NO die Proliferation glatter Muskelzellen über einen cGMP-abhängigen Mechanismus zu hemmen [6].

2.2.2 Die endotheliale Dysfunktion

Der Begriff der endothelialen Dysfunktion kann als eine Störung des endothelialen NO-Metabolismus definiert werden [7]. Die bedeutende pathophysiologische Bedeutung einer gestörten Endothelfunktion ergibt sich aus den oben beschriebenen physiologischen Funktionen des endothelialen NO-Systems.

Verschiedene Veränderungen im NO-Stoffwechsel sind möglich:

- eine verminderte Synthese und Freisetzung des als NO identifizierten EDRF [8]
- ein Verlust von Endothelzellen [9]
- eine verminderten Bioverfügbarkeit von NO durch eine exzessive Produktion von Superoxidradikalen in der Gefäßwand (oxidativer Stress) und damit eine Oxidierung und Inaktivierung des NOs [10-13]
- eine verminderte Diffusion von NO beim Transit durch die Endothelzellen in die darunter liegenden glatten Muskelzellen [14]
- eine verminderte Ansprechbarkeit der glatten Muskelzellen auf NO [8;15]

Atherosklerotische Läsionen gehen mit einer verminderten Endothel abhängigen Relaxation des arteriellen Gefäßes einher [16;17].

2.3 Atherosklerose

2.3.1 Physiologischer Aufbau einer Arterie

Die normale Struktur einer Leitungsarterie besteht aus drei morphologisch unterschiedlichen Schichten (siehe Abbildung 1):

Außen befindet sich die *Tunica adventitia*, die aus Bindegewebe mit eingelagerten Fibroblasten und glatten Muskelzellen besteht. Die *Tunica media*, als mittlere Schicht, besteht aus glatten Muskelzellen. Daran schließt sich die normalerweise sehr dünne *Tunica intima* an. Sie besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen und Kollagen. Zur Media hin ist die deutlich ausgeprägte Membrana elastica interna zu erkennen. Zum Lumen wird die Tunica intima durch eine einschichtige Endothelzellschicht abgeschlossen.

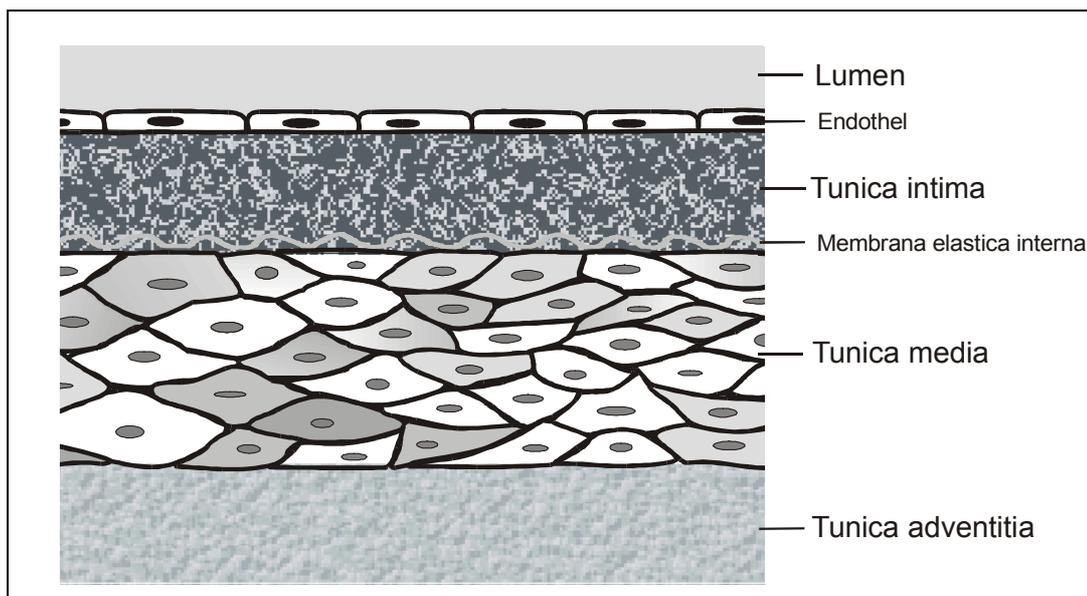


Abbildung 1: Exemplarische Struktur einer Leitungsarterie. Die Arterie besteht aus drei verschiedenen morphologischen Schichten: Die Tunica intima, die innerste Schicht, ist im pathologisch nicht veränderten Zustand sehr dünn. Sie besteht aus einer Bindegewebsmatrix aus Proteoglykanen und Kollagen. Zur luminalen Seite wird sie durch einen einschichtigen Endothelzellverband abgegrenzt. Auf der peripheren Seite befindet sich eine Lage mit elastischen Fasern, die Membrana elastica interna. Die Tunica media, die mittlere Schicht, besteht aus glatten Muskelzellen. Die Tunica adventitia, die äußere Schicht, besteht aus mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen durchsetztem Bindegewebe.

2.3.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Histopathologische Studien haben eine Reihe von Veränderungen in den Gefäßen bei der Entstehung der Atherosklerose aufgezeigt. Dabei spielen entzündliche Prozesse eine Schlüsselrolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Endothel eine zentrale Rolle bei den Entzündungsreaktionen spielt [18]. Mit seinen Interzellularspalten (tight junctions, Zonula occludens) ist das Endothel eine permeable Barriere zwischen Blut und Gewebe. Oxidiertes LDL wird in der Intima angesammelt. Das LDL wird vor allem durch Oxidation, aber auch durch Lipolyse, Proteolyse und Aggregationsreaktionen modifiziert. Diese veränderten LDL-Partikel werden von Makrophagen aufgenommen. Rezeptoren, wie SR-A und CD36, vermitteln eine Schaumzellbildung. Sie bilden die *frühe atherosklerotische Läsion*.

Im Laufe der Zeit sterben die Schaumzellen ab. Es bildet sich fibröse Plaque, die durch eine wachsende Masse an extrazellulären Lipiden und eine Akkumulation von glatten Muskelzellen sowie ein dadurch entstehende extrazelluläre Matrix charakterisiert ist. Cytokine und Wachstumsfaktoren, die durch Makrophagen und T-Zellen freigesetzt werden, sind für die Migration und Proliferation sowie für die Produktion der extrazellulären Matrix von Bedeutung. Man spricht von einer *fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion*. Zuerst wachsen die Läsionen bis zu einem kritischen Punkt zur Adventitia hin. Danach expandieren sie nach außen und engen das Gefäßlumen ein (positives und negatives Remodeling).

Acetylcholin (ACh) bewirkt unter normalen Umständen eine Vasorelaxation durch Freisetzung des EDRF. Bei Entfernung des Endothels oder durch atherosklerotische Läsionen kommt es zu einer unphysiologischen Konstriktion anstelle einer Dilatation nach ACh Gabe. Diese wird, wie oben beschrieben, als endotheliale Dysfunktion bezeichnet [16;19;20].

Ferid Murad [21] konnte bereits vor der Identifizierung des NO als dem EDRF für Nitrate wie Nitroglycerin eine Freisetzung von NO (ohne Endothelbeteiligung) sowie eine Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen unter Beweis stellen. Unter normalen Versuchsbedingungen werden nur bei schwersten atherosklerotischen Veränderungen Einschränkungen in der

endothelunabhängigen Relaxation beobachtet [22]. Unter normalen Bedingungen ist die endothelunabhängige Dilatation im Alter dagegen nicht beeinträchtigt [9].

Schon 1968 wurde von Eggen et al. [23] gezeigt, dass man bereits in der Kindheit atherosklerotische Veränderungen, nämlich Plaques, findet. Diese nehmen mit wachsenden Alter zu [24]. Beobachtungen, dass im steigenden Alter die Sensitivität auf NO-Donatoren abnimmt, lassen sich dadurch erklären. Man spricht von einer altersabhängigen Verschlechterung der Endothelfunktion [9;25]. Damit repräsentiert NO ein potentes antiatherosklerotisches Molekül.

Für die Entwicklung von Thromben induzierten koronaren Ereignissen ist die Zusammensetzung und Empfindlichkeit entscheidender als die Schwere der Stenose. Anfällige Plaque hat eine dünne fibröse Deckplatte und eine erhöhte Anzahl an Entzündungszellen. Rupturen findet man häufig im Randbereich der Läsionen, die reich an Schaumzellen sind [26].

2.3.3 Klinische Relevanz der Atherosklerose

Das für die Atherosklerose bedeutendste Lipoprotein ist das LDL. Es ist, neben dem Gesamtcholesterol und dem Apoprotein B, der wichtigste Risikofaktor sowohl für koronare Akutereignisse, wie tödlicher und nicht tödlicher Myokardinfarkt, als auch für chronische koronarsklerotische Folgeerkrankungen [27]. Die Koronare Herzerkrankung (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien. Bedingt durch flusslimitierende Koronarstenosen kommt es zum Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Herzmuskel [28]. Die durch diese Koronarinsuffizienz hervorgerufene Myokardischämie kann sich klinisch als äußern:

- Angina pectoris
- Myokardinfarkt
- Linksherzinsuffizienz
- Herzrhythmusstörungen
- Plötzlicher Herztod

Daneben spielt die arterielle Verschlusskrankheit (AVK) eine wichtige Rolle bei atherosklerotisch bedingten Erkrankungen. Sie umfasst stenosierende und okkludierende Veränderungen der Aorta und der Extremitätenversorgenden Arterien.

Man unterteilt vier Stadien der peripheren AVK:

- I. Beschwerdefreiheit, bei distal der Stenose nicht mehr tastbarem Puls
- II. Belastungsschmerz (Claudicatio intermittens, „Schaufensterkrankheit“)
- III. Ischämischer Ruheschmerz
- IV. Nekrose / Gangrän

Die Erkrankung der hirnversorgenden Halsschlagadern (cerebrale AVK) kann asymptomatisch sein. In leichten Fällen kann es zu einer vorübergehenden Beeinträchtigung des Sehvermögens (Amaurosis fugax) kommen, schwerere Formen können mit vorübergehender Bewusstseinsbeeinträchtigung (transitorische, ischämische Attacke) oder Symptomen des Schlaganfalls (Apoplexie) einhergehen [29;30].

Die Atherosklerose ist in der westlichen Gesellschaft für 50 % der Gesamtmortalität verantwortlich [26].

2.3.4 Therapeutische Möglichkeiten

Bei normalem HDL-Cholesterin steigt oberhalb von 200 mg/dl Gesamtcholesterin die Infarktmorbidität steil an und zeigt bei 250 mg/dl eine Verdopplung, bei 300 mg/dl eine Vervierfachung im Vergleich zum Risiko bei 200 mg/dl. Daher wurde für den Menschen 200 mg/dl als der anzustrebende Grenzwert für das Gesamtcholesterin festgesetzt [31].

Zur Vermeidung und Vorbeugung von atherosklerotischen Folgeerkrankungen umfasst das therapeutische Vorgehen im ersten Schritt diätetische Maßnahmen. Dabei spielen eine Fettreduktion, der Fettausgleich (bevorzugt pflanzliche Fette mit ungesättigten Fettsäuren sowie Konsum von Seefisch mit einem hohen Gehalt an Omega 3-Fettsäuren) und eine eingeschränkte Cholesterin Aufnahme über die

Nahrung eine wichtige Rolle. Im gleichen Zug ist das Körpergewicht zu normalisieren. Daneben ist auf eine optimale Einstellung eines Diabetes mellitus, einer arteriellen Hypertonie zu achten. Zusätzliche Risikofaktoren wie z.B. Zigarettenrauchen sollten eingestellt und die körperliche Aktivität erhöht werden.

Ist mit den oben beschriebenen Maßnahmen allein keine ausreichende Normalisierung des Lipidblutspiegels zu erreichen sind zusätzlich Lipid senkende Medikamente indiziert. Dafür stehen verschiedene Präparatgruppen zur Verfügung:

3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A Reduktasehemmer (=HMG-CoA Reduktasehemmer)

Synonyme: Cholesterol-Synthese-Hemmer (=CSE-Hemmer), Statine

Die HMG-CoA Reduktasehemmer sind die wirksamsten LDL-Cholesterolsenkenden Medikamente. Sie hemmen kompetitiv das Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese, das 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A. Die Beeinflussung des Fettstoffwechsels beinhaltet neben einer Abnahme des LDL-Cholesterols auch einen Anstieg des HDL-Cholesterols und eine Verringerung der Triglyceride und des VLDL-Cholesterols sowie der Zusammensetzung der Chylomikronen. Die individuelle Ansprechbarkeit auf HMG-CoA Reduktasehemmer ist unterschiedlich. Die maximale Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterols im Blut kann bis zu 60% betragen [32;33].

Anionenaustauscherharze

Die nicht resorbierbaren, basischen Anionenaustauscherharze binden im Dünndarm Gallensäuren und entziehen diese so dem enterohepatischen Kreislauf. Dadurch werden die LDL-Rezeptoren in der Leber stimuliert, wodurch es zum Absinken des LDL-Cholesterols kommt. Die maximale Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterols im Blut kann bis zu 30% betragen.

Resorptionshemmer

Ezetimib ist ein neuer Lipidsenker, der im November 2002 in den deutschen Markt eingeführt wurde. Die Cholesterolspiegelsenkung beruht auf einer intestinalen Resorptionshemmung von Cholesterol aus der Nahrung und dem Gallensaft. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht endgültig geklärt. Wahrscheinlich werden die Transportersysteme in der Darmwand für Cholesterol gehemmt. Eine Senkung des LDL-Cholesterol um mehr als 25 % Prozent konnte nachgewiesen werden [34].

Fibrate

Synonyme: Aryloxy-carbonsäure-Derivate, Clofibrinsäure-Derivate

Die Clofibrinsäure aktiviert die Lipoproteinlipase, woraus ein gesteigerter Katabolismus triglyceridreicher Lipoproteine resultiert. Die maximale Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterol im Blut kann bis zu 20% betragen.

Nicotinsäure

Nicotinsäure hemmt über die Adenylatcyclase die Triglyceridlipase, was eine Verminderung der Lipolyse bewirkt. Es ist eine maximale Senkung der Cholesterolwerte um 10-15% möglich.

Kann durch eine Monotherapie, gegebenenfalls auch durch einen Wechsel des Präparats, kein ausreichender therapeutischer Erfolg erzielt werden, werden Kombinationen, z.B. von HMG-CoA Reduktasehemmern mit Anionenaustauscherharzen, eingesetzt.

Extrakorporale LDL-Elimination

Synonym: LDL-Apherese

Bei Versagen sowohl von diätetischen als auch medikamentösen Therapieverfahren ist eine erfolgreiche Senkung der Cholesterol- bzw. LDL-Werte nur mit frühzeitig begonnenen und regelmäßig fortgesetzten extrakorporalen Eliminationsverfahren möglich. Die maximale Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterol im Blut kann 60-80% betragen [1;28;35].

2.3.5 Statine- Stand der Forschung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit einer Verschlechterung der endothelialen Relaxation einher. Das Endothel ist für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion von essentieller Bedeutung. Es moduliert den aktuellen und bedarfsgerechten Gefäßtonus, die antithrombotischen und antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand und die Architektur der Gefäßwand sowie die Gefäßpermeabilität. Eine Störung der endothelialen Funktion wird als frühes Schlüsselereignis in der Entwicklung der Atherosklerose gesehen [36].

Sowohl beim Kaninchen [16;37] als auch beim Menschen [38] wurde nachgewiesen, dass die Höhe des Cholesterolspiegels eine wichtige Rolle für die Intaktheit des Endothels und seiner physiologischen Funktionsfähigkeit ausübt. Zu hohe Cholesterolvereinerungen sind mit pathologischen Veränderungen verbunden.

Bereits 1976 wusste man, dass sich niedrige Cholesterolvereinerungen günstig auf die Gefäßwände auswirken und atherosklerotische Veränderungen vorbeugen. Endo und Kuroda isolierten eine Verbindung, Compactin (auch Mevastatin genannt), aus *Penicillium citrinum*, welche einen Cholesterol

senkenden Effekt aufwies [39]. Wie sich herausstellte, handelte es sich dabei um einen Inhibitor der Cholesterolsynthese, genauer um einen Inhibitor der Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase.

Daraus entwickelte man mit Lovastatin den ersten Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktasehemmer, der 1989 auf den Markt kam. Seit der Markteinführung wurde an Modifizierungen gearbeitet. Der nächste Entwicklungsschritt führte von den Prodrugs Lovastatin und Simvastatin zum Pravastatin, was bereits bei der Einnahme als aktiver Metabolit vorliegt. Veränderungen in der Ringstruktur führten zu erhöhter Lipophilie, höherer Plasmaproteinbindung und besserer Bioverfügbarkeit (siehe Tabelle 1).

In Abbildung 2 sind die Strukturformeln der gegenwärtigen HMG-CoA Reduktasehemmer nach der Pharmazeutischen Stoffliste [40] dargestellt. Cerivastatin wurde auf Grund eines vermutlich erhöhten Risikos für Myopathien / Rhabdomyolysen bei gleichzeitiger Behandlung mit Cerivastatin und Gemfibrozil [41] am 08.August.2001 von der Firma Bayer vom Markt genommen [42].

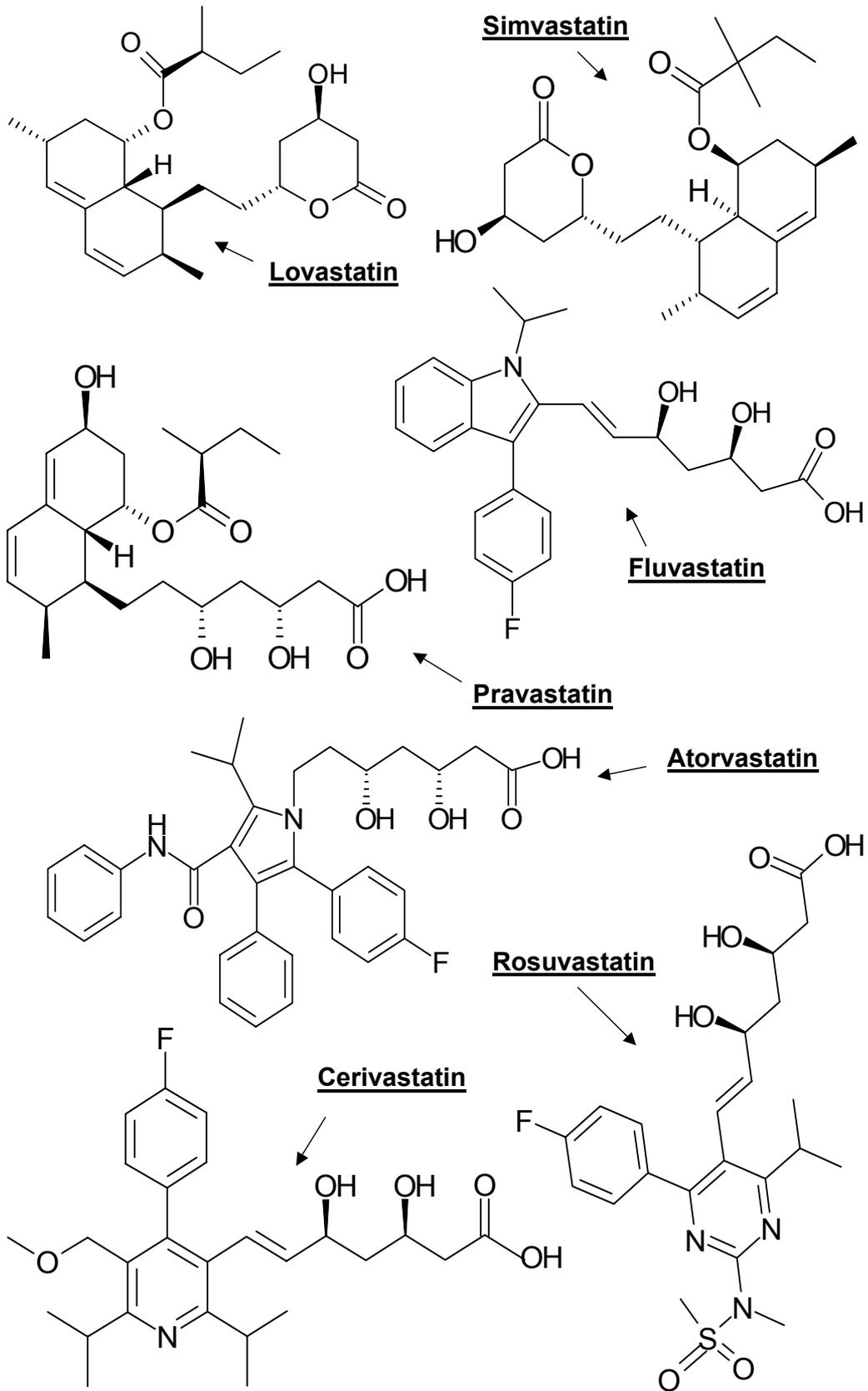


Abbildung 2: Strukturformeln der Statine

Tabelle 1: Pharmakologie der Statine

	Lovastatin	Simvastatin	Pravastatin	Fluvastatin	Atorvastatin	(Cerivastatin)	Rosuvastatin
Handelsname	Mevinacor®	Denan® Zocor®	Mevalotin® Pravasin®	Cranoc® Locol®	Sortis®	Lipobay® Zenas®	Crestor®
Markteinführung	1989	1990	1990	1994	1997	1997	vorraussichtlich 2003
Marktrücknahme	/	/	/	/	/	Aug. 2001	/
therap. Tagesdosis	20-80 mg	20 - 40 mg	10 - 40 mg	40 - 80 mg	10 - 80 mg	0,1 - 0,4 mg	10 - 80 mg
Tagestherapiekosten	1,35 - 4,20 €	1,93 - 2,32 €	1,12 - 2,50 €	1,23 - 1,51 €	1,23 - 4,51 €	(1,85 - 2,90 DM)	
Bioverfügbarkeit	< 5 %	< 5 %	10 - 26 %	24%	40,7%	60%	75%
Plasmaproteinbindung	>95 %	>95 %	40 - 55 %	98%	98%	99%	90%
Absorbtion-orale Dosis	30%	85%	34%	98%	30%	98%	20%
max. Plasmakonz. nach	2 - 4 h	1 - 2 h	1 h	0,5 - 1 h	2 - 4 h	2,5 - 3 h	3 h
Plasmahalbwertszeit	1,1 - 1,7 h	1,9 h	1,8 h	1,4 - 3,2 h	12 - 57,6 h	2 - 3 h	20 h
renale Ausscheidung	30%	13%	43 - 48 %	6%	2,3%	30%	10%
Hauptmetabolisierung in	Leber	Leber	Niere	Leber/Galle	Leber/Galle	Leber	Leber
Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke	ja	ja	nein	nein	nein		nein
Einnahme	mit dem Abendessen	zum Essen (abends)	abends / vor dem Zubettgehen	4 h nach dem Essen/ abends	mit oder ohne Essen (tageszeitenunabh.)	abends / vor dem Zubettgehen	mit oder ohne Essen (tageszeitenunabh.)
sonstiges	natürlich aus einem Pilz Prodrug	"verändertes Lovastatin" Prodrug	"verändertes Lovastatin"	synthetisch hergestellt	evtl. längeres Verbleiben am Rezeptor daher höhere Effektivität	synthetisch hergestellt, 200fache Affinität zum Schlüsselenzym HMG-CoA Reduktase als die anderen Substraten im Tierexperiment Rhamdomyolyse bei Kombi mit Gemfibrozil und bei hohen Dosen (0,8 mg sind in den USA zugelassen gewesen)	

Quellen: [43-57]

In zahlreichen großen placebokontrollierten, randomisierten Doppelblindstudien [58-67] konnte die Bedeutung einer Cholesterolsenkung gezeigt werden. Übereinstimmend haben die Untersuchungen den koronarangiographischen Nachweis erbracht, dass die Atherogenese zum Stillstand gebracht werden kann. Die Reduktion hochgradiger Stenosen war dagegen gering. Überraschend waren die klinischen Konsequenzen der Lipidtherapie. Kardiale Ereignisse konnten durch eine Senkung des Cholesterolspiegels erheblich vermindert werden. Es ist klar geworden, dass sowohl im frühen als auch im späten Stadium der koronaren Herzkrankheit eine Senkung der Infarkthäufigkeit und Gesamtmortalität erreicht werden kann [68;69]. Diese Beobachtungen der Morbidität und Mortalität waren ausschließlich deskriptiv. Offen blieb die Frage, wie die Statine in den Stoffwechsel eingreifen.

Die günstigen Effekte der Statine wurden bis vor Kurzem auf die Fähigkeit der Reduktion des Cholesterolspiegels zurückgeführt. In jüngerer Zeit werden aber auch Effekte, die unabhängig von der Senkung des Cholesterolspiegels sind, diskutiert. Auf Grund dessen, dass der Eingriff in die Cholesterolsynthese nicht nur eine Auswirkung auf die Cholesterolbildung, sondern auch auf andere nicht steroidale isoprenoide Verbindungen hat, sind pleiotrope Effekte denkbar [70]. Beobachtet werden Wirkungen auf

- die LDL-Oxidation (siehe 2.3.5.1)
- die Endothelfunktion (siehe 2.3.5.2)
- Entzündungsreaktionen (siehe 2.3.5.3)
- die Zellproliferation, Migration und Apoptose (siehe 2.3.5.4)
- die Plaquestabilität (siehe 2.3.5.5)
- die Koagulation (siehe 2.3.5.6)

2.3.5.1 LDL-Oxidation

Die LDL-Oxidation ist ein Schlüsselschritt bei der Entstehung der Atherosklerose. Sie hat einen Einfluss auf

- die Inhibition der NOS-Aktivität [71]
- die Zellbildung und den Zelltod [72]
- die Gewebeexpression durch Monozyten [73]
- Entzündungsprozesse [74]

In der Nähe von atherosklerotischen Läsionen wird gehäuft oxidiertes LDL gefunden, welches zu einer Akkumulation von Makrophagencholesterol führt. Cholesterolsenkende Medikamente, wie die Statine, inhibieren die Anfälligkeit zur LDL-Oxidation. Dadurch wird der Anteil an oxidiertem Substrat verringert [75-77]. Effekte von oxidiertem LDL auf die eNOS mRNA Expression und den Proteinspiegel werden unterdrückt [78].

Giroux et al. [79] konnten nachweisen, dass es zu einer dosisabhängigen Verminderung an Superoxidbildung kommt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Statinen zu einer Reduktion in der Makrophagen-Superoxid-Bildung führt. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Statine selber ein antioxidatives Potential besitzen und somit schützend wirken [80;81].

Zudem weiß man, dass die HMG-CoA Reduktasehemmer an die Phospholipidfraktion des LDL binden und damit die Diffusion freier Radikale in den Lipoproteinkern vermindern können. Dieser stimulierende Effekt auf die Dezymierung von LDL aus der Zirkulation und der direkte Bindungseffekt der Statine beeinflusst die Plättchenaggregation und führt zu einer Abnahme der Schaumzellbildung. Dies hat wiederum günstige Folgen für die Atherogenese [82].

2.3.5.2 Endothelfunktion

Das unbeschädigte Endothel setzt bei der Stimulation durch Acetylcholin Stickstoffmonoxid (NO) als relaxierenden Faktor frei [83]. Es kann aber auch kontrahierende Faktoren, wie Endothelin, ein stark

vasokonstriktorisches Peptid, absondern [84]. Das intakte Endothel steuert somit das vasomotorische Verhalten [85;86]. Eine gestörte Endothelfunktion spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose [87].

Bereits 1998 beschrieben Laufs et al. [71], dass oxidiertes LDL zeitabhängig die endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) mRNA und den Proteinspiegel vermindert. Simvastatin und Lovastatin dagegen führten zu einem Anstieg der eNOS Expression und schützten konzentrationsabhängig vor der Herunter-Regulation durch ox-LDL. Bei Zusatz von L-Mevalonat (alleine ohne Effekt auf die eNOS Aktivität) zum Simvastatin konnte der hoch-regulatorische Effekt des Simvastatin unterdrückt werden. Studien mit Actinomycin D (ein Peptidantibiotikum, welches über eine Hemmung der RNA-Polymerase das Wachstum proliferierender Zellen beeinträchtigt) haben gezeigt, dass Simvastatin die eNOS mRNA stabilisiert. Simvastatin beeinflusst die eNOS Gentranskription nicht. Somit wurde geschlossen, dass die Statine hauptsächlich post-transkriptionale Mechanismen der eNOS Expression hochregulieren und die eNOS Aktivität erhöhen.

Im gleichen Jahr stellten Laufs et al. [88] den Eingriff der HMG-CoA Reduktasehemmer in die Cholesterolsynthese dar. Auch die Synthese wichtiger Intermediatprodukte (Isoprenoide, wie Farnesylpyrophosphat [FPP] bzw. Geranylgeranylpyrophosphat [GGPP]) der Cholesterolsynthese werden bei Statineinsatz verhindert. Diese Isoprenoide sind wichtige lipophile Anhänge für post-translationale Modifikationen bei einer Reihe von Proteinen (z.B. Rho). Mevastatin erhöht den eNOS mRNA- und den Protein-Spiegel. Bei Zugabe von L-Mevalonat oder GGPP wurde der „Statin-Effekt“ unterdrückt (FPP bzw. LDL hatten dagegen keinen Effekt). Da die Rho GTPase einer geranylgeranyl-Modifikation unterliegt, wurde der Einfluss von Rho auf die eNOS Expression ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die eNOS Expression von Rho negativ beeinflusst wird. Statine blockieren die Rho-Geranylgeranylation, die für die membranassoziierte Aktivität notwendig ist, und regulieren somit die eNOS Expression.

Eine weitere Arbeit unterstützt die aufgestellten Thesen: Statine führen durch die Inhibition der Isoprenylierung der Rho GTPase zur Hoch-Regulation der NO-Produktion. Entzug der Statine führte über einen Rebound-Effekt zu einer 90%igen Verringerung der NO-Produktion. Das bedeutet, dass der Statin-Entzug zu einem kurzzeitigen Anstieg der Rho-Aktivität als Ursache einer Suppression der endothelialen NO-Produktion führen könnte [89].

2.3.5.3 Entzündungsreaktionen

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle bei der Bildung und dem Wachstum von atherosklerotischer Plaque spielt [74;90-92]. Adhäsionsmoleküle wie MCP1, VCAM, ICAM und die Selektine sind für die Anhaftung von Leukozyten und T-Lymphozyten am Endothel verantwortlich [70;93;94].

Die Statine vermindern den MCP1-Spiegel in der Neointima und der Media. Dadurch wird die arterielle Makrophageninfiltration reduziert. Dies könnte eine Stabilisierung der atherosklerotischen Plaque zur Folge haben [95]. Es handelt sich dabei um einen günstigen Effekt, da so ischämische Vorfälle, das bedeutet eine Verminderung der Durchblutung durch sich lösende Thromben oder Emboli, reduziert werden [13].

Niwa et al. [96] hält es für denkbar, dass zelluläre Interaktionen zwischen Monozyten und dem Endothel durch Fluvastatin inhibiert werden, was eine reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen zur Folge hat. Eine weitere Studie spricht von einem antientzündlichen Prozess. Dieser sei durch eine Reduzierung der Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen und durch eine Herunter-Regulation der P-Selectin-Expression gekennzeichnet [97].

Unterstrichen wird diese Aussage durch das Erbringen des Beweises, dass die Statine in der Lage sind, die Expression und Funktion von Leukozytenzelloberflächen positiv zu beeinflussen. Leukozytenzelloberflächenmoleküle sind für die Anhaftung von Monozyten an das Endothel von Bedeutung. Im Blut von hypercholesterolämischen

Patienten wurde nach einer Statinbehandlung eine verminderte Expression des Leukozytenzelloberflächemoleküls CD 11b und eine verringerte Anhaftung von Monozyten an das Endothel nachgewiesen [98].

2.3.5.4 Zellproliferation, Migration und Apoptose

Atherosklerotische Veränderungen gehen mit der Neubildung von Intimagewebe einher. Dabei kommt es zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen. Durch Gabe von HMG-CoA Reduktasehemmern konnte ein deutlicher Rückgang der DNA-Synthese in den glatten Muskelzellen nachgewiesen werden, was auf eine Wirkung der Statine auf die Myozytenproliferation hinweist [99].

Die Statine tragen zu einer Hemmung der Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen bei [100]. Pauletto et al. [101] erklärt, dass sich die Behandlung mit einem CSE-Hemmer auf das Differenzierungspotential der glatten Muskelzellen auswirkt. Es kommt zu einer drastischen Reduktion der Akkumulation der Gefäßmuskelzellen und Makrophagen in der Intima. Dadurch wird die Entwicklung von intimalen Läsionen verhindert.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es neben einer Modulation der glatten Muskelzellproliferation durch die HMG-CoA Reduktasehemmer, mit Ausnahme des hydrophilen Pravastatins, zu einer Veränderung bei der Apoptose der glatten Muskelzellen kommt [102].

2.3.5.5 Plaquestabilität

Die Komposition und Empfindlichkeit der Plaque (Plaquetyp) ist mehr als der Grad der Stenosierung (Plauegröße) für die Entwicklung von durch einen Thrombus herbeigeführtes koronares Ereignis verantwortlich. Lipid reiche und weiche Plaque ist gefährlicher als Kollagen reiche und harte Plaque, weil sie instabil und thrombogen ist [103].

Die meisten akuten koronaren Ereignisse hängen mit instabilen atherosklerotischen Läsionen zusammen. Durch Ruptur der Plaque kommt

es zur Gerinnungsaktivierung, Plättchenaktivierung und Thrombenbildung. Verantwortlich dafür sind Metalloproteinasen, die von Makrophagen sezerniert werden und zur Ulzeration von instabiler Plaque führen [104].

Für Fluvastatin konnte nachgewiesen werden, dass es die Sekretion dieser Proteasen inhibiert [105]. Die Folge ist eine Verminderung von Makrophagen und extrazellulären Lipideinlagerungen. Außerdem kommt es zu einem Anstieg des Kollagenanteils und einer Unterdrückung der Verminderung der glatten Muskelzellen im Läsionsbereich. Die Reduktion der entzündlichen Prozesse führt zu einer Stabilisierung der Läsionen mit konsekutiver Abnahme der kardialen Morbidität und Mortalität.

2.3.5.6 Koagulation

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit einer Hyperlipoproteinämie die Fibrinolyse gestört ist. Die Statine führen zu einem Expressionsanstieg und erhöhter Aktivität des Gewebsplasminogen-Aktivators (tPA) und zu einer Inhibierung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI-1) [106].

Dieser Effekt konnte durch Mevalonat und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) rückgängig gemacht werden. Eine Inhibierung des aktivierten geranylgeranylierten Rho Proteins konnte den Effekt des HMG-CoA Reduktase Inhibitors dagegen reproduzieren. Aus diesem Grund ist der Schluss zulässig, dass diese durch das Statin verursachte Stimulation der Fibrinolyse durch eine Inhibierung von geranylgeranylierten Proteinen, vermutlich Rho Proteinen (siehe 2.3.5.2), ausgelöst wird.

Eine Ablagerung von Fibrin oder extrazellulärer Matrix wird verhindert, was die Plaquebildung und akute Thrombosen vermindert und dadurch die Progression der Atherosklerose vorbeugt [107;108].

2.3.6 Vaskulärer NO-Stoffwechsel

NO ist eine bedeutende intrazelluläre und extrazelluläre Signalsubstanz. Die Bildung und Metabolisierung von NO wurde mit vielen regulierenden Funktionsmechanismen in Säugetierzellen in Verbindung gebracht. In Abbildung 3 sind die wichtigsten Zweige der biochemischen Verstoffwechslung des NO im Plasma dargestellt.

Das Blut spielt für den NO-Metabolismus eine entscheidende Rolle [11]. Das Hauptabbauprodukt von NO im Plasma ist Nitrit. Daneben ist das Nitrat von Bedeutung.

Kovalente Bindungen von NO an Plasmaproteine führen zu Plasmathiolen (RSNOs). Dabei repräsentiert S-Nitrosoalbumin (SNOAlb) das wichtigste Reaktionsprodukt [109]. Es wird angenommen, dass die RSNOs ein Transport und Puffersystem darstellen, welches den interzellulären NO Austausch kontrolliert.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass im Plasma unter physiologischen Bedingungen hohe Konzentrationen von Nitrosaminen (RNNOs) gefunden werden können [110]. Auch wenn Nitrosamine besonders bei krankhaften Zuständen gebildet werden sind sie auch ohne Entzündungen im Blut anzutreffen. Die genaue physiologische und/oder pathologische Rolle der Nitrosamine muss allerdings noch geklärt werden.

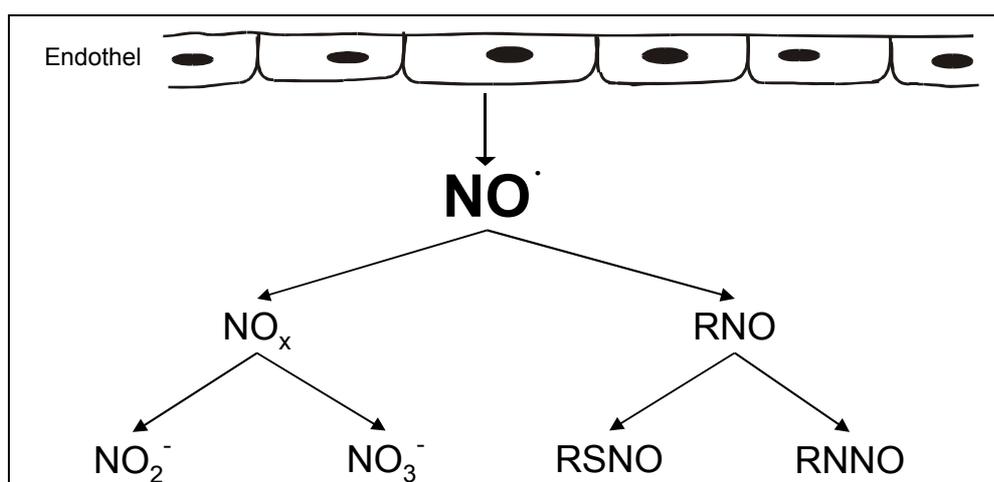


Abbildung 3: Mögliche Verstoffwechslung von NO im Blut. NO kann mit molekularem Sauerstoff (O₂) bzw. Superoxid (O₂⁻) zu Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻) oxidieren. Alternativ dazu kann NO mit Thiolen zu Nitrosothiolen (RSNOs) und mit Aminen zu Nitrosaminen (RNNOs) reagieren.

2.3.7 Fragestellung dieser Arbeit

Fluvastatin (= (\pm) - $(3R',5S',6E)$ -7-[3-(4-Fluorphenyl)-1-isopropyl-2-indolyl]-3,5-dihydroxy-6-heptensäure) gehört in die Gruppe der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A Reduktasehemmer. Unter Behandlung mit Fluvastatin wurde in klinischen Studien ein deutlicher Einfluss auf die koronare Herzkrankheit mit und ohne Todesfolge gezeigt [111]. Für die positiven Effekte der Statine wird normalerweise deren Cholesterolsenkende Wirkung verantwortlich gemacht. Obwohl seit einigen Jahren intensiv auf diesem Gebiet geforscht wird, sind die genauen biologischen Abläufe noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch nicht-Lipid bezogene Mechanismen können bei dem günstigen Einfluss auf die Plaquestabilität, die Endothelfunktion, auf Entzündungen und die Thrombose eine Rolle spielen. Ebenso ist eine kombinierte Wirkung dieser Mechanismen denkbar [112].

Diese Arbeit behandelt die bisher nicht beantwortete Frage, wie die Veränderung der Gefäßfunktion durch Fluvastatin erreicht wird. Eine Möglichkeit kann die Verstoffwechslung und damit die Bioverfügbarkeit von NO sein. Aus diesem Grund wurden endothelabhängige und endothelunabhängige Veränderungen der Vasomotion sowie Abweichungen des biochemischen Markers Nitrit nach chronischer Behandlung mit Fluvastatin beobachtet.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalienliste

Acetylcholinchlorid ($C_7H_{16}ClNO_2$, ACh)	CIBA-VISION, Germering, Deutschland
Brenztraubensäure- Natriumsalz ($C_3H_3NaO_3$)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Droperidol ($C_{22}H_{22}FN_3O_2$)	JANSSEN-CILAG, Neuss, Deutschland
Fluvastatin-Natrium ($C_{24}H_{25}FNO_4Na$)	ASTRA, Wedel, Deutschland
D-(+)-Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	SIGMA-ALDRICH CHEMICALS, Steinheim, Deutschland
Glyceroltrinitrat ($C_3H_5N_3O_9$)	POHL BOSKAMP, Hohenlockstedt, Deutschland
Heparin-Natrium	HOFFMANN-LA ROCHE, Grenzach Wyhlen, Deutschland
HPLC-Wasser (LiChrosolv)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
4-(2-Hydroxyethyl)-1- -piperazin-ethansulfonsäure ($C_8H_{18}N_2O_4S$, Hepes)	BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
(S)-Ketaminhydrochlorid ($C_{13}H_{17}Cl_2NO$)	PARKE-DAVIS, Berlin, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6 H_2O$)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
N-(1-Naphthyl)ethylendiamin	SIGMA-ALDRICH CHEMICALS, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
wässrige Natriumchlorid- Lösung 0,9% (NaCl)	BRAUN, Melsungen, Deutschland
Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	MERCK, Darmstadt, Deutschland

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
L-Phenylephrinhydrochlorid ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$)	SIGMA-ALDRICH CHEMICALS, Steinheim, Deutschland
Sulfanilamid	SIGMA-ALDRICH CHEMICALS, Steinheim, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	BAYER, Leverkusen, Deutschland

3.2 Versuchstiere und Behandlungsprotokoll

Bei der Auswahl des geeigneten Versuchsaufbaus kam eine klinische Studie am Patienten wegen der geplanten Organentnahmen von Aorta und Herz nicht in Frage. Dementsprechend wurde eine Studie an dem schon lange evaluierten Kaninchenmodell durchgeführt.

Sowohl beim Kaninchen [113] als auch beim Menschen [114] hat die Hypercholesterolämie einen Einfluss auf die Endothelfunktion und geht der Atherosklerose voraus. Schon Anfang des letzten Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass die Pathologie und Pathogenese der Atherosklerose beim Kaninchen der Pathologie und Pathogenese des Menschen sehr ähnlich ist [115].

Es gibt zwei verschiedene Kaninchenmodelle zur zeitnahen Darstellung atherosklerotischer Veränderungen:

Die New Zealand White (NZW) Kaninchen haben einen normalen Cholesterolfstoffwechsel. Sie werden für die Simulation der Hypercholesterolämie mit Cholesterolf gefüttert.

Dagegen weisen die homozygoten Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) Kaninchen einen genetisch bedingten hepatischen LDL-Rezeptor Defekt auf, so dass sie bereits bei Fütterung mit Standardfutter massiv erhöhte Serumspiegel für Gesamtcholesterolf, LDL-Cholesterolf und VLDL-Cholesterolf erreichen.

Es wurde belegt, dass die morphologische Ähnlichkeit zu atherosklerotischer Plaque beim Menschen bei den WHHL Kaninchen

größer ist als bei den mit Cholesterol gefütterten NZW Kaninchen. Genau wie bei der familiären Hypercholesterolämie ist auch bei den WHHL Kaninchen der größte Anteil an intravasalem Cholesterol LDL und ein kleinerer sind Lipoproteine von mittlerer Dichte. Dagegen wird bei mit Cholesterol gefütterten Kaninchen der größte Anteil von Cholesterol als VLDL gefunden [116;117].

Das Kaninchenmodell bietet zusätzlich den Vorteil externe Einflüsse, wie z.B. das Alter und die Ernährung der Tiere, kontrollieren zu können.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 70 Kaninchen beiderlei Geschlechts aus zwei verschiedenen Züchtungen untersucht:

- New Zealand White (NZW) Kaninchen
- Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) Kaninchen

Die NZW Kaninchen wurden von der Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland geliefert. Die WHHL Kaninchen stammten aus der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg, Deutschland.

Die Untersuchungen wurden zu zwei verschiedenen Alterszeitpunkten durchgeführt:

- im Alter zwischen 18 und 23 Wochen
- im Alter zwischen 28 und 44 Wochen

Zusätzlich gab es bei den hyperlipoproteinämischen WHHL Kaninchen ein Kollektiv von Tieren, die ab ihrer 17. Lebenswoche für die Dauer von durchschnittlich 17 Wochen peroral mit Fluvastatin behandelt wurden.

Im weiteren Verlauf werden die Kollektive der Kaninchen im Alter zwischen 18 und 23 Wochen als „jung“ und die Kollektive der Kaninchen im Alter zwischen 28 und 44 Wochen als „alt“ bezeichnet.

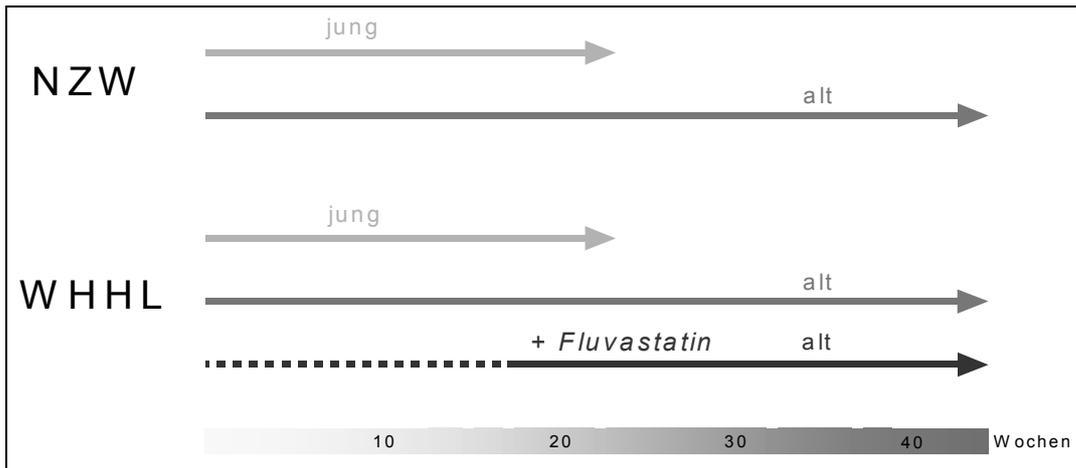


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Kaninchenkollektive

Tabelle 3: Anzahl der Tiere in den unterschiedlichen Versuchstierkollektiven († sind mit 40 mg/kg Körpergewicht Fluvastatin behandelte Kaninchen, die verstorben sind)

	Anzahl der jungen Kaninchen Alter: 18-22 Wochen	Anzahl der alten Kaninchen Alter: 28-44 Wochen
NZW Kontrollkollektiv	10	20
WHHL Kontrollkollektiv	10	10
WHHL + Fluvastatin (Therapiedauer: 17 Wochen)		14 + 6 †

In den folgenden Abbildungen sind den verschiedenen Kaninchenkollektiven, soweit nichts anderes erwähnt wird, immer die gleichen Symbole zugeordnet:

- junge NZW Kaninchen
- alte NZW Kaninchen
- junge WHHL Kaninchen
- alte WHHL Kaninchen
- ⊗ alte, mit Fluvastatin behandelte WHHL Kaninchen

3.2.1 Kaninchen-Haltung

Die Kaninchen wurden einzeln in Edelstahlkäfigen (72 * 52 * 36 cm) auf Lochgittern gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 18-20 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 55 % ± 5 %, der Tag-Nacht-Rhythmus 12 h (7⁰⁰ bis 19⁰⁰ Uhr), aufrechterhalten durch Kunstlicht (300 Lux). Durch eine automatische Tränke erhielten die Tiere entkeimtes Wasser ad libitum.

Das Futter wurde von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, bezogen. Die Kaninchen erhielten Standardfutterpellets ad libitum. Zusätzlich dazu erhielt ein Kollektiv von WHHL Kaninchen mit Fluvastatin angereichertes Spezialfutter. Dazu wurde das in Cranoc[®] Kapseln enthaltene Pulver dem Standardfutter beigemischt und von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH ebenfalls in Pellets gepresst. Die Dosierung des Fluvastatins wurde während des Versuchs variiert. Zunächst wurden 40 mg/kg Körpergewicht/Tag Fluvastatin eingesetzt. Diese Dosierung des Medikaments entsprach dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis. Die in der Literatur publizierten Dosierungen für Fütterungsversuche an Kaninchen variierten zwischen 2 und 50 mg/kg Körpergewicht/Tag Fluvastatin [118-121]. Blutanalysen des Fluvastatinspiegels an der Universität Dresden konnten zeigen, dass die Spiegel des eingesetzten Medikaments einen höheren Bereich, als bei der eingesetzten Dosis zu vermuten war, erreicht hatten. Da es zu teilweise tödlichen Nebenwirkungen (Myositis, Myokarditis, Ödembildung) bei den Tieren kam, musste die Dosierung reduziert werden. Relevant für die Untersuchungen war eine Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht/Tag bei den WHHL Kaninchen.

3.3 HEPES-Puffer

Für die Versuche am isolierten Aortensegment und für die Untersuchungen am isoliert perfundierten Herzen wurde HEPES-Puffer verwendet. Folgende Substanzen wurden zur Herstellung in demineralisiertem Wasser gelöst:

Tabelle 4: Hepes-Puffer-Zusammensetzung:

	MW	mmol/l	g/l
NaCl	58,44	140,00	8,1816
KCl	74,56	4,00	0,2982
MgCl ₂ *6H ₂ O	203,30	1,03	0,2094
CaCl ₂ *2H ₂ O	147,02	1,84	0,2706
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	137,99	0,42	0,0580
Glucose	180,20	5,00	0,9010
Brenztraubensäure	110,00	2,00	0,2200
HEPES	238,30	10,00	2,3830

Für die Anwendung am isolierten Kaninchenherzen wurde zusätzlich noch 0,01 mmol/l (3,6 mg/l) Indometacin (MW 357,80) im Puffer gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Nach Sterilfiltration wurde der Puffer auf 37 °C erwärmt und mit Sauerstoff begast.

3.4 Blutanalysen

Zur Kontrolle der Gesundheit der Tiere und Dokumentation möglicher Veränderungen der Blutwerte wurde den Kaninchen in zweiwöchigen Abständen Blut aus der Ohrarterie entnommen. Untersucht wurden:

- die *Serumlipidwerte*. Es sollte sicher gestellt werden, dass das ausgesuchte Kaninchenmodell die Hyperlipoproteinämie tatsächlich adäquat simuliert.
- die *Elektrolyte*. Auch wenn Fluvastatin hauptsächlich über die Leber metabolisiert wird, sollten Störungen des Wasserhaushalts (Veränderung der Ionenzusammensetzung und daraus folgende Volumenänderung) bei allen Kaninchen ausgeschlossen werden.
- die *Transaminasen*. Zur Überprüfung der Leberfunktion und zum Ausschluss von Leberschädigungen, wie sie bei den HMG-CoA Reduktasehemmern beschrieben wurden [47], wurden die Glutamat-

Oxalacetat-Transaminase (GOT) und die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) untersucht.

- die *Kreatinkinasen*. Auf Grund der Tatsache, dass bei der Behandlung mit Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktasehemmern Myopathien, einschließlich Myositis und Rhabdomyolysen aufgetreten sind [47], wurde die Kreatinkinase (CK) ebenfalls regelmäßig überprüft.

Die Untersuchungen der Blutwerte wurde im Institut für klinische Chemie und Labordiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit kommerziell erhältlichen Diagnosekits durchgeführt.

Die Cholesterol-, LDL-, HDL- und Triglycerid-Messungen erfolgten mittels enzymatisch-kolorimetrischen Tests (CHOD-PAP, LDL-C plus, HDL-C plus, GPO-PAP). Bei den Elektrolytmessungen wurde die Na⁺-Konzentration mittels einer Natrium-Elektrode (Glasmembranelektrode) und die K⁺-Konzentration mittels einer Kalium-selektiven Elektrode (Ionenaustauschermembranelektrode) potentiometrisch bestimmt. Da Calcium im Blut nur etwa zu 50% ionisiert vorliegt [122], wurde der Gesamtcalciumgehalt gemessen. Dazu wurde die Farbintensität des violetten Calcium-o-Kresolphthalein-Komplexes photometrisch bestimmt. Bei der Bestimmung der Transaminasen GOT und GPT wurde ein UV-Test nach einer standardisierten Methode (AST bzw. ALT) verwendet. Für die Berechnung der Kreatinkinasewerte wurde ein UV-Test (CK NAC) herangezogen. Alle Tests stammten von der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland. Zur Messung diente ein Hitachi Analyzer 917, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland.

3.4.1 Blutanalysen in der Literatur

Die in der Literatur zu findenden Blutwerte für die NZW und die WHHL Kaninchen unterscheiden sich zum Teil innerhalb der Kaninchenkollektive erheblich. Die Angaben für die WHHL Kaninchen sind in der Literatur unvollständig.

Tabelle 5: Übersicht über Blutreferenzwerte von NZW bzw. WHHL Kaninchen in der Literatur

		NZW	WHHL
Serumlipide	Cholesterol	38 mg/dl ± 5 mg/dl [123] bzw. 58 mg/dl ± 20 mg/dl [124]	80 mg/dl ± 15 mg/dl [125] bzw. 722 mg/dl ± 35 mg/dl [22] bzw. 1168 mg/dl ± 31 mg/dl [126]
	LDL	19 mg/dl ± 17 mg/dl [124]	427 mg/dl ± 19 mg/dl [125]
	HDL	39 mg/dl ± 2 mg/dl [123] bzw. 29 mg/dl ± 10 mg/dl [124]	12 mg/dl ± 1 mg/dl [125]
	Triglyceride	38 mg/dl ± 10 mg/dl [123] bzw. 56 mg/dl ± 18 mg/dl [124]	276 mg/dl ± 187 mg/dl [127] bzw. 619 mg/dl ± 222 mg/dl [22]
Elektrolyte	Na⁺	141 mmol/l ± 1 mmol/l (♂) bzw. 139 mmol/l ± 1 mmol/l (♀) [128]	
	K⁺	5,1 mmol/l ± 0,1 mmol/l (♂) bzw. 5,3 mmol/l ± 0,1 mmol/l (♀) [128]	
	Calcium	3,5 mmol/l ± 0,01 mmol/l [129]	
Transaminasen	GOT	42 U/l ± 6 U/l (♂) bzw. 44 U/l ± 5 U/l (♀) [128]	
	GPT	35 U/l ± 3 U/l (♂) bzw. 33 U/l ± 2 U/l (♀) [128]	
Kreatinkinase	CK	91 U/l ± 5 U/l [130] bzw. 610 U/l ± 3 U/l [129]	

3.5 Untersuchungen an isolierten Aortensegmenten

Zur funktionellen Charakterisierung der Vasomotion im Bereich der Makrozirkulation dient ein hämodynamisches Assay. Dabei werden Tonusänderungen an isolierten Gefäßstreifen untersucht. Alle Bestandteile der Apparatur zur Untersuchung am isolierten Aortensegment wurden, soweit nicht anders erwähnt, von der Firma Hugo-Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland, geliefert. Sie setzte sich aus folgenden Geräten und Materialien zusammen:

Tabelle 6: Apparatur zur Untersuchung am isolierten Aortensegment:

1	Basiseinheit für sechs Organbäder, Modell Graz, Type 846/1
6	doppelwandige Organbäder, 2 ml, mit Fritte und Ablasshahn
6	Halter für 2 ml Organbäder
6	HSE isometrische Spannungsmesser F 30 Typ 372
6	Feinjustierungen Typ 850 N
6	M-A Plugsys Umwandler Verstärkermodule Typ 705/1
1	Plugsys Basissystem case Typ 603 (6,5 kg) Universal 19 Inch Träger Model (80 E)
1	HSE Datenerfassungshardware, Plugsys Version für win 98
1	HSE-ACAD Software für Windows 98
1	Umwälz-Bad-Thermostat Haake B3, Haake, Seeheim/Ober-Beebach, Deutschland

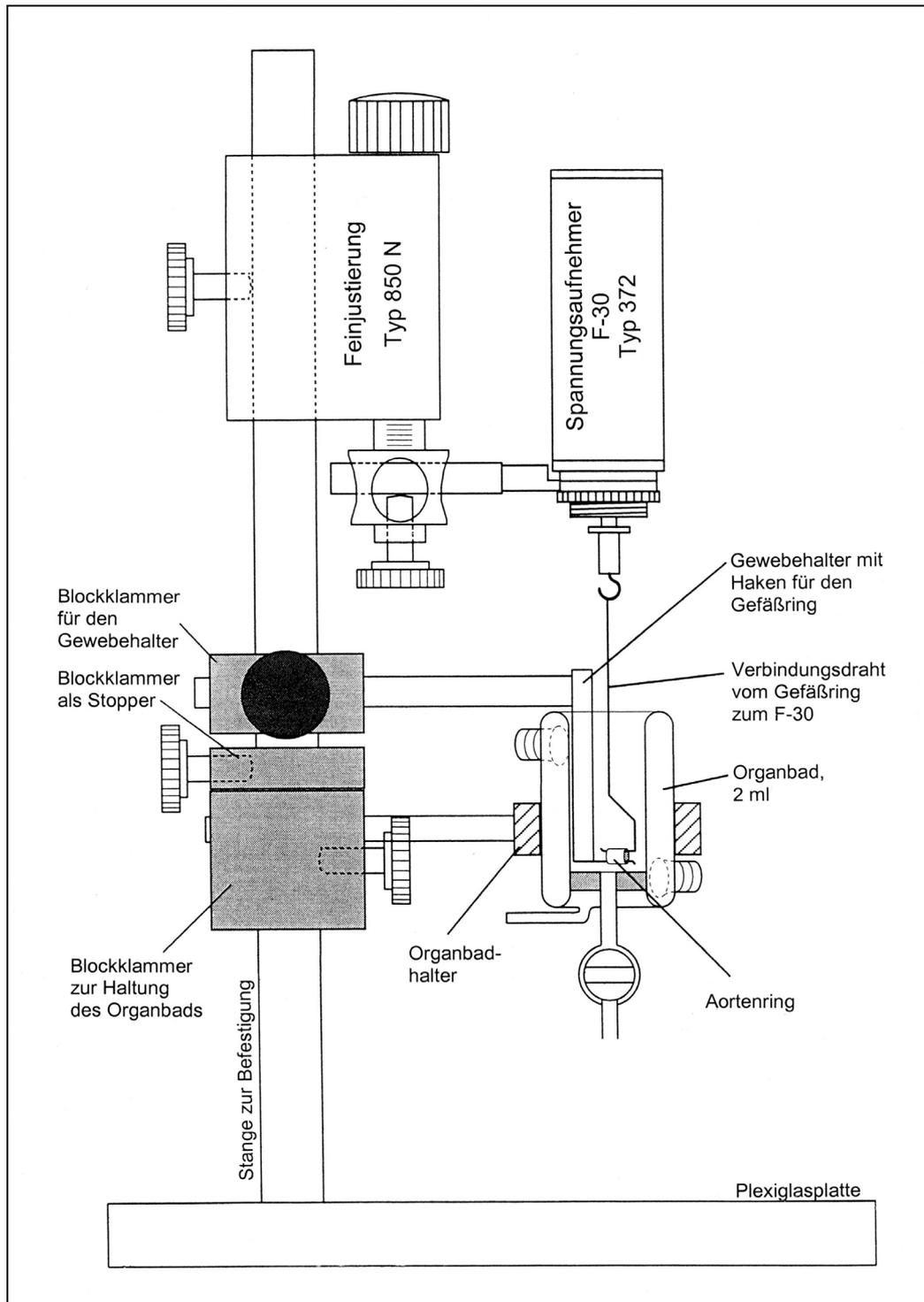


Abbildung 5: Aufbau der Apparatur zur Messung des Gefäßtonus von isolierten Aortensegmenten. An einer stabilen Stange sind die drei Hauptelemente befestigt: i) Ein verschiebbares und beheizbares Organbad, mit einem Ablasshahn für einen Pufferwechsel. Über eine Fritte im Boden kann der Puffer begast werden. ii) Ein festgestellter Gewebehälter mit einem Haken für den Gefäßring. iii) Ein Spannungsaufnehmer, an dem ein Verbindungsdraht zum Gefäßring befestigt ist. Spannungen, am zwischen den Haken aufgehängten Aortenring, können über das Drehen an der Rändelschraube der Feinjustierung verringert oder erhöht werden.

Aortenringe beider Kaninchenzüchtungen wurden präpariert. Dafür wurden alle Tiere intramuskulär (i.m.) mit Ketaminhydrochlorid (Ketanest[®], 30 mg/kg Körpergewicht, Parke-Davis, Berlin, Deutschland), Xylazin (Rompun[®], 45 ml/kg Körpergewicht, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Droperidol (Dehydrobenzperidol[®], 1,2 mg/kg Körpergewicht, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) narkotisiert und ebenfalls i.m. heparinisiert (Liquemin[®], 5000 I.E./Tier, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Nach Entnahme des Herzens wurde die Aorta entfernt und von Fett, Bindegewebe und Blutresten befreit. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Endothel nicht beschädigt wurde.

Die Aorta wurde entweder am selben Tag verwendet oder über Nacht in Sauerstoff gesättigtem Hepes-Puffer eingelegt und am nächsten Tag weiterverarbeitet. Sie wurde in 5 mm breite Ringe geschnitten. Diese Ringe wurden zwischen zwei Drähten eingespannt, ohne verdreht oder irgendwelchen Vorspannungen ausgesetzt zu werden. Die Ringe wurden in 2 ml Badgefäße, die mit 37 °C warmem und mit Sauerstoff begastem Hepes-Puffer gefüllt waren, eingebracht.

Nachfolgend wurde eine Spannung von 2 g durch Drehen an einer Rändelschraube am Feintrieb aufgebaut. Während der Inkubationszeit von 90 Minuten wurde der Hepes-Puffer alle 15 Minuten gewechselt und die Ringspannung wenn nötig auf 2 g nachjustiert.

Anschließend wurde durch Zugabe einer $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin-Lösung die Konstriktion der Aortenringe bewirkt. Nach ca. 30 Minuten hatte sich ein Plateau eingestellt. Jetzt wurden Konzentrationswirkungskurven der Relaxation mit einer Prüfsubstanz (z.B. ACh bzw. GTN) durch Einpipettieren von Lösungen in aufsteigenden Konzentrationen erstellt. Die Wartezeit, bis sich nach Pharmakonzugabe ein Plateau einstellte, betrug sieben Minuten.

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Aorten wurde am Ende des Versuchs eine hohe Konzentration des Konstriktors Phenylephrin in das Organbad gegeben und die Reaktion am Spannungsaufnehmer beobachtet.

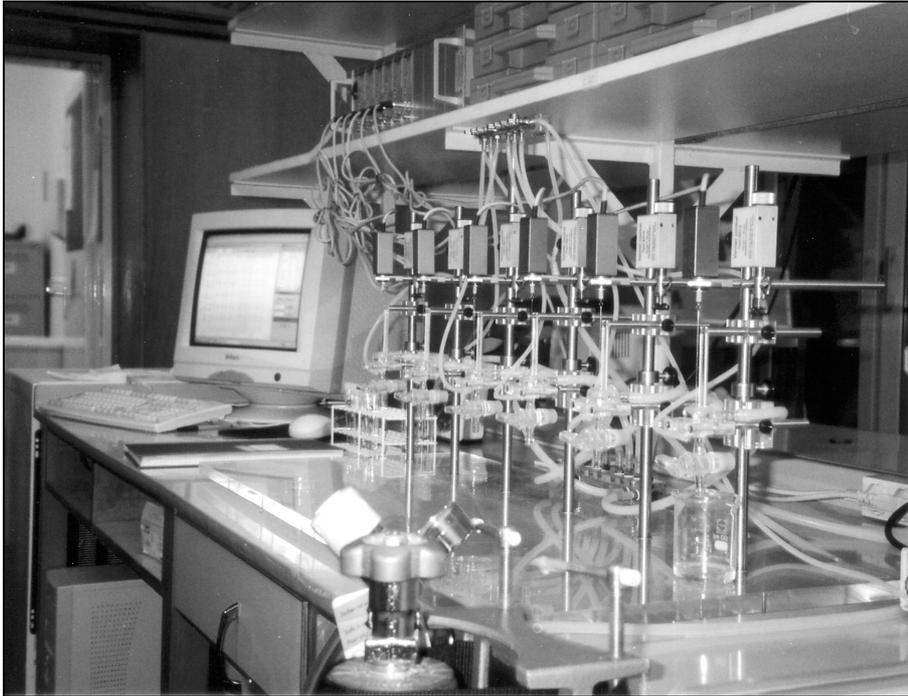


Abbildung 6: Foto der Apparatur zur Messung des Gefäßtonus von isolierten Aortensegmenten

3.6 Histopathologische Untersuchungen an isolierten Aortensegmenten

Die Anfärbung der gesammelten isolierten Aortenringe der unterschiedlichen Kaninchenkollektive erfolgte im Pathologischen Institut der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Dazu wurden die Ringe in Paraffin eingebettet und in 7 μm dicke Scheiben geschnitten (Gefrierschnitt). Anschließend erfolgte eine Färbung mit FAT RED 7B der Firma Sigma-Aldrich Chemicals, Steinheim, Deutschland. Die Auswertung der Schnitte erfolgte im Institut für Pathologie der Universität Essen bei einer 25fachen bzw. 100fachen Vergrößerung im Mikroskop (DMSC, Leica, Bensheim, Deutschland). Die Quantifizierung des Plaqueanteils und der Plaqueausdehnung wurden mittels computerisierter Planimetrie (Software: Dietermann & Heuser, Greifenstein-Beilstein) bestimmt.

3.7 Untersuchungen an isoliert perfundierten Herzen

Im 19. Jahrhundert entwickelte Oscar Langendorff eine Methode, um die mechanische Tätigkeit eines Säugetierherzens zu erforschen [131]. Dabei wird das vollkommen aus dem Körper isolierte Herz durch eine Kanüle, die in den Anfangsteil der Aorta eingebunden ist, mittels einer mit Sauerstoff angereicherten Flüssigkeit (z.B. Hapes-Puffer) retrograd perfundiert. Die Aortenklappen schließen währenddessen, so dass das Perfusat durch die Kranzarterien fließt und das Gefäßsystem durch den Sinus coronarius wieder verlässt. Das Effluat tropft an der Herzspitze ab.

Eine solche Apparatur nach O. Langendorff [132] wurde für die Untersuchung am isoliert perfundierten Herzen verwendet. Sie setzte sich aus folgenden Materialien und Geräten zusammen:

Tabelle 7: Apparatur zur Untersuchung am isoliert perfundierten Herzen nach O. Langendorff:

- 1 Puffervorratsgefäß, Glasbläserei Verhees, Neuss, Deutschland
- 1 Fritte für die Sauerstoffzufuhr, Glasbläserei Verhees, Neuss, Deutschland
- 1 Wärmebad, Welabo, Düsseldorf, Deutschland
- 1 Pumpe easy load Masterflex model 7518-10, Cole Parmer, Chicago, USA
- 1 Wärmeaustauscher, Glasbläserei Verhees, Neuss, Deutschland
- 1 Verbindungsstück mit Injektionsport, Braun, Melsungen, Deutschland
- 1 Infusionspumpe Precidor Typ 5003, Infors HT, Bottmingen, Schweiz
- 1 Filter Minisart (Porengröße 0,20 µm), Satorius AG, Göttingen, Deutschland
- 1 Dreivegehahn Discofix Plus, Braun, Melsungen, Deutschland
- 1 Druckwandler Statham P23 ID, Gould, Oxnard, USA
- 1 Doppelwandiges Wärmebad, Glasbläserei Verhees, Neuss, Deutschland
- 1 Latexballon Größe 10, Hugo-Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- 1 Pacer Grass S88 Stimulator, Grass Medical, Quincy, USA
- 1 Schreiber Recorder 2800S, Gould, Oxnard, USA

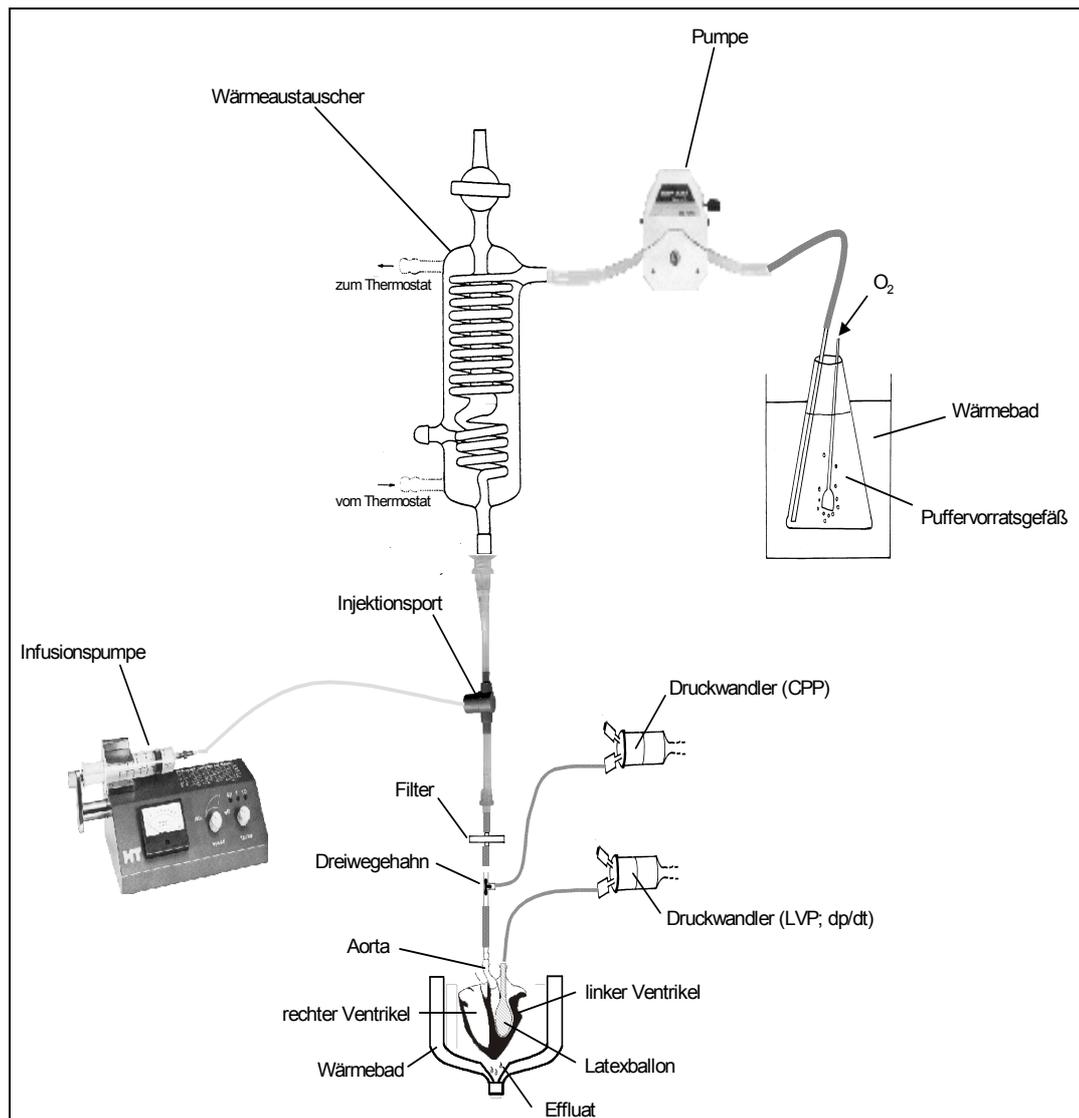


Abbildung 7: Aufbau der Anlage zur flusskonstanten Perfusion des Langendorff-Herzens. Im Vorratsgefäß wird der Hepes-Puffer temperiert und mit Sauerstoff begast. Der Puffer wird mittels einer Rollerpumpe mit konstantem Fluss durch das System gepumpt. Über einen Injektionsport können dem Puffer Pharmaka beigemischt werden. Bevor der Hepes-Puffer das Herz erreicht, wird er filtriert, um mögliche Verunreinigungen auszuschließen. Der Puffer gelangt über eine Aortenkanüle in das in einem Luftwärmebad befindliche Herz. Ein Druckwandler ermöglicht die Bestimmung des koronaren Perfusionsdrucks (CPP). Über einen Latexballon im linken Ventrikel des Herzens kann mittels eines weiteren Druckwandlers der linksventrikuläre Druck (LVP) erfasst werden.

Die NZW Kaninchen bzw. WHHL Kaninchen wurden intramuskulär (i.m.) mit Ketaminhydrochlorid (Ketanest[®], 30 mg/kg Körpergewicht, Parke-Davis, Berlin, Deutschland), Xylazin (Rompun[®], 45 ml/kg Körpergewicht, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Droperidol (Dehydrobenzperidol[®], 1,2 mg/kg

Körpergewicht, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) narkotisiert und ebenfalls i.m. heparinisiert (Liquemin[®], 5000 I.E./Tier, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Nach Eintritt der Vollnarkose und erloschenem Lidreflex wurde das Versuchstier auf einen Operationstisch fixiert. Das Fell wurde von der Mitte des Abdomens bis zum Hals durch einen Längsschnitt aufgetrennt und das Abdomen bis zum Zwerchfell eröffnet. Der Thorax wurde vom Zwerchfell in Richtung Hals rechts und links parallel zum Sternum bis zur ersten Rippe aufgeschnitten. Die Thorax-Vorderwand wurde hochgeklappt und das Perikard mit einer Pinzette gefasst und so aufgeschnitten, dass das Herz frei lag.

Als nächstes wurde das Herz vorsichtig entnommen. In die Aorta wurde einer Kanüle eingebunden. Das Herz wurde zum Transport zur Herzanlage nach O. Langendorff in mit Eis gekühlten und Heparin versetzten Hepes-Puffer gegeben.

Die Aortenkanüle wurde an das entsprechende Schlauchstück des Wärmeaustauschers angesteckt, wobei darauf geachtet wurde, dass das gesamte Flüssigkeitssystem vom Vorratsbehälter bis zum Herzen luftblasenfrei gefüllt war. Eventuell noch am Herzen adhärente Gewebeteile, wie Fettgewebe, Lungenteile oder Gefäßstümpfe, wurden entfernt. Das Herz wurde nun retrograd mit einer physiologischen, mit Sauerstoff gesättigten und auf 37 °C temperierten Hepes-Pufferlösung, perfundiert.

Zur Stabilisierung der Präparation des Herzens wurde eine 30 minütige Äquilibrationszeit eingeräumt, wobei sich das Herz in einer mit Parafilm „M“[®] (American National Can[™], Chicago, USA) abgedeckten doppelwandigen Organkammer zur Erhaltung von Temperatur und Feuchtigkeit befand. Anfangs wurde ein mittlerer koronarer Perfusionsdruck, gemessen mit einem Druckwandler, von 50 mmHg aufgebaut, der langsam durch Erhöhung der Pumpgeschwindigkeit der Rollerpumpe auf 80 mmHg erhöht wurde.

Die Flussgeschwindigkeit des Puffers durch das Herz wurde mittels volumetrischer Messung bestimmt und nicht mehr verändert (flusskonstante Messung). Zur Registrierung der mechanischen Tätigkeit

des Herzens wurde der linke Vorhof inzidiert. Ein mit Flüssigkeit gefüllter Ballon wurde durch die mit einer Schere aufgetrennte Mitralklappe in die linke Herzkammer eingeführt und mit einem Faden gesichert. Der Ballon war mit einem Druckwandler zur kontinuierlichen Messung des linksventrikulären Drucks und dessen 1. Ableitung verbunden.

Nach der Äquilibrationszeit wurden dem Perfusat (Hepes-Puffer) in alternierender Reihenfolge Acetylcholin (ACh, Endkonzentration der Perfusionslösung im Herzlumen 10^{-6} mol/l), Glyceroltrinitrat (GTN, Endkonzentration der Perfusionslösung im Herzlumen 10^{-6} mol/l) und Fluvastatin (Endkonzentration der Perfusionslösung im Herzlumen 10^{-5} g/ml, entsprechend der hundertfachen Plasmakonzentration beim Menschen [133]) beigemischt.

Während des ganzen Experiments wurde das Herz über einen Herzschrittmacher (180 Impulse/min, 4V) stimuliert. Die dazu eingesetzten Platinelektroden wurden in den rechten Vorhof und in die Spitze des rechten Ventrikels implantiert.

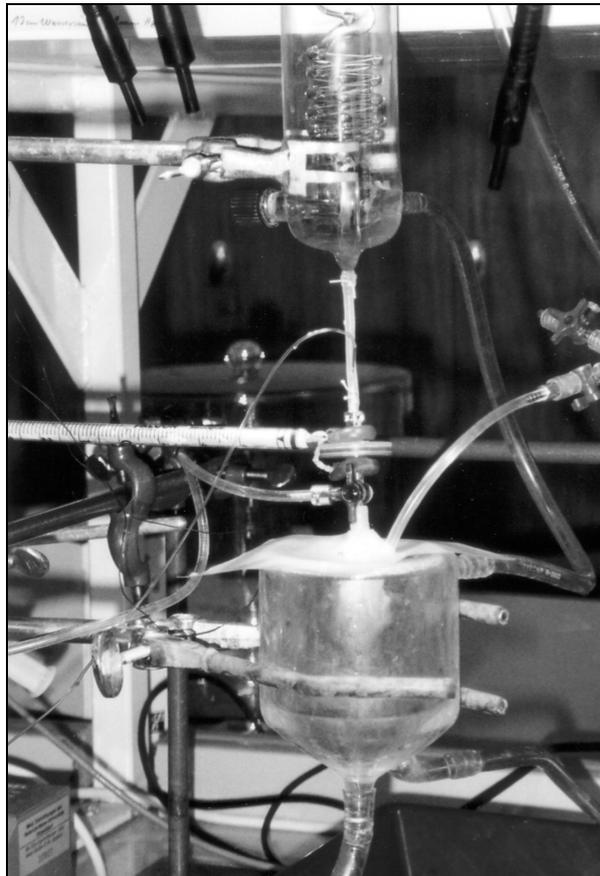


Abbildung 8: Foto der Herzanlage nach Langendorff

3.8 Biochemische Analysen

Aufgrund des Radikalcharakters von Stickstoffmonoxid (NO) lässt sich die extrem hohe Reaktivität erklären [11]. Das hat zur Folge, dass der Nachweis von NO problematisch ist. Hauptabbauprodukt in wässrigen Lösungen ist das Nitrit. Daneben spielen bei der Metabolisierung des NO, wie in Abbildung 9 dargestellt wird, die Nitrosothiole (RSNOs), d.h. Stickstoffoxide gebunden an schwefelhaltige Aminosäure (Cystein) bzw. an Proteine (Albumin), und das Nitrat eine Rolle.

Es konnte gezeigt werden, dass Nitrit der relevante Marker für die endogene NO-Produktion ist [134]. Aus diesem Grund wurde das NO_2^- im Blut der Kaninchen analysiert.

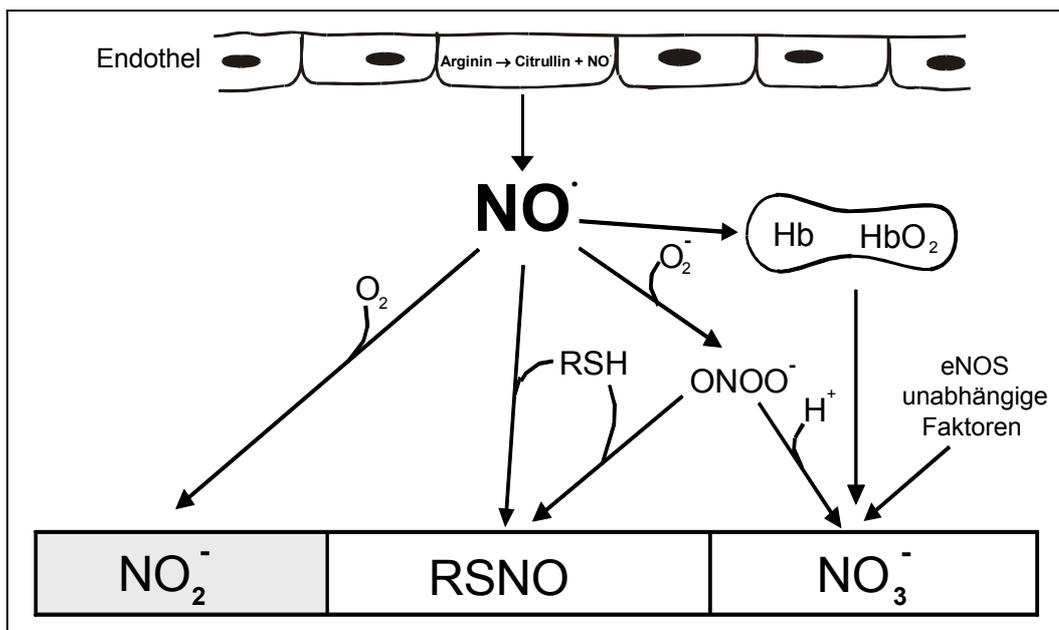


Abbildung 9: Vereinfachtes Schema des Biotransformationswegs von NO im zirkulierenden Blut. Durch die Endothelzellen freigesetztes NO reagiert im wässrigen Plasma mit molekularem Sauerstoff (O_2) zu Nitrit (NO_2^-) oder mit Superoxid (O_2^-) zu Peroxynitrit (ONOO^-). Die nachfolgende Zersetzung des Peroxynitrits und folglich das Verhältnis des gebildeten Nitrits und Nitrats (NO_3^-) hängt von den Umgebungsbedingungen ab. Alternativ kann der Nitrosonium-Anteil (NO^+) von NO mit Thiolen (RSH) in Anwesenheit von Elektronenakzeptoren zu Nitrosothiolen (RSNO) reagieren. Ein weiterer Anteil des NO erreicht die Erythrozyten und reagiert mit Oxyhämoglobin (HbO_2) zu Nitrat (und Methämoglobin). Nitrat ist das unspezifische Endprodukt, wohingegen Nitrit (und die Nitrosothiole) spezifisch, aber instabile Intermediärprodukte des NO-Metabolismus im humanen Blut sind.

Während der Haltung der Kaninchen in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf wurde jeweils sechs Tieren in einem 14-tägigen Abstand Blut mit einer Kanüle aus der Ohrarterie entnommen. Ca. 1,5 ml Blut wurden dabei in ein Reagenzglas, welches mit 6 ml 4 °C kalter Stopp-Lösung (bestehend aus Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) und Citrat (3,8 %)) versetzt war, aufgenommen. Die Stopp-Lösung dient dazu durch Verdünnung das im Blut enthaltene Nitrit zu stabilisieren und die Koagulation zu verhindern. Durch Abwiegen wurde die genaue Blutmenge bestimmt und das Blut mit der Stopplösung genau auf das Verhältnis 1:5 verdünnt. Im folgenden Schritt wurde das Blut mit Stopplösung für 15 Minuten bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert.

Der aus Plasma und Stopplösung bestehende Überstand wurde in Ultrafiltrationsröhrchen (Centrisart, Satorius, Göttingen, Deutschland) mit einer Porengröße von 20 kDa pipettiert und bei 4000 g für 60 Minuten zentrifugiert. 190 µl des Ultrafiltrats wurde mit je 10 µl einer NO_2^- Lösung in aufsteigenden Konzentrationen (entsprechende Endkonzentrationen 0, 100, 200, 400 und 600 nmol/l) versetzt (Standardadditionsverfahren). Die so aufgearbeiteten Blutproben wurden mit einer Fluss-Injektions-Analyse-Anlage (FIA-Anlage) auf den Nitrit-Gehalt vermessen. Die lineare Korrelation zwischen der Nitrit-Konzentration und der Signalintensität ist für proteinhaltige Lösungen (Blut) in einem Bereich zwischen 50-3000 nmol aufzeigt worden.

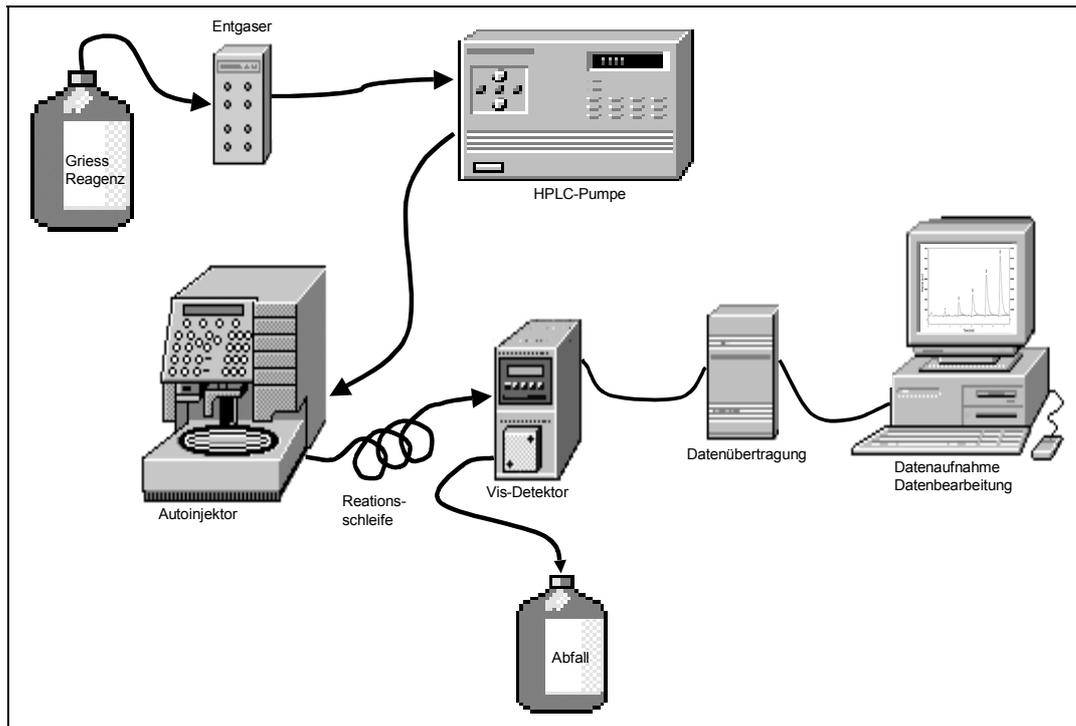


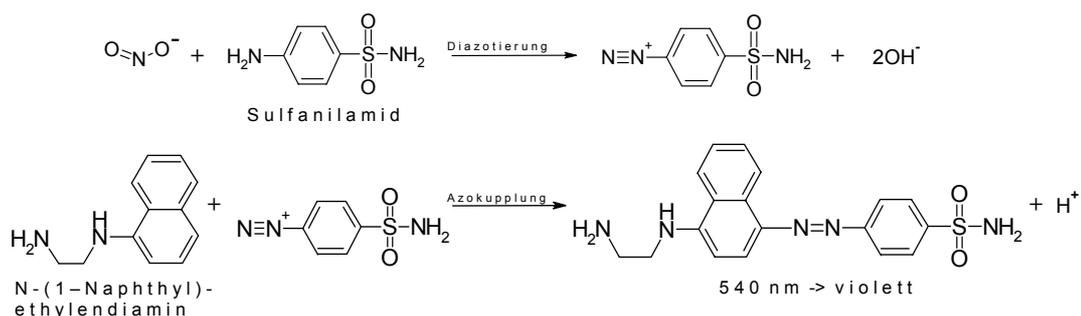
Abbildung 10: Aufbau der FIA-Anlage. Das Griess Reagenz wird entgast und dann mittels einer HPLC-Pumpe mit einem konstanten Fluss von 1 ml/min durch das System gepumpt. Ein Autoinjektor bringt 20 µl der Probe über ein Injektionsventil in das System. Die Reaktion zwischen Nitrit und dem Griess-Reagenz findet in einer Reaktionsschleife mit standardisierter Länge und Durchmesser statt. Ein visueller Detektor misst die Absorption bei 540 nm und übermittelt die Daten über einen Analog-digitalen Konverter an eine HPLC-Auswertungs-Software. Die Peakhöhe wird für die quantitative Auswertung herangezogen.

Das System bestand aus einer HPLC Pumpe (Shimadzu LC-6A, Duisburg, Deutschland), einem Autoinjektor (Triathlon, SunChrom GmbH / Spark Deutschland Wissenschaftliche Geräte GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland), einem UV/Vis-Detektor (Shimadzu SPD-6AV, Duisburg, Deutschland) und einem Computer für die Datenaufnahme und Datenbearbeitung (Knaur, Dortmund, Deutschland). Alle Kapillaren hatten einen Durchmesser von 0,25 mm und bestanden aus Polyetheretherketonen (PEEK). Die Reaktionsschleife hatte eine Länge von 90 cm.

Die Reaktionslösung, das Griess-Reagenz, bestand aus: 58 mmol/l Sulfanilamid und 0,77 mmol/l N-(1-Naphthyl)ethylendiamin aufgelöst in 1%iger Salzsäure. Die Lösung wurde entgast (SunChrom Degaser 24,

SunChrom GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland) und dann mit einem konstanten Fluss von 1 ml/min durch das System gepumpt.

Durch das in den Proben enthaltene Nitrit kam es zu einer Diazotierung des Sulfanilamid und einer Azokupplung mit dem N-(1-Naphthyl)ethylendiamin (siehe Reaktionsgleichung 1). Die Nitrit-Konzentration der Lösung konnte in einer 3 µl Messzelle im Detektor im visuellen Bereich bei 540 nm vermessen werden.



Reaktionsgleichung 1: Griess-Reaktion

3.9 Statistik

Die statistischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Universitätsrechenzentrum (Bereich: Statistik) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Zur Bestimmung der EC_{50} Werte wurden die einzelnen Messpunkte durch lineare Interpolation zu einem Polygonzug ergänzt. Für diese Kurve wurde das Maximum der Dilatation bestimmt. Als EC_{50} wurde die Dosis numerisch berechnet, die zum halben Maximum gehört. In der Kurve ist die Dosis logarithmisch abgetragen. Verließ die Dilatationskurve lokal horizontal, so dass die Zuordnung von Dilatation nicht umkehrbar eindeutig war, wurde einer Dilatation jeweils die kleinste Dosis zugeordnet.

In der gesamten Arbeit werden Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Daten wurden einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Anschließend folgte als Post-hoc-Test der Dunnett-Test.

Da beim zeitlichen Vergleich nicht immer beide Werte vorlagen, wurde eine ANOVA mit Messwiederholungen und fehlenden Werten gerechnet. Die Analyse basiert auf der Theorie der gemischten Modelle. Sie wurde mit dem Programm Mixed aus SAS gerechnet. Als Kovarianzmodell wurde das Modell der ‚compound symmetry‘ gewählt.

Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Daten wurden mittels der statistischen Software SAS (SAS Institute Inc., SAS/STAT User's Guide, Version 8.2, Cary, NC:SAS Institute Inc., 2000) analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Stoffwechseluntersuchungen

Bei den Untersuchungen des Blutes wurden regelmäßig Serumlipide, Elektrolyte, Transaminasen und CK-Werte bestimmt.

4.1.1 Serumlipidwerte

Wie zu erwarten war, zeigten die unterschiedlichen Kaninchenkollektive sehr unterschiedliche Blutfettwerte. Die Mittelwerte \pm Standardfehler sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Serumlipidwerte der unterschiedlichen Kaninchenkollektive

	Cholesterd [mg/dl]	HDL [mg/dl]	LDL [mg/dl]	Triglyceride [mg/dl]
junge NZW	44 \pm 4 * † ‡ (n = 22)	32 \pm 5 * † ‡ (n = 8)	45 \pm 2 * † ‡ (n = 7)	38 \pm 3 * † ‡ (n = 21)
alte NZW	35 \pm 5 § II ¶ (n = 18)	34 \pm 5 § II ¶ (n = 4)	34 \pm 7 § II ¶ (n = 3)	42 \pm 5 § II ¶ (n = 18)
junge WHHL	807 \pm 29 †† (n = 16)	20 \pm 1 (n = 16)	466 \pm 21 (n = 16)	237 \pm 20 ** (n = 16)
alte WHHL	765 \pm 14 †† (n = 7)	19 \pm 2 (n = 7)	529 \pm 32 (n = 7)	445 \pm 93 †† (n = 7)
alte, mit Fluvastatin behandelte WHHL	588 \pm 42 (n = 10)	18 \pm 1 (n = 8)	557 \pm 99 (n = 5)	283 \pm 54 (n = 10)

* signifikanter Unterschied NZW jung vs. WHHL jung

† signifikanter Unterschied NZW jung vs. WHHL alt

‡ signifikanter Unterschied NZW jung vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt

§ signifikanter Unterschied NZW alt vs. WHHL jung

II signifikanter Unterschied NZW alt vs. WHHL alt

¶ signifikanter Unterschied NZW alt vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt

** signifikanter Unterschied WHHL jung vs. WHHL alt

†† signifikanter Unterschied WHHL jung vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt

‡‡ signifikanter Unterschied WHHL alt vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt

Junge New Zealand White Kaninchen

Bei den jungen NZW Kaninchen lag der Cholesterolverwert von 22 Blutbestimmungen bei 44 mg/dl \pm 4 mg/dl (siehe Abbildung 11). Der HDL-Wert betrug 32 mg/dl \pm 5 mg/dl (n=8), der LDL-Wert lag bei 45 mg/dl \pm 2 mg/dl (n=7) und der Triglyceridwert betrug 38 mg/dl \pm 3 mg/dl (n=21).

Alte New Zealand White Kaninchen

In diesem Kollektiv wurden 18 Cholesterolmessungen durchgeführt. Der Mittelwert lag bei 35 mg/dl \pm 5 mg/dl (siehe Abbildung 11). Der gefundene HDL-Wert war mit 34 mg/dl \pm 5 mg/dl (n=4) genau wie der LDL-Wert mit 34 mg/dl \pm 7 mg/dl (n=3) und der Triglyceridwert mit 42 mg/dl \pm 5 mg/dl (n=18) nicht signifikant unterschiedlich zu den Werten der jungen NZW Kaninchen.

Junge Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Die Untersuchungen des Cholesterolspiegels der jungen, hypercholesterolämischen Tiere umfasste 16 Blutabnahmen. Der Cholesterolverwert lag bei 807 mg/dl \pm 29 mg/dl (siehe Abbildung 11). Wie durch die genetische Veränderung des LDL-Rezeptors zu erwarten war, war der LDL-Wert mit 466 mg/dl \pm 21 mg/dl (n=6) höher als bei den NZW Kaninchen. Auch der Triglyceridwert war mit 237 mg/dl \pm 20 mg/dl (n=16) erhöht, wohingegen der HDL-Wert mit 20 mg/dl \pm 1 mg/dl (n=16) etwas niedriger war.

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Es wurden bei sieben alten WHHL Kaninchen Blutmessungen durchgeführt. Der Cholesterolmittelwert lag hier bei 765 mg/dl \pm 14 mg/dl (siehe Abbildung 11). Bei der HDL-Bestimmung war der Mittelwert 19 mg/dl \pm 2 mg/dl und bei der LDL-Bestimmung lag der Wert bei 529 mg/dl \pm 32 mg/dl. Der gefundene Triglyceridwert betrug 445 mg/dl \pm 93 mg/dl.

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

In diesem Kollektiv wurde im Vergleich zu den nicht mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen bei zehn Messungen ein im Mittel niedrigerer Cholesterolwert von 588 mg/dl \pm 42 mg/dl bestimmt (siehe Abbildung 11). Sowohl der HDL-Wert mit 18 mg/dl \pm 1 mg/dl (n=8) als auch der LDL-Wert mit 557 mg/dl \pm 99 mg/dl (n=5) blieben unbeeinflusst. Der Triglyceridmittelwert war mit 283 mg/dl \pm 54 mg/dl (n=10) niedriger als der Triglyceridmittelwert bei den alten, unbehandelten WHHL Kaninchen .

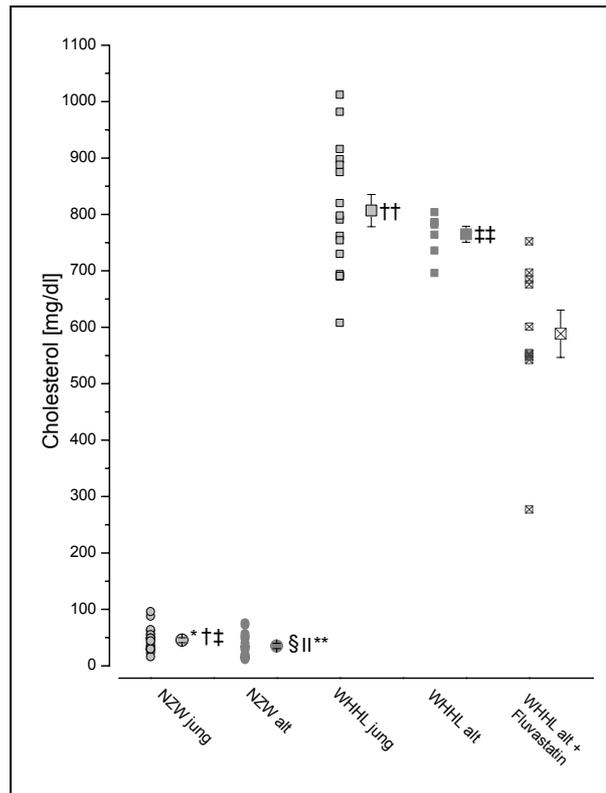


Abbildung 11: Cholesterol: Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der unterschiedlichen Kaninchenkollektive

- * signifikanter Unterschied NZW jung vs. WHHL jung
- † signifikanter Unterschied NZW jung vs. WHHL alt
- ‡ signifikanter Unterschied NZW jung vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt
- § signifikanter Unterschied NZW alt vs. WHHL jung
- || signifikanter Unterschied NZW alt vs. WHHL alt
- ** signifikanter Unterschied NZW alt vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt
- †† signifikanter Unterschied WHHL jung vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt
- ‡‡ signifikanter Unterschied WHHL alt vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt

4.1.2 Elektrolyte

Die Ergebnisse der Bestimmung der Elektrolytwerte werden in Tabelle 9 dargestellt. Es wird ersichtlich, dass es keine signifikanten Unterschiede bei den einzelnen Kaninchenkollektiven gab.

Tabelle 9: Blutelektrolyte der unterschiedlichen Kaninchenkollektive

	Na ⁺ [mmol/l]	K ⁺ [mmol/l]	gesamt Calcium [mmol/l]
junge NZW	140 ± 1 (n = 18)	4,7 ± 0,1 (n = 18)	3,6 ± 0,1 (n = 18)
alte NZW	140 ± 1 (n = 18)	4,7 ± 0,1 (n = 16)	3,6 ± 0,1 (n = 18)
junge WHHL	138 ± 1 (n = 16)	4,6 ± 0,1 (n = 16)	3,5 ± 0,1 (n = 16)
alte WHHL	140 ± 1 (n = 7)	4,6 ± 0,2 (n = 7)	3,6 ± 0,1 (n = 7)
alte, mit Fluvastatin behandelte WHHL	140 ± 1 (n = 10)	4,3 ± 0,1 (n = 10)	3,7 ± 0,1 (n = 10)

4.1.3 Transaminasen

Die Blutwerte sind in Tabelle 10 wiedergegeben. Man erkennt nur geringfügige Unterschiede bei den einzelnen Kaninchenkollektiven. Allerdings waren die GOT- und GPT-Werte bei den mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen erhöht.

Tabelle 10: Transaminasen der unterschiedlichen Kaninchenkollektiven

	GOT [U/l]	GPT [U/l]
junge NZW	8,4 ± 0,9 (n = 19)	25,1 ± 4,3 (n = 19)
alte NZW	6,3 ± 0,5 (n = 16)	19,7 ± 2,6 (n = 18)
junge WHHL	7,5 ± 0,6 (n = 16)	30,6 ± 1,0 (n = 16)
alte WHHL	6,1 ± 0,4 * (n = 7)	25,0 ± 3,4 * (n = 7)
alte, mit Fluvastatin behandelte WHHL	22,8 ± 5,3 (n = 10)	65,6 ± 6,4 (n = 10)

* signifikanter Unterschied WHHL alt vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt

4.1.4 Kreatinkinase

Junge New Zealand White Kaninchen

Bei den jungen Kontrolltieren (n=22) lag der CK-Wert im Mittel bei 203 U/l \pm 37 U/l. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich wird, wurden in diesem Kollektiv zwei Werte (470 U/l und 855 U/l) gemessen, die um mehr als das Doppelte bzw. Vierfache vom Mittelwert abweichen. Berechnet man einen Mittelwert ohne diese beiden Ausreißer, so ergibt sich ein Mittelwert von 157 U/l \pm 14 U/l.

Alte New Zealand White Kaninchen

Die Kreatinkinasewerte der Blutbestimmungen bei den alten NZW Kaninchen (n=18) lagen niedriger, im Mittel bei 112 U/l \pm 12 U/l (siehe Abbildung 12).

Junge Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Der CK-Wert von 233 U/l \pm 33 U/l der jungen, genetisch veränderten WHHL Kaninchen (n=16) war mit dem CK-Wert der gesunden NZW Kaninchen im selben Alter vergleichbar (siehe Abbildung 12).

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Analog dazu lag auch der Mittelwert der Kreatinkinase von 114 U/l \pm 22 U/l der alten WHHL Kaninchen (n=7) im gleichen Bereich wie der Mittelwert der alten NZW Kaninchen (siehe Abbildung 12).

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei der Behandlung der hyperlipidämischen Kaninchen mit Fluvastatin (n=10) stieg der CK-Wert im Mittel auf 435 U/l \pm 208 U/l an (siehe Abbildung 12). Auffällig sind zwei Messwerte, die um mehr als das Doppelte (975 U/l) bzw. fast Fünffache (2153 U/l) vom berechneten Mittelwert abweichen. Aufgrund der geringen Probenzahl von nur n=10 fallen diese beiden Werte stark ins Gewicht. Ein Mittelwert ohne die beiden Ausreißer kann bei 153 U/l \pm 17 U/l berechnet werden.

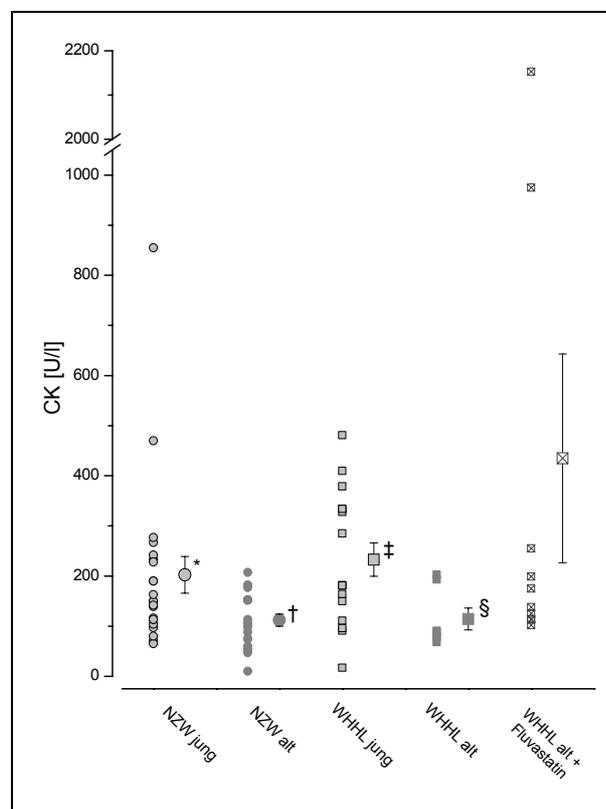


Abbildung 12: Kreatinkinase: Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der unterschiedlichen Kaninchenkollektive

* signifikanter Unterschied NZW jung vs. NZW alt

† signifikanter Unterschied NZW alt vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt

‡ signifikanter Unterschied WHHL jung vs. WHHL alt

§ signifikanter Unterschied WHHL alt vs. WHHL alt und mit Fluvastatin behandelt

4.2 Auswertungen der Untersuchungen der isolierten Aortenringe

Bei den Untersuchungen von isolierten Aortenringen wurden Dosis-Antwortkurven unter Zugabe aufsteigender Mengen an Acetylcholin (ACh) und Glyceroltrinitrat (GTN) aufgezeichnet. Dabei wurden bei den verschiedenen untersuchten Kaninchen unterschiedlich viele Aortenringe vermessen. Die folgenden Abbildungen zeigen zum einen die Einzelkurven, wobei jeweils ein Symbol einem Kaninchen zugeordnet ist, als auch die Durchschnittskurve mit dem dazugehörigen Standardfehler.

4.2.1 Endothelabhängiger Vasodilatator Acetylcholin

Junge New Zealand White Kaninchen

Bei den untersuchten jungen NZW Kaninchen (6 Kaninchen, 12 Aortenringe) führte die Gabe des endothelabhängigen Vasodilatators ACh zu einer Dilatation der Aorta, die im Mittel bei $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l ACh mit $58 \% \pm 8 \%$ ihr Maximum erreichte. Bei einer weiteren Dosiserhöhung kam es zu einer Vasokonstriktion. Bei $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l ACh betrug die Dilatation nur noch $45 \% \pm 4 \%$. Die EC_{50} lag im Mittel bei $2,4 \cdot 10^{-7}$ mol/l $\pm 7,7 \cdot 10^{-8}$ mol/l ACh (siehe Abbildung 13).

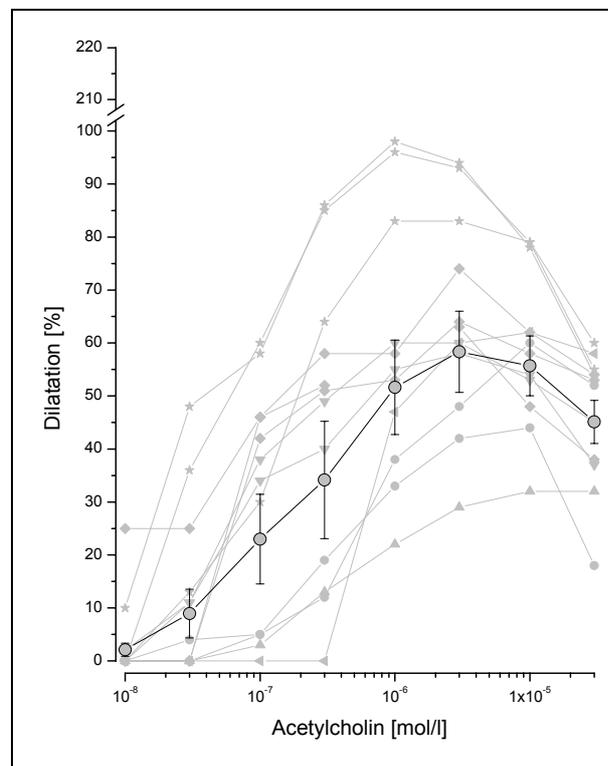


Abbildung 13: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Acetylcholin dilatierenden Aortenringe der jungen NZW Kaninchen

Alte New Zealand White Kaninchen

Die Aorten der alten NZW Kaninchen (11 Kaninchen, 18 Aortenringe) zeigten unter dem endothelabhängigen Vasodilatator ACh ebenfalls eine Dilatation, die bei $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l ACh im Mittel $41 \% \pm 5 \%$ betrug und bei höheren Konzentrationen ACh ebenfalls wieder abnahm. Bei $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l ACh war die Dilatation nur noch $33 \% \pm 4 \%$. Die EC_{50} lag im Mittel bei $2,1 \cdot 10^{-7}$ mol/l $\pm 4,4 \cdot 10^{-7}$ mol/l ACh (siehe Abbildung 14).

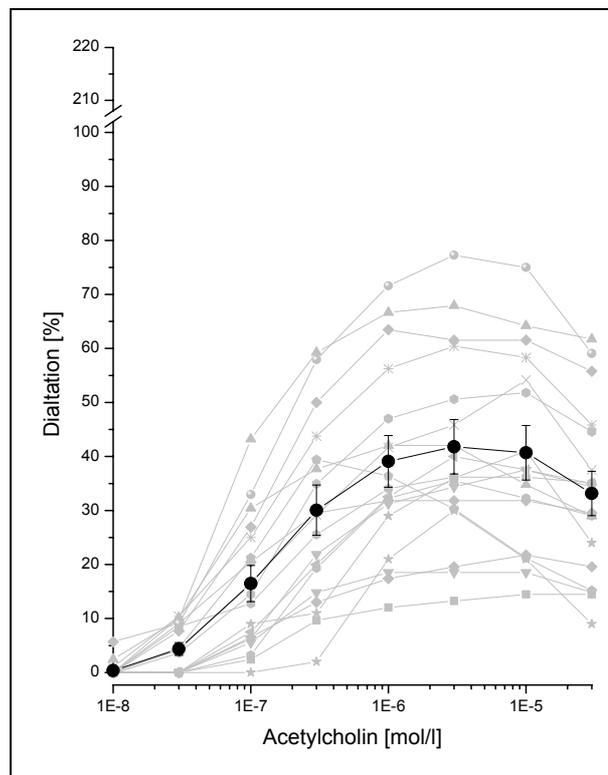


Abbildung 14: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Acetylcholin dilatierenden Aortenringe der alten NZW Kaninchen

Junge Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei den hypercholesterolämischen WHHL Kaninchen (8 Kaninchen, 20 Aortenringe) zeigte sich schon im jungen Alter eine eingeschränkte dilatatorische Kapazität der Aorta. Im Mittel wurde bereits bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l ACh die stärkste Dilatation erzielt. Sie betrug $30 \% \pm 4 \%$. Bei Applikation höherer Dosen kam es genau wie bei den NZW Kaninchen zu einer Konstriktion. Bei $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l ACh betrug die Dilatation im Mittel nur noch $2 \% \pm 5 \%$. Die EC_{50} lag im Mittel bei $1,4 \cdot 10^{-7}$ mol/l $\pm 4,1 \cdot 10^{-8}$ mol/l ACh (siehe Abbildung 15).

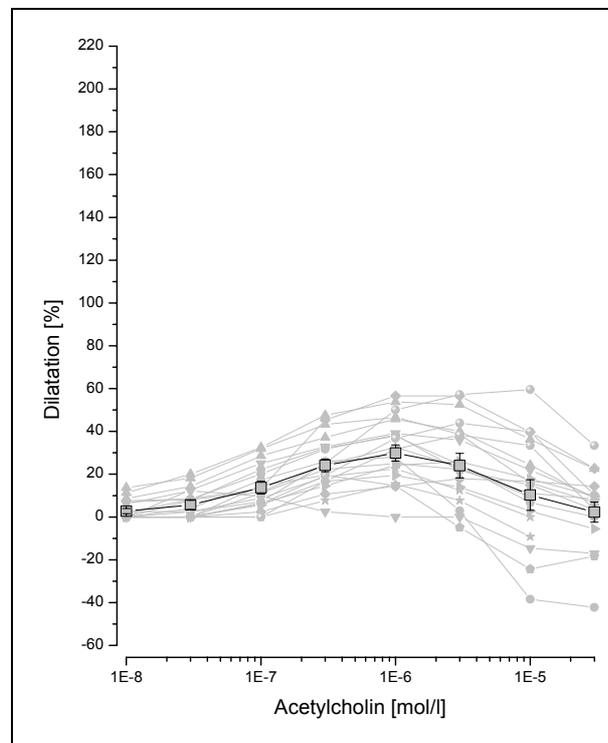


Abbildung 15: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Acetylcholin dilatierenden Aortenringe der jungen WHHL Kaninchen

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei den alten, hypercholesterolämischen Tieren (4 Kaninchen, 8 Aortenringe) war nur eine geringe Progression der eingeschränkten dilatatorischen Kapazität der Aorta im Vergleich zu den jungen WHHL Kaninchen zu beobachten. Die maximale Dilatation bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l ACh betrug $26 \% \pm 4 \%$. Bei weiterer Dosiserhöhung des ACh kam es wiederum zu einer pathologischen Konstriktion. Bei der Maximalkonzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l ACh betrug die Dilatation nur noch $10 \% \pm 4 \%$. Die EC_{50} lag im Mittel bei $2,3 \cdot 10^{-7}$ mol/l $\pm 8,0 \cdot 10^{-8}$ mol/l ACh (siehe Abbildung 16).

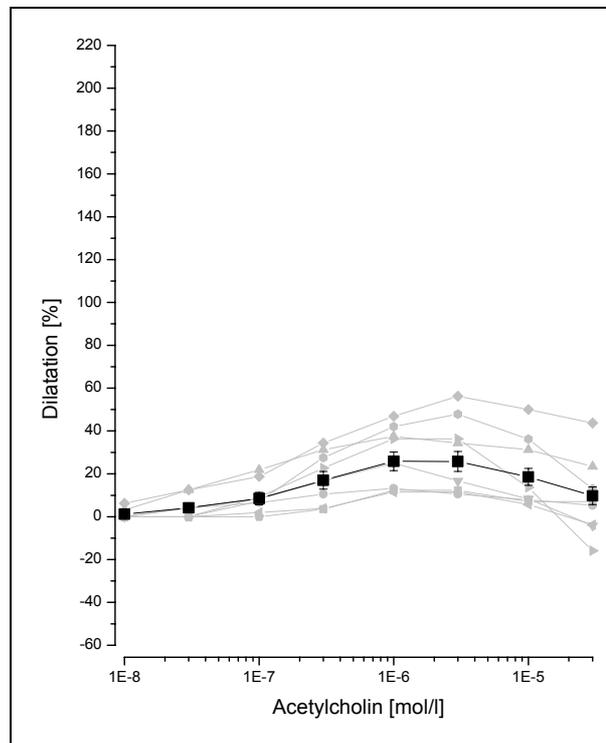


Abbildung 16: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Acetylcholin dilatierenden Aortenringe der alten WHHL Kaninchen

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Nach der Behandlung der hyperlipidämischen Tiere mit Fluvastatin (5 Kaninchen, 13 Aortenringe) zeigte sich eine Verbesserung der endothelabhängigen dilatatorischen Kapazität der Aorta im Vergleich zu den hyperlipidämischen Kaninchen ohne Behandlung mit Fluvastatin. Die maximale Dilatation bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l ACh betrug im Mittel $83 \% \pm 26 \%$. Bei einer Erhöhung der Dosis auf $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l ACh verminderte sich die Dilatation auf $57 \% \pm 34 \%$. Die EC_{50} lag im Mittel bei $2,1 \cdot 10^{-7}$ mol/l $\pm 5,8 \cdot 10^{-8}$ mol/l ACh (siehe Abbildung 17).

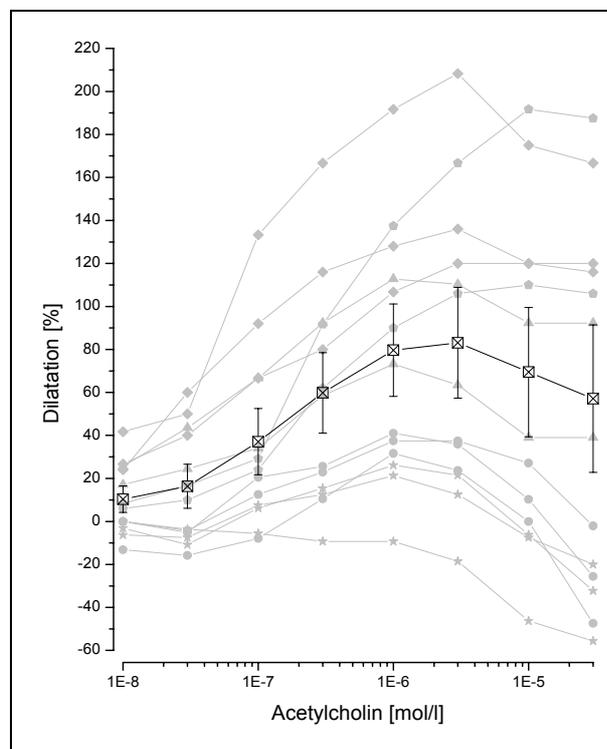


Abbildung 17: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Acetylcholin dilatierenden Aortenringe der alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen

4.2.1.1 Acetylcholin: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität der isolierten Aorta

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen der ACh Dosis-Antwortkurven der isolierten Aortenringe miteinander verglichen.

Altersabhängigkeit

Im ersten Vergleich wurde die Dilatation der Aorten von jungen New Zealand White Kaninchen der Dilatation der Aorten von alten NZW Kaninchen gegenübergestellt (siehe Abbildung 18). Dazu wurden aufsteigende Dosen von ACh appliziert. Die maximale Dilatation wurde bei einer Konzentration von etwa $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l ACh erreicht. Die Aorten der jungen Tiere weisen gegenüber den Aorten der alten Tiere kein signifikant größeres Potential zur Dilatation durch den endothelabhängigen Dilatator auf. Bei beiden Kollektiven kam es bei Gabe höherer Dosen von ACh zu einer Vasokonstriktion.

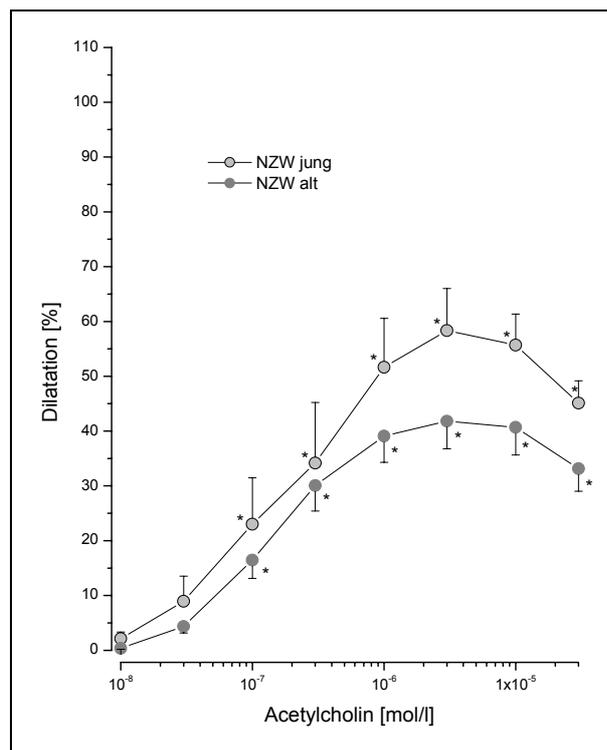


Abbildung 18: Vergleich der Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve mit Standardfehler der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Acetylcholin dilatierenden Aortenringe der jungen (6 Kaninchen, 12 Aortenringe) versus der alten (11 Kaninchen, 18 Aortenringe) NZW Kaninchen

* signifikanter Unterschied zur Grundlinie ($p < 0,05$)

Altersabhängigkeit bei Hypercholesterolämie

Bei den Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen war unter ACh bereits bei den jungen Tieren nur eine eingeschränkte Gefäßerweiterung zu sehen. Es kam nicht zu einer wesentlichen altersabhängigen Verschlechterung (siehe Abbildung 19). Zu erkennen ist, dass bei den alten WHHL Kaninchen die Dilatation erst bei geringfügig höheren Dosen des Dilatators einsetzt und insgesamt etwas schwächer ausgeprägt ist.

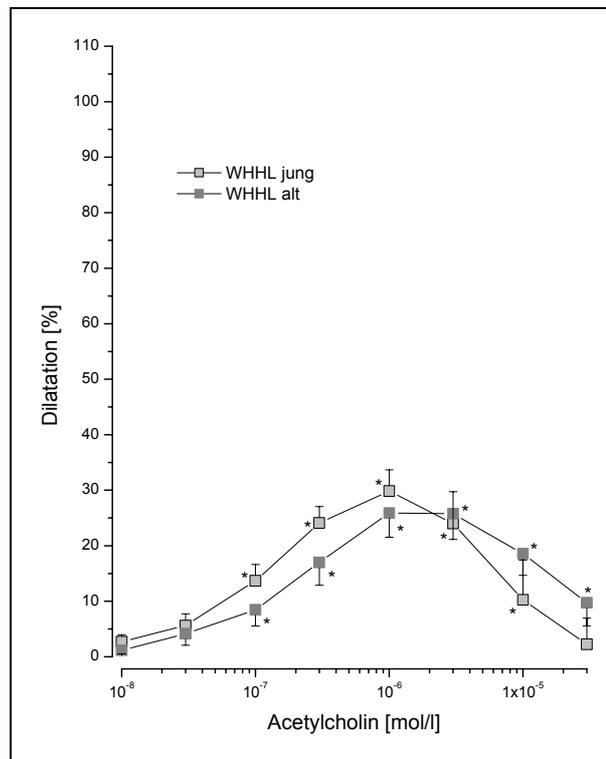


Abbildung 19: Vergleich der Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve mit Standardfehler der mit 2×10^{-7} mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Acetylcholin dilatierenden Aortenringe der jungen (8 Kaninchen, 20 Aortenringe) versus der alten (4 Kaninchen, 8 Aortenringe) WHHL Kaninchen

* signifikanter Unterschied zur Grundlinie ($p < 0,05$)

Normo- versus Hypercholesterolämie

Der Vergleich alter NZW Kaninchen mit alten WHHL Kaninchen (siehe Abbildung 20) unterstreicht noch einmal, dass die Hyperlipidämie zu einer Einschränkung der dilatatorischen Kapazität führt.

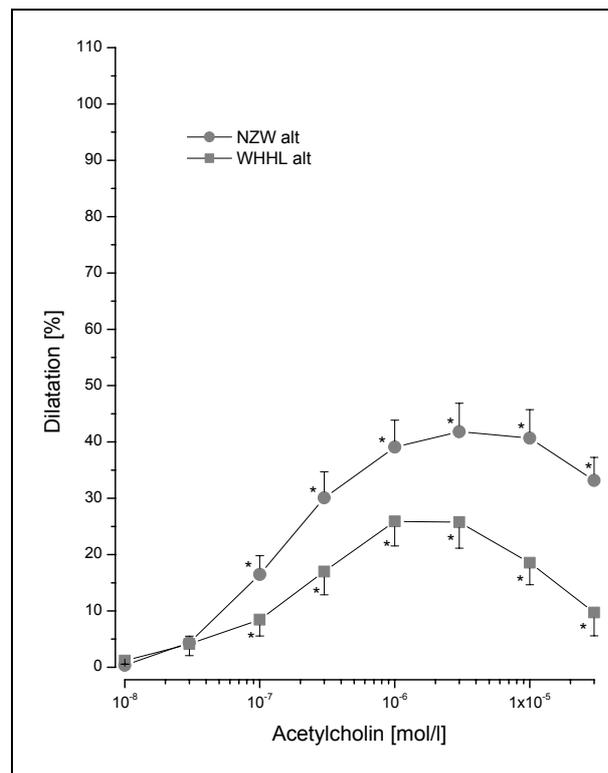


Abbildung 20: Vergleich der Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve mit Standardfehler der mit 2×10^{-7} mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Acetylcholin dilatierenden Aortenringe der alten NZW Kaninchen (11 Kaninchen, 18 Aortenringe) versus der alten WHHL Kaninchen (4 Kaninchen, 8 Aortenringe)

* signifikanter Unterschied zur Grundlinie ($p < 0,05$)

Behandlung mit Fluvastatin

Bei der Gegenüberstellung der alten WHHL Kaninchen mit den altersgleichen, mit Fluvastatin behandelten Tieren (siehe Abbildung 21) wurde die Verbesserung der endothelabhängigen dilatatorischen Kapazität der Aorta unter dem CSE-Hemmer-Einfluss deutlich.

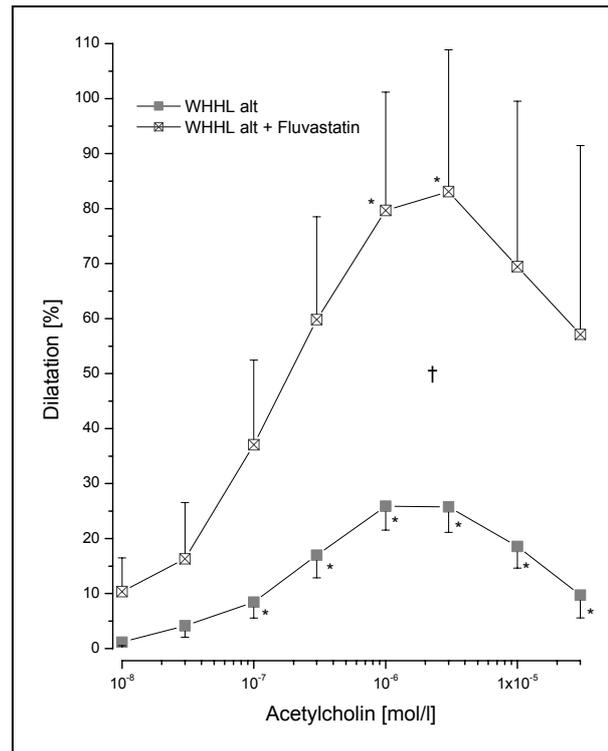


Abbildung 21: Vergleich der Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve mit Standardfehler der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstrangierten und mit aufsteigenden Dosen Acetylcholin dilatierenden Aortenringe der alten (4 Kaninchen, 8 Aortenringe) versus der alten, mit Fluvastatin behandelten (5 Kaninchen, 13 Aortenringe) WHHL Kaninchen

* signifikanter Unterschied zur Grundlinie ($p < 0,05$)

† signifikanter Unterschied in der maximalen Dilatation ($p < 0,05$)

4.2.2 Endothelunabhängiger Vasodilatator

Glyceroltrinitrat

Parallel zu den Untersuchungen mit dem endothelabhängigen Vasodilatator ACh konnte man beim endothelunabhängig wirkenden Glyceroltrinitrat (GTN) ebenfalls eine Vasodilatation, sowohl bei den New Zealand White Kaninchen als auch bei den WHHL Kaninchen, beobachten. Die maximale Dilatation zeigte sich jeweils bei der höchsten gegebenen Dosis, nämlich $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l GTN.

Junge New Zealand White Kaninchen

Bei den jungen NZW Kaninchen (7 Kaninchen mit 20 Ringen) betrug der Wert der maximalen Dilatation der Aorta $86 \% \pm 13 \%$. Die EC_{50} lag im Mittel bei $2,2 \cdot 10^{-7}$ mol/l $\pm 1,0 \cdot 10^{-7}$ mol/l GTN (siehe Abbildung 22).

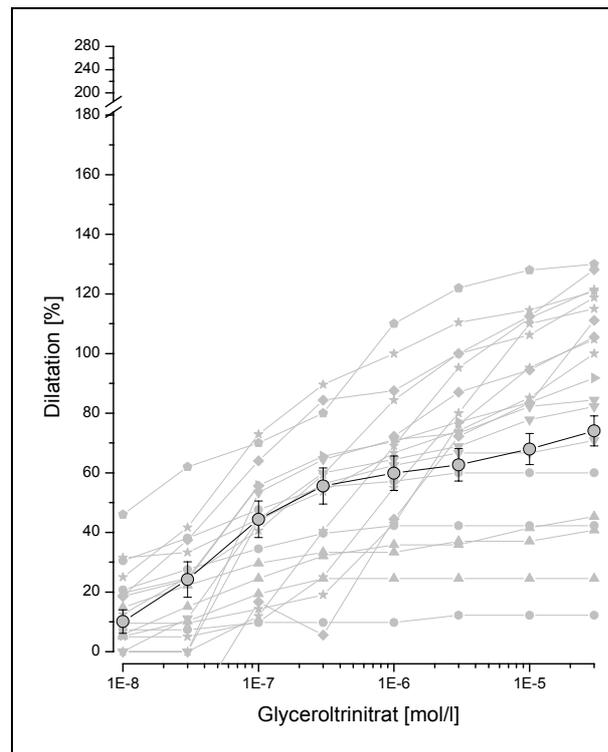


Abbildung 22: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Glyceroltrinitrat dilatierenden Aortenringe der jungen NZW Kaninchen

Alte New Zealand White Kaninchen

Die alten NZW Kaninchen (10 Kaninchen mit 20 Ringen) zeigten im Mittel eine maximale Dilatation der Aorta von $80\% \pm 10\%$. Die EC_{50} lag im Mittel bei $1,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l} \pm 1,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ GTN (siehe Abbildung 23).

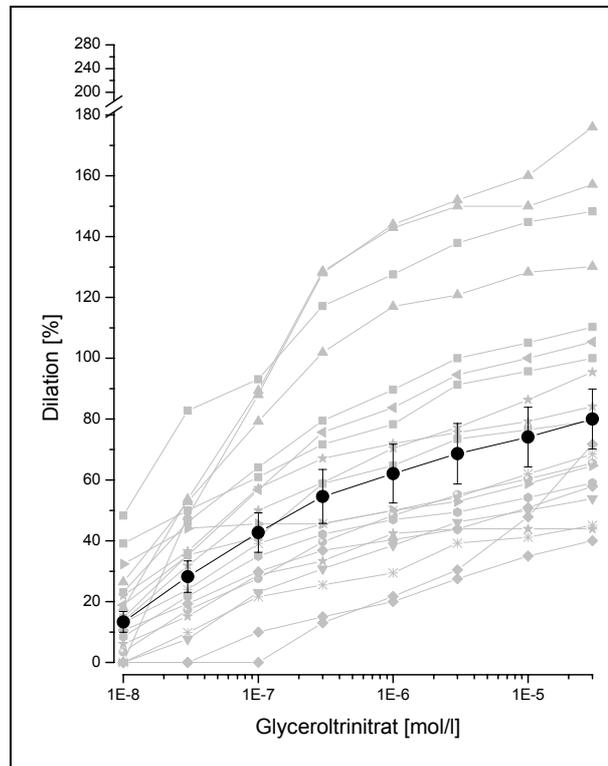


Abbildung 23: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Glyceroltrinitrat dilatierenden Aortenringe der alten NZW Kaninchen

Junge Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Die isolierten Gefäßstreifen der untersuchten hypercholesterolämischen Tiere (6 Kaninchen mit 11 Ringen) dilatierten auf maximal 74 % \pm 5 %. Die EC_{50} lag im Mittel bei $7,6 \cdot 10^{-8}$ mol/l \pm $1,6 \cdot 10^{-8}$ mol/l GTN (siehe Abbildung 24).

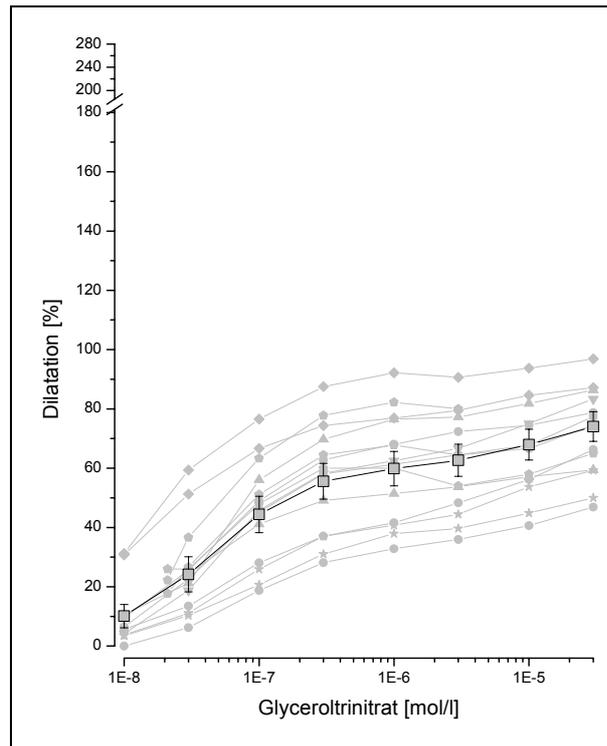


Abbildung 24: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Glyceroltrinitrat dilatierenden Aortenringe der jungen WHHL Kaninchen

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Die Aorten der alten WHHL Kaninchen (4 Kaninchen mit 8 Ringen) zeigten eine maximale Dilatation von $57\% \pm 10\%$. Die EC_{50} lag im Mittel bei $6,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l} \pm 3,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ GTN (siehe Abbildung 25).

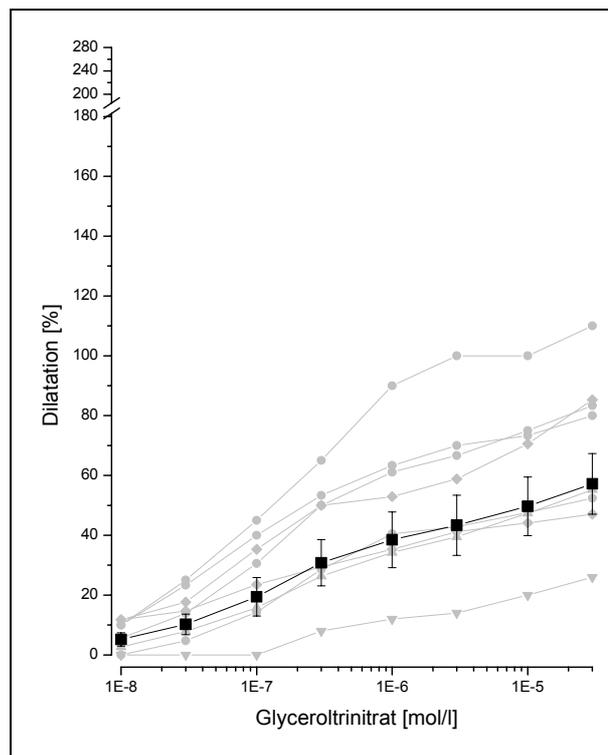


Abbildung 25: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Glyceroltrinitrat dilatierenden Aortenringe der alten WHHL Kaninchen

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Durch die Behandlung der hypercholesterolämischen WHHL Kaninchen (7 Kaninchen mit 14 Ringen) mit Fluvastatin verstärkte sich die maximale Dilatation der Aorta auf $128 \% \pm 21 \%$. Die EC_{50} lag im Mittel bei $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l $\pm 1,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l GTN (siehe Abbildung 26).

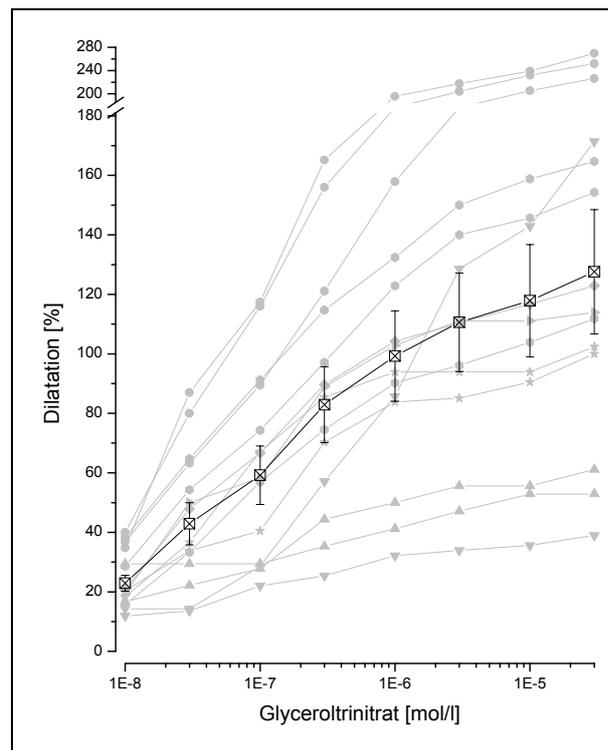


Abbildung 26: Einzelwert-Dosis-Antwort-Kurven (kleine Symbole) und Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve (große Symbole mit Standardfehler) der mit $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Glyceroltrinitrat dilatierenden Aortenringe der alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen

4.2.2.1 Glyceroltrinitrat: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität der isolierten Aorta

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen der GTN Dosis-Antwortkurven der isolierten Aortenringe miteinander verglichen.

Altersabhängigkeit

Beim Vergleich der dilatatorischen Kapazität der Aorta unter dem endothelunabhängigen Glyceroltrinitrat wurde bei den jungen New Zealand White Kaninchen gegenüber den alten NZW Kaninchen keine Differenz gefunden (siehe Abbildung 27).

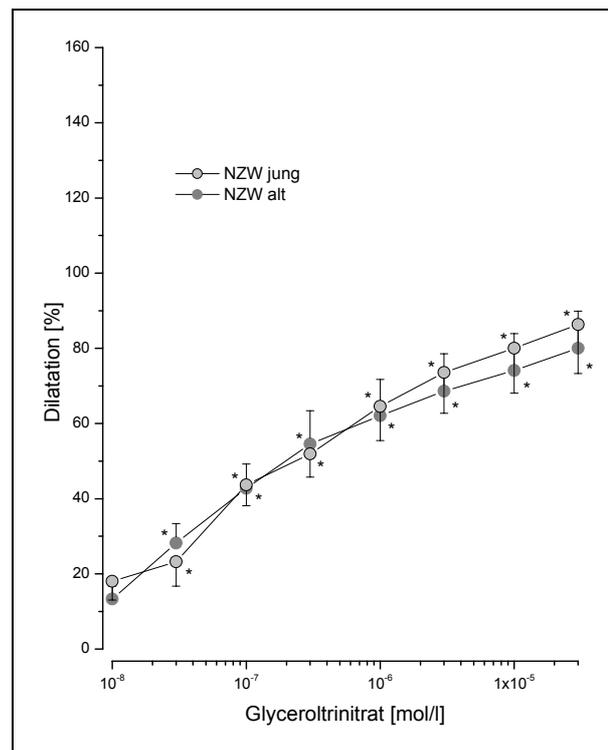


Abbildung 27: Vergleich der Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve mit Standardfehler der mit 2×10^{-7} mol/l Phenylephrin vorkonstrangierten und mit aufsteigenden Dosen Glyceroltrinitrat dilatierenden Aortenringe der jungen (7 Kaninchen, 20 Aortenringe) versus der alten (10 Kaninchen, 20 Aortenringe) NZW Kaninchen

* signifikanter Unterschied zur Grundlinie ($p < 0,05$)

Altersabhängigkeit bei Hypercholesterolämie

Analog dazu wurden die jungen WHHL Kaninchen den alten WHHL Kaninchen gegenübergestellt (siehe Abbildung 28). Es ergab sich kein Unterschied in der maximalen dilatatorischen Kapazität, allerdings war die EC_{50} bei den jungen signifikant ($p=0,0048$) niedriger als bei den alten WHHL Kaninchen.

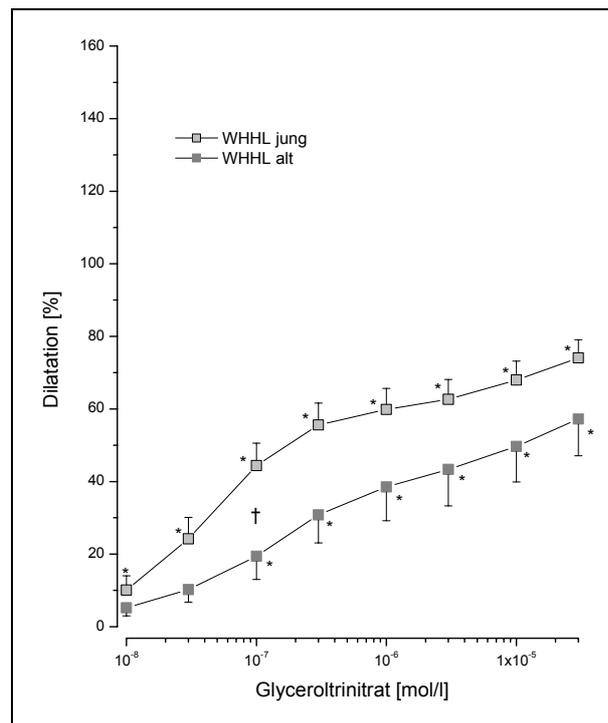


Abbildung 28: Vergleich der Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve mit Standardfehler der mit 2×10^{-7} mol/l Phenylephrin vorkonstrangierten und mit aufsteigenden Dosen Glyceroltrinitrat dilatierenden Aortenringe der jungen (6 Kaninchen, 11 Aortenringe) versus der alten (4 Kaninchen, 8 Aortenringe) WHHL Kaninchen

* signifikanter Unterschied zur Grundlinie ($p < 0,05$)

† signifikanter Unterschied in der EC_{50} ($p < 0,05$)

Normo- versus Hypercholesterolämie

Die isolierten Aortenringe der alten WHHL Kaninchen zeigten gegenüber den Aortenringen der alten NZW Kaninchen eine signifikant ($p=0,0103$) reduzierte EC_{50} . Die maximale Dilatation war bei den beiden Kaninchenkollektiven nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 29).

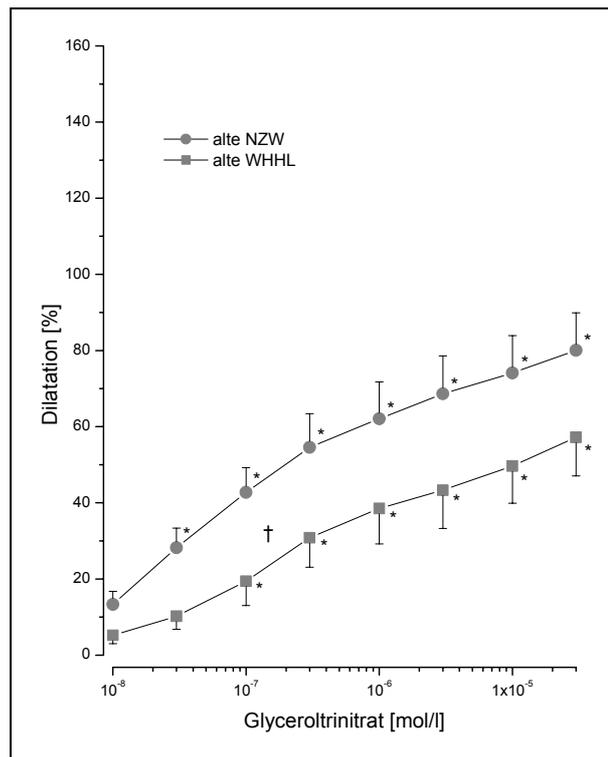


Abbildung 29: Vergleich der Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve mit Standardfehler der mit 2×10^{-7} mol/l Phenylephrin vorkonstrangierten und mit aufsteigenden Dosen Glyceroltrinitrat dilatierenden Aortenringe der alten NZW Kaninchen (10 Kaninchen, 20 Aortenringe) versus der alten WHHL Kaninchen (4 Kaninchen, 8 Aortenringe)

* signifikanter Unterschied zur Grundlinie ($p < 0,05$)

† signifikanter Unterschied in der EC_{50} ($p < 0,05$)

Behandlung mit Fluvastatin

Bei den alten WHHL Kaninchen war unter GTN Gabe die maximale Dilatation über 120 % stärker ausgeprägt als bei den altersgleichen, mit Fluvastatin behandelten Tieren (siehe Abbildung 30).

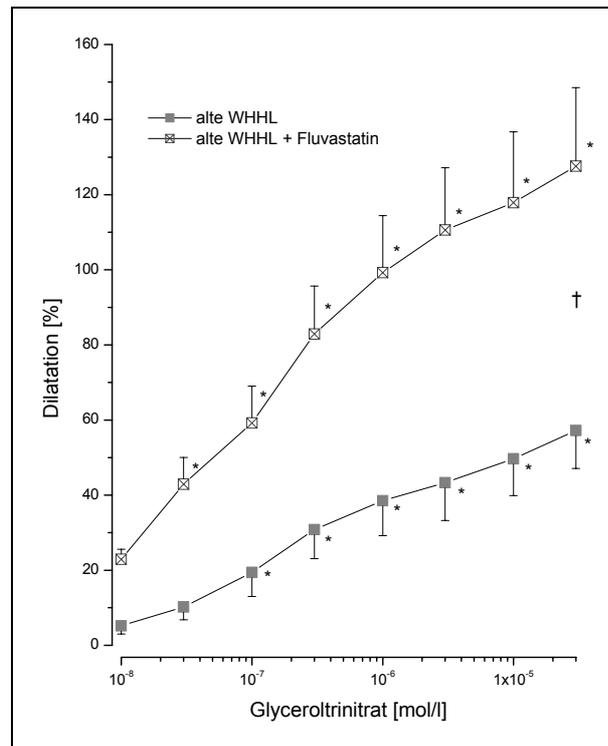


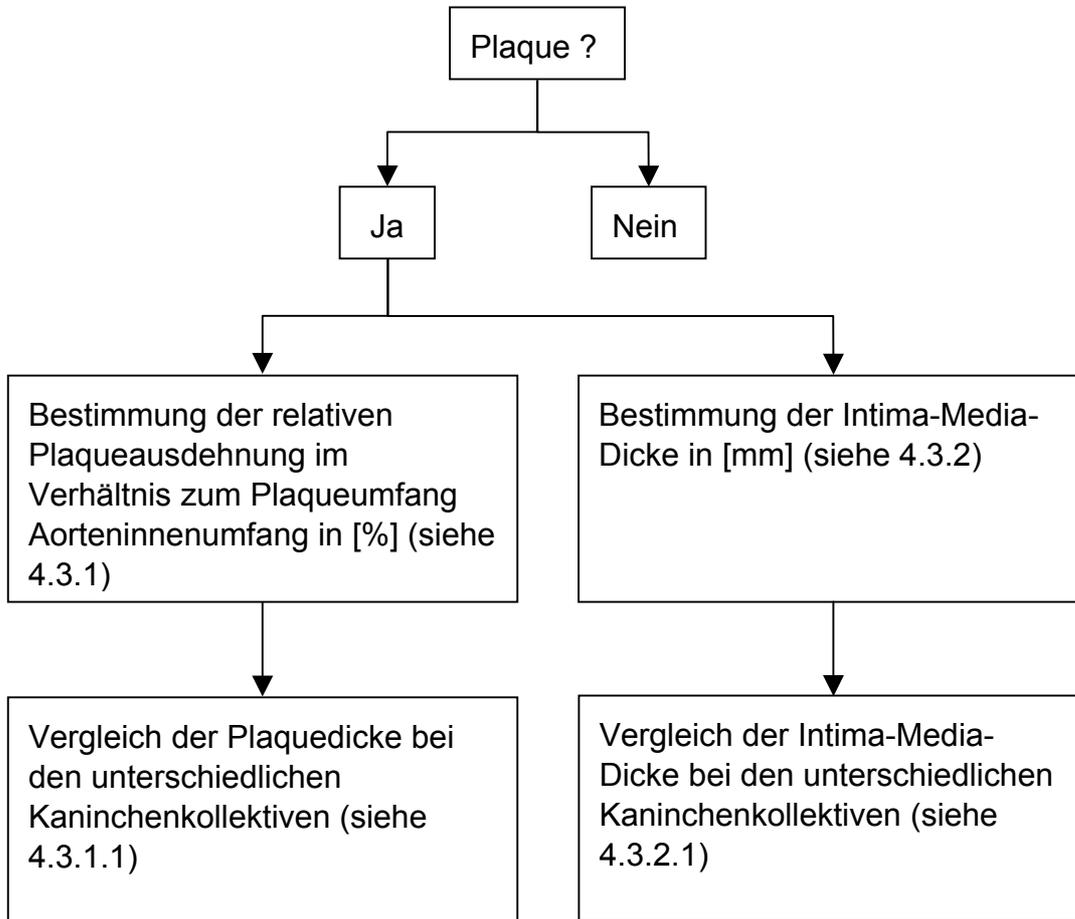
Abbildung 30: Vergleich der Mittelwert-Dosis-Antwort-Kurve mit Standardfehler der mit 2×10^{-7} mol/l Phenylephrin vorkonstringierten und mit aufsteigenden Dosen Glyceroltrinitrat dilatierenden Aortenringe der alten (4 Kaninchen, 8 Aortenringe) versus der alten, mit Fluvastatin behandelten (7 Kaninchen, 14 Aortenringe) WHHL Kaninchen

* signifikanter Unterschied zur Grundlinie ($p < 0,05$)

† signifikanter Unterschied in der maximalen Dilatation ($p < 0,05$)

4.3 Histopathologie

Für die histopathologischen Untersuchungen wurde folgendes Untersuchungsschema verwendet:



Bei keinem der New Zealand White Kaninchen wurden atherosklerotische Läsionen detektiert. Bei den alten WHHL Kaninchen und auch bei den alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen konnte dagegen Plaque beobachtet werden.

4.3.1 Plaquequantifizierung

Im ersten Schritt wurde die Ausdehnung der Plaque bestimmt. Dazu wurde eine Ja/Nein-Entscheidung getroffen, ob Plaque vorhanden ist oder nicht. In Abbildung 31 ist eine Aorta schematisiert dargestellt. In dieser Darstellung ist die Aorta in ihrer Zirkumferenz zu 50 % atherosklerotisch verändert. Die anderen 50 % des Aortenumfangs sind frei von Ablagerungen.

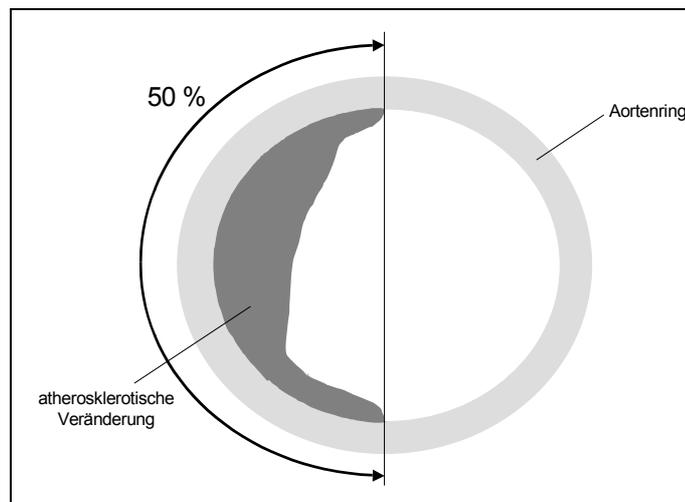


Abbildung 31: Aorta- schematisiert- Messung der Plaqueausdehnung. 50 % der Zirkumferenz sind atherosklerotisch verändert, die anderen 50 % sind frei von Ablagerungen.

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei den alten WHHL Kaninchen wurden vier Aorten mit einer Plaqueausdehnung von $95,0 \% \pm 4,8 \%$ vermessen (siehe Abbildung 32).

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

In dem Kollektiv der alten, mit Fluvastatin behandelten hyperlipoproteinämischen Tiere ($n=6$) betrug die Plaqueausdehnung nur $76,9 \% \pm 4,2 \%$ (siehe Abbildung 32).

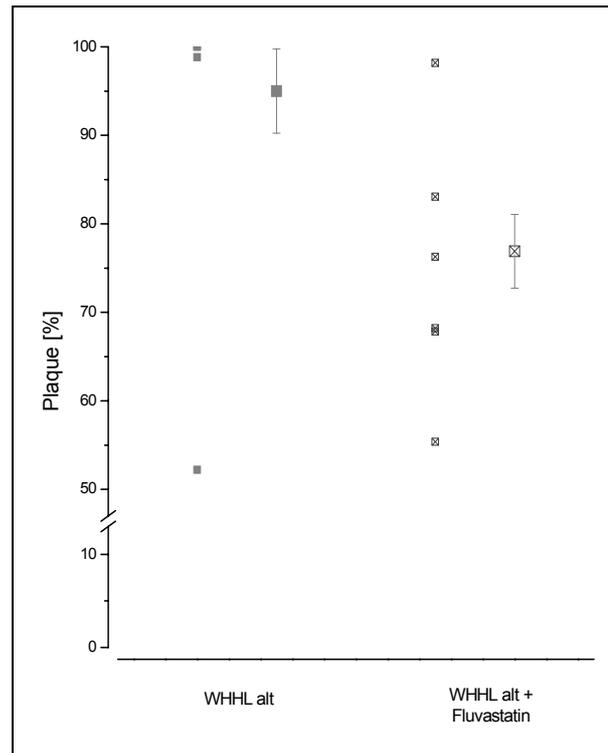


Abbildung 32: Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Plaqueausdehnung an den Aorten der alten WHHL Kaninchen (4 Kaninchen, 10 Ringe) und der alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen (6 Kaninchen, 18 Ringe)

4.3.1.1 Vergleiche der Plaqueausdehnung

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen der Ausdehnung der Plaque miteinander verglichen.

Behandlung mit Fluvastatin

Die mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen zeigten eine geringere Plaqueausdehnung als die nicht mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen (siehe Abbildung 33).

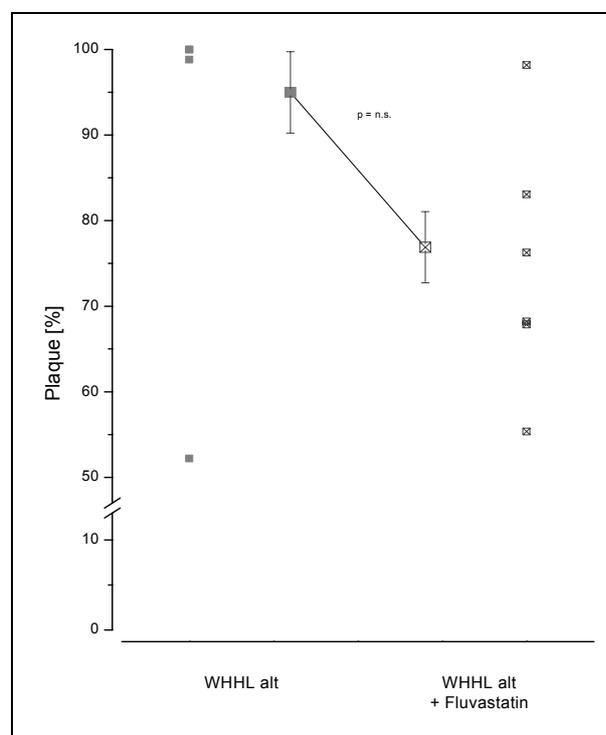


Abbildung 33: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Plaqueausdehnung an der Aorta bei den alten versus den alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen

4.3.2 Intima-Media-Dicke

Ferner wurde eine Aussage die Intima-Media-Dicke untersucht. Dazu wurden Messungen an verschiedenen Schnittstellen sowie an verschiedenen Ringen desselben Tieres gemittelt. Dies wird analog zur Abbildung 31 in Abbildung 34 gezeigt.

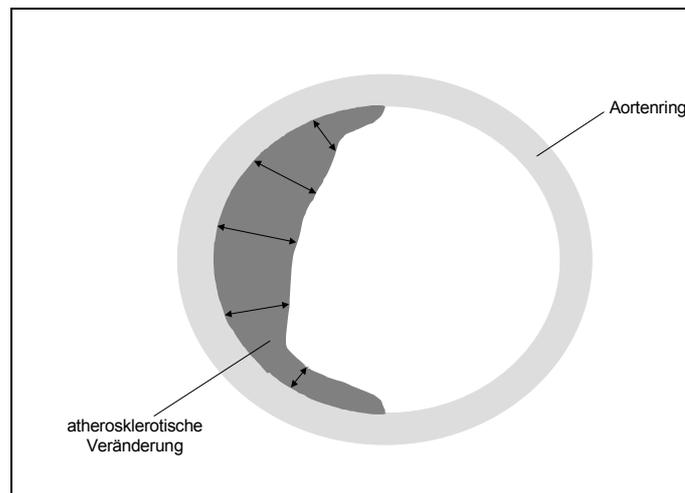


Abbildung 34: Aorta- schematisiert- Messung der Intima-Media-Dicke. An verschiedenen Schnittstellen wird die Intima-Media-Dicke bestimmt.

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei der Untersuchung der alten WHHL Kaninchen ohne Behandlung mit Fluvastatin betrug bei 4 unterschiedlichen Aortenringen die mittlere Intima-Media-Dicke $0,81 \pm 0,08$ mm (siehe Abbildung 35).

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Entsprechend der Untersuchung der Plaqueausdehnung wurden auch bei der Vermessung der Intima-Media-Dicke sechs Aortenringe betrachtet. Der Mittelwert lag bei $0,57 \pm 0,07$ mm (siehe Abbildung 35).

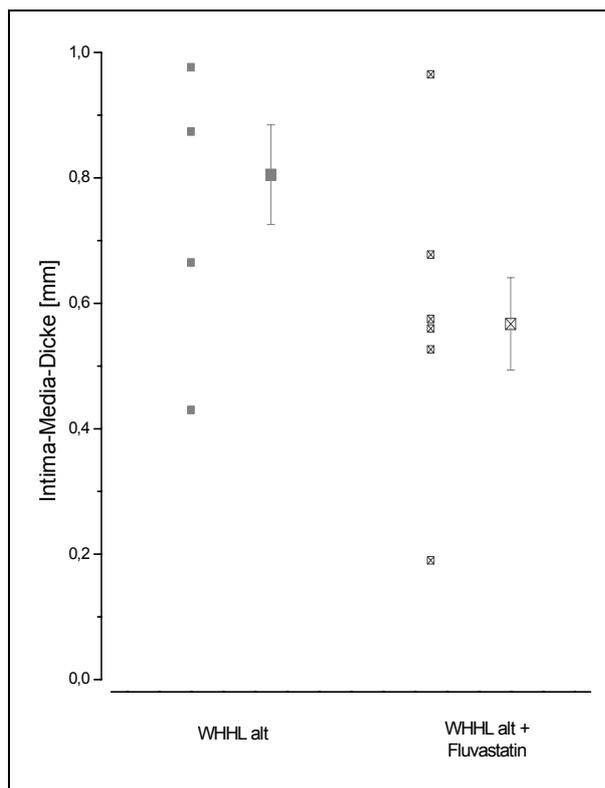


Abbildung 35: Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Intima-Media-Dicke der Aorten der alten WHHL Kaninchen (4 Kaninchen, 10 Ringe) und der alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen (6 Kaninchen, 18 Ringe)

4.3.2.1 Vergleich der Intima-Media-Dicke

Im folgenden werden die Ergebnisse der Messungen der Intima-Media-Dicke miteinander verglichen.

Behandlung mit Fluvastatin

Analog zu den Ergebnissen bei der Plaqueausdehnung erkennt man auch beim Vergleich der Intima-Media-Dicke der alten WHHL Kaninchen mit den mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen (siehe Abbildung 36) eine Abnahme. Diese ist allerdings nicht signifikant.

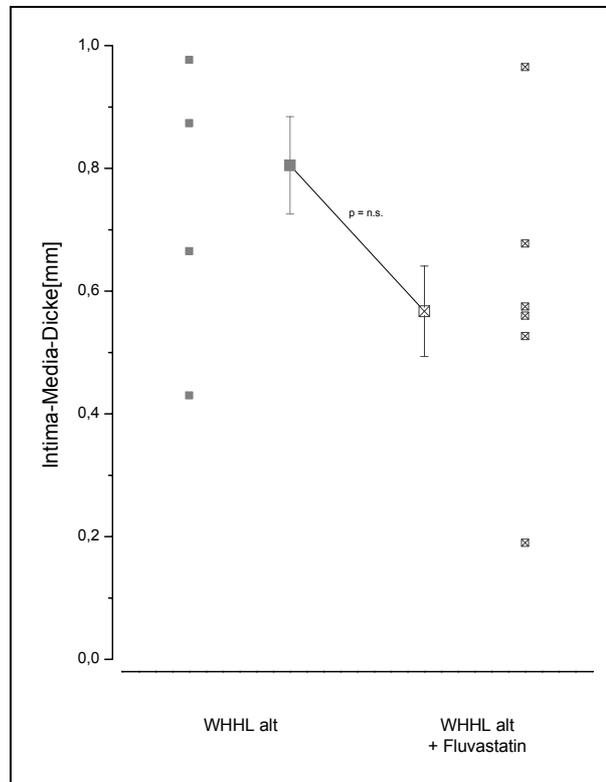


Abbildung 36: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Intima-Media-Dicke der Aorten bei den alten versus den alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen

4.4 Auswertungen der Untersuchungen der isoliert perfundierten Herzen

Bei der Untersuchung am isoliert perfundierten Herzen wurden dem Perfusat (Hepes-Puffer) nach der 30 minütigen Äquibrierungszeit das endothelabhängige Pharmakon Acetylcholin (ACh), das endothelunabhängige Pharmakon Glyceroltrinitrat (GTN) und der HMG-CoA Reduktasehemmer Fluvastatin in alternierender Reihenfolge beigegeben.

Analysiert wurde die Änderung des koronaren Perfusionsdrucks (CPP in [mmHg]). Daneben fand zur Kontrolle der linksventrikulären Funktion eine Messung des linksventrikulären Drucks (LVP in [mmHg]) und des Drucks gegen die Zeit integriert (dp/dt in [mmHg/s]) statt. Tendenziell fiel der CPP bei jedem der drei Interventionen. Die Stärke und Dauer der vasorelaxierenden Wirkung war allerdings abhängig vom Pharmakon sowie der Stammeszugehörigkeit und dem Alter des Tieres.

Zum Vergleich der Kollektive untereinander wurde der koronarvaskuläre Widerstand (CVR) herangezogen, da bei diesem Wert der koronare Fluss (CF in [ml/min]) mit in die Beurteilung des koronaren Perfusionsdrucks einbezogen wird. Der koronarvaskuläre Widerstand errechnet sich aus der Division des koronaren Perfusionsdrucks und dem koronaren Fluss: $CVR = CPP/CF$ [mmHg*min/ml].

Die Differenz des CVR bevor und nachdem ein Pharmakon in den Perfusionspuffer injiziert wurde, wird als Δ CVR bezeichnet. Die relative Darstellung Δ CVR [%] wird für die graphische Verdeutlichung gewählt. Dabei wird jeweils der koronarvaskuläre Widerstand ohne Intervention gleich 100 % gesetzt. Da sich bei den beiden Kaninchenrassen die koronarvaskulären Widerstände in unterschiedlichen Messbereichen befinden, lassen sich so die verschiedenen Kollektive besser vergleichen.

4.4.1 Endothelabhängiger Vasodilatator Acetylcholin

Acetylcholin führt unter physiologischen Bedingungen zu einer Vasodilatation. Kommt es zu einer Konstriktion wird diese im Folgenden als pathologische Konstriktion bezeichnet.

Junge New Zealand White Kaninchen

Bei retrograder Infusion von 1 $\mu\text{mol/l}$ ACh in die KoronargefäÙe junger NZW Kaninchen ($n=10$) fiel der koronarvaskuläre Widerstand um $24,0 \% \pm 4,0 \%$. Es wurde keine pathologische Konstriktion beobachtet (siehe Abbildung 37).

Alte New Zealand White Kaninchen

Bei den alten NZW Kaninchen ($n=17$) nahm der koronare Widerstand um $11,1 \% \pm 3,6 \%$ ab. Ein Anteil von 24 % dieses Kaninchenkollektivs zeigte pathologische Konstriktionen (siehe Abbildung 37).

Junge Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Ähnliches konnte bei den WHHL Kaninchen beobachtet werden. Die jungen Kaninchen ($n=10$) zeigten einen Abfall des koronarvaskulären Widerstands von $24,8 \% \pm 6,9 \%$. Bereits im jungen Alter zeigte sich bei einem der Kaninchen eine pathologische Konstriktion anstelle einer Dilatation nach Gabe von ACh (siehe Abbildung 37).

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei den alten hypercholesterolemischen Kaninchen ($n=9$) wurde eine Abnahme des Widerstands von $7,6 \% \pm 8,1 \%$ nachgewiesen. Der Anteil an pathologischen Konstriktionen stieg bei den alten WHHL Kaninchen auf 44 % und lag somit am höchsten (siehe Abbildung 37).

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei der Untersuchung der alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen (n=10) zeigte sich eine Abnahme des Widerstands von $6,9 \% \pm 9,3 \%$. Der Anteil an pathologischen Konstriktionen war gegenüber den Tieren ohne Behandlung mit Fluvastatin um 14 % niedriger und lag bei 30% (siehe Abbildung 37).

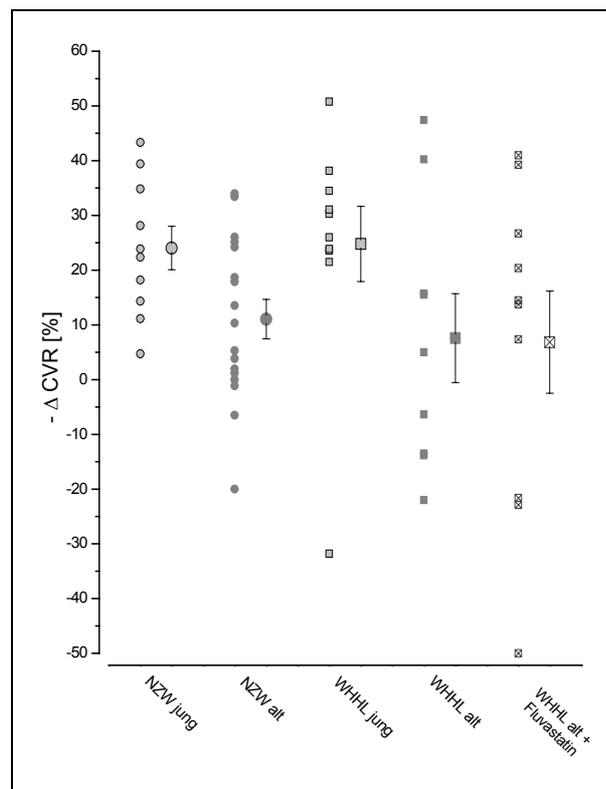


Abbildung 37: Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands der unterschiedlichen Kaninchenkollektive bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Acetylcholin

4.4.1.1 Acetylcholin: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität des isoliert perfundierten Herzens

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen der koronarvaskulären Widerstände (CVR) unter Infusion von ACh in die isolierten Herzen miteinander verglichen.

Altersabhängigkeit

Bei der Gegenüberstellung von den isolierten Herzen der jungen NZW Kaninchen mit isolierten Herzen der alten NZW Kaninchen ist zu sehen, dass die Abnahme des koronarvaskulären Widerstands der jungen Tiere gegenüber Abnahme des Widerstands der alten Tiere deutlich höher ist (siehe Abbildung 38). Von Bedeutung ist außerdem, dass man bei den alten im Gegensatz zu den jungen Kaninchen einen Anteil an pathologischen Konstriktionen findet. Bei den alten Tieren ist in 24 % der Fälle nach ACh Gabe eine Konstriktion anstelle einer Dilatation zu beobachten.

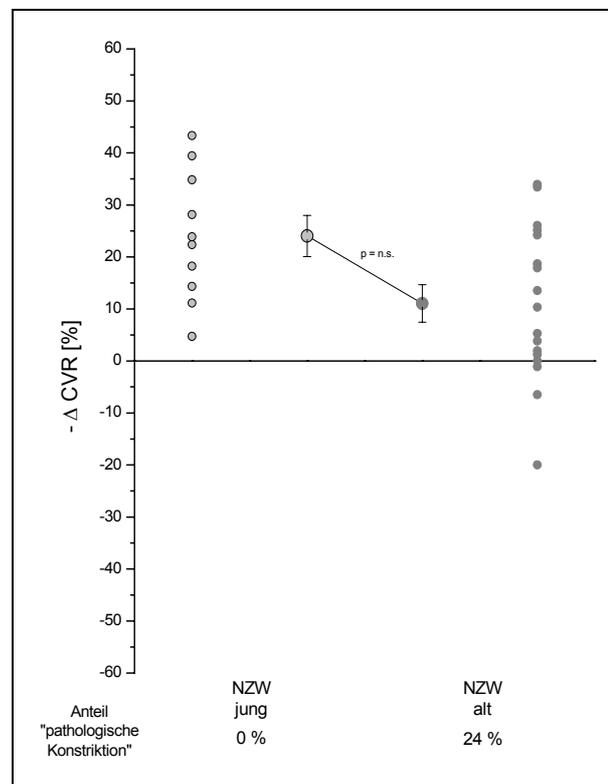


Abbildung 38: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Acetylcholin bei den jungen versus den alten NZW Kaninchen

Altersabhängigkeit bei Hypercholesterolämie

Analog dazu wurden die jungen WHHL Kaninchen den alten WHHL Kaninchen gegenübergestellt (siehe Abbildung 39). Bei den hyperlipoproteinämischen Tieren war die Abnahme des Widerstands bei den jungen Kaninchen gegenüber der Abnahme des Widerstands bei den alten Kaninchen um mehr als $\frac{2}{3}$ geringer. Hinzu kam eine erhebliche Zunahme des Anteils an pathologischen Konstriktionen von 10 % bei den jungen Tieren gegenüber 44 % bei den alten Tieren.

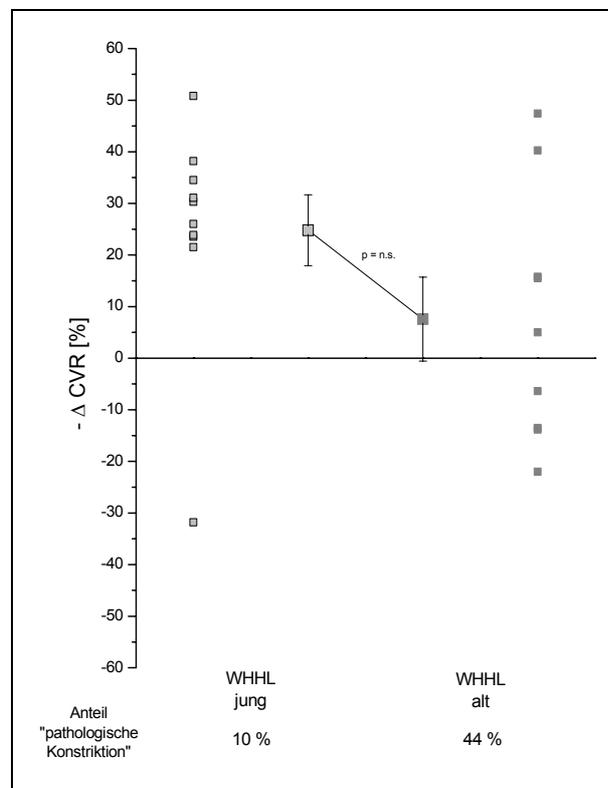


Abbildung 39: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Acetylcholin bei den jungen versus den alten WHHL Kaninchen

Normo- versus Hypercholesterolämie

Beim Vergleich der alten NZW Kaninchen mit den alten WHHL Kaninchen (siehe Abbildung 40) zeigte sich kein deutlicher Unterschied bei der Abnahme des Widerstands. Dennoch ließ sich aber ungefähr eine Verdopplung des Anteils an Kaninchen mit pathologischer Konstriktion nachweisen.

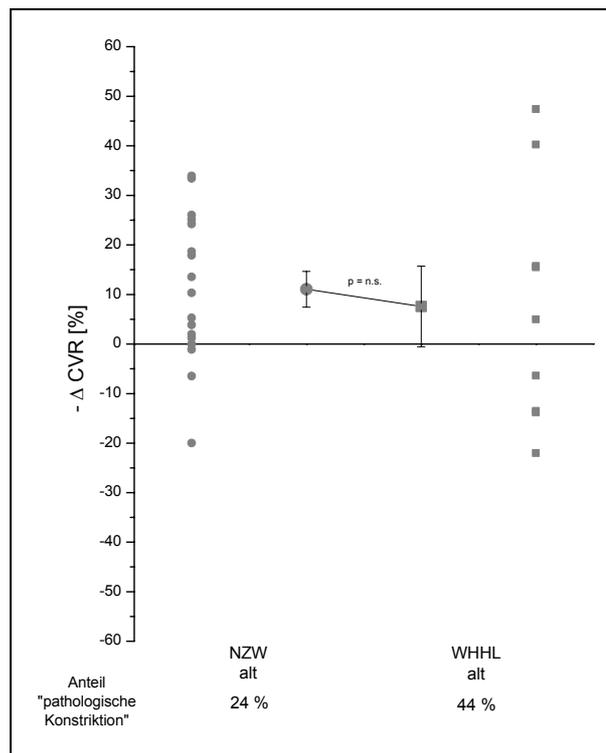


Abbildung 40: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronaren Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Acetylcholin bei den jungen NZW Kaninchen versus den alten WHHL Kaninchen

Behandlung mit Fluvastatin

Bei der Gegenüberstellung der alten WHHL Kaninchen mit den altersgleichen, mit Fluvastatin behandelten Tieren (siehe Abbildung 41) wurde keine Verbesserung der Abnahme des Widerstands deutlich. Allerdings war der Anteil an pathologischen Konstriktionen bei den mit Fluvastatin behandelten Tieren gegenüber den nicht behandelten Tieren um etwa ein Drittel niedriger.

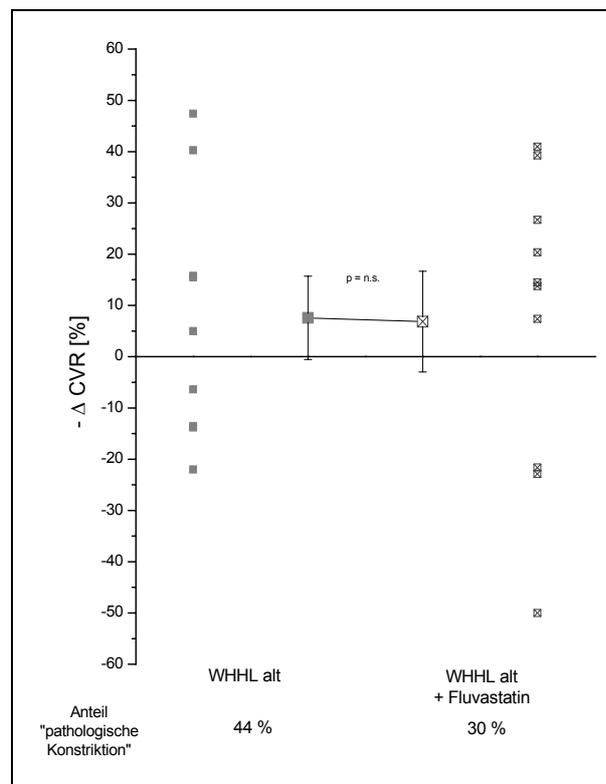


Abbildung 41: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Acetylcholin bei alten versus den alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen

4.4.2 Endothelunabhängiger Vasodilatator Glyceroltrinitrat

Junge New Zealand White Kaninchen

Bei retrograder Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l GTN lag die Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei den jungen NZW Kaninchen (n=10) bei $17,7 \% \pm 4,0 \%$ (siehe Abbildung 42).

Alte New Zealand White Kaninchen

Bei den alten NZW Kaninchen (n=17) betrug die Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Gabe von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l GTN $19,3 \% \pm 4,4 \%$ (siehe Abbildung 42).

Junge Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei den jungen WHHL Kaninchen (n=10) wurde eine Abnahme des Widerstands von $30,7 \% \pm 3,5 \%$ beobachtet (siehe Abbildung 42).

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Der Widerstandswert der jungen hypercholesterolemischen Tiere (n=9) lag bei $24,9 \% \pm 4,8 \%$ (siehe Abbildung 42)

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Nach der Behandlung mit Fluvastatin (n=9) nahm der koronarvaskuläre Widerstand um $26,8 \% \pm 3,5 \%$ ab (siehe Abbildung 42).

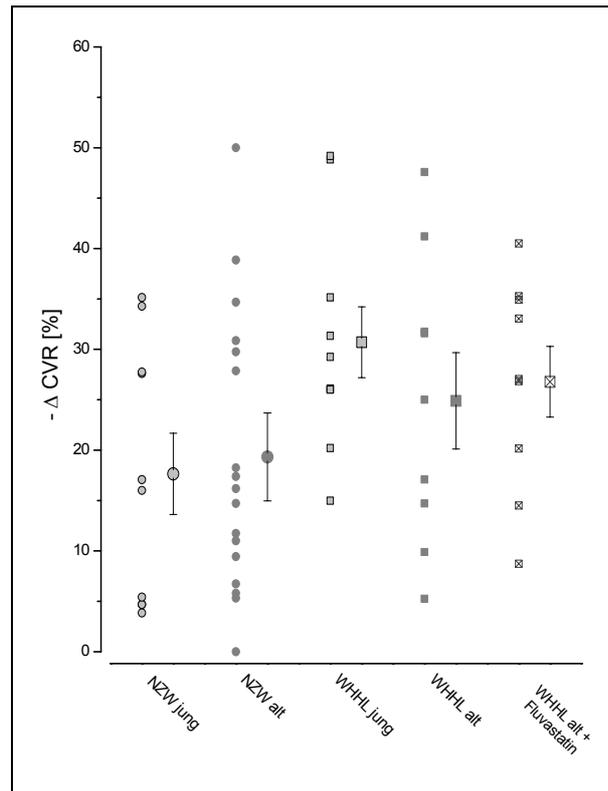


Abbildung 42: Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands der unterschiedlichen Kaninchenkollektive bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Glyceroltrinitrat

4.4.2.1 Glyceroltrinitrat: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität des isoliert perfundierten Herzens

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen der koronarvaskulären Widerstände (CVR) unter Infusion von GTN in die isolierten Herzen miteinander verglichen.

Altersabhängigkeit

Bei der Gegenüberstellung der jungen mit den alten NZW Kaninchen (siehe Abbildung 43) wird ersichtlich, dass die Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Gabe des endothelunabhängigen Vasodilatators Glyceroltrinitrat nicht vom Alter abhängig ist.

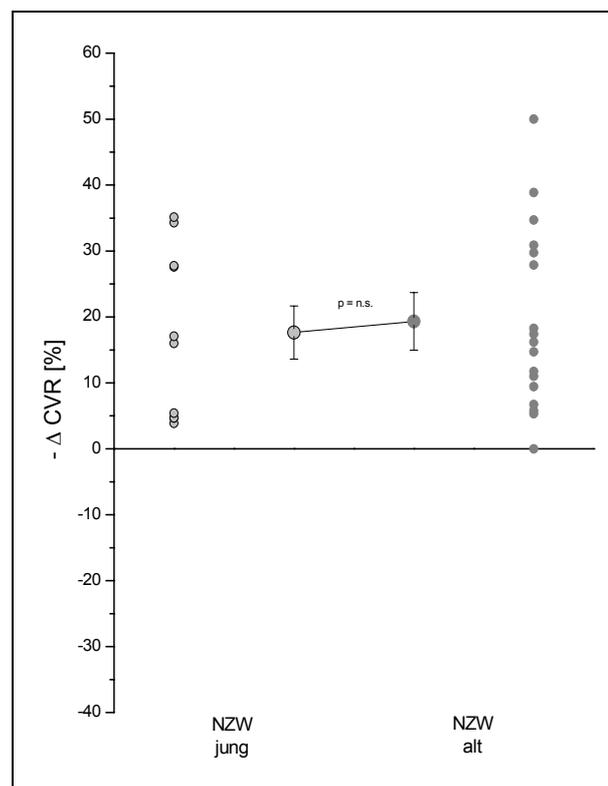


Abbildung 43: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Glyceroltrinitrat bei den jungen versus den alten NZW Kaninchen

Altersabhängigkeit bei Hypercholesterolämie

Die gleiche Aussage, die für die Altersabhängigkeit bei den NZW Kaninchen gilt, ist auch bei dem Vergleich der jungen mit den alten WHHL Kaninchen (siehe Abbildung 44) richtig: Es ergibt sich keine signifikante Verschiebung des koronarvaskulären Widerstands.

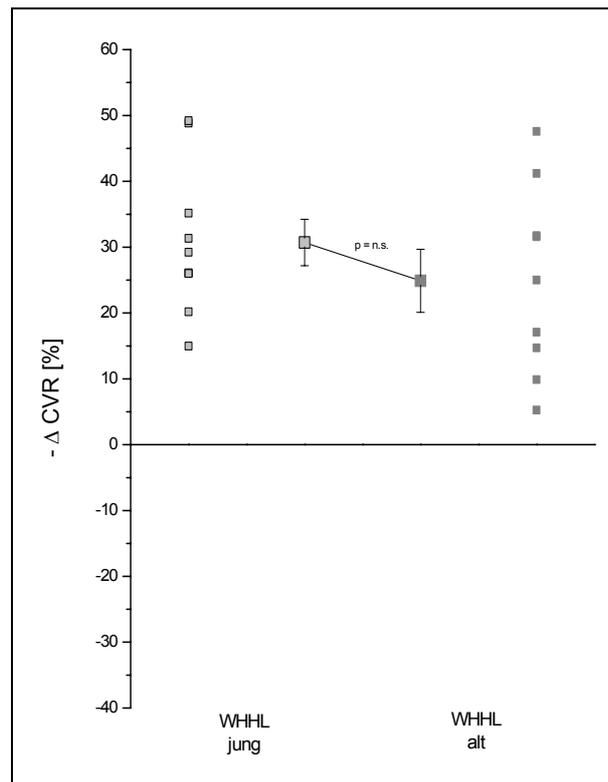


Abbildung 44: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Glyceroltrinitrat bei den jungen versus den alten WHHL Kaninchen

Normo- versus Hypercholesterolämie

Die Gegenüberstellung der NZW Kontrolltiere gegenüber den hyperlipoproteinämischen WHHL Kaninchen (siehe Abbildung 45) ließ keine signifikanten Unterschiede deutlich werden.

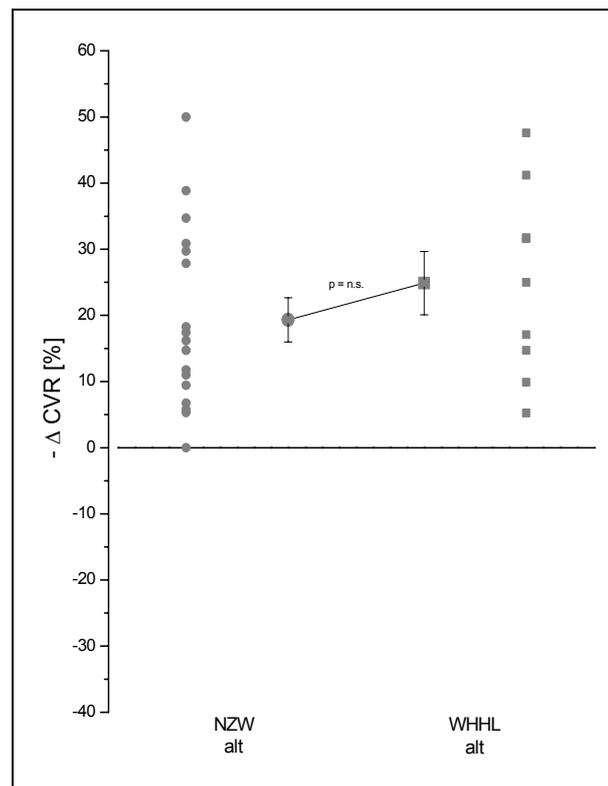


Abbildung 45: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Glyceroltrinitrat bei den alten NZW Kaninchen versus den alten WHHL Kaninchen

Behandlung mit Fluvastatin

Beim Vergleich der unbehandelten gegenüber den mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen (siehe Abbildung 46) zeigte sich unter GTN Gabe ebenso wenig, wie bei der ACh Gabe (siehe 4.4.1.1), kein signifikanter Unterschied in der Abnahme des Widerstands.

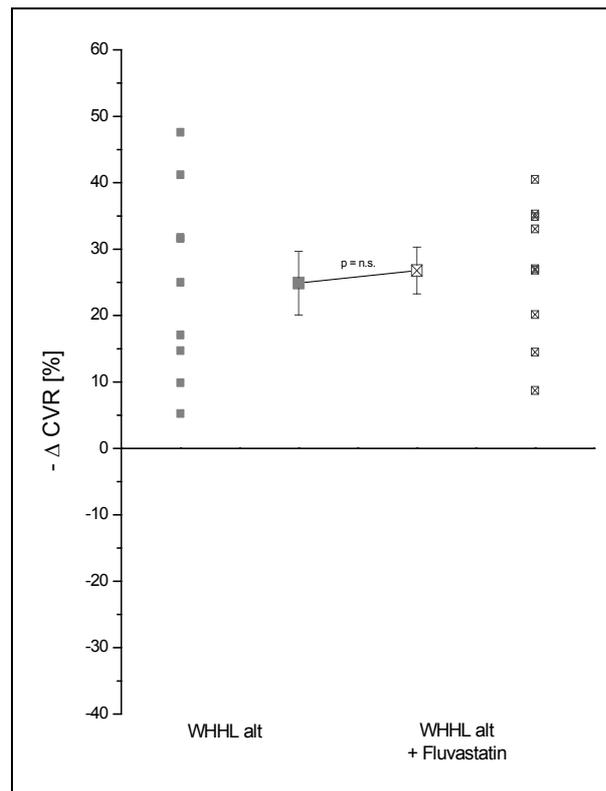


Abbildung 46: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l Glyceroltrinitrat bei alten versus den alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen

4.4.3 HMG-CoA Reduktasehemmer Fluvastatin

Im folgenden Kapitel wird die Dilatation der Aorten bei akuter Infusion von Fluvastatin in das jeweilige Kaninchenherz untersucht. Diese akute Gabe ist getrennt von der chronischen Gabe über 17 Wochen von dem in Futter gepressten Fluvastatin zu betrachten.

Junge New Zealand White Kaninchen

Bei retrograder Infusion von 10^{-5} g/ml Fluvastatin lag die Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei den jungen NZW Kaninchen (n=10) bei $26,0 \% \pm 3,0 \%$ (siehe Abbildung 47).

Alte New Zealand White Kaninchen

Bei den alten NZW Kaninchen (n=18) betrug die Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Gabe von $10 \mu\text{g/ml}$ Fluvastatin $21,2 \% \pm 3,0 \%$ (siehe Abbildung 47).

Junge Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei den jungen WHHL Kaninchen (n=10) wurde eine Abnahme des Widerstands von $28,5 \% \pm 5,1 \%$ unter Infusion von 10^{-5} g/ml Fluvastatin beobachtet (siehe Abbildung 47).

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Der Widerstandswert der alten WHHL Kaninchen (n=9) nahm unter akuter Gabe von Fluvastatin um $18,8 \% \pm 3,4 \%$ ab (siehe Abbildung 47).

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Bei den chronisch mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen (n=9) führte die akute Infusion von Fluvastatin zu eine Abnahme des koronarvaskulären Widerstands von $29,7 \% \pm 5,7 \%$ (siehe Abbildung 47).

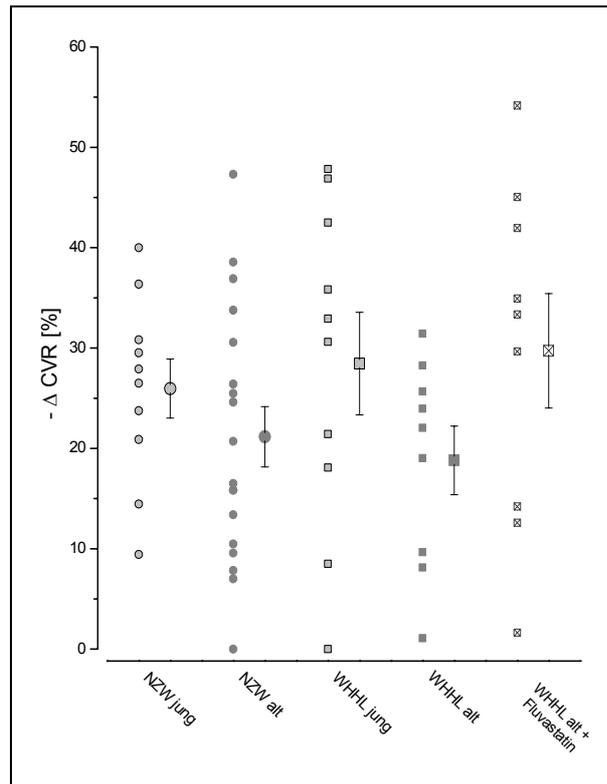


Abbildung 47: Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands der unterschiedlichen Kaninchenkollektive bei Infusion von $1 \cdot 10^{-5}$ g/ml Fluvastatin

4.4.3.1 Fluvastatin: Vergleiche der dilatatorischen Kapazität des isoliert perfundierten Herzens

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen der koronarvaskulären Widerstände (CVR) unter Infusion von Fluvastatin in die isolierten Herzen miteinander verglichen.

Altersabhängigkeit

Bei der Gegenüberstellung der jungen und alten Kontrolltiere (siehe Abbildung 48) ist keine altersabhängige Veränderung der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands ersichtlich.

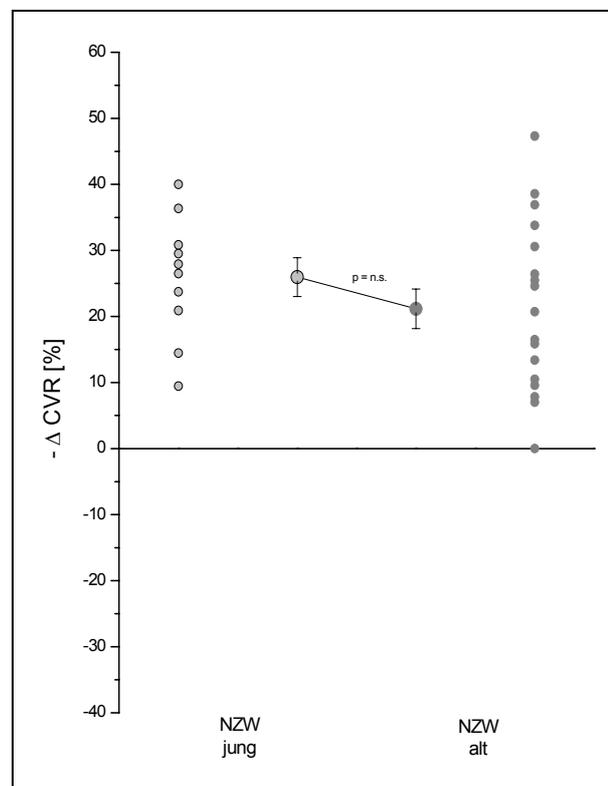


Abbildung 48: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-5}$ g/ml Fluvastatin bei den jungen versus den alten NZW Kaninchen

Altersabhängigkeit bei Hypercholesterolämie

Bei der Gegenüberstellung der jungen mit den alten hyperlipoproteinämischen Tieren (siehe Abbildung 49) ist keine signifikante Abnahme des koronarvaskulären Widerstands zu erkennen.

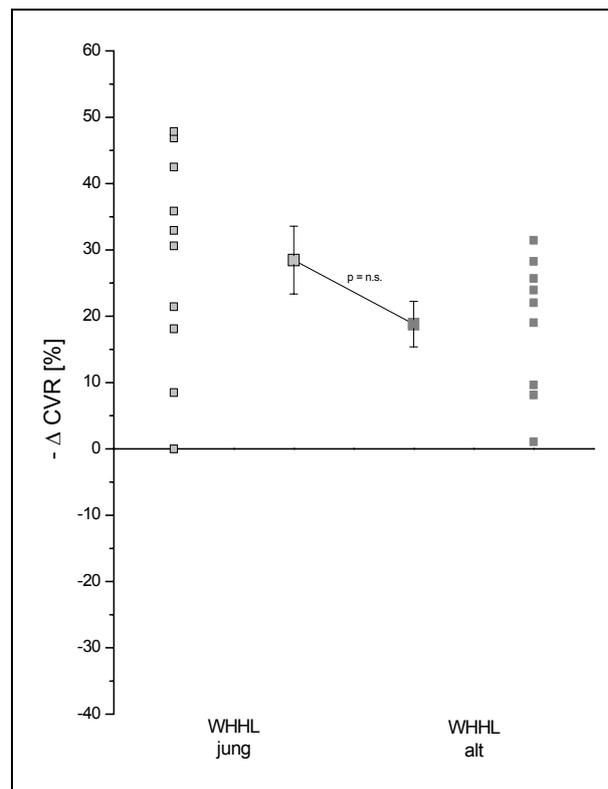


Abbildung 49: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-5}$ g/ml Fluvastatin bei den jungen versus den alten WHHL Kaninchen

Normo- versus Hypercholesterolämie

Betrachtet man den Vergleich der NZW Kaninchen mit den WHHL Kaninchen (siehe Abbildung 50) werden keine Unterschiede zwischen den gleich alten Kaninchenkollektiven sichtbar.

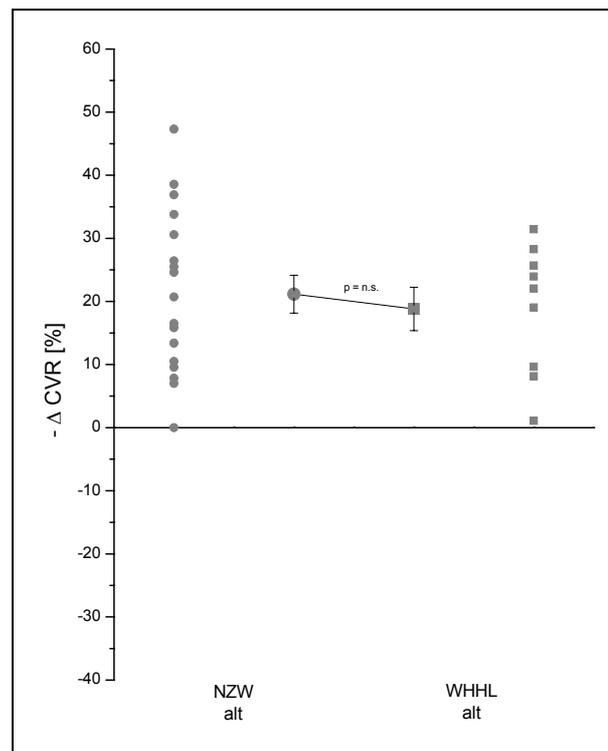


Abbildung 50: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronaryaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-5}$ g/ml Fluvastatin bei den alten NZW Kaninchen versus den alten WHHL Kaninchen

Behandlung mit Fluvastatin

Stellt man die hypercholesterolämischen Tiere ohne ($-\Delta \text{CVR} = 18,8 \% \pm 3,4 \%$) und mit ($-\Delta \text{CVR} = 29,7 \% \pm 5,7 \%$) Behandlung mit Fluvastatin gegenüber (siehe Abbildung 51) wird eine Tendenz ($p=0,0539$) zu einer signifikant verstärkten Abnahme des koronarvaskulären Widerstands durch die Behandlung der Tiere mit dem CSE-Hemmer sichtbar.

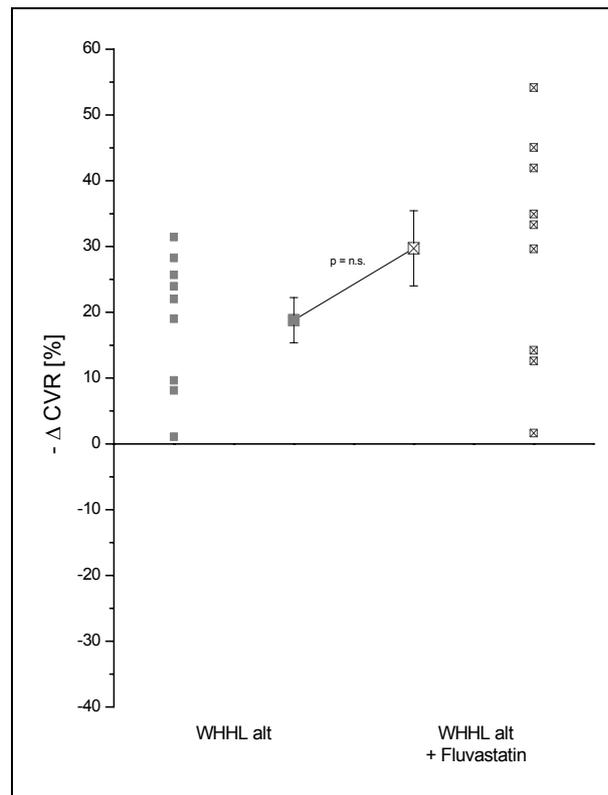


Abbildung 51: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands bei Infusion von $1 \cdot 10^{-5}$ g/ml Fluvastatin bei den alten versus den alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen

4.5 Biochemische Analysen des NO-Stoffwechsels

Im folgenden werden die Ergebnisse der Messungen des Nitrits im Plasma vorgestellt.

4.5.1 Konzentration an Nitrit im Plasma

Junge New Zealand White Kaninchen

Bei den jungen, gesunden Tieren wurden 11 Blutabnahmen vorgenommen. Die Konzentration des Nitrits im Plasma lag im Mittel bei 1088 nmol/l \pm 213 nmol/l (siehe Abbildung 52).

Alte, New Zealand White Kaninchen

Die Untersuchung des Nitritspiegels im Plasma der alten NZW Kaninchen umfasste 16 Blutbestimmungen. Die mittlere Nitritkonzentration lag bei 1002 nmol/l \pm 196 nmol/l (siehe Abbildung 52).

Junge Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

In die Plasmanitrituntersuchung der jungen WHHL Kaninchen gingen 25 Blutuntersuchungen ein. Der Mittelwert lag bei 938 nmol/l \pm 90 nmol/l (siehe Abbildung 52).

Alte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

In die Plasmanitrituntersuchung der alten, hypercholesterolemischen Tiere wurden 4 Untersuchungen des Bluts mit eingeschlossen. Der Mittelwert lag bei 447 nmol/l \pm 115 nmol/l (siehe Abbildung 52).

Alte, mit Fluvastatin behandelte Watanabe Heritable Hyperlipidemic Kaninchen

Der mittlere Nitritspiegel im Plasma der 9 untersuchten Blutproben lag bei den alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen bei 917 nmol/l \pm 105 nmol/l (siehe Abbildung 52).

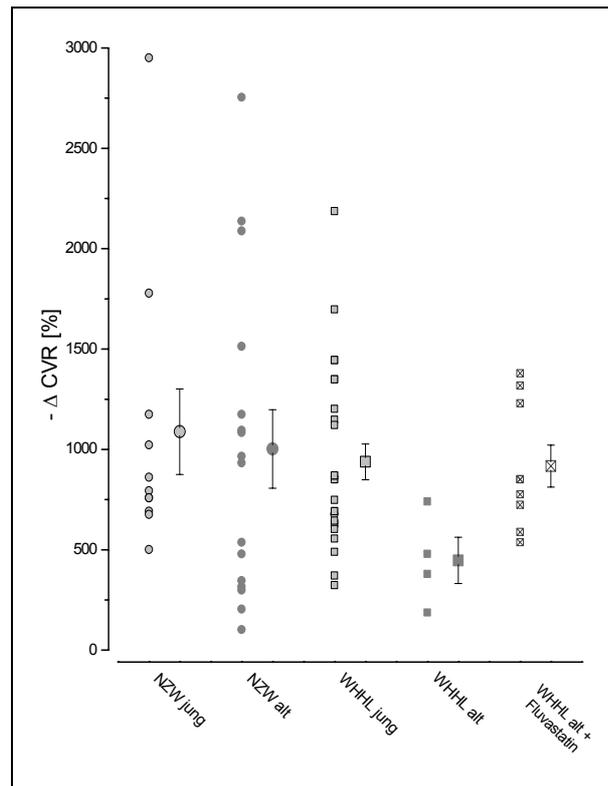


Abbildung 52: Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Nitrit-Konzentration im Plasma der unterschiedlichen Kaninchenkollektive

4.5.1.1 Vergleiche der Konzentration von Nitrit im Plasma

Im folgenden werden die in Abbildung 52 dargestellten Ergebnisse der Untersuchungen des Nitrits paarweise gegenübergestellt.

Altersabhängigkeit

Bei der Gegenüberstellung der jungen NZW Kaninchen ($1088 \text{ nmol/l} \pm 213 \text{ nmol/l}$) mit den alten NZW Kaninchen ($1002 \text{ nmol/l} \pm 192 \text{ nmol/l}$) ergab sich kein Unterschied in der Konzentration von Nitrit im Plasma (siehe Abbildung 53).

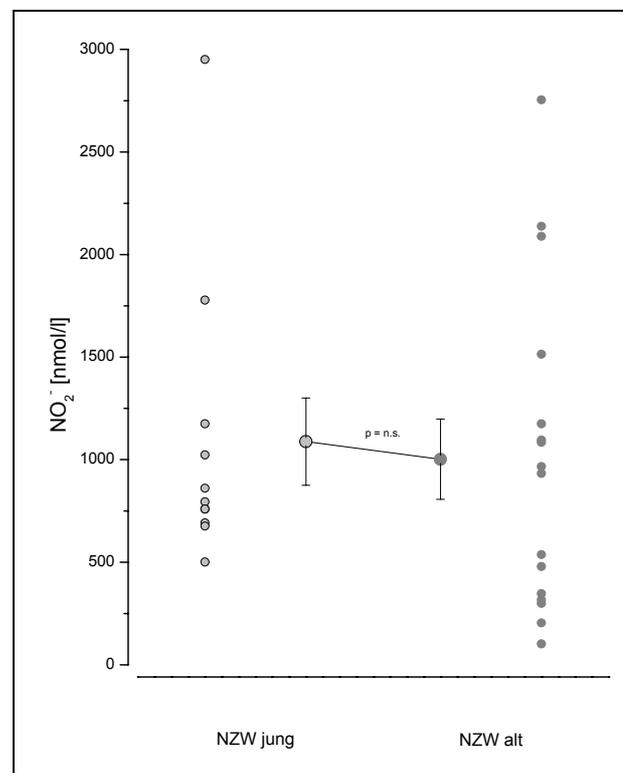


Abbildung 53: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Nitrit-Konzentration im Plasma bei den jungen versus den alten NZW Kaninchen

Altersabhängigkeit bei Hypercholesterolämie

Beim Vergleich der jungen WHHL Kaninchen ($938 \text{ nmol/l} \pm 90 \text{ nmol/l}$) mit den alten WHHL Kaninchen ($447 \text{ nmol/l} \pm 115 \text{ nmol/l}$) zeigte sich dagegen eine signifikante Verringerung ($p=0,0119$) der Konzentration von Nitrit im Plasma (siehe Abbildung 54).

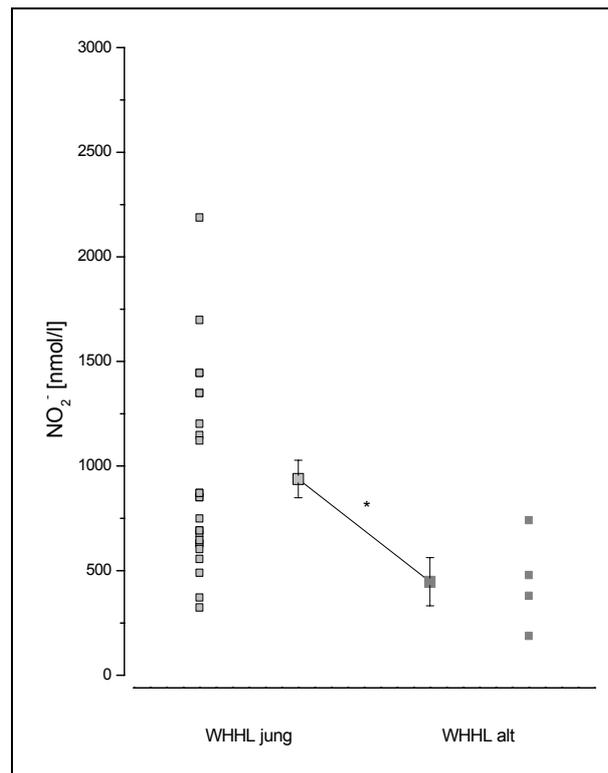


Abbildung 54: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Nitrit-Konzentration im Plasma bei den jungen versus den alten WHHL Kaninchen

* signifikanter Unterschied in der Plasmanitritkonzentration ($p<0,05$)

Normo- versus Hypercholesterolämie

Bestätigt wird diese Beobachtung bei der Betrachtung des Vergleichs in Abbildung 55. Hier sind die alten NZW Kaninchen ($1002 \text{ nmol/l} \pm 196 \text{ nmol/l}$) den alten WHHL Kaninchen ($447 \text{ nmol/l} \pm 115 \text{ nmol/l}$) gegenübergestellt. Die hyperlipoproteinämischen Tiere weisen im Alter eine um mehr als die Hälfte erniedrigte Konzentration an Nitrit im Plasma auf.

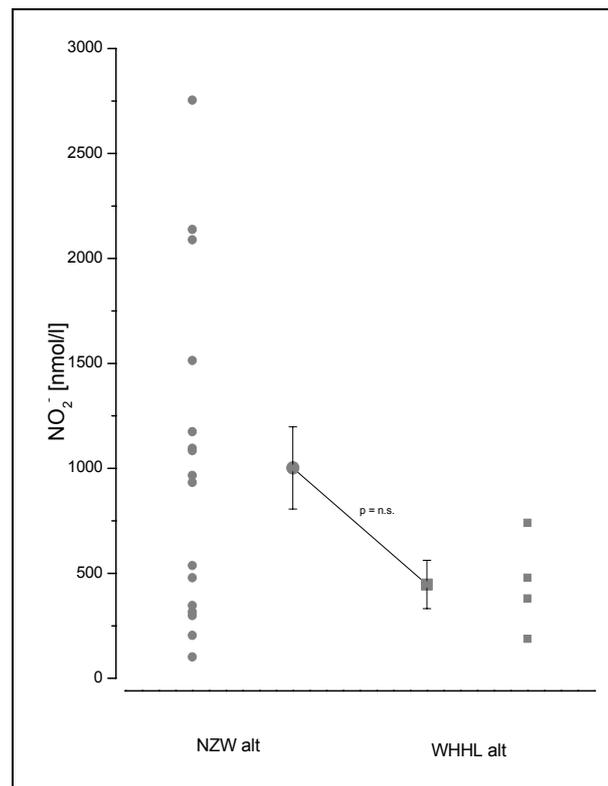


Abbildung 55: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Nitrit-Konzentration im Plasma bei den alten NZW Kaninchen versus den alten WHHL Kaninchen

Behandlung mit Fluvastatin

Behandelt man die Kaninchen mit Fluvastatin lässt sich der Verminderung des Nitritspiegels im Plasma entgegenwirken. Die Konzentration von Nitrit im Plasma, der mit Fluvastatin behandelten Tiere, liegt mit einem Wert von $917 \text{ nmol/l} \pm 105 \text{ nmol/l}$ im vergleichbarem Bereich, wie der Nitritspiegel im Plasma der altersgleichen NZW Kaninchen ($1002 \text{ nmol/l} \pm 196 \text{ nmol/l}$) (siehe Abbildung 56).

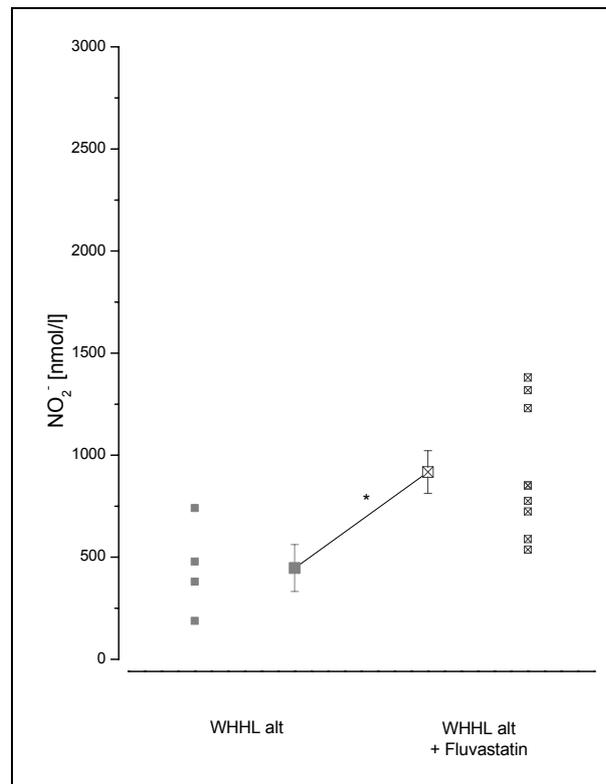


Abbildung 56: Vergleich der Einzel- (kleine Symbole) und Mittelwerte (große Symbole mit Standardfehler) der Nitrit-Konzentration im Plasma bei den alten versus den alten, mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen

- signifikanter Unterschied in der Plasmanitritkonzentration ($p < 0,05$)

4.6 Zusammenfassung

Insgesamt wurden die Auswirkungen von Alterung und Hypercholesterolämie auf die Hämodynamik der Mikrostrombahn und Makrostrombahn untersucht. Diese korrelieren mit den Veränderungen der Nitritkonzentration im Plasma bedingt durch Hypercholesterolämie. Des Weiteren wurden die Auswirkungen von einer Behandlung der Hypercholesterolämie mit Fluvastatin geprüft.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es den Zusammenhang zwischen der veränderten Gefäßfunktion bei der Hyperlipoproteinämie und die Einflussnahme auf diese bei akuter bzw. chronischer Gabe von Fluvastatin zu beurteilen.

Im den folgenden Abschnitten wird über die Ursache der Verbesserung der endothelialen Funktion durch den Einsatz des HMG-CoA Reduktasehemmers diskutiert. Der Abschnitt 5.1 geht auf die vorgenommenen Untersuchungen des Bluts zur Überprüfung des angewandten Kaninchenmodells ein. Die Abschnitte 5.2 und 5.4 behandeln die Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchungen an isolierten Aortensegmenten (Abschnitt 5.2) und am isoliert perfundierten Herzen (Abschnitt 5.4). Eine Beurteilung der pathologischen Veränderungen der Aorten erfolgt in Abschnitt 5.3. Im abschließenden Abschnitt 5.5 werden die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen der Konzentration des Nitrits im Plasma als Parameter für Reaktivitätsveränderungen der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase diskutiert.

5.1 Stoffwechseluntersuchungen

Auf Grund der Tatsache, dass die Angaben zu den Untersuchungen des Bluts bei NZW und WHHL Kaninchen in der Literatur sehr inhomogen sind, ist eine Beurteilung der Werte schwierig. Daher war die Blutwertbestimmung jeweils mit internem Referenzkollektiv erforderlich.

Auffällig bei der Auswertung der *Serumlipide* sind die Unterschiede zwischen den NZW und den WHHL Kaninchen. Hier findet man signifikant unterschiedliche Werte. Dies bestätigt die auch in der Literatur [120] beschriebene Erwartung, dass die WHHL Kaninchen ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Hypercholesterolämie sind.

Bei den Natrium-, Kalium- und Calcium-Werten (*Elektrolyte*) gab es keine signifikanten Unterschiede, so dass eine Störung des Wasserhaushalts ausgeschlossen werden konnte.

Eine Erhöhung der *Transaminasen* ist assoziiert mit typischen Krankheitserscheinungen, wie Benommenheit, Fressunlust, Futterverweigerung, Atmungsbeschwerden, harte Kotballen und

Gewichtsverlust mit Abmagerung [135;136]. Trotz höherer Leberwerte bei den mit Fluvastatin behandelten Tieren, war das Verhalten aller Kaninchen unauffällig. Daher war kein Therapieabbruch notwendig. Für die Anwendung am Menschen gilt, dass die Fortsetzung der Therapie bei einem Transaminasenanstieg um das dreifache nicht mehr gerechtfertigt ist [47].

Die Angaben über die *Kreatinkinasewerte* in der Literatur sind sehr inhomogen, wodurch eine abschließende Bewertung erschwert wird. Bei den CK-Werten wurden Ausreißer gefunden. Insgesamt waren die betroffenen Kaninchen unauffällig. Sie hatten ein normales Aussehen und Verhalten. Aus diesem Grund wurden sie mit in die weitere Bewertung aufgenommen.

Zusammenfassend kann für alle Kaninchen ein guter Allgemeinzustand (beobachtet wurden unter anderem ein normales Verhalten, keine Veränderungen in der Häufigkeit und Beschaffenheit der Ausscheidungen sowie eine normale Futteraufnahme und ein glänzendes Fell) bestätigt werden. Außerdem waren die Streuungen der Untersuchungsergebnisse bei den unterschiedlichen Tierkollektiven innerhalb des Versuchszeitraums gering. Die in dieser Versuchsreihe gefundenen Ergebnisse liegen im physiologischen Bereich. Erkrankungen der Tiere können weitgehend ausgeschlossen werden.

5.2 Aorta

Altersabhängigkeit

Bei den untersuchten New Zealand White (NZW) Kaninchen kommt es bei Gabe des endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin (ACh) im Alter zu einer Einschränkung der dilatatorischen Kapazität (siehe Abbildung 18). In Übereinstimmung mit der Literatur [16;19] wird bei der Gabe höherer Dosen von ACh eine Vasokonstriktion (Rekonstriktion) beobachtet.

Beim endothelunabhängigen Glyceroltrinitrat (GTN) ist das, wie zu erwarten war [9], nicht der Fall (siehe Abbildung 27).

Es kann geschlussfolgert werden, dass es sich um eine altersabhängige Verschlechterung der Endothelfunktion handelt.

Altersabhängigkeit bei Hypercholesterolämie

Analog dazu wurden die jungen WHHL Kaninchen den alten WHHL Kaninchen gegenübergestellt (siehe Abbildung 19). In der Literatur wurde beschrieben, dass schon bei neugeborenen WHHL Kaninchen eine vermehrte Adhäsion von Leukozyten und Schaumzellen festgestellt werden konnte. In Bereichen der Aorta sind vermehrt glatte Muskelzellen in der Intima zu finden [117].

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass schon bei den jungen Tieren eine eingeschränkte Dilatation der Aorta zu beobachten war. Es konnte folglich angenommen werden, dass sich schon bei den jungen WHHL Kaninchen die Folgen der Hyperlipoproteinämie auswirken.

Auf Grund der Tatsache, dass schon die Aorten der jungen Tiere nur wenig auf den Dilatator Acetylcholin reagierten, war auch im Alter keine vermehrte Dilatation durch ACh zu erwarten. Die im Vergleich zu den NZW Kaninchen beobachtete nur geringe altersabhängige Verschlechterung der endothelialen Funktion bei den Tieren mit Hypercholesterolämie stützt diese Interpretation.

Bei der Betrachtung der glatten Gefäßmuskelzellen der Leitungsarterien wird in den meisten Studien eine unverminderte Antwort auf hohe Dosen endothelunabhängiger Dilatatoren beobachtet [137;138]. Allerdings konnte auch, zumindest bei mit Cholesterol gefütterten Kaninchen, eine Beeinträchtigung der Dilatation nachgewiesen werden [139]. Diese Aussage von Verbeuren et al. wird jedoch in der gleichen Arbeit relativiert, indem gesagt wird, dass eine komplette Relaxation unter GTN bei einer entsprechend hohen Konzentration doch erreicht werden kann. Wie aus Abbildung 28 ersichtlich wird, kann hier bestätigt werden, dass es nicht zu einer signifikanten altersabhängigen Verringerung der endothelunabhängigen Antwort kommt. Die leichte, nicht signifikante Verschiebung der Dilatationskurve der alten Kaninchen deutet darauf hin,

dass bei einem entsprechenden Schweregrad der Plaqueansammlung die physiologische Funktionsfähigkeit der Aorta, d.h. die Fähigkeit zur Dilatation, gestört sein kann.

Normo- versus Hypercholesterolämie

Obwohl in dieser Studie die Dilatation der Aorten der WHHL Kaninchen durch das GTN (siehe Abbildung 29) eher als die durch ACh (siehe Abbildung 20) hervorgerufene Dilatation den Dilatationskurven der gesunden Tiere entsprach, wurde dennoch nicht- auch nicht bei den höchsten Dosen von $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l- das Level der NZW Kaninchen erreicht. Erklärt werden können diese eingeschränkten Antworten durch die massive atherosklerotische Beeinträchtigung der Aorten der hyperlipoproteinämischen Tiere. Die massive Plaqueansammlung könnte eine komplette Relaxation verhindern.

Behandlung mit Fluvastatin

Frühere Studien, sowohl am Menschen [137] wie auch am WHHL Kaninchen [125;140;141], haben einen positiven Effekt der HMG-CoA Reduktasehemmer auf die endothelabhängige Vasodilatation gezeigt. Bei der Gegenüberstellung der hypercholesterolämischen Tieren mit und ohne Behandlung mit dem CSE-Hemmer Fluvastatin wurde, in Übereinstimmung mit diesen Studien, eine wesentliche Verbesserung der dilatatorischen Kapazität sichtbar (siehe Abbildung 21). Eine denkbare Begründung könnte der positive Einfluss des Statins auf die Regulierung des durch das Endothel freigesetzten Stickstoffmonoxids sein. Es erscheint wahrscheinlich, dass Fluvastatin der Beeinträchtigung der NO-Synthese entgegenwirkt. Damit ist es wahrscheinlich, dass Fluvastatin einen positiven Einfluss auf die Regulierung des durch das Endothel freigesetzten Stickstoffmonoxids hat. Die Reduzierung des EDRF bei pathologischen Veränderungen wird korrigiert. Die Vermutung der antiatherosklerotischen Wirkung des Fluvastatins würde damit bestätigt.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte der Einfluss des Fluvastatins auf die bei der Hyperlipoproteinämie gestörte Fibrinolyse sein. Die Steigerung der fibrinolytischen Aktivität der Endothelzellen bei Behandlung mit Fluvastatin verlangsamt die Progression der Atherosklerose. Infolgedessen ließe sich die verbesserte dilatatorische Kapazität unter Einfluss des CSE-Hemmers erklären.

Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit eine ausgeprägt stärkere Relaxation unter dem endothelunabhängigen GTN gezeigt werden (siehe Abbildung 30). Die maximale Dilatation bei den mit Fluvastatin behandelten Tieren war doppelt so stark ausgeprägt als bei den Tieren ohne Behandlung. Dieser Effekt könnte möglicherweise mit einer Verminderung von atherosklerotischer Plaque, welche die Aortendilatation stark behindert, in Zusammenhang stehen.

Daneben könnte eine durch die Statine vorgerufene Hemmung von Entzündungsmediatoren eine wichtige Rolle für die Wiederherstellung der Funktion sowohl der endothelabhängigen als auch der glattmuskulären Dilatation spielen.

Außerdem ist bekannt, dass NO die lösliche Guanylatcyclase (sGC) aktiviert, die cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) als sekundären Botenstoff synthetisiert. Das cGMP stimuliert wiederum zwei Proteinkinasen (PK I, PK II) von denen hauptsächlich die PK I für die nachfolgende Phosphorylierung verschiedener Membranproteine des sarkoplasmatischen Retikulums verantwortlich ist. Die Phosphorylierung führt letztendlich zur Senkung der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Dadurch wird die Relaxation der glatten Muskelzellen und eine Hemmung der Plättchenaggregation vermittelt [142]. Möglicherweise ist es so, dass das Fluvastatin in der Lage ist, den konstriktischen Effekt von Phenylephrin, welcher durch Erhöhung des freien intrazellulären Calciums gekennzeichnet ist, aufzuheben. Es ist somit wahrscheinlich, dass Fluvastatin das cGMP anregt. Es kommt zu einer Verminderung des freien Calciums und infolgedessen zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen.

Einen weiteren Erklärungsansatz diskutieren Brandes et al. [143]. Sie beschreiben, dass durch ein chronisches Defizit von NO, wie es bei NO-Synthase eNOS^{-/-} knock-out-Mäusen der Fall ist, oder auch ein akutes NO-Defizit durch Blockade der NO-Bildung bei Wildtypmäusen zu einer veränderten NO-Sensitivität kommt. Es kommt zu einer Hypersensitivität der sGC, was wiederum mit einer verstärkten Relaxation der glatten Muskelzellen als Antwort auf NO-Vasodilatoren einhergeht. Es wäre möglich, dass die in den Versuchen dieser Arbeit beobachtete verstärkte Dilatation mit dieser Hypersensitivität erklärt werden könnte.

5.3 Histopathologie

Behandlung mit Fluvastatin

Bei der Beurteilung der Plaqueausdehnung und der Intima-Media-Dicke (IMT) spielt die Höhe der Cholesterolsenkung eine entscheidende Rolle. Der Grad der Plaqueminderung hängt maßgeblich von der Höhe der Cholesterolsenkung ab [144].

Obwohl die Cholesterolreduktion bei den WHHL durch die Behandlung mit Fluvastatin 23 % betrug, war der absolute Cholesterolspiegel immer noch fast 15 mal so hoch wie bei den NZW Kaninchen (siehe Tabelle 8).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass sowohl bei der Plaquequantifizierung als auch bei der Bestimmung der Intima-Media-Dicke nur eine positive Tendenz nicht aber ein signifikanter Unterschied bei der Gegenüberstellung der mit Fluvastatin behandelten versus der nicht mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen nachgewiesen werden konnte.

Analog zu den hier gefundenen Ergebnissen stellten auch Watanabe et al [140] keine signifikante Reduzierung des atherosklerotischen Plaques durch Behandlung mit Pravastatin in der Aorta bei WHHL Kaninchen fest. Sie nehmen an, dass sich die Atherosklerose in Aorten bei niedrigeren Serumcholesterolspiegeln entwickelt.

Vermuten lässt sich, dass sich die Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaque verändert hat. Es sind jedoch weitere

Untersuchungen zu den pathologischen Veränderungen der Aorten für das Verständnis dieser Vorgänge notwendig.

5.4 Herz

Altersabhängigkeit

In der Literatur wird sowohl für den Menschen[145] als auch für andere Spezies, wie Nager [146], eine Beeinträchtigung der dilatatorischen Kapazität der Mikrostrombahn durch Acetylcholin mit zunehmendem Alter beschrieben. In dieser Arbeit konnte in Übereinstimmung dazu gezeigt werden, dass bei Gabe von ACh der koronarvaskuläre Widerstand (CVR) sinkt. Bei älteren Tieren ist die CVR Abnahme geringer als bei jungen Tieren (siehe Abbildung 38).

Bei den vorliegenden Versuchen erkennt man eine deutliche Zunahme der pathologischen Konstriktionen mit dem Alter. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die meisten Koronararterien der älteren Versuchstiere ein geschädigtes Endothel haben. Die Tatsache, dass die Antwort auf Glyceroltrinitrat (GTN) unverändert war (siehe Abbildung 43) unterstützt die Hypothese des Zusammenspiels zwischen direkter Vasokonstriktion und vom EDRF vermittelter Vasodilatation. Erklärungsmöglichkeiten für die verminderte Abnahme des CVR bei Infusion vom endothelabhängigen ACh sind eine eingeschränkte Freisetzung des Stickstoffmonoxids (EDRF) sowie eine erhöhte Sensitivität der glatten Muskelzellen im atherosklerotisch veränderten Bereich auf den kontraktile Effekt des AChs.

Bei allen akuten interkoronaren Infusionen von Fluvastatin war die Endkonzentration der Perfusionslösung im Herzlumen 10^{-5} g/ml, was der hundertfachen Plasmakonzentration beim Menschen unter Standardbehandlung (40mg Fluvastatin, oral) entspricht [133]. Es kann bei den Kaninchen bei der dilatatorischen Kapazität keine Altersabhängigkeit (siehe Abbildung 48) signifikant nachgewiesen werden. Es kommt auch nicht zu einer pathologischen Konstriktion. Offensichtlich ist es so, dass

Fluvastatin zumindest bei akuter Infusion keinen Einfluss auf die Endothelfunktion ausübt.

Altersabhängigkeit bei Hypercholesterolämie

Bei der Erfassung der hämodynamischen Veränderungen der isolierten Aortensegmente der hyperlipoproteinämischen Tiere konnte gezeigt werden, dass bereits bei den jungen Tieren nur eine eingeschränkte endothelabhängige Gefäßerweiterung erfolgt (siehe 5.2). Damit einher geht bei den WHHL Kaninchen die Beobachtung von pathologischen Konstriktionen am Herzen bereits im jungen Alter (siehe Abbildung 39). Darüber hinaus nimmt mit fortschreitendem Alter der Anteil an pathologischen Konstriktionen deutlich zu.

Im Bereich der endothelunabhängigen Dilatation wurde auch im Alter bei den WHHL Kaninchen keine signifikante Verschlechterung des koronarvaskulären Widerstands gemessen (siehe Abbildung 44).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass auch für die Einschränkung der dilatatorischen Kapazität des Herzens bei der Hypercholesterolämie die Veränderung der Endothelfunktion von Bedeutung ist. Analog zu den Schlussfolgerungen der altersabhängigen Verminderung der Abnahme des CVR bei den Kontrolltieren legen die hier gefundenen Ergebnisse nahe, dass atherosklerotische Veränderungen zu einer verminderten endothelialen Produktion und/oder verstärkter Inaktivierung des NO führen.

Die Tatsache, dass selbst bei den alten hyperlipoproteinämischen WHHL Kaninchen bei akuter Infusion von Fluvastatin (siehe Abbildung 49) keine pathologische Konstriktion zu erkennen war, bestätigt die oben aufgestellte Vermutung, dass die Vasodilatation durch akut infundiertes Fluvastatin endothelunabhängig erfolgt.

Diese Beobachtung geht mit dem konform, was Obata et al. [147] berichtet haben. Ihrer Aussage zufolge reduziert sowohl akut wie auch chronische gegebenes Fluvastatin die Bildung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen. Dabei soll die LDL-Oxidation nicht durch die NOS-Aktivierung vermittelt werden. Es wird

vielmehr vermutet, dass die LDL-Oxidation mit einer Noradrenalin induzierten Bildung von $\cdot\text{OH}$ in Verbindung steht.

Normo- versus Hypercholesterolämie

Der Anteil der pathologischen Konstriktion unter Gabe von ACh ist bei den WHHL Kaninchen im Alter fast doppelt so hoch wie der der gleichaltrigen Kontrolltiere (siehe Abbildung 40).

Es zeigte sich kein Unterschied in der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands der beiden Kaninchenkollektive bei der Bewertung der endothelunabhängigen Dilatation unter Glyceroltrinitrat (siehe Abbildung 45). Weder bei den alten NZW noch bei den alten WHHL Kaninchen war eine signifikante Verschlechterung des CVR im Alter zu beobachten.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei Hyperlipoproteinämie im Bereich der Mikrostrombahn zu endothelial bedingten Einschränkungen der hämodynamischen Kapazität kommt.

Auch bei der Gegenüberstellung der beiden Tierkollektive unter akuter Infusion von Fluvastatin ergab sich kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 50). Auch dies spricht für eine endothelunabhängig erfolgende Dilatation bei akuter Infusion von Fluvastatin. Dennoch kann über den Mechanismus nur gemutmaßt werden, da die akut infundierte Konzentrationen von Fluvastatin sehr hoch war. Weitere Studien sind notwendig, um über die Signifikanz dieses Endergebnisses zu entscheiden.

Behandlung mit Fluvastatin

Stellt man die mit Fluvastatin behandelten den nicht behandelten Kaninchen gegenüber, lässt sich keine wesentliche Verbesserung der dilatatorischen Kapazität unter Infusion von ACh bzw. GTN in der Mikrostrombahn nachweisen (siehe Abbildung 41 und Abbildung 46). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass mit der Behandlung durch HMG-CoA Reduktasehemmer eine verbesserte Antwort auf ACh nachweisbar war [144;148].

Wichtig ist allerdings, dass Veränderungen in der Plaquegeometrie, der Lipidzusammensetzung und der Thrombenbildungsfähigkeit eine längere Therapiedauer voraussetzen [149]. Dadurch wird deutlich, dass das sichtbare Ergebnis stark von den Versuchsbedingungen und der Versuchsdauer abhängig ist.

Im vorliegenden Fall (siehe Abbildung 41) war der Anteil der pathologischen Konstriktion bei den mit dem Statin behandelten Tieren um fast 15 % geringer. Diese Reduzierung beweist den günstigen Effekt des Fluvastatins auf das Endothel. Die Verringerung von atherosklerotischen Ablagerungen durch die Behandlung mit Fluvastatin führt zu einer Verbesserung der Antwort der Mikrostrombahn auf endotheliale Reize.

Bei der Beobachtung der chronischen Applikation und zusätzlich akuter Infusion von Fluvastatin fällt im Vergleich zu den Tieren ohne Behandlung eine Verstärkung der Abnahme des koronarvaskulären Widerstands auf (siehe Abbildung 51). Die gefundenen Ergebnisse untermauern die Auffassung des wichtigen Einflusses von Fluvastatin auf die LDL-Oxidation.

5.5 NO-Stoffwechsel

Die Autoren früherer Publikationen haben versucht die in vivo NO-Bioverfügbarkeit abzuschätzen. Dazu wurde der NO_x -Gehalt, das bedeutet die Summe von Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-), herangezogen. Allerdings fehlten den Autoren der Nachweis über die Kinetik der Metabolisierung des Stickstoffmonoxids unter physiologischen Bedingungen. In dieser Studie wurde das Nitrit als Hauptabbauprodukt von NO im Kaninchenblut bestimmt. Das Plasmanitrit wurde als Überträger von intravaskulärem NO identifiziert. Entgegen der früheren Auffassung, dass die Nitratkonzentration und/oder die NO_x -Konzentration sinnvolle Marker für die endogene NO-Produktion sind, konnte nachgewiesen werden, dass nur die Nitritplasmakonzentration der adäquate Parameter ist, um endotheliale NO-Synthase-Reaktivitätsveränderungen aufzuzeigen [134]. Durch Inhibition der NOS wurde dosisabhängig das Nitrit und die durch ACh induzierte Vasodilatation reduziert. Der Nitratgehalt dagegen blieb unbeeinflusst. Daraus folgt für diese Studie, dass es korrekt ist, den NO_2^- -Gehalt und nicht

den NO_x-Gehalt mit den hämodynamischen Gefäßveränderungen zu assoziieren.

Altersabhängigkeit

Es konnte keine altersabhängige Veränderung bei den New Zealand White (NZW) Kaninchen dokumentiert werden (siehe Abbildung 53). Es kann gefolgert werden, dass sich die Aktivität der endothelialen NOS bei den untersuchten Kontrollkaninchen im Alter nur minimal oder gar nicht verringerte.

Altersabhängigkeit bei Hypercholesterolämie

Die Hyperlipoproteinämie führt zu einer Minderung der Endothelfunktion [16]. Es ist bekannt, dass ein hoher LDL-Spiegel ein Risikofaktor für die Entwicklung der Atherosklerose ist. Die Mechanismen, wie sich LDL zu der NOS-Regulation verhält sind jedoch noch nicht genau aufgeklärt.

Eine Vermutung ist, dass das LDL die Stickstoffmonoxid-Produktion über eine Veränderung bei der NOS Expression moduliert. Natives LDL spielt dabei keine Rolle. Dagegen soll oxidiertes LDL die endotheliale NOS-Expression hemmen. Dies geschieht über eine Kombination aus einer frühen transkriptionalen Inhibition und noch wichtiger aus einer post-transkriptionalen m-RNA-Destabilisierung. Dadurch kommt es konzentrationsabhängig zu einer Herunter-Regulation der endothelialen NOS mRNA- und Protein-Spiegel [150;151].

Die oben aufgeführten Vermutungen könnten durch die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit experimentell bestätigt werden: Bei den hyperlipoproteinämischen Tieren fiel der Nitritspiegel im Plasma signifikant mit dem Alter (von 938 nmol/l ± 90 nmol/l auf 447 nmol/l ± 115 nmol/l, p<0,05) (siehe Abbildung 54). Das deutet darauf hin, dass zumindest bei langer Exposition zum oxidierten LDL der Stickstoffmonoxid-Spiegel abfällt. Das bei der Hyperlipoproteinämie vermehrt vorhandene oxidierte

LDL beeinträchtigt wahrscheinlich die eNOS mRNA und den Proteinspiegel stark.

Normo- versus Hypercholesterolämie

Auch bei der Gegenüberstellung gleichaltriger Kontrolltiere ($1002 \text{ nmol/l} \pm 192 \text{ nmol/l}$) mit den WHHL Kaninchen ($447 \text{ nmol/l} \pm 115 \text{ nmol/l}$) wurde eine Verminderung der Plasmanitritkonzentration durch die Hyperlipoproteinämie deutlich (siehe Abbildung 55). Setzt man die Nitritwerte mit den bei den Aorten gefundenen Dilatationskurven des AChs in Beziehung, erkennt man den Zusammenhang zwischen der endothelabhängigen Hämodynamik und dem Nitritgehalt. Die durch die Hypercholesterolämie hervorgerufene Beeinträchtigung der Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch das Endothel hat eine Verminderung der Dilatation zur Folge.

Behandlung mit Fluvastatin

Es wurde ein möglicher positiver Einfluss durch eine Behandlung mit dem HMG-CoA Reduktaseinhibitor auf die Wiederherstellung der Bioverfügbarkeit von NO untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Plasmanitrit unter Statinbehandlung von hyperlipoproteinämischen Tieren zunimmt ($447 \text{ nmol/l} \pm 115 \text{ nmol/l}$ vs. $917 \text{ nmol/l} \pm 105 \text{ nmol/l}$) (siehe Abbildung 56). Diese Ergebnisse passen zu den oben dargestellten Ergebnissen der Hämodynamik und Pathophysiologie: Die Verbesserung der endothelialen Antworten auf Acetylcholin nach Behandlung der Hyperlipoproteinämie mit Fluvastatin gehen mit einer höheren endothelialen NOS-Reaktivität einher. Es konnte hier der Beweis geliefert werden, dass die NO-Bioverfügbarkeit unter HMG-CoA Reduktasehemmerbehandlung wiederhergestellt werden kann.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung der hyperlipoproteinämischen Kaninchen mit dem HMG-CoA

Reduktasehemmer Fluvastatin der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen und endotheliale Dysfunktion vorgebeugt werden kann. Die verbesserte dilatatorische Kapazität der Gefäße und die Erhöhung der Nitrit-Konzentration belegen den protektiven Effekt, den der CSE-Hemmer auf die endotheliale Funktion hat.

5.6 Studienlimitation

Gearbeitet wurde mit einem Tiermodell, welches immer nur bedingt auf Menschen übertragbar ist. Trotzdem war die Arbeit am Tier unerlässlich, da Organentnahmen, wie hier durchgeführt, am Menschen schon aus ethischen Gründen undenkbar wären. Gewählt wurde ein Kaninchenmodell mit WHHL Kaninchen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Pathologie und Pathogenese der Atherosklerose beim Kaninchen der Pathologie und Pathogenese des Menschen sehr ähnlich ist [115] und die morphologische Ähnlichkeit zu atherosklerotischem Plaque beim Menschen bei den WHHL Kaninchen sehr ähnlich ist [117].

WHHL Kaninchen weisen sehr stark erhöhte Cholesterinspiegel auf. Die Cholesterolsenkung um 23% war durchaus deutlich. Dennoch war der Cholesterolspiegel immer noch fast 15 fach höher als bei den NZW Kaninchen. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum nur im Trend gezeigt werden konnte, dass die vermehrte Plaquebildung bei Hypercholesterolämie durch Behandlung mit Fluvastatin abgeschwächt werden kann. Trotzdem konnten mit dem angewendeten Modell positive Effekte statistisch signifikant nachgewiesen werden, was für die Potenz des Fluvastatins als HMG Co-A Reduktasehemmer spricht.

Auf Grund des Radikalcharakters von NO ist die Nachweisbarkeit in Blutproben schwierig. Bestimmt wurde Nitrit als Marker für hämodynamische Gefäßveränderungen. Die Proben wurden mit kalter Stopp-Lösung versetzt. So konnte das Nitrit stabilisiert und die Koagulation verhindert werden.

5.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen Hypercholesterolämie, eingeschränkter hämodynamischer Antwort auf Endothel abhängige und Endothel unabhängige Vasodilatoren und verminderter Bildung von NO aufgezeigt werden. Die Behandlung mit Fluvastatin führte zu einer Verbesserung der verringerten hämodynamischen Antwort.

Es sind weitere Versuche notwendig, um den Mechanismus der endothelunabhängigen Dilatation bei kurzfristiger Infusion von Fluvastatin abzusichern. Des weiteren ist es notwendig die Vermutung abzusichern, dass die Behandlung mit Fluvastatin pathologischen Veränderungen, wie die atherosklerotische Plaquebildung und -Zusammensetzung, bei Hypercholesterolämie entgegenwirkt.

Diese Ergebnisse haben eine therapeutische Relevanz für die kardiovaskuläre Pathologie und den Einsatz von Statinen bei der endothelialen Dysfunktion.

6 Zusammenfassung

An der Makrostrombahn konnte gezeigt werden, dass Fluvastatin tatsächlich zu einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion bei der Hyperlipoproteinämie führt. Dies wird durch die signifikante Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation durch Acetylcholin bei Behandlung der hyperlipoproteinämischen Kaninchen mit Fluvastatin deutlich.

Außerdem wurde dargelegt, dass Fluvastatin die glattnuskulär vermittelte Vasodilatation verbessert.

Ursachen für diese Effekte können die Verminderung von Plaque, die Hemmung von Entzündungsmediatoren und die Abschwächung der Zellproliferation und Migration sein. Außerdem könnte eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase, die letztendlich zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen und einer Hemmung der Plättchenaggregation führt, von Bedeutung sein.

Es konnte keine Verbesserung der Hämodynamik der Mikrostrombahn nachgewiesen werden. Der Anteil an pathologischen Konstriktionen verringerte sich.

Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass Fluvastatin einen Abfall der Konzentration an bioaktivem NO verhindert. Die Nitritplasmakonzentration, als Marker für eNOS-Reaktivitätsveränderungen, war bei den mit Fluvastatin behandelten WHHL Kaninchen gegenüber den nicht behandelten Tieren signifikant erhöht.

Eine signifikante Verminderung der Plaqueausdehnung und der Intima-Media-Dicke war unter Fluvastatin-Behandlung nicht nachweisbar. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei den WHHL Kaninchen trotz Cholesterolsenkung der Cholesterolspiegel immer noch um das 15fache erhöht war.

Diese Arbeit veranschaulicht die wichtigsten hämodynamischen, biochemischen und histopathologischen Veränderungen durch die Hypercholesterolämie sowie die günstigen Effekte des CSE-Hemmers Fluvastatin auf diese Veränderungen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Behandlung mit dem potenten HMG-CoA Reduktasehemmer Fluvastatin einen protektiven Effekt gegen das Fortschreiten der vaskulären Dysfunktion im Rahmen der Atherosklerose hat.

7 Literaturverzeichnis

1. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen. 6 ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1991.
2. Auterhoff H, Knabe J, Höltje H-D. Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. 13 ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1994.
3. Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, 1998.
4. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)*. 1980;288:373-376.
5. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med*. 1995;27:331-340.
6. Simon BS. Klinische Bedeutung der gestörten Endothelfunktion. <http://www.uni-marburg.de/herzzentrum/hza9.htm>, Zugriff: Juli 2003. 2003.
7. Kelm M, Rath J. Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-arginine-NO pathway. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:107-127.
8. Kelm M, Preik M, Hafner DJ et al. Evidence for a multifactorial process involved in the impaired flow response to nitric oxide in hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Hypertension*. 1996;27:346-353.
9. Chauhan A, More RS, Mullins PA et al. Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:1796-1804.

10. Dalloz F, Maupoil V, Lecour S et al. In vitro studies of interactions of NO donor drugs with superoxide and hydroxyl radicals. *Mol Cell Biochem.* 1997;177:193-200.
11. Kelm M. Nitric Oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411:273-289.
12. Kelm M, Dahmann R, Wink D et al. The nitric oxide/superoxide assay. *J Biol Chem.* 1997;272:9922-9932.
13. Bandoh T, Mitani H, Niihashi M et al. Fluvastatin suppresses atherosclerotic progression, mediated through its inhibitory effect on endothelial dysfunction, lipid peroxidation, and macrophage deposition. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35:136-144.
14. Ross R. Atherosclerosis: Current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc.* 1993;25:2041-2943.
15. Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. *Circulation (Dallas TX).* 1992;85:1927-1938.
16. Jayakody L, Kappagoda T, Senaratne MPJ et al. Impairment of endothelium-dependent relaxation: an early marker for atherosclerosis in the rabbit. *Br J Pharmacol.* 1988;94:335-346.
17. Badimon L, Badimon JJ, Penny W et al. Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens Suppl.* 1992;10:S43-S50.
18. Braunwald E. Heart disease a textbook of cardiovascular medicine. 1988.
19. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315:1046-1051.

20. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Suppl 4:S1-14.
21. Stickstoffmonoxid als kardiovaskulärer Botenstoff. *DAZ*. 1998;138:48.
22. Kolodgie FD, Virmani R, Rice HE et al. Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque. A study in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ Res*. 1990;66:1112-1126.
23. Eggen DA, Solberg LA. Variation of atherosclerosis with age. *Lab Invest*. 1968;18:571-579.
24. Tanaka H, Dineno FA, Monahan KD et al. Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation (Dallas TX)*. 2000;102:1270-1275.
25. Egashira K, Inou T, Hirooka Y et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation (Dallas TX)*. 1993;88:77-81.
26. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature (London)*. 2000;407:233-241.
27. Cremer P, Muche R. Göttinger Risiko-, Inzidenz- und Prävalenzstudie (GRIPS). Empfehlungen zur Prävention der koronaren Herzkrankheit. *Ther Umsch*. 1990;47:482-491.
28. Herold G. Innere Medizin. 2003.
29. Deutsche Gesellschaft für Angiologie GfG. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Angiologie- Gesellschaft für Gefäßmedizin: Diagnostik und Therapie der arteriellen Verschlusskrankheit der Becken-Beinarterien. <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/11/iang-001.htm>, Zugriff: April 2003. 2001.

30. Hinterreiter F. Gefäßchirurgie. http://www.hinterreiter-gefaesschirurgie.at/text/gefaesschirurgie/frameset_gefaess.html, Zugriff: April 2003. 2000.
31. American Heart Association. What Are Healthy Levels of Cholesterol? <http://www.americanheart.org>, Zugriff: Juni 2003. 2003.
32. Jones P, Kafonek S, Laurora I et al. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol*. 1998;81:582-587.
33. Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH et al. Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:678-682.
34. Bertsche T, Schulz M. Ezetimib hemmt die Cholesterolresorption. *DAZ*. 2003;148:16-18.
35. Stefanec G. Prädiktionsparameter extrakorporaler Eliminationstherapien am Modell der LDL-Apherese. 1999.
36. Kelm M, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion: Therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist (Berlin)*. 1999;40:1300-1307.
37. Osborne JA, Siegman MJ, Sedar AW et al. Lack of endothelium-dependent relaxation in coronary resistance arteries of cholesterol-fed rabbits. *Am J Physiol (Cell Physiol)*. 1989;256:C591-C597.
38. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B et al. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*. 1993;92:652-662.

-
39. Endo A, Kuroda M. Citrinin, an inhibitor of cholesterol synthesis. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976;29:841-843.
 40. ABDATA Pharma-Daten-Service. Pharmazeutische Stoffliste. 13. 2002.
 41. Wichtige Mitteilungen: Cerivastatin-haltige Arzneimittel. *DAZ*. 2001;141:3836.
 42. Geschäftsbericht 2001 der Firma Bayer- Performance through People. 2002.
 43. Hamelin BA, Turgeon J. Hydrophilicity/ lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*. 1998;19:26-37.
 44. Moghadasian MH. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci*. 1999;65:1329-1337.
 45. Davidson MH. Safety profiles for the HMG-CoA reductase inhibitors: treatment and trust. *Drugs (Auckland)*. 2001;61:197-206.
 46. Hellwig B. Rhabdomyolyse - Nebenwirkung mit Todesfolge. *DAZ*. 2001;141:28-31.
 47. AstraZeneca. Cranoc 20/40. *Fachinformation*. 2001.
 48. Rote Liste. Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main, 2001.
 49. Rote Liste. Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main, 2002.
 50. Arning M, Brauer KG, Rotta C. Scribas Tabelle der verschreibungspflichtigen Mittel und Gegenstände nach

- bundesrechtlichen Vorschriften. 81. 2002. Deutscher Apotheker Verlag.
51. Dr.Steiner. mündliche Informationen der Firma Bayer. 2001.
52. Igel M, Sudhop T, von Bergmann K. Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin. *J Clin Pharmacol.* 2002;42:835-845.
53. Astra Zeneca. Summary of the product characteristics- Crestor™. 6-11-2002.
54. Wagner U. Statine in der Diskussion. *PZ.* 2002;147:86-88.
55. White CM. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *J Clin Pharmacol.* 2002;42:963-970.
56. Sparks DL, Connor DJ, Browne PJ et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) in the treatment of Alzheimer's disease and why it would be ill-advise to use one that crosses the blood-brain barrier. *J Nutr Health Aging.* 2002;6:324-331.
57. Laufs U, Gertz K, Dirnagl U et al. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res.* 2002;942:23-30.
58. The Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Design and baseline results of the Scandinavian Simvastatin Survival Study of patients with stable angina and/or previous myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1993;71:393-400.
59. Brown G, Albers JJ, Fisher LD et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid- lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med.* 1990;323:1289-1298.

-
60. The West of Scotland Coronary Prevention Study group. A coronary primary prevention study of Scottish men aged 45-64 years: trial design. The West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *J Clin Epidemiol.* 1992;45:849-860.
 61. Pitt B, Ellis SG, Mancini GB et al. Design and recruitment in the United States of a multicenter quantitative angiographic trial of pravastatin to limit atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC I). *Am J Cardiol.* 1993;72:31-35.
 62. The Pravastatin Multinational Study Group. Effects of pravastatin in patients with serum total cholesterol levels from 5.2 to 7.8 mmol/liter (200 to 300 mg/dl) plus two additional atherosclerotic risk factors. The Pravastatin Multinational Study Group for Cardiac Risk Patients. *Am J Cardiol.* 1993;72:1031-1037.
 63. MAAS Investigators. Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti- Atheroma Study (MAAS). *Lancet (London).* 1994;344:633-638.
 64. Waters D, Higginson L, Gladstone P et al. Effects of monotherapy with an HMG-CoA reductase inhibitor on the progression of coronary atherosclerosis as assessed by serial quantitative arteriography. The Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial. *Circulation (Dallas TX).* 1994;89:959-968.
 65. The LIPID study group. Design features and baseline characteristics of the LIPID (Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease) Study: a randomized trial in patients with previous acute myocardial infarction and/or unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 1995;76:474-479.

-
66. Byington RP, Furberg CD, Crouse JR, III et al. Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries (PLAC- II). *Am J Cardiol.* 1995;76:54C-59C.
 67. Zavoral JH, Haggerty BJ, Winick AG et al. Efficacy of fluvastatin, a totally synthetic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. FLUENT Study Group. Fluvastatin Long- Term Extension Trial. *Am J Cardiol.* 1995;76:37A-40A.
 68. Windler E, Greten H. Lipidtherapie- Ziel und Nutzen in der Prävention der koronaren Herzkrankheit. *Internist (Berl).* 1996;37:1244-1248.
 69. What's What- Leitfaden der Herz-Kreislauf-Prüfungen. 3. ed. 1998.
 70. Bellosta S, Ferri N, Bernini F et al. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med.* 2000;32:164-176.
 71. Laufs U, La Fata V, Plutzky J et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation (Dallas TX).* 1998;97:1129-1135.
 72. Bjorkerud B, Bjorkerud S. Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:416-424.
 73. Broze GJ, Jr. The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. *Semin Hematol.* 1992;29:159-169.
 74. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.

75. Hoffman R, Brook GJ, Aviram M. Hypolipidemic drugs reduce lipoprotein susceptibility to undergo lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis (Limerick)*. 1992;93:105-113.
76. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U et al. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:61-69.
77. Obata T, Yamanaka Y. Protective effect of fluvastatin, a new inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, on MPP(+)-induced hydroxyl radical in the rat striatum. *Brain Res*. 2000;860:166-169.
78. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1998;101:2711-2719.
79. Giroux LM, Davignon J, Naruszewicz M. Simvastatin inhibits the oxidation of low-density lipoproteins by activated human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1165:335-338.
80. Suzumura K, Yasuhara M, Tanaka K et al. Protective effect of Fluvastatin Sodium (XU-62-320), a 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, on oxidative modification of human low-density lipoprotein in vitro. *Biochem Pharmacol*. 1999;57:697-703.
81. Kano H, Hayashi T, Sumi D et al. A HMG-CoA reductase inhibitor improved regression of atherosclerosis in the rabbit aorta without affecting serum lipid levels: possible relevance of up-regulation of

- endothelial NO synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259:414-419.
82. Aviram M, Hussein O, Rosenblat M et al. Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;31:39-45.
83. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (London)*. 1987;327:524-526.
84. Ragazzi E, Chinellato A, De Biasi M et al. Endothelium-dependent relaxation, cholesterol content and high energy metabolite balance in Watanabe hyperlipemic rabbit aorta. *Atherosclerosis (Limerick)*. 1989;80:125-134.
85. Senaratne MPJ, Thomson ABR, Kappagoda T. Lovastatin prevents the impairment of endothelium dependent relaxation and inhibits accumulation of cholesterol in the aorta in experimental atherosclerosis in rabbits. *Cardiovasc Res*. 1991;25:568-578.
86. Griffith TM, Lewis MJ, Newby AC et al. Endothelium-derived relaxing factor. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:797-806.
87. John S, Jakobi J, Schneider M et al. Rasche Verbesserung der Endothelfunktion durch lipidsenkende Therapie mit Cerivastatin innerhalb von zwei Wochen. *Perfusion*. 2000;Abstracts: Forschungswerkstatt Cerivastatin:412-413.
88. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. 1998;273:24266-24271.

-
89. Laufs U, Endres M, Custodis F et al. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation (Dallas TX)*. 2000;102:3104-3110.
 90. Ferro D, Parrotto S, Basili S et al. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:427-431.
 91. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:115-121.
 92. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation (Dallas TX)*. 1995;91:2844-2850.
 93. Kimura M, Kurose I, Russell J et al. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1521-1526.
 94. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA et al. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998;102:145-152.
 95. Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:2057-2064.
 96. Niwa S, Totsuka T, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol*. 1996;18:669-675.

97. Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2894-2900.
98. Weber C, Erl W, Weber KS et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b- dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:1212-1217.
99. Soma MR, Donetti E, Parolini C et al. HMG-CoA Reduktasehemmer: In-vivo Wirkungen auf die Verdickung der Karotis-intima bei Kaninchen mit normalem Cholesterinspiegel. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:571-578.
100. Corsini A, Bellosta S, Baetta R et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther (Oxford).* 1999;84:413-428.
101. Pauletto P, Puato M, Faggin E et al. Low-dose cerivastatin inhibits spontaneous atherogenesis in heterozygous watanabe hyperlipidemic rabbits. *J Vasc Res.* 2000;37:189-194.
102. Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res.* 1998;83:490-500.
103. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation (Dallas TX).* 1995;92:657-671.
104. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* 1995;77:863-868.

-
105. Bellosta S, Via D, Canavesi M et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1671-1678.
106. Mussoni L, Banfi C, Sironi L et al. Fluvastatin inhibits basal and stimulated plasminogen activator inhibitor 1, but induces tissue type plasminogen activator in cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2000;84:59-64.
107. Essig M, Nguyen G, Prie D et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res.* 1998;83:683-690.
108. Essig M, Vrtovsnik F, Nguyen G et al. Lovastatin modulates in vivo and in vitro the plasminogen activator/plasmin system of rat proximal tubular cells: role of geranylgeranylation and Rho proteins. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:1377-1388.
109. Peters T. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Academic Press, 1995.
110. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M et al. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1590-1596.
111. Langtry HD, Markham A. Fluvastatin- A review of its use in lipid disorders. *Drugs (Auckland).* 1999;57:583-606.
112. Mariani M, Kaski JC. Nicht Lipid-bezogene Mechanismen der Statine zur Verminderung kardialer Ereignisse. *The European cardiologist-Journal by Fax.* 2000;64.

113. Ayajiki K, Ozaki M, Shiomi M et al. Comparison of endothelium-dependent relaxation in carotid arteries from Japanese white and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36:622-630.
114. Shiode N, Kato M, Hiraoka A et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels in hypercholesterolemic patients. *Intern Med*. 1996;35:89-93.
115. Finking G, Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis (Limerick)*. 1997;135:1-7.
116. Nolte CJ, Tercyak AM, Wu HM et al. Chemical and physiochemical comparison of advanced atherosclerotic lesions of similar size and cholesterol content in cholesterol-fed New Zealand White and Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits. *Lab Invest*. 1990;62:213-222.
117. Allev G, Burnstock G. Watanabe rabbits with heritable hypercholesterolaemia: a model of atherosclerosis. *Histol Histopathol*. 1998;13:797-817.
118. Mitani H, Bandoh T, Ishikawa J et al. Inhibitory effects of fluvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, on the increase in vascular ACE activity in cholesterol-fed rabbits. *Br J Pharmacol*. 1996;119:1269-1275.
119. Tanguay M, Blaise G, Dumont L et al. Beneficial effects of volatile anesthetics on Decrease in coronary flow and myocardial contractility induced by oxygen-driven free radicals in isolated rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;18:863-870.

-
120. Kurokawa J, Hayashi K, Toyota Y et al. High dose of fluvastatin sodium (XU62-320), a new inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, lowers plasma cholesterol levels in homozygous Watanabe-heritable hyperlipidemic rabbits. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1259:99-104.
121. Shiomi M, Shiraishi M, Yata T et al. Effect of fluvastatin sodium on secretion of very low density lipoprotein and serum cholesterol levels. In vivo study using low density lipoprotein receptor deficient watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arzneimittelforschung*. 1994;44:1154-1156.
122. Greiling H, Gressner AM. Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3 ed. 1995.
123. Sun YP, Lu NC, Parmley WW et al. Effects of cholesterol diets on vascular function and atherogenesis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;224:166-171.
124. Lehr HA, Sagban TA, Ihling C et al. Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation (Dallas TX)*. 2001;104:914-920.
125. Shiomi M, Ito T, Tsukada T et al. Reduction of serum cholesterol levels alters lesional composition of atherosclerotic plaques. Effect of pravastatin sodium on atherosclerosis in mature WHHL rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1938-1944.
126. Shiomi M, Ito T. Effect of cerivastatin sodium, a new inhibitor of HMG-CoA reductase, on plasma lipid levels, progression of atherosclerosis, and the lesional composition in the plaques of WHHL rabbits. *Br J Pharmacol*. 1999;126:961-968.

-
127. Dalessandri KM, Lantz BM, Tsukamoto H et al. Superior mesenteric artery vasoactivity in hyperlipidemic Watanabe rabbits versus normal lipidemic New Zealand controls. *J Invest Surg.* 1989;2:471-477.
128. Weibarth S, Flatt R, Kraus A. The biology of the laboratory rabbit. Academic Press, 1974.
129. Hewitt CD, Innes DJ, Savory J et al. Normal biochemical and hematological values in New Zealand white rabbits. *Clin Chem.* 1989;35:1777-1779.
130. Lindena J, Trautschold I. Catalytic enzyme activity concentration in plasma of man, sheep, dog, cat, rabbit, guinea pig, rat and mouse. Approach to a quantitative diagnostic enzymology, I. Communication. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986;24:11-18.
131. Döring HJ, Dehnert H. Das isolierte perfundierte Herz nach Langendorff. 1 ed. Biomesstechnik-Verlag March GmbH, 1985.
132. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Archiv der Physiologie.* 1895;61:291-332.
133. Dain JG, Fu E, Gorski J et al. Biotransformation of fluvastatin sodium in humans. *Drug Metab Dispos.* 1993;21:567-572.
134. Lauer T, Preik M, Rassaf T et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12814-12819.
135. Löllinger HC. Kaninchenkrankheiten. 1. ed. 1986.
136. Matthes S. Kaninchenkrankheiten. 3. ed. 1995.

-
137. Egashira K, Hirooka Y, Kai H et al. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium- dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation (Dallas TX)*. 1994;89:2519-2524.
138. Kitagawa S, Yamaguchi Y, Sameshima E et al. Differences in endothelium-dependent relaxation in various arteries from Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits with increasing age. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1994;21:963-970.
139. Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL et al. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res*. 1986;58:552-564.
140. Watanabe Y, Ito T, Shiomi M et al. Preventive effect of pravastatin sodium, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, on coronary atherosclerosis and xanthoma in WHHL rabbits. *Biochim Biophys Acta*. 1988;960:294-302.
141. Kroon AA, Stalenhoef AFH, Buikema H et al. The effect of cholesterol reduction on the endothelial function and progression of atherosclerosis in WHHL rabbits. *Atherosclerosis (Limerick)*. 1993;103:221-230.
142. Müller S, Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotektion durch vaskuläres NO. *Medizinische Monatszeitschrift für Pharmazeuten*. 2002;25:45-51.
143. Brandes RP, Kim D, Schmitz-Winnenthal FH et al. Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*. 2000;35:231-236.

144. Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM et al. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:684-691.
145. Yasue H, Matsuyama K, Matsuyama K et al. Responses of angiographically normal human coronary arteries to intracoronary injection of acetylcholine by age and segment. Possible role of early coronary atherosclerosis. *Circulation (Dallas TX)*. 1990;81:482-490.
146. Hachamovitch R, Wicker P, Capasso JM et al. Alterations of coronary blood flow and reserve with aging in Fischer 344 rats. *Am J Physiol*. 1989;256:H66-H73.
147. Obata T, Ebihara A, Yamanaka Y. Effect of fluvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, on nitric oxide-induced hydroxyl radical generation in the rat heart. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1536:55-63.
148. 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:-481.
149. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet (London)*. 1996;348:1079-1082.
150. Liao JK, Shin WS, Lee WY et al. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1995;270:319-324.
151. Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J et al. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem*. 1998;252:378-384.

Anhang

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm danke ich für die Überlassung des Themas, seinem Interesse junge Leute zum selbstständigen wissenschaftliche Arbeiten anzuleiten und seiner Diskussionsbereitschaft. Seine schnelle Auffassungsgabe und Fachkenntnis sowie die Fähigkeit komplizierte Sachverhalte kurz und treffend zusammenzufassen und darzustellen haben mir oftmals sehr geholfen und mich beeindruckt.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. H.-D. Höltje möchte ich für die Kooperationsbereitschaft und freundliche Übernahme des Korreferats danken. Seine Fähigkeit pharmazeutisch-chemische Zusammenhänge plastisch darzustellen, haben in mir die Faszination für die „Forschung“ geweckt.

Herrn Dr. med. S. M. Perings danke ich für die vielen Diskussionen, Vorschläge und Ideen. Für sein aufmerksames und kritisches Korrekturlesen bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Den technischen Assistentinnen, insbesondere Frau BTA Claudia Ferfers und Frau MTA Simone Matern, danke ich für die dauernde Unterstützung bei der Arbeit im Kardiologischen Labor. Ihre Hilfsbereitschaft und ihr stetiger Einsatz waren mir bei der Lösung vieler Probleme eine große Hilfe. Das auch privat freundschaftliche Verhältnis war für mich oft von großer Bedeutung.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Kelm danke ich für die stetigen Anregungen und Diskussionen. Durch die konstruktive Kritik habe ich gelernt zu argumentieren, mich durchzusetzen und Vorträge zu gestalten und halten.

Für die Unterstützung bei der Arbeit mit den Tieren danke ich der Geschäftsführenden Direktorin der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-

Universität Düsseldorf Frau Dr. A. Treiber. Frau Tierpflegerin Nicole Frisch danke ich für die Pflege der Kaninchen. Sie stand mir mit Rat und Tat bei der Betreuung der Tiere zur Seite.

Herrn Dr. med. D. Hermsen danke ich für die Hilfe bei der Bestimmung der Blutwerte im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Ich danke der Akademischen Rätin des Instituts für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Frau Dr. med. P. Reinecke sowie dem Direktor des Instituts für Pathophysiologie des Universitätsklinikums Essen Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Heusch und Herrn Prof. Dr. med. R. Schulz für ihre Kooperationsbereitschaft. Den MTAs Frau D. Thurm und Frau I. Konietzka danke ich für Ihre Hilfe bei der Erstellung und Auswertung der pathologischen Schnitte der Aorten.

Herrn Dr. R. Willers danke ich seine Bemühungen mir bei den statistischen Auswertungen zur Seite zu stehen. Seine Hilfsbereitschaft habe ich sehr geschätzt.

Carola Bley, Dr. rer. nat. Sybille Buchwald-Werner, Petra Kleinbongard, Dr. med. Thomas Lauer, Dr. med. Anka Nohr, Stephan Pistel, Elke Rosendahl und Dr. med. Guido Stefanec danke ich dafür, dass sie sich die Zeit und Ruhe genommen haben, meine Arbeit Korrektur zu lesen.

Mein Dank richtet sich auch an Stephan, meine Eltern, meine Schwester und deren Familie. Sie haben mich immer wieder motiviert und mich in allen Lebenslagen unterstützt. Ohne ihre Hilfe hätte ich es nicht geschafft, die Arbeit fertigzustellen.

Lebenslauf

Name	Nike Grubert
Geburtsdatum	02.Juni 1971
Geburtsort	Düsseldorf
Eltern	Cara und Janusz Grubert

Schulbildung

1977-1981	Grundschule Dormagen
1981-1990	Leibniz-Gymnasium, Dormagen Abschluss: Abitur
Jan.-Jul. 1988	Egg Harbor Township High School Abschluss: High School Diploma mit Letter und National Honor Society

Hochschulausbildung

Okt. 1990- Jun. 1997	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Pharmazie Studium
Sep. 1994	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Jun. 1997	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen

Praktische Ausbildung

Jun.-Dez. 1997	Bristol Royal Infirmary, Bristol, England
Dez.-Jun. 1998	Schwanen-Apotheke, Köln
Jul. 1998	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Aug. 1998	Approbation als Apothekerin

Promotion/Berufstätigkeit

Sep. 1998-Dez. 2000	Wissenschaftliche Angestellte an der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Kardiologisches Labor, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. M. Kelm)
seit Apr.1999	Neue Apotheke, Leverkusen
Feb. 2001-Sep. 2002	Apotheke Dr. Herrmann, Düsseldorf
Nov. 2002 -Mär. 2003	Markt-Apotheke, Dormagen