

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Verbesserung der Endothelfunktion bei herzinsuffizienten Ratten durch  
den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Rosuvastatin**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Andreas Firnschild  
aus Würzburg**

**Würzburg, August 2007**

**Referent: Prof. Dr. J. Bauersachs**

**Korreferent: Prof. Dr. K. Schuh**

**Dekan: Prof. Dr. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung:  
29.01.2008**

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>B. Material und Methoden</b>	<b>10</b>
I. Versuchstiere	10
II. Medikamentöse Behandlung	10
III. Experimenteller Myokardinfarkt	11
IV. Hämodynamische Messungen	12
V. Infarktgrößenbestimmung	13
VI. Gefäßpräparation	14
VII. Organbad	14
VIII. Messung der Superoxidanionen-Bildung	16
IX. Messung der VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten	17
X. Statistik	18
XI. Substanzen	18
<b>C. Ergebnisse</b>	<b>19</b>
I. Hämodynamik und deskriptive Parameter	19
II. Kontraktionskraft	20
III. Relaxation	22
IV. Aortale Superoxidanion-Bildung	25
V. VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten	26
<b>D. Diskussion</b>	<b>27</b>
<b>E. Zusammenfassung</b>	<b>32</b>
<b>F. Literatur</b>	<b>33</b>
<b>G. Anhang</b>	
I. Danksagung	
II. Lebenslauf	

## A. Einleitung

Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz sind in Europa in den letzten Jahrzehnten bedingt durch die demographische Veränderung der Altersstruktur und die Verbesserung der Akutbehandlung kardiovaskulärer Erkrankungen stark angestiegen und werden auch in Zukunft weiter zunehmen (Abb.1). Eine Vielzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie zum Beispiel Adipositas, Rauchen oder Diabetes mellitus,

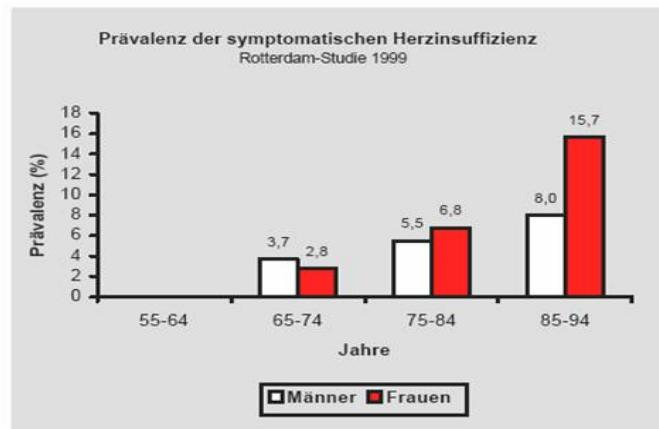


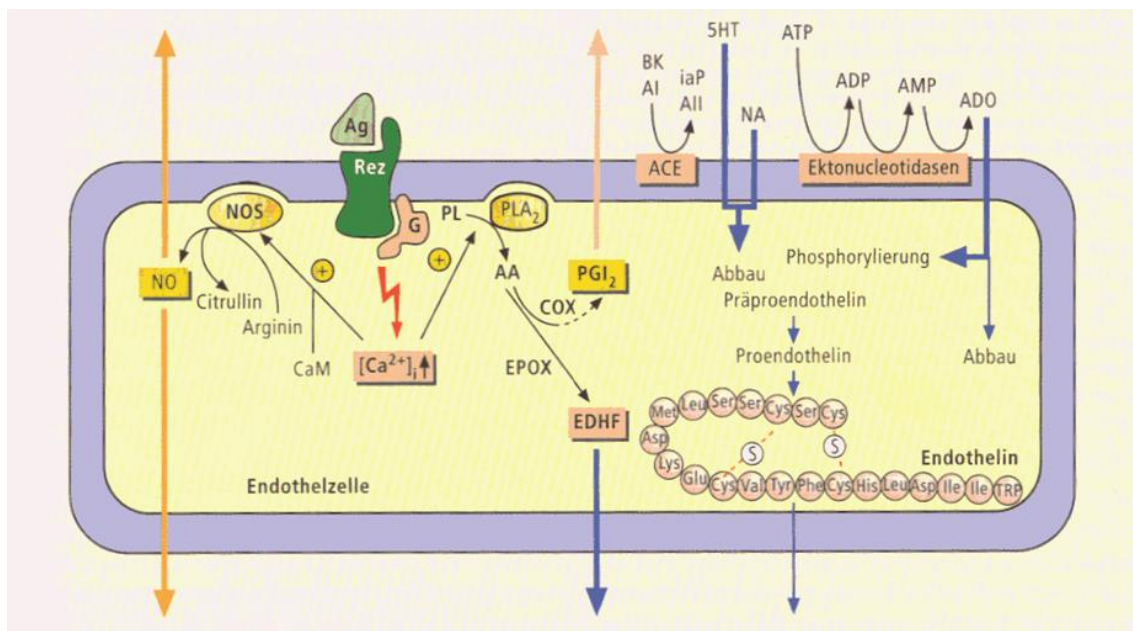
Abb. 1: Prävalenz der symptomatischen Herzinsuffizienz in der niederländischen männlichen und weiblichen Allgemeinbevölkerung in Abhängigkeit vom Alter; Rotterdam-Studie 1999<sup>1</sup>

und zahlreiche weitere Erkrankungen können an der Entstehung einer Herzinsuffizienz beteiligt sein, die koronare Herzkrankheit und die arterielle Hypertonie stellen jedoch die wichtigsten Ursachen dar. Im Verlauf der Erkrankung kommt es nach zeitweiliger Stabilisation der Herzleistung und damit Gewährleistung der Organdurchblutung durch funktionelle, neurohumorale und morphologische Adaptationsmechanismen schließlich zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion. Diese führt zur Beeinträchtigung verschiedener Organsysteme und zur Verschlechterung der Symptomatik. Kongestive Herzinsuffizienz (CHF) ist mit einer beträchtlichen Morbidität und Mortalität verbunden<sup>2-4</sup>. Für die Patienten bedeutet dies eine drastische Einschränkung ihrer Lebensqualität und für die Gesellschaft erfordert es die Bereitstellung umfangreicher medizinischer und finanzieller Ressourcen, wohingegen adäquate Behandlung eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität und der Überlebenschancen verspricht. Deshalb sind weitere Anstrengungen und Forschungen zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten notwendig.

Ein nützliches und etabliertes Modell zur Untersuchung der pathophysiologischen Mechanismen und Folgen der kongestiven Herzinsuffizienz ist der chronische Myokardinfarkt (MI) nach Koronarligatur an der Ratte. Bei diesen Tieren führen ausgedehnte Infarkte, ähnlich wie beim Menschen, zum progressiven linksventrikulären Versagen und

zur Entwicklung einer mit neurohumoraler Aktivierung - zum Beispiel erhöhte Katecholamin- und Endothelinspiegel, sowie Aktivierung des systemischen und auch des lokalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) - verbundener CHF. Während eine akute endotheliale Dysfunktion bereits zwei Stunden nach der Infarktinduktion nachgewiesen werden kann, wird die progressive chronische Dysfunktion des Endothels erst ab der 4. Woche nach dem MI im Rattenmodell manifest<sup>5</sup>. Anders als beim Menschen erlaubt dieses Modell die Bewertung der endothelialen Gefäßfunktion unabhängig vom Einfluss weiterer atherogener Risikofaktoren.

Das Endothel kleidet als einlagige Zellschicht das Gefäßsystem luminal aus und trennt den Intravasalraum von der übrigen Gefäßwand. Es stellt dabei nicht nur eine passive Barriere dar, sondern ist ein wichtiges Ziel für Neurotransmitter, Hormone oder physiologische Stimuli<sup>5;6</sup> und nimmt zahlreiche metabolische Funktionen wahr, über die es die vaskuläre Homöostase reguliert und somit die Funktion vieler Organe beeinflusst<sup>7-9</sup> (Abb.2).



**Abb. 2: Übersicht über die vasomotorischen Funktionen des Endothels (nach Busse)<sup>10</sup>**

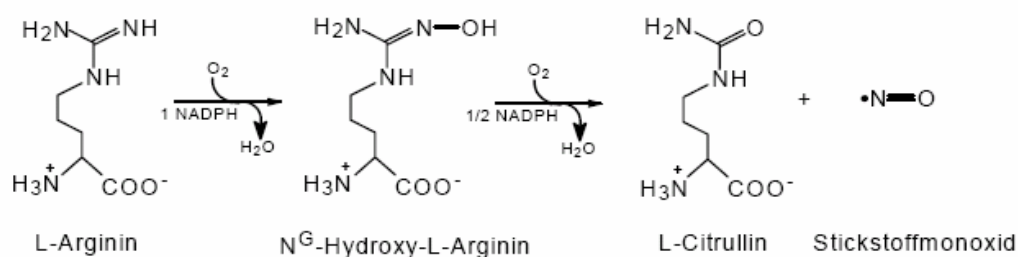
AI = Angiotensin I, AII = Angiotensin II, ANP = atriales natriuretisches Peptid, BK = Bradykinin, iaP = vasoinactive Peptide, ACE = Angiotensin-Konversions-Enzym, ADO = Adenosin, 5-HT = Serotonin, NA = Noradrenalin, AA = Arachidonsäure, COX = Cyclooxygenase, EPOX = Epoxigenase, PL = Phospholipide, PLA<sub>2</sub> = Phospholipase A<sub>2</sub>, EDHF = Endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor, CaM = Calmodulin, NOS = NO-Synthase, Ag = Agonist, Rez = Rezeptor, G = G-Protein, PGI<sub>2</sub> = Prostacyclin

Es trägt beispielsweise zur Umwandlung von Angiotensin I in vasokonstriktorisches Angiotensin II bei<sup>11;12</sup>, inaktiviert Bradykinin und synthetisiert unter anderem Stickstoffmonoxid (NO), Arachidonsäurederivate<sup>13;14</sup>, Endothelin und EDHF (endothelium-

derived hyperpolarising factor)<sup>14;15</sup>, welche wiederum aktiv die Gefäßweite beeinflussen. Die Endothelzellen regulieren die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten, kontrollieren die Blutgerinnung, hemmen die Proliferation glatter Muskelzellen, verhindern das Eindringen von „low density lipoprotein“ (LDL) -Cholesterin in die Gefäßwand und spielen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Gefäßtonus und damit des Blutdrucks. Integrität und Funktionsfähigkeit des Endothels sind daher für den Organismus äußerst wichtig. 1980 entdeckten Furchgott et al. eine vom Endothel gebildete Substanz, die eine Relaxation von Blutgefäßen bewirkt<sup>15;16</sup>. Sie bezeichneten sie als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF). Moncada und Palmer konnten 1988 zeigen, dass EDRF mit NO, dem bedeutendsten der endothelial freigesetzten Autokoide, identisch ist<sup>13;17</sup>. Nach der Bildung durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS)<sup>18</sup> diffundiert NO durch die Plasmamembran der Endothelzelle in die darunter liegende Gefäßmuskelzelle. Dort aktiviert es durch Bindung an der Häm-Gruppe<sup>7</sup> die NO-sensitive Guanylatecyclase (sGC). Diese synthetisiert nun aus Guanosintriphosphat (GTP) den „second messenger“ 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP), der die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGK-I) aktiviert<sup>19</sup>. Dadurch kommt es durch eine Senkung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zur Relaxation der Muskelzelle und damit zur Dilatation des Blutgefäßes<sup>20</sup>. Neben der Mitwirkung an der Regulation des Gefäßtonus vermittelt NO noch zahlreiche weitere Signalwege. Von besonderem Interesse sind hierbei die Hemmung Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)-generierender Enzymsysteme, wie zum Beispiel der NADH/NADPH-Oxidase<sup>21</sup>, und die Inhibition der Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an Endothelzellen<sup>22;23</sup>. Eine Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit führt sowohl kurz-<sup>23</sup>, als auch langfristig<sup>24</sup> zu einer Steigerung der Thrombozytenaktivierung und ist bei Tiermodellen und Menschen mit endothelialer Dysfunktion mit der Bildung arterieller Thrombenbildung assoziiert<sup>22</sup>. Das in den Endothelzellen gebildete NO ist somit für das Herz-Kreislauf-System von großer Bedeutung.

NO wird von NO-Synthasen (NOS), von denen bisher drei Isoformen beschrieben sind<sup>25</sup>, aus L-Arginin synthetisiert<sup>26</sup> (Abb.3). Die eNOS wird konstitutiv in Endothelzellen exprimiert und ist hauptsächlich in den Caveolae der Plasmamembran lokalisiert<sup>15;27;28</sup>. Dagegen sind die neuronale NOS (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS) zytosolische Enzyme, die vor allem in Neuronen bzw. Zellen des Immunsystems vorliegen<sup>29</sup>. NO-Synthasen bestehen aus zwei identischen Monomeren, die jeweils in eine

Reduktase-Domäne und in eine Oxidase-Domäne mit Bindungsstellen für unter anderem Tetrahydrobiopterin und L-Arginin unterteilt werden können<sup>25</sup>. Zwischen den beiden Domänen liegt die Calmodulin-Bindungsstelle, welche eine Schlüsselrolle für die Funktion des Moleküls spielt. Die Aktivierung der eNOS kann einerseits Calcium-unabhängig durch physikalische Stimuli wie blutflussvermittelte Scherkräfte auf die luminale Endotheloberfläche, welche zu den wichtigsten physiologischen Regulatoren der eNOS-Genexpression und Aktivierung *in vivo* gehören<sup>30</sup>, ausgelöst werden. Andererseits auch durch rezeptorabhängige Faktoren wie Acetylcholin, Bradykinin oder Endothelin, welche durch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration die Bildung eines  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplexes bewirken<sup>25</sup>, erfolgen. Durch Oxidation der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin wird ein NO-Radikal freigesetzt<sup>26</sup>.



**Abb. 3: Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin katalysiert durch die NO-Synthase**

Bei erheblichem oxidativen Stress kann es zur Oxidation von Tetrahydrobiopterin<sup>31</sup> oder durch Beeinträchtigung des endothelialen Transports zu einem relativen L-Arginin-Mangel<sup>32;33</sup> kommen. Dies kann zur Entkopplung der eNOS führen, wodurch die Synthese von  $\text{O}_2^-$  anstelle von NO erfolgt<sup>34</sup>. Die gesteigerte  $\text{O}_2^-$ -Generation bewirkt eine Inaktivierung von NO<sup>35;36</sup> unter Bildung von Peroxynitrit<sup>36;37</sup>. Erhöhte Plasmaspiegel von Peroxiden weisen deshalb bei CHF-Patienten auf gesteigerten oxidativen Stress hin<sup>38;39</sup>.  $\text{O}_2^-$  ist auch als Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase beschrieben<sup>40</sup>. Es wird durch NO-Synthasen, aber auch durch Angiotensin-II-induzierte NADH/NADPH-Oxidasen<sup>41;42</sup> und Xanthin-Oxidasen<sup>43</sup> gebildet. Bei CHF kommt es durch vermehrte Bildung von Superoxidanionen<sup>35;38;39;44;45</sup> zur Inaktivierung von NO. Die Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit und die übermäßige Bildung von  $\text{O}_2^-$  führen bei endothelialer Dysfunktion zu einem Ungleichgewicht zwischen NO und  $\text{O}_2^-$ <sup>46</sup>.

Da die Verringerung des bioaktiven NOs maßgeblich zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion beiträgt<sup>47</sup> und mit einem verstärkten Vorkommen arterieller

Thromben<sup>22</sup> assoziiert ist, ist die Bewertung der NO-Bioverfügbarkeit für die Einschätzung der endothelialen Funktion von großem Interesse. Die kurze Halbwertszeit des NO-Moleküls (2-30 Sekunden)<sup>7</sup> macht eine direkte Messung schwierig, weshalb verschiedene Methoden zur in vivo und in vitro Untersuchung entwickelt wurden. Die Bestimmung der stabilen NO-Abbauprodukte Nitrit und Nitrat im Plasma oder Urin ist relativ ungenau, da deren Level mit der Nahrungsaufnahme schwanken und auch die NO-Bildung durch iNOS und nNOS widerspiegeln. Die Untersuchung der vasomotorischen Funktion mittels Myographie und Organbad ist für menschliche Probanden wenig praktikabel, da nur pathologisch veränderte Gefäßsegmente aus Bypass-Operationen und keine gesunden Kontrollgefäße zur Verfügung stehen. Auch eine direkte Messung der Gefäßkontraktion nach intraarterieller Injektion von Acetylcholin oder Bradykinin kommt aufgrund der Invasivität des Verfahrens nicht für Routineuntersuchungen infrage. Die indirekte Bewertung der NOS-Aktivität durch Hemmung der eNOS ist aufgrund möglicher Komplikationen äußerst problematisch. Ein weiteres, leider verhältnismäßig untersucherabhängiges Verfahren zur Bestimmung der NO-Produktion unter in vivo Bedingungen ist die Darstellung der flussmedierten Dilatation, welche der NO-vermittelten Relaxation entspricht, mittels Ultraschall oder Magnetresonanztomographie (MRT)<sup>48</sup>. All diese Methoden leiden unter verschiedenen Einschränkungen und sind deshalb nicht für den standardmäßigen Einsatz verwendbar. Ein geeignetes Verfahren sollte spezifisch, objektiv, wenig invasiv und einfach durchführbar sein sowie die Bestimmung eines Basalwertes ermöglichen. Ein neues Hilfsmittel, das diese Ansprüche zu erfüllen scheint und eine Bewertung der Aktivität des NO/cGMP-Signalweges ermöglicht, ist die Analyse des basalen Phosphorylierungsstatus des „vasodilator-stimulated phosphoprotein“(VASP)<sup>42;49;50</sup>.

Das 1987 in Würzburg entdeckte VASP-Protein<sup>51</sup> kann in fast allen Zelltypen, vor allem an Aktinfilamenten, fokalen Adhäsionsstellen und an dynamischen Regionen der Zellmembran<sup>52</sup>, nachgewiesen werden, liegt in Thrombozyten aber in besonders hohen Konzentrationen vor. VASP verfügt über drei Phosphorylierungsstellen (Serin 157 (Ser<sup>157</sup>), Serin 239 (Ser<sup>239</sup>) und Threonin 278 (Thr<sup>278</sup>)), die von cGMP- und cAMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK, cAK) unterschiedlich erkannt werden (Abb.4).

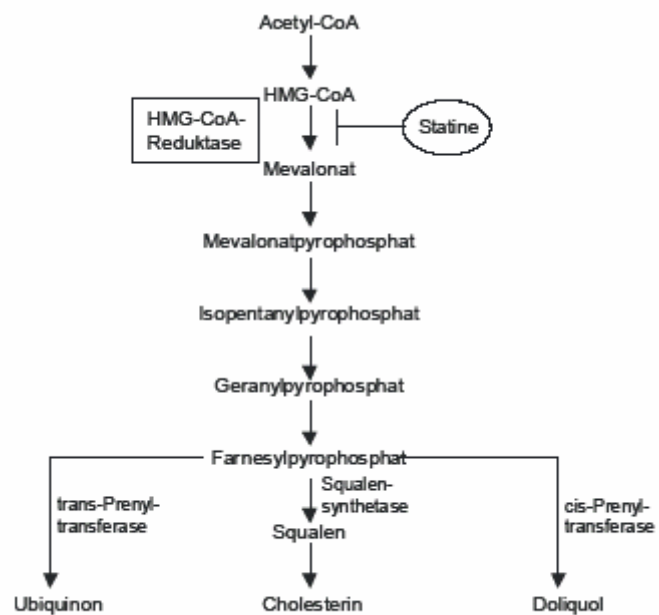




per gegen phosphoryliertes Ser<sup>239 55</sup> in frisch gewonnenen Thrombozyten ist also ein geeignetes Mittel zur Bewertung der in vivo NO-Bioverfügbarkeit<sup>49;50;70</sup>.

Medikamente, die bereits zur Verbesserung der Gefäßfunktion eingesetzt werden, sind 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-(HMG-CoA)-Reduktasehemmer (Statine), welche klassischerweise in der Therapie der Hypercholesterinämie zur Anwendung kommen. Sie hemmen die Cholesterinbiosynthese durch Blockade der Umwandlung von HMG-CoA in Mevalonat (Abb.5).

Daraus resultiert eine Senkung der intrazellulären Cholesterinkonzentration, was zur Aktivierung von „sterol-regulatory element binding proteins“ (SREBPs) führt<sup>71</sup>. Diese beeinflussen die Transkription der mRNA des LDL-Rezeptors<sup>72</sup> und bewirken über eine Hochregulation der LDL-Rezeptor-Expression ein Absinken des Serum-LDL-Cholesterins und der Serum-Triglyceride. Langzeitstudien konnten beweisen, dass Statinbehandlung die Morbidität und Mortalität von Patienten mit



**Abb.5: Hemmung der Cholesterinbiosynthese mittels HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren durch Blockade der Umwandlung von HMG-CoA in Mevalonat**

koronarer Herzkrankheit senkt<sup>73;74</sup>. Beobachtungen legen nahe, dass die protektive Wirkung der Statine über eine reine Cholesterinsenkung hinausgeht und auch durch direkte antiatherosklerotische, so genannte pleiotrope Effekte<sup>75</sup>, bewirkt wird. Durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase kommt es zu einer Reduktion zahlreicher Intermediate der Cholesterinbiosynthese, wie zum Beispiel Geranylpyrophosphat, welche verschiedene Signalkaskaden in der Zelle beeinflussen und deren Hemmung für die lipidunabhängigen Statineffekte (Abb.6) verantwortlich sein könnte. Dazu gehören antiinflammatorische Wirkungen<sup>76</sup>, die durch Reduktion der Expression und Aktivierung verschiedener Entzündungsmoleküle und durch Senkung des CRP-Spiegels vermittelt werden, sowie antioxidative Effekte<sup>77</sup>, die eine Verringerung der Oxidation von LDL-

Cholesterin beinhalten. Oxidiertes LDL-Cholesterin hemmt die eNOS<sup>78</sup> und stimuliert inflammatorische Prozesse.

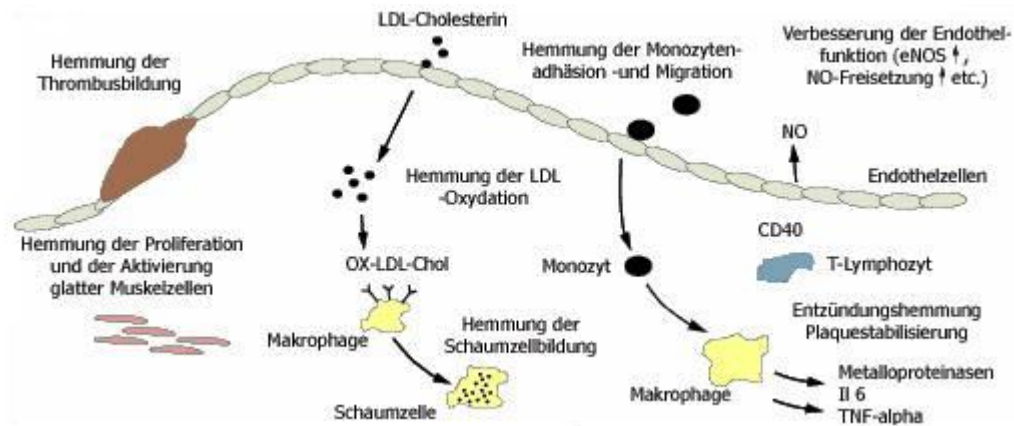


Abb. 6: Übersicht über die pleiotropen, antiatherosklerotische Wirkungen von Statinen

Statine verbessern die Stabilität atherosklerotischer Plaques<sup>79-81</sup> durch Hemmung der Expression von Metalloproteasen in Makrophagen und durch Erhöhung des kollagenen Anteils der fibrösen Plaquekappe. Zusätzlich scheint eine Statingabe durch Senkung der Gewebefaktoraktivität und der Thrombinbildung<sup>82</sup> eine Abnahme der Thrombenentstehung zu bewirken<sup>83</sup>. Ebenfalls Teil der pleiotropen Effekte sind eine Hemmung der Proliferation arterieller Myozyten<sup>15;84;85</sup>, eine Verminderung der Endothelin-1-Synthese<sup>86</sup> und eine Verringerung der endothelialen Adhäsion von Leukozyten<sup>87</sup>.

Letztlich, und für diese Studie am interessantesten, führt Inhibition der HMG-CoA-Reduktase zu einer Verbesserung der Endothelfunktion. Dies geschieht durch Steigerung der Expression und Aktivität vaskulärer eNOS<sup>88;89</sup> und durch Reduktion der Aktivität von NADH/NADPH-Oxidasen<sup>21;90</sup>. Die Steigerung der NO-Bildung und die Verringerung der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Generation bewirken eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit und tragen zur Verbesserung der endothelialen Funktion bei<sup>46</sup>. Statine senken deshalb die Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse bei KHK<sup>73;91</sup>. Ob Statin-Behandlung auch die Überlebenschancen von CHF-Patienten verbessert, ist Gegenstand laufender Untersuchungen, auch wenn retrospektive Analysen in diese Richtung weisen<sup>92;93</sup>.

Daher wurden die therapeutischen Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibition durch Rosuvastatin auf die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung, die vasomotorische Endothelfunktion und die basale VASP-Phosphorylierung bei Ratten mit CHF nach experimentellem Myokardinfarkt un-

tersucht. Als Hypothese diente die Annahme, die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase bei CHF würde die endotheliale Funktion verbessern und die NO-Bioverfügbarkeit in vivo steigern.

## **B. Material und Methoden**

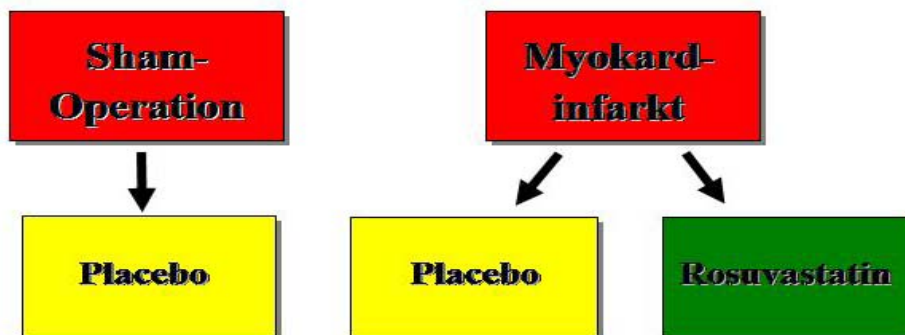
### **I. Versuchstiere**

Für die Studie wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten (250-300 g, bezogen von Harlan-Winkelmann, Borcheln) verwendet. Wie bei allen anderen Versuchen wurden die Tiere in Käfigen mit höchstens fünf Ratten bei konstanter Raumtemperatur und konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten. Bei freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter unterlagen sie einem zwölfstündigem Hell-/ Dunkelrhythmus.

Um Tiere mit schwerer CHF zu erhalten, wurde das experimentelle Modell des chronischen MI bei Ratten (siehe unten) verwendet.

### **II. Medikamentöse Behandlung**

Die Versuchstiere wurden in eine Placebo- (Gummiarabikum) und in eine Wirkstoffgruppe (Rosuvastatin) aufgeteilt (Abb. 7).

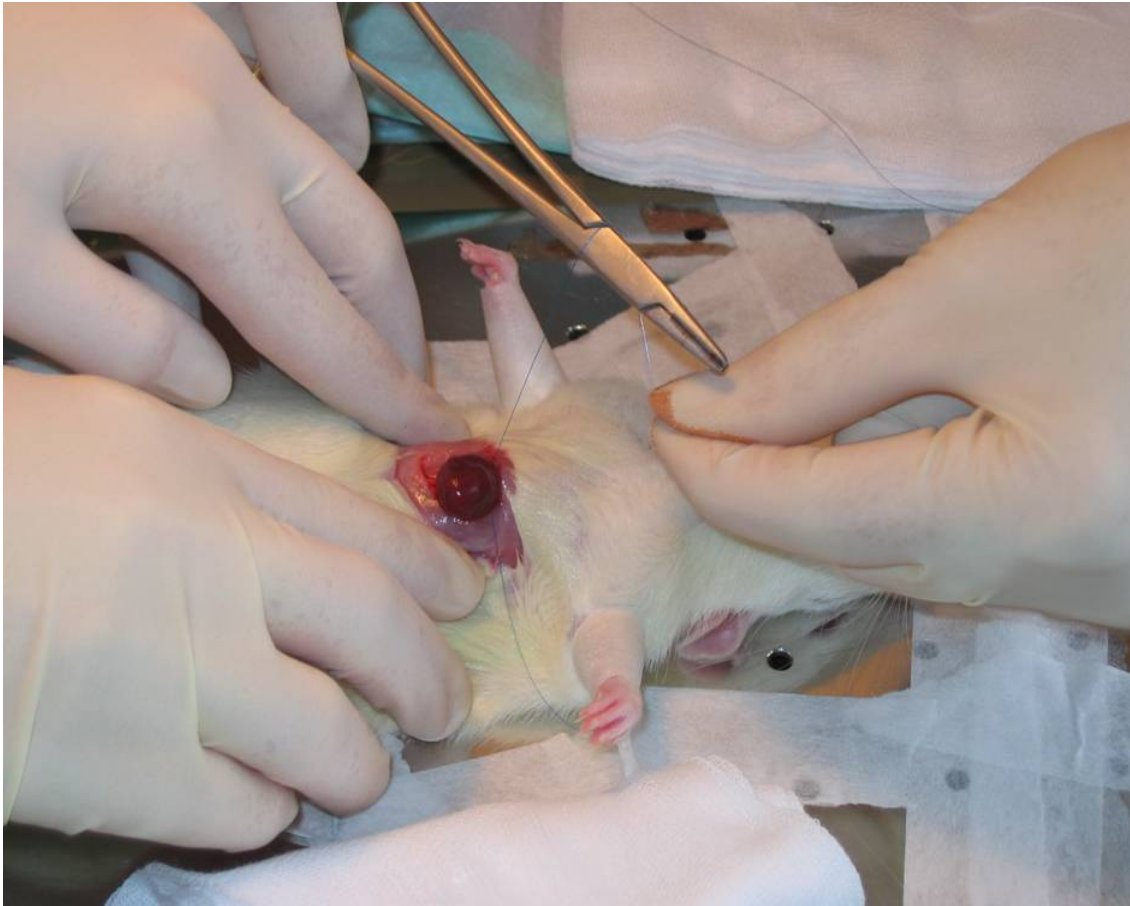


**Abb. 7: Einteilung der Versuchstiere nach Infarzierung oder Scheinoperation (Sham) sowie nach Wirkstoff- oder Placebogabe.**

Die tägliche Placebo- oder Rosuvastatingabe (20mg/kg/Tag; entsprechend der Dosis, welche bei Ratten die HMG-CoA-Reduktase zu 90% inhibiert<sup>94</sup>) per Schlundsonde begann zwei Tage vor dem operativen Eingriff und wurde über einem Zeitraum von zehn Wochen durchgeführt. Die Versuchstiere wurden während dieser Zeit wöchentlich gewogen, so dass die Dosierung der Wirkstoffmenge den Veränderungen des Gewichts der einzelnen Tiere angepasst werden konnte.

### **III. Experimenteller Myokardinfarkt**

Ein experimenteller Myokardinfarkt wurde durch Koronarligatur induziert oder es wurde eine Scheinoperation durchgeführt. Hierzu wurde die von Pfeffer et al.<sup>95</sup> beschriebene Methodik verwendet. Unter endotrachealer Intubation und Isofluran-Narkose wurden die Ratten über einen Kleintier-Respirator (Rodent Ventilator UB 7025) beatmet. Die Narkose wurde mit einem anästhesieüblichen Isofluran-Verdampfer aufrechterhalten. Zunächst wurde die linke Throaxhälfte enthaart, die Haut mit einer Schere durchtrennt und die Pektoralismuskulatur stumpf präpariert. Die Interkostalmuskulatur und das Perikard wurden durchtrennt, anschließend konnte das Herz durch vorsichtigen Druck auf die Thoraxwand nach außen luxiert werden. Der Ramus interventricularis anterior (RIVA) der linken Herzkranzarterie wurde umstochen und mit einem Prolene Monofil 5-0-Faden ligiert. Bei der Scheinoperation wurde keine Ligatur durchgeführt. Das Herz befand sich insgesamt nur für circa 30 Sekunden außerhalb des Perikards, nach Reposition wurde die Pektoralismuskulatur mit einer Tabaksbeutelnaht und die Haut mit Einzelnähten verschlossen. Letztlich wurden die Lungen durch kurzfristige Überdruckbeatmung entfaltet. Nach Beendigung des Eingriffes erhielten die Versuchstiere Buprenorphinhydrochlorid (0,2 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal zur akuten Schmerztherapie. In einer anschließenden fünfstündigen Nachbeobachtungszeit wurden die Ratten bedarfsweise mittels Herzdruckmassage reanimiert.



**Abb. 8: Experimenteller Myokardinfarkt durch Ligatur des Ramus interventricularis der linken Koronararterie unter endotrachealer Intubation und Beatmung**

#### **IV. Hämodynamische Messungen**

Die hämodynamischen Messungen wurden zehn Wochen nach Infarkt in der stabilen chronischen Phase der Herzinsuffizienz<sup>96</sup> durchgeführt. Die Ratten wurden erneut unter Isoflurannarkose nach Intubation mit einer Frequenz von 75/Minute und einem Atemzugvolumen von 2,8 ml über einen Kleintier-Respirator (Rodent Ventilator UB 7025) beatmet. Die rechte Arteria carotis wurde mit einem Polyethylen-Katheter (PE 50) kanüliert. Der Katheter wurde in die linke Herzkammer vorgeschoben und dessen korrekte Lage anhand der Druckkurve, welche über einen Mikro-Tip-Katheter (Millar-Instruments Inc., Houston, USA) abgeleitet wurde, kontrolliert. Während der Messungen wurden kontinuierlich der linksventrikuläre systolische und diastolische Druck sowie die maximale Druckentwicklung über die Zeit gemessen. Nach dem Zurückziehen des Katheters aus dem Ventrikel in die Aorta konnten der systolische und diastolische Aortendruck sowie der aortale Mitteldruck bestimmt werden. Da eine Verbesserung der



hämodynamischen Funktion durch Rosuvastatin möglicherweise die Ergebnisse beeinflusst hätte, gingen nur Tiere mit offenkundiger CHF (linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)  $> 15\text{mmHg}$ , erniedrigtem arteriellen Blutdruck, rechtsventrikulärer Hypertrophie und reduzierter linksventrikulärer Kontraktilität trotz Behandlung) in die Analyse ein.



Abb. 9: Häodynamische Messungen unter endotrachealer Intubation, 10 Wochen nach Infarkt mittels eines Katheters im linken Ventrikel des Versuchstierherzes

## **V. Infarktgrößenbestimmung**

Am Ende der Experimente wurde den Tieren in tiefer Narkose das Herz entnommen. Der linke Ventrikel wurde von den übrigen Kammern getrennt und in drei transversale Abschnitte, Apex, mittlerer Ring und Basis, aufgeteilt. Der circa 3 mm dicke, mittlere Ring wurde tiefgefroren und anschließend mit einem Mikrotom (Leica CM 1850, Bensheim) in etwa zehn jeweils 5  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte geteilt. Diese wurden nach Gieson gefärbt, mit einer auf einem Mikroskop aufmontierten Scannerkamera (3CCD-IRIS, Sony) eingescannt und mit Hilfe eines digitalisierten Computerprogramms (Sigma Scan pro, Jandel Software) vermessen. Die Ausdehnung der Infarktnarbe wurde endo- und epi-



kardial ausgemessen und zum endo- und epikardialen Gesamtumfang in Beziehung gesetzt.

## VI. Gefäßpräparation

Nach der Entnahme des Herzens wurde die Aorta thoracalis freipräpariert. Der Aortenbogen wurde durchtrennt und die Aorta descendens bis zum Diaphragma unter Vermeidung von Druck oder Zug entnommen. Danach wurde das Gefäß in Krebs-Henseleit-Lösung (118,4 mmol/l NaCl, 25 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 1,6 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 4,7 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mmol/l MgSO<sub>4</sub> und 12 mmol/l Glukose plus 1 µmol/l Diclofenac) gelegt und intraluminal durchgespült, um verbliebenes Blut aus dem Lumen zu entfernen. Die Aorta wurde unter einem Mikroskop von umliegendem Fett- und Bindegewebe freipräpariert und in drei Millimeter breite Ringe geschnitten.

## VII. Organbad

Die Gefäßringe wurden in mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Kammern (5 ml; Abb. 10,11) der Organbäder (Föhr-Medical-Instruments, Seeheim; Abb.12) untersucht. Die Lösung (37°C, pH 7,4) wurde dabei ständig mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Die Rattenaorten wurden anfangs passiv auf 2 g vorgespannt und über 30 Minuten äquiliibriert.



Abb. 10: Einzelne Organkammer eines Organbads, mit eingehängtem Gefäß (←)

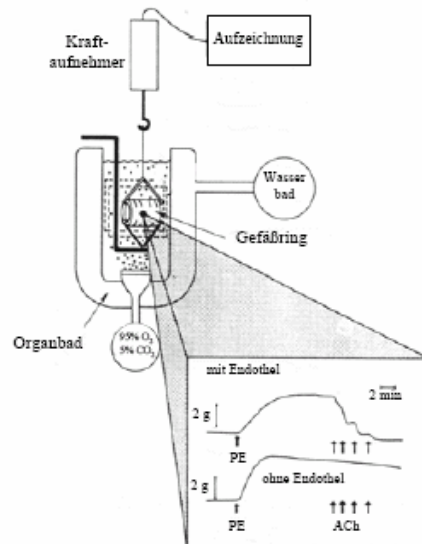


Abb.11: Schematische Darstellung einer Organkammer mit eingehängtem, auf 2g vorgespanntem Gefäß und endothelab-hängiger Relaxation auf Acetylcholin (kumulative Gabe)



**Abb. 12: Organbad (Föhr-Medical-Instruments) mit vier parallelen Organkammern, in denen die Experimente durchgeführt wurden**

Nach Erreichen des passiven Tonus wurde zunächst die Ansprechbarkeit der glatten Muskulatur durch wiederholte Gabe von Kalium (max. 100 mmol/l) überprüft. Anschließend wurde ein Endotheltest durch Gabe von Acetylcholin (ACh; 1  $\mu\text{mol/l}$ ) nach Maximalkontraktion mit Phenylephrin (PE; 1  $\mu\text{mol/l}$ ) durchgeführt. Hiernach wurden die Substanzen ausgewaschen und eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit PE durchgeführt. Danach wurden die Ringe ausgewaschen und einheitlich vorkontrahiert, bevor eine Relaxations-KWK mit Acetylcholin erstellt wurde.

Nach deren Beendigung wurden die Gefäße erneut ausgewaschen und nach einer 30-minütigen Ruhephase langsam mit steigenden, niedrigen Dosen PE auf ca. 20% ihrer jeweiligen Maximalkontraktion vorkontrahiert. Nach Erreichen dieser wurde der NOS-Inhibitor  $\text{N}^{\text{G}}$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA; 100  $\mu\text{mol/l}$ ) zugegeben und für 45 Minuten einwirken gelassen. Die isometrische Dehnung der Endothelzellschicht in diesen Versu-

chen bewirkt eine Freisetzung von NO, welche indirekt durch eine nachfolgende Hemmung der NO-Synthase dargestellt wird (Abb. 13).

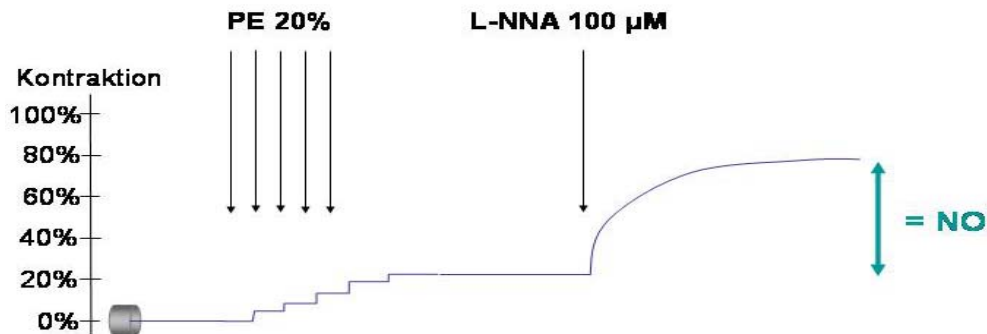


Abb. 13: Indirekter Nachweis der NO-Freisetzung: Vorkontraktion der Gefäße mit steigenden, niedrigen Dosen PE auf ca. 20% ihrer jeweiligen Maximalkontraktion, dann Zugabe des NOS-Inhibitors N<sup>6</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NNA). Die isometrische Dehnung der Endothelzellschicht in diesen Versuchen bewirkt eine Freisetzung von NO, welche indirekt durch eine nachfolgende Hemmung der NO-Synthase dargestellt wird

Danach erfolgte eine Vorkontraktion mit PE auf vergleichbare Kontraktionszustände, von denen aus KWKs mit Diethylaminodiazem-1-ium-1,2-dioate (DEA-NONOate) durchgeführt wurden. Nach Erreichen der Maximaldosis (10 µmol/l) wurde das Experiment abgeschlossen.

### VIII. Messung der Superoxidanionen-Bildung

Die vaskuläre Superoxidanionenbildung wurde mittels lucigeninverstärkter Chemolumineszenz gemessen<sup>97</sup>. Die Lichtreaktion zwischen Superoxidanionen und Lucigenin (5µmol/l) wurde mit einem Lunimometer (Wallac, Freiburg; Abb. 14) bestimmt, während die Aortenringe in einem HEPES-modifiziertem Krebs-Puffer (pH 7,4) inkubiert waren. Die spezifische Chemolumineszenz wurde als counts pro Minute pro Milligramm Trockengewicht des Gewebes (cpm/mg) ausgedrückt.

Die Evaluation der in situ Produktion von Superoxidanionen erfolgte mit Hilfe des oxidativen Fluoreszenzfarbstoffs Dihydroethidin (DHE)<sup>97</sup>. Die unfixierten, gefrorenen Aortenringe wurden dazu in 10µm dicke Schnitte geteilt und auf einen Objektträger gelegt. Den Gewebeschnitten wurde topisch DHE (2µmol/l) zugegeben. Danach wurden sie bedeckt und für 30 Minuten in einer lichtgeschützten, angefeuchteten Kammer bei 37°C inkubiert. Die Bilder wurden mittels eines mit einem Krypton/Argon-Laser ausgestatteten Bio-Rad MRC 1024 konfokalen Laserscan-Mikroskops gewonnen. Die Fluoreszenz

wurde unter Nutzung eines 585-nm-long-pass-Filters bestimmt. Die Aortenringe von CHF-Tieren und das Kontrollgewebe wurden parallel bearbeitet und abgebildet. Die Lasereinstellungen waren dabei für die Bildergewinnung von CHF- oder Kontrollproben identisch.



Abb. 14: Luminometer zur Messung der Superoxidationen-Bildung in den Aortenringen

### **IX. Messung der VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten**

Die Proben aus Citratblut wurden zunächst für 5 Minuten in Methanol-freiem Formaldehyd (1,5% final) fixiert und anschließend mit Triton X-100 (0,2% final) für 10 Minuten permeabilisiert. Nach einem weiteren Verdünnungsschritt wurden die direkt Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markierten Antikörper gegen phosphoryliertes VASP-Ser<sup>239</sup>)<sup>98</sup> hinzugegeben. In parallel angelegten Proben wurde die unspezifische Bindung gemessen, wobei der Antikörper zuvor für mindestens 30 Minuten bei 4°C mit einem blockenden Phosphopeptid inkubiert worden war. Nach 45-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Antikörper wurde die Fluoreszenz mit einem FACS-Calibur-Durchflußzytometer gemessen.

## **X. Statistik**

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. „n“ repräsentiert die Anzahl unterschiedlicher Experimente bzw. die Anzahl der Versuchstiere. Die Relaxation wurde prozentual zur Vorkontraktion angegeben. Die statistische Analyse erfolgte durch Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen, gefolgt von einem Tukey-Kramer-Test. Hämodynamik, Superoxidanionen-Bildung und Thrombozyten-Parameter wurden mittels ANOVA analysiert, gefolgt von einem Tukey-post-hoc-Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

## **XI. Substanzen**

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Substanzen von Sigma (Deisenhofen) in der höchsten Reinheit bezogen.

Rosuvastatin wurde freundlicherweise von AstraZeneca (Mölndal, Schweden) zur Verfügung gestellt.

Isofluran (Baxter, Unterschleißheim)

Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic; Essex Pharma, München)

DEA-NONOate (Alexis Biochemicals, San Diego, USA)

Methanol-freies Formaldehyd (Polysciences, Inc., Warrington, USA)

FITC-markierten Antikörper gegen phosphoryliertes VASP-Ser<sup>239</sup> (16C2; nanotools, Tenningen)

Phosphopeptid gegen 16C2 (nanotools, Tenningen)

## C. Ergebnisse

### I. Hämodynamik und deskriptive Parameter

Umfassende Parameter und hämodynamische Messungen von CHF-Ratten und scheinoperierten Tieren werden in Tabelle 1 gezeigt.

	<b>Sham Placebo</b>	<b>CHF Placebo</b>	<b>CHF Rosuvastatin</b>
<b><u>N</u></b>	9	22	15
<b>SAP</b> [mmHg]	134 ± 5	105 ± 3*	104 ± 3*
<b>DAP</b> [mmHg]	103 ± 6	78 ± 4*	83 ± 3*
<b>LVEDP</b> [mmHg]	6 ± 1	24 ± 2*	23 ± 2*
<b>dP/dt<sub>max</sub></b> [1000*mmHg/s]	15,2 ± 1,3	8,9 ± 0,5*	9,2 ± 0,5*
<b>dP/dt<sub>min</sub></b> [1000*mmHg/s]	11,2 ± 1,3	6,3 ± 0,5*	6,9 ± 0,5*
<b>ΔLungengewicht</b> [mg/kg KG]	3,3 ± 0,2	7,0 ± 0,8*	8,0 ± 0,9*
<b>Rechter Ventrikel</b> [mg]	170 ± 10	360 ± 20*	330 ± 30*
<b>Körpergewicht</b> [g]	360,3 ± 18,0	357,0 ± 12,4	343,5 ± 8,7

**Tab. 1: Deskriptive Parameter von scheinoperierten Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder Rosuvastatin behandelt wurden.**  
SAP = systolic arterial pressure; DAP = diastolic arterial pressure; LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck  
\* = P < 0,05 vs. Sham Placebo.

Die Infarktgrößen waren zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen vergleichbar. Bei Tieren mit CHF waren, unabhängig von der Behandlung, der Blutdruck signifikant erniedrigt und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) signifikant erhöht.

## II. Kontraktionskraft

Die vasomotorische Funktion wurde mit Hilfe etablierter in vitro Tests systematisch analysiert.

Zunächst wurden die Aortenringe mittels Kaliumchlorid(KCl)-induzierter Depolarisation wiederholt kontrahiert (bis zu einem Maximum von 100 mmol/l). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen (Abb. 15). Die rezeptorunabhängige Ansprechbarkeit der glatten Muskulatur auf Kontraktionsreize war demnach vergleichbar.

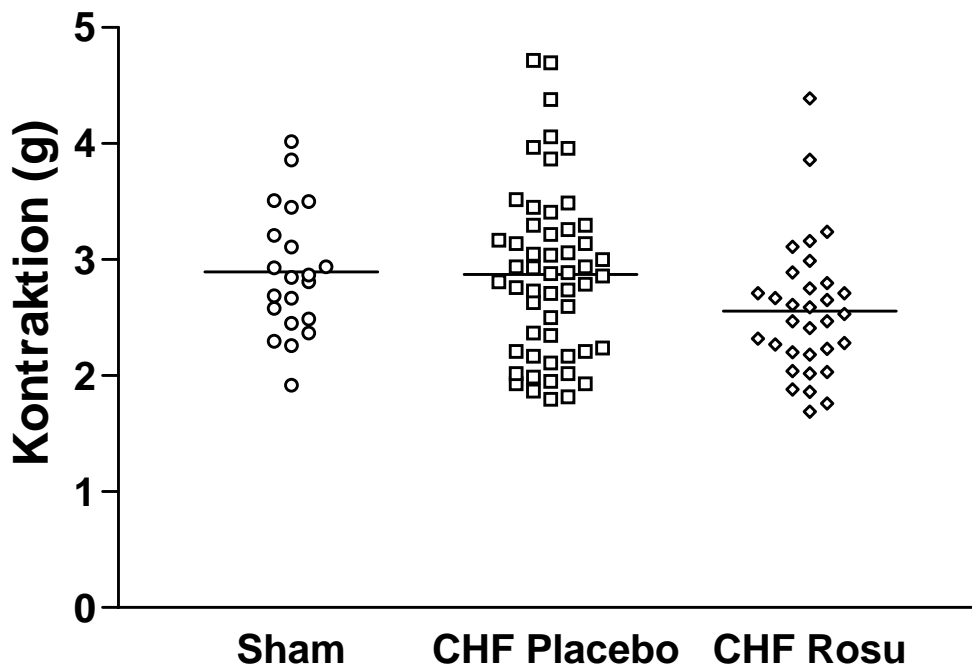


Abb. 15: Überprüfung der rezeptorunabhängigen glattmuskulären Ansprechbarkeit in Aorten von scheinoperierten Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin (Rosu) behandelt wurden, durch wiederholte Kontraktion mittels Kaliumchlorid (KCl; bis zu einem Maximum von 100 mmol/l).  
Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen.

Sowohl die durch eine einzelne hohe Dosis (1  $\mu\text{mol/l}$ ) wie auch durch kumulierende Dosen von Phenylephrin induzierte Vasokonstriktion war bei Ratten mit CHF im Vergleich zu Sham-Tieren signifikant gesteigert. Durch Behandlung mit Rosuvastatin konnte dieser Unterschied teilweise normalisiert werden (Abb. 16, 17).

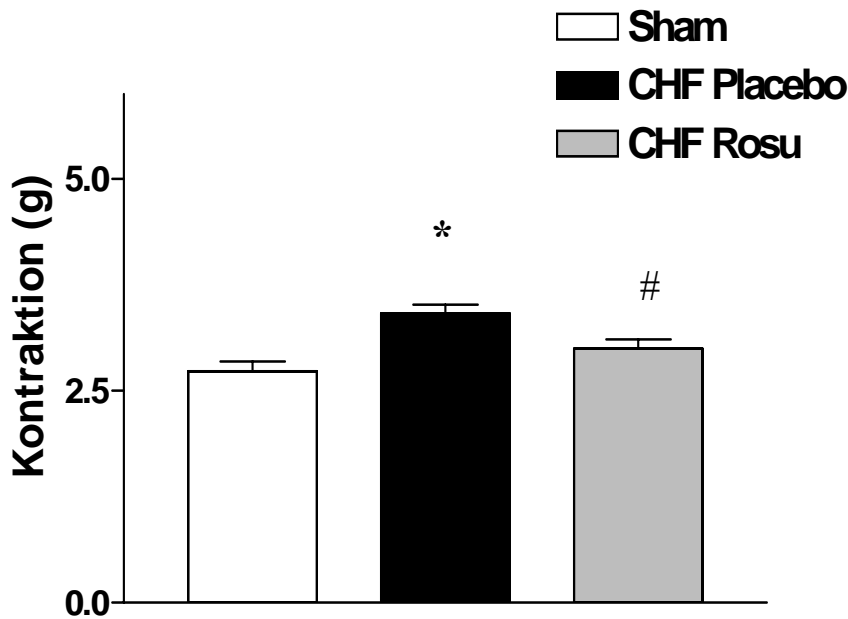


Abb. 16: Kontraktionsverhalten nach einmaliger Gabe von PE 1 µmol/l in Aorten von scheinoperierten Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin (Rosu) behandelt wurden. Signifikant gesteigerte Vasokonstriktion bei Ratten mit CHF im Vergleich zu Sham-Tieren; teilweise Normalisierung durch Rosuvastatin-Behandlung.  
\* = P < 0,01 vs. Sham; # = P < 0,05 vs. CHF Placebo.

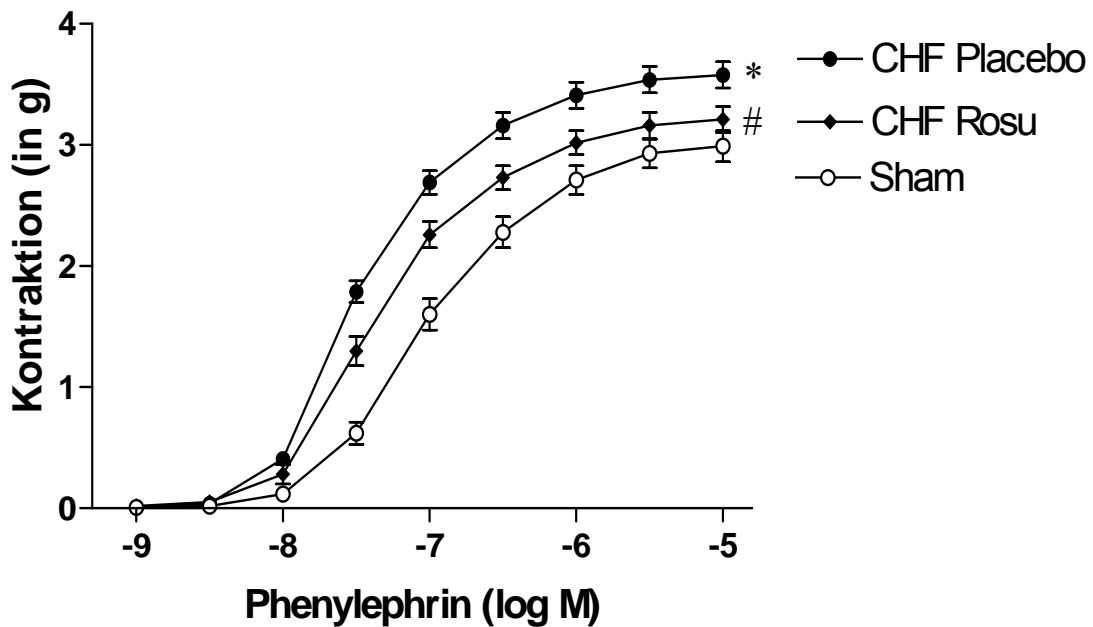


Abb. 17: Konzentrationswirkungskurve der vasokonstriktorischen Funktion durch kumulative Applikation von Phenylephrin in Aorten von scheinoperierten Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder Rosuvastatin (Rosu) behandelt wurden. Signifikant gesteigerte Vasokonstriktion bei Ratten mit CHF im Vergleich zu Sham-Tieren; teilweise Normalisierung durch Rosuvastatin-Behandlung.  
\* = P < 0,05 vs. Sham; # = P < 0,05 vs. CHF Placebo.



Die Hemmung der tonischen NO-Freisetzung durch L-NNA bewirkte in geringfügig vorkontrahierten Aortenringen eine zusätzliche Kontraktion. Diese war bei Tieren mit CHF abgeschwächt, was auf eine Reduktion der kontraktionsinduzierten NO-Freisetzung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige NOS-Aktivierung in CHF-Aorten hindeutet. Bei mit Rosuvastatin behandelten Tieren war die L-NNA-induzierte Konstriktion mit dem Niveau scheinoperierter Tiere vergleichbar (Abb. 18).

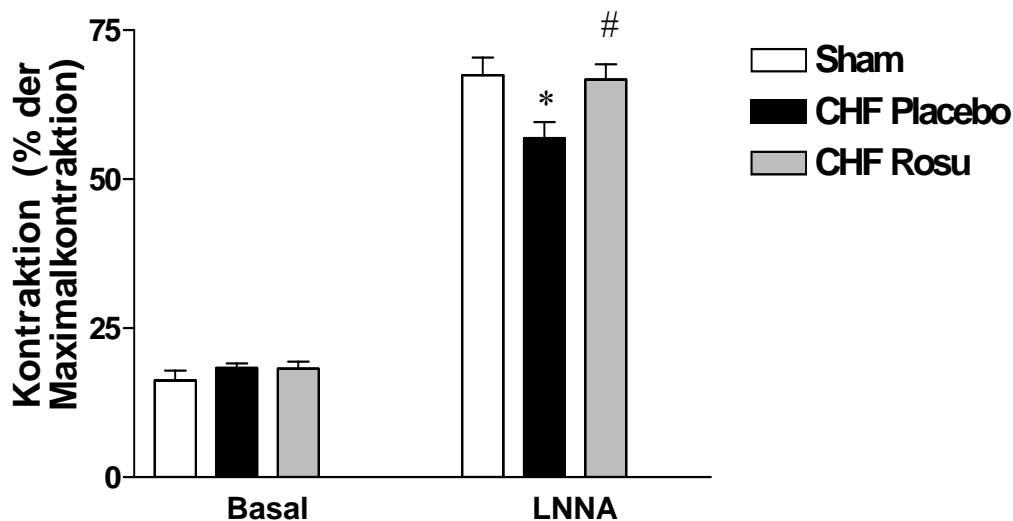


Abb. 18: Zusätzliche Steigerung des Gefäßtonus in geringfügig vorkontrahierten Aortenringen durch NOS-Inhibition mittels  $\text{N}^{\text{G}}$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA) als Nachweis für eine verringerte vaskuläre NO-Bildung in Aorten von scheinoperierten Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin (Rosu) behandelt wurden.

Annähernde Normalisierung der Werte von CHF-Tieren durch Rosuvastatin-Behandlung im Vergleich zu den Sham-Tieren.

\* =  $P < 0,05$  vs. Sham; # =  $P < 0,05$  vs. CHF Placebo.

### III. Relaxation

Die Verabreichung von Acetylcholin in zunehmenden Dosen (Abb. 19 und Tab. 2) bewirkte bei gleich vorkontrahierten Aortenringen eine endothelabhängige Vasorelaxation, die bei CHF signifikant beeinträchtigt war und durch Behandlung mit Rosuvastatin signifikant verbessert wurde.

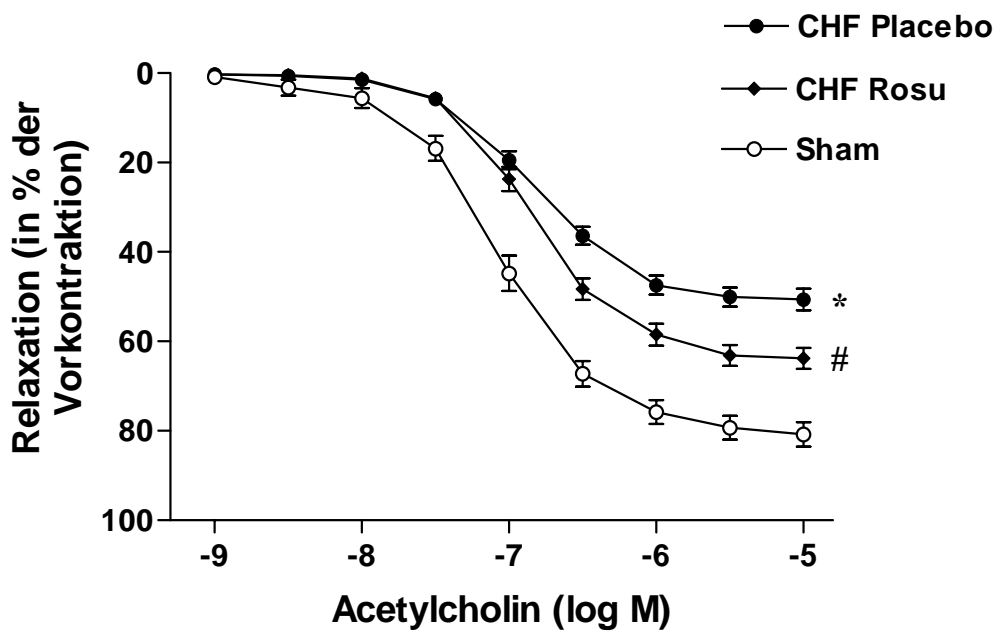


Abb. 19: Endothelabhängige Vasorelaxation durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige NO-Synthasen-(NOS)-Aktivierung mittels kumulativer Applikation von Acetylcholin in den Phenylephrin-vorkontrahierten Aortenringen von scheinoperierten Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin (Rosu) behandelt wurden.

Beeinträchtigung bei CHF, signifikante Verbesserung durch Rosuvastatin-Behandlung.

\* =  $P < 0,01$  vs. Sham; # =  $P < 0,01$  vs. CHF Placebo.

Agonist	Behandlung	$\text{EC}_{50}$ (nmol/l)	$\text{R}_{\text{max}}$ (%)
Acetylcholin	Sham Placebo	$86,0 \pm 7,3$	$80,9 \pm 2,7$
	CHF Placebo	$171,5 \pm 13,5$ *	$50,7 \pm 2,4$ *
	CHF Rosuvastatin	$149,7 \pm 10,6$	$63,9 \pm 2,4$ #

Tab. 2: Endothelabhängige vasomotorische Funktion von Aorten scheinoperierter Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin behandelt wurden.

$\text{EC}_{50}$  = Konzentration des halbmaximalen Effektes;  $\text{R}_{\text{max}}$  = maximale Relaxation;

\* =  $P < 0,01$  vs. Sham Placebo; # =  $p < 0,01$  vs. CHF Placebo.

Die endothelunabhängige Vasorelaxation durch ansteigende Konzentrationen von DEA-NONOate zeigte keine signifikanten Unterschiede in der glattmuskulären Sensitivität für NO zwischen den Untersuchungsgruppen (Abb. 20 und Tab. 3).

Die Unterschiede im Acetylcholin-Versuch sind also eindeutig endothelial bedingt und lassen sich nicht auf eine verminderte Sensitivität der glatten Endothelmuskelzellen für NO zurückführen.

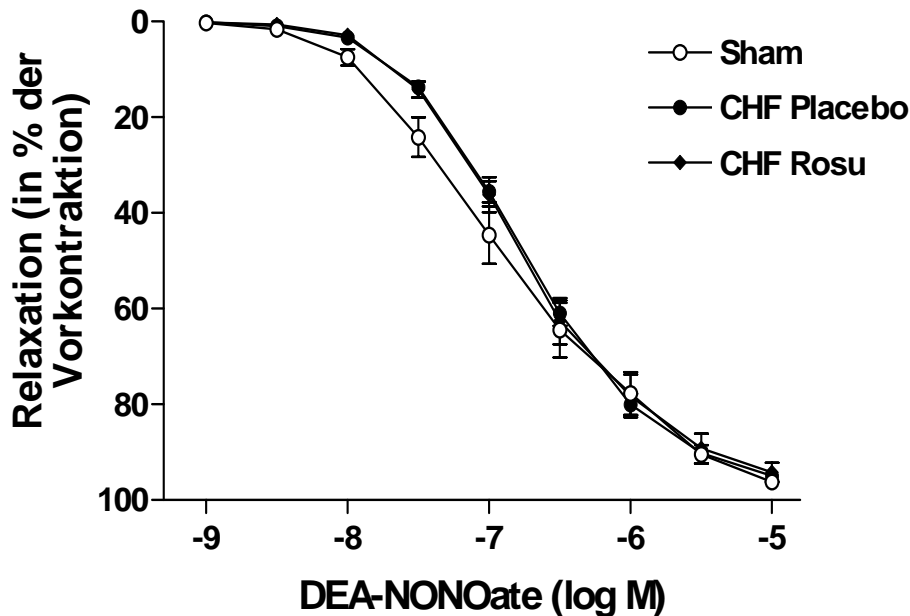


Abb. 20: Endothelunabhängige Relaxation durch ansteigende Konzentrationen von DEA-NONOate zur Untersuchung der glattmuskulären Sensitivität von Aorten scheinoperierter Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin (Rosu) behandelt wurden. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen.

Agonist	Behandlung	EC <sub>50</sub> (nmol/l)	R <sub>max</sub> (%)
DEA-NONOate	Sham Placebo	146,1 ± 54,8	96,3 ± 0,7
	CHF Placebo	278,4 ± 39,1	95,1 ± 0,7
	CHF Rosuvastatin	279,0 ± 76,5	94,3 ± 2,0

Tab. 3: Endothelunabhängige vasomotorische Funktion von Aorten scheinoperierter Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin behandelt wurden.

EC<sub>50</sub> = Konzentration des halbmaximalen Effektes; R<sub>max</sub> = maximale Relaxation.

#### IV. Aortale $O_2^-$ -Bildung

Die Bildung von  $O_2^-$ , gemessen mittels lucigeninverstärkter Chemolumineszenz, war in Aorten von Ratten mit CHF signifikant gesteigert und wurde durch Behandlung mit Rosuvastatin verbessert (Abb.21).

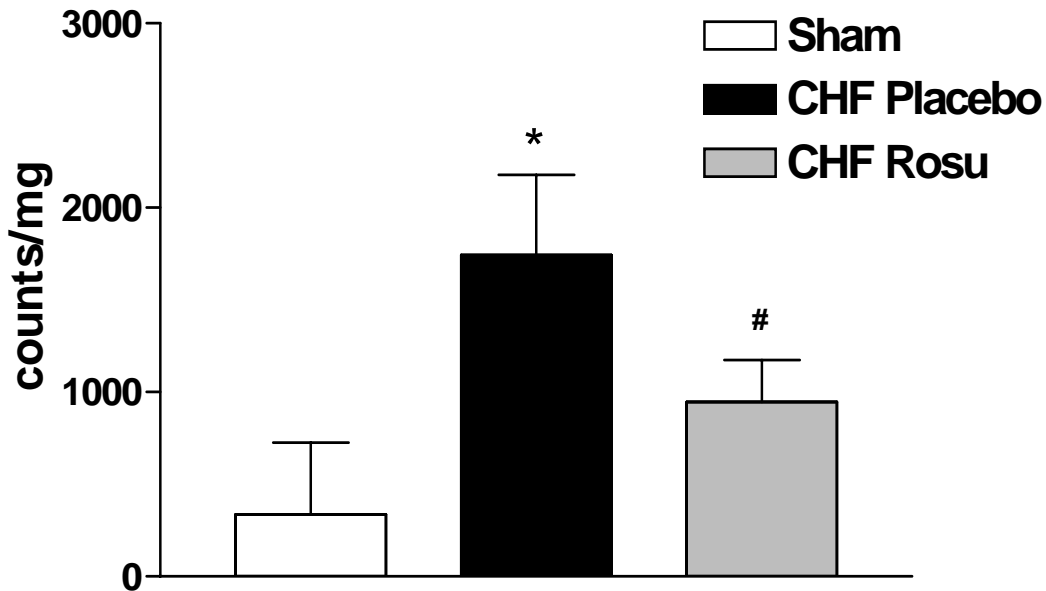


Abb.21: Mittels lucigeninverstärkter Chemolumineszenz gemessene Superoxidationen-Bildung ( $O_2^-$ ) in Aortenringen von scheinoperierten Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin (Rosu) behandelt wurden.

Steigerung der  $O_2^-$ -Bildung bei CHF-Tieren, Reduktion durch Rosuvastatin-Behandlung.

\* =  $P < 0,05$  vs. Sham; # =  $P < 0,05$  vs. CHF Placebo.

Eine qualitative Verifizierung spezifisch für Superoxid erfolgte mittels Dihydroethidin-Färbung. In repräsentativen konfokalmikroskopischen Aufnahmen der  $O_2^-$ -Produktion in Gefäßringen zeigte sich bei CHF-Tieren im Vergleich zu scheinoperierten Ratten eine erhöhte Signalintensität. Bei Versuchstieren, die mit Rosuvastatin behandelt wurden, war diese deutlich herabgesetzt (Abb.22).

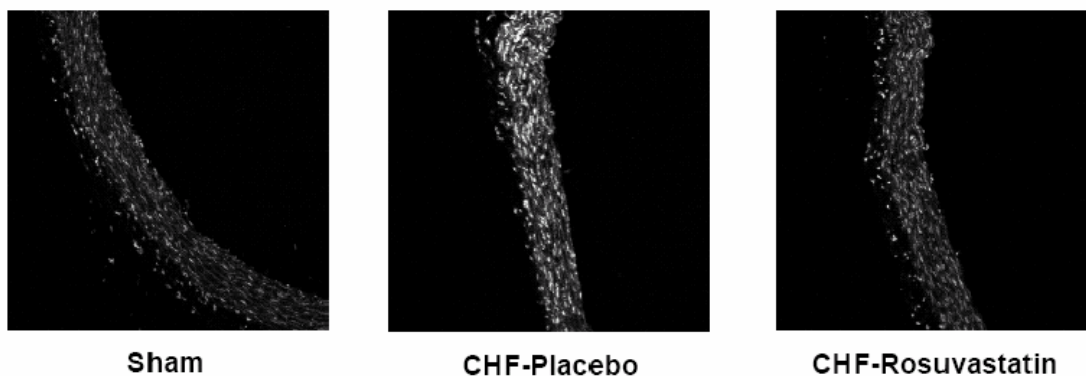
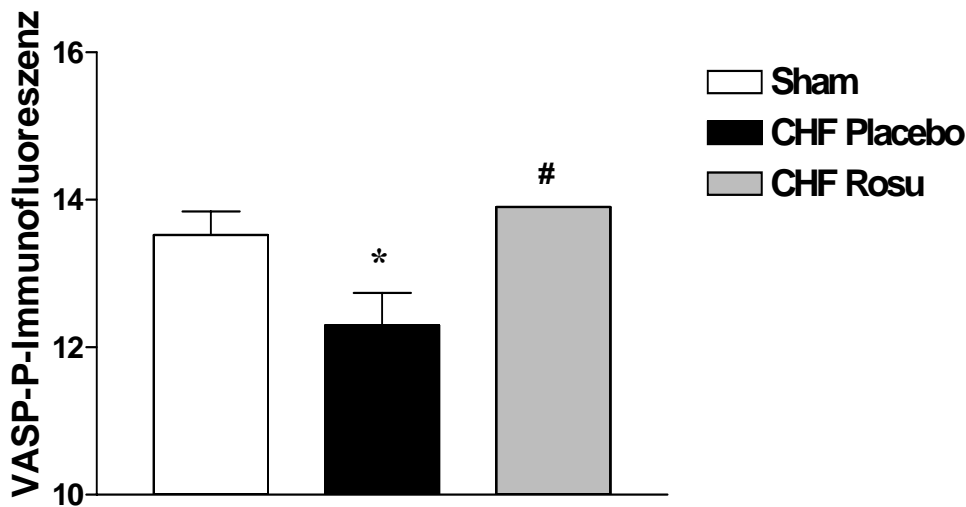


Abb. 22: Qualitative Darstellung der Superoxid-Bildung in Gefäßringen von scheinoperierten Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin behandelt wurden, mit Hilfe des Farbstoffs Dihydroethidin, welcher durch Superoxid zu fluoreszierenden Hydroxyethidium oxidiert wird.

Erhöhte Signalintensität bei CHF-Tieren, signifikante Reduktion durch Rosuvastatin-Behandlung.

## V. VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten

Da die Endothelfunktion signifikant beeinträchtigt war, wurde die intraluminale NO-Bioverfügbarkeit untersucht. Hierzu wurde die NO-vermittelte Signalwirkung auf Thrombozyten mittels in vivo phosphoryliertem VASP in Thrombozyten aus Vollblut, welches sofort nach der Gewinnung fixiert wurde, gemessen. Die basale VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten an Ser<sup>239</sup> war bei CHF signifikant reduziert und bei CHF-Ratten, die mit Rosuvastatin behandelt wurden, normalisiert (Abb. 23).



**Abb. 23:** Messung der basalen in vivo Phosphorylierung von VASP an Ser<sup>239</sup> in Thrombozyten von scheinoperierten Ratten (Sham) vs. Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF), die entweder für 10 Wochen mit Placebo oder mit Rosuvastatin (Rosu) behandelt wurden.

**Signifikante Reduktion der basalen VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten an Ser<sup>239</sup> bei CHF-Tieren, Normalisierung durch Rosuvastatin-Behandlung.**

Ergebnisse als mittlere Fluoreszenz ± SEM; \* = P < 0,05 vs. Sham; # = P < 0,05 vs. CHF Placebo.

## **D. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Statine in einem normocholesterinämischen Modell der experimentellen Herzinsuffizienz eine Verbesserung der endothelialen Funktion und der NO-Bioverfügbarkeit bewirken.

Zur Untersuchung der pathophysiologischen Mechanismen und der Folgen einer kongestiven Herzinsuffizienz eignet sich das Modell des chronischen Myokardinfarkts bei sonst gesunden Ratten. Hierbei kommt es nach operativer Induktion eines Myokardinfarkts durch Ligatur der linken Koronararterie zu einer progressiven Insuffizienz des linken Ventrikels einschließlich neurohumoraler Aktivierung. Dieses Tiermodell erlaubt die Bewertung der Modifikation der endothelialen Funktion unabhängig von anderen atherogenen Risikofaktoren, da die nachfolgenden systemischen Veränderungen einzig durch das Ausmaß der linksventrikulären Beeinträchtigung bedingt sind und nicht durch eventuell vorbestehende vaskuläre Dysfunktion oder Thromben beeinflusst werden. Da die Messungen 10 Wochen nach Ligatur in einem chronischen Stadium der Erkrankung durchgeführt werden, hat der operative Eingriff selbst keine Auswirkungen auf die Analysen. Bei CHF führt die Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion zu verringerten Scherkräften auf der luminalen Seite des Gefäßendothels, welche physiologischerweise einer der wichtigsten Regulatoren der Expression und Aktivierung von eNOS *in vivo* sind<sup>30</sup>. Die Folge ist eine Dysfunktion des Endothels. Dabei kommt es zu einer verringerten Bildung von NO und zu einer vermehrten Entstehung von Sauerstoffradikalen, welche durch entkoppelte endotheliale NO-Synthasen und NADPH-Oxidasen produziert werden. Diese Radikale inaktivieren NO, wodurch es zu einer zusätzlichen Verringerung der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit kommt. Stickstoffmonoxid induziert die Phosphorylierung von VASP durch NO-abhängige Aktivierung der Guanylatcyclase und anschließender cGMP-vermittelter Stimulation von cGMP-abhängigen Kinasen<sup>53</sup>. Ein Mangel an NO ist folglich mit einer verringerten Phosphorylierung von VASP in Thrombozyten assoziiert<sup>99</sup>. Die VASP-Phosphorylierung spiegelt damit die Bioaktivität des NO/cGMP-Weges wieder<sup>50;53;59-61</sup> und ist ein essentieller Bestandteil der Inhibition der Thrombozytenaktivierung. Die Relevanz dieses Signalweges wird durch experimentelle Studien unterstrichen, welche eine Steigerung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie eine erhöhte Expression von P-Selektin bei VASP-defizienten Mäu-

sen zeigen<sup>59;100</sup>. Die Hemmung der NO-Bildung hat eine verringerte VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten begleitet von einer gesteigerten Plättchenaktivierung zur Folge. Durch Gabe von exogenem NO kann dieser Effekt umgekehrt werden<sup>23</sup>. Darüber hinaus sind bei CHF Thrombozyten weniger sensitiv gegenüber NO<sup>101</sup>. Verschiedene Therapieansätze zur Modulation der Mechanismen der Endotheldysfunktion wurden und werden erforscht, einige davon konnten bereits eine klare Verbesserung der NO-Bioverfügbarkeit und der endothelialen Gefäßfunktion beweisen. Bei CHF kommt es zu einer deutlichen Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), wodurch es zu einer Angiotensin II-vermittelten Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes kommt<sup>102;103</sup>. Durch den Einsatz von ACE-Inhibitoren<sup>104;105</sup>, AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten<sup>103;106</sup> und Aldosteron-Antagonisten<sup>97;107-109</sup> kann eine Verbesserung der hämodynamischen Parameter, der Symptome und der Mortalität von CHF-Patienten erreicht werden. Auch konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Gabe eines Endothelin-Antagonisten und eines ACE-Hemmers bei Herzinsuffizienz eine Reduktion des systemischen Gefäßwiderstandes<sup>110</sup> und der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung<sup>111</sup> bewirkt. Ebenfalls von Interesse ist die Frage, welchen Einfluß Antioxidantien wie Vitamin E oder Vitamin C auf die endotheliale Funktion<sup>112</sup>, die Entstehung einer Herzinsuffizienz<sup>113;114</sup> oder auf die Größe eines Myokardinfarktes haben<sup>115-117</sup>. So konnte gezeigt werden, dass eine langfristige Gabe von Vitamin E im experimentellen Modell eine Normalisierung der Acetylcholin-induzierten Relaxation, vermutlich durch eine Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit aufgrund verringerter O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion, bewirkt<sup>45</sup>. Darüber hinaus scheint die Behandlung mit Vitamin E den Übergang von der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz zu verzögern<sup>113</sup>. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz führte die chronische Zufuhr hoher Dosen Vitamin C zur Verbesserung der beeinträchtigten NO-vermittelten Dilatation in Arterien mit Windkesselfunktion<sup>112</sup>. Patienten mit CHF leiden unter einer Verminderung ihrer physischen Leistungsfähigkeit und sind deshalb im alltäglichen Leben eingeschränkt und von der Teilnahme am sozialen Leben mehr oder weniger ausgegrenzt. Lange Zeit galten Ruhe und Vermeidung körperlicher Anstrengung als Grundregel für herzinsuffiziente Patienten. Im letzten Jahrzehnt aber hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass ein adäquat dosiertes Trainingsprogramm auch bei Patienten mit stabiler chronischer Herzinsuffizienz nicht zu einer Verschlechterung der funktionellen Leistungsfähigkeit des Herzens führt, sondern eine Verbesserung der Belastbarkeit und der Lebensqualität

der Lebensqualität der Patienten bewirkt<sup>118-120</sup>. Körperliches Training führt zu einer Korrektur der Endotheldysfunktion und zu einer Verringerung des Sympathikotonus<sup>121;122</sup>. Obwohl die genauen Mechanismen bisher noch unklar sind, eine durch Scherkräfte induzierte Steigerung der NO-Bildung<sup>123</sup> ist ebenso wie eine Reduktion des oxidativen Stresses durch Induktion der Expression antioxidativer Enzyme<sup>124</sup> im Gespräch, scheinen viele Herzinsuffizienz-Patienten von einem Fitnessprogramm profitieren zu können. Durch Behandlung mit Statinen konnte bei hypercholesterinämischen Patienten und an experimentellen Modellen der Hypercholesterinämie vielfältige positive Wirkungen nachgewiesen werden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Statine die endotheliale Funktion auch bei normocholesterinämischen Versuchstieren mit schwerer Herzinsuffizienz deutlich verbessern. Da nur Tiere mit CHF trotz Statinbehandlung in die Untersuchung eingegangen sind, ist eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nicht für die beobachteten Veränderungen der Endothelfunktion verantwortlich. Die Normalisierung der VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten legt nahe, dass die Reduktion der Thrombozytenreaktivität durch Rosuvastatin mit einer Verbesserung der endoluminalen NO-Bioverfügbarkeit zusammenhängt. Neben der reinen Blockade der Cholesterinbiosynthese wirkt die HMG-CoA-Reduktase-Inhibition noch über weitere, so genannte pleiotrope Effekte. Statine üben verschiedene protektive Effekte auf das Endothel aus, zu welchen vor allem eine Erhöhung der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit<sup>125</sup> durch Steigerung der Expression vaskulärer eNOS<sup>126</sup> und Reduktion der Aktivität von O<sub>2</sub><sup>-</sup>-bildenden NAD(P)H-Oxidasen<sup>127</sup> beiträgt. Auch kommt es zu einer Normalisierung der Thrombozytenfunktion, zu einer Stabilisierung atherosklerotischer Plaques und zu einer Unterdrückung von Gefäßwandentzündungen<sup>128;129</sup>. Darüber hinaus verhindern Statine die Angiotensin-II-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Rattenaorten<sup>130</sup> und beeinflussen die Thrombozytenaktivierung durch Verminderung der Gewebefaktor- und Thrombinbildung auf zellulärer Ebene positiv<sup>82</sup>. So kommt es durch Reduktion der Thrombozytenaktivierung und Verringerung der Thromboxanbiosynthese<sup>129;131</sup> zu einer selteneren Entstehung von Thromben<sup>83</sup>. Die akute Verabreichung von Statinen steigert signifikant die flussvermittelte Dilatation der Arteria brachialis bei gesunden, normocholesterinämischen Versuchspersonen<sup>132</sup>. Auch wurden rasche Wirkungen der Statine auf die koronare Endothelfunktion beschrieben<sup>133;134</sup>. Neben der positiven Modulation nach der Einleitung einer Statinbehandlung



wurde außerdem eine anschließende Hyperreaktivität der Thrombozyten nach Unterbrechung selbiger beschrieben<sup>135</sup>. Die Kombination von Pravastatin und einem ACE-Hemmer senkte signifikant die Thrombozytenantwort auf Thrombin bei atheroskleroseanfälligen Affen<sup>136</sup>. Die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase scheint bei Patienten mit KHK ohne Herzinsuffizienz sogar so wirksam zu sein, dass in diesen Fällen Statine RAAS-Hemmern den Rang als Mittel der Wahl zusätzlich zur konventionellen Therapie ablaufen könnten. ACE-Hemmung bewirkt neben der reinen Blutdrucksenkung auch eine Verringerung der Morbidität und Mortalität bei Patienten mit eingeschränkter Gefäßfunktion oder mit Diabetes mellitus ohne Herzinsuffizienz und reduzierter Ejektionsfraktion<sup>137</sup> ebenso wie bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit ohne Hinweise einer Herzinsuffizienz<sup>138</sup>. Deshalb erstaunten die Ergebnisse einer neuen großen Studie (Prevention of Events with Angiotensin Converting Enzyme Inhibition (PEACE))<sup>139</sup> die Fachwelt, da sie bei Patienten mit stabiler KHK und normaler linksventrikulärer Funktion keine signifikanten Verbesserungen im Überleben der Trandolapril- gegenüber der Placebogruppe zeigte, wenn die Probanden bereits mit Statinen behandelt wurden. Bringt die Kombination der beiden Wirkstoffgruppen unter Umständen nicht immer Vorteile, sondern für manchen Patienten möglicherweise nur eine Addition der Nebenwirkungen? Die auf dem ersten Blick widersprüchlichen Resultate der Studien lassen sich nun unterschiedlich erklären. Zunächst einmal sind eventuell nicht alle ACE-Hemmer bei allen Indikationen gleich wirksam<sup>140</sup>. Auch könnten bei Patienten mit normaler linksventrikulärer Funktion höhere Wirkstoffdosen notwendig sein, um einen ähnlichen Vorteil im Gesamtkollektiv hinsichtlich einer Mortalitätsreduktion wie bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion zu erzielen. Interessanterweise zeigt eine retrospektive Betrachtung der Ergebnisse der TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction)-Studie<sup>141</sup>, dass ACE-Inhibition bei KHK-Patienten ohne linksventrikuläres systolisches Versagen nur bei gleichzeitig überdurchschnittlich hohen LDL-Cholesterinspiegeln die Funktion der Koronarendothelien signifikant verbesserte. Diese Beobachtung wird durch eine ähnliche Analyse der QUIET (The QUinapril Ischemic Event Trial)-Studie<sup>142</sup> verstärkt, da auch dort ACE-Hemmung nicht die gesamte Rate an kardiovaskulären Ereignissen reduzierte, sondern nur die der Patienten mit erhöhten LDL-Cholesterinwerten. Statine und ACE-Hemmer haben einen gemeinsamen Wirkmechanismus bezüglich der Aufnahme oxidiertem LDLs (oxLDL): beide

reduzieren die Aktivierung des Lecithin-ähnlichen oxLDL-Rezeptors und verringern dadurch die Aufnahme von oxLDL-Cholesterin<sup>143</sup>. Da nun die PEACE-Patienten bereits eine intensive, die oxLDL-Aufnahme verringernde Basistherapie erhielten, 70% waren mit Lipidsenkern vorbehandelt – im Vergleich zu 29% (HOPE) und 56% (EUROPA) - und damit eine entsprechend niedrigere LDL-Konzentration aufwiesen, könnte die ACE-Inhibition deshalb keinen zusätzlichen Nutzen gebracht haben. Eine mögliche Schlussfolgerung aus der PEACE-Studie ist deswegen, dass Gefäßpatienten ohne Herzinsuffizienz unter einer adäquaten Standardtherapie, einschließlich HMG-CoA-Reduktase-Inhibition, ein niedrigeres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse haben. Bei nicht-herzinsuffizienten Patienten könnte demgemäß zukünftig der Einsatz von Statinen anstelle eines ACE-Hemmers ausreichend sein.

Patienten mit bestehender Herzinsuffizienz könnten jedoch unabhängig von ihren Cholesterin-Plasmawerten von der Gabe eines HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors zusätzlich zu einem ACE-Hemmer profitieren, da Statine, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, das NO/O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Gleichgewicht verbessern und hierdurch auch linksventrikuläres Remodelling und Funktion positiv modulieren<sup>144;145</sup>. Zwar wurde in einer Reihe neuerer Studien von positiven Auswirkungen der Statinbehandlung auf die Überlebensraten von CHF-Patienten berichtet<sup>92;93</sup>, dennoch fehlen weiterhin große prospektive Studien, die diese retrospektiven Ergebnisse bestätigen. Ob Statine bald Eingang in die Standardtherapie der Herzinsuffizienz finden, bleibt deshalb noch abzuwarten.

## **E. Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen einer 10-wöchigen Therapie mit dem 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-(HMG-CoA)-Reduktase-Inhibitor Rosuvastatin auf die endotheliale Funktion, die Stickstoffmonoxid (NO)-Bioverfügbarkeit und die Phosphorylierung des „vasodilator-stimulated phosphoprotein“ (VASP) in Thrombozyten im Rattenmodell der chronischen Herzinsuffizienz (CHF) nach Koronarligatur untersucht.

Die Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion war in Gefäßringen von Versuchstieren mit CHF im Vergleich zu Tieren ohne Herzinsuffizienz deutlich verstärkt, was sich auf eine Reduktion der tonischen NO-Freisetzung in Aortenringen von CHF-Ratten zurückführen ließ. Die Behandlung mit Rosuvastatin erhöhte die NO-Freisetzung und normalisierte die gesteigerte Kontraktionsantwort bei CHF-Tieren. Die durch Acetylcholin induzierte endothelabhängige Vasorelaxation war bei CHF signifikant beeinträchtigt und wurde durch die Behandlung mit Rosuvastatin ebenfalls deutlich verbessert. Da sich keine Unterschiede in der endothelunabhängigen Relaxation nach Gabe eines NO-Donors zwischen den Untersuchungsgruppen zeigten, ist die Reduktion der Acetylcholin-Antwort demnach eindeutig endothelial bedingt und lässt sich nicht auf eine verminderte NO-Sensitivität der Muskelzellen zurückführen. Diese endotheliale Dysfunktion scheinen Statine zumindest teilweise normalisieren zu können. Die Bildung von Superoxidanionen in Aorten von CHF-Tieren war im Vergleich zu Tieren ohne Herzinsuffizienz signifikant gesteigert. Durch chronische Therapie mit Rosuvastatin konnte dies signifikant reduziert werden. Passend hierzu war die intraluminale NO-Bioverfügbarkeit, gemessen als basale VASP-Phosphorylierung an Ser<sup>239</sup> in Thrombozyten, bei CHF-Tieren erniedrigt und wurde durch die Rosuvastatin-Behandlung normalisiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es durch chronische Therapie mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Rosuvastatin zu einer Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit und damit zu einer Verbesserung der Endothelfunktion bei Ratten mit Herzinsuffizienz kommt.

## **F. Literatur**

1. Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 1999;20:447-455.
2. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med*. 1991;325:293-302.
3. Cohn JN, Archibald DG, Ziesche S et al. Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med*. 1986;314:1547-1552.
4. Dunkman WB, Johnson GR, Carson PE et al. Incidence of thromboembolic events in congestive heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation*. 1993;87:VI94-101.
5. Teerlink JR, Clozel M, Fischli W et al. Temporal evolution of endothelial dysfunction in a rat model of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:615-620.
6. Bauersachs J, Fraccarollo D, Galuppo P et al. Endothelin receptor blockade improves endothelial vasomotor dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2000;47:142-149.
7. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 1994;120:227-237.
8. Lüscher TF, Rubanyi GM, Masaki T et al. Endothelial control of vascular tone and growth. *Circulation*. 1993;87[suppl V]:V-1-V-2.
9. Griendling KK, Alexander RW. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J*. 1996;10:283-292.
10. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H., Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie - 8., völlig neu bearb. und erw. Aufl. - Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges. 2001.
11. Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*. 1986;78:31-39.
12. Ganten D, Hermann K, Unger T et al. The tissue renin-angiotensin systems: focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. *Clin Exp Hypertens*. 1983;5:1099-1118.

13. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 1978;30:293-331.
14. Vanhoutte P. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation.* 1993;87:V-9-V-17.
15. Chen GF, Yamamoto Y, Miwa K et al. Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. *Am J Physiol.* 1991;260:H1888-H1892.
16. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.
17. Moncada S, Radomski MW, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:2495-2501.
18. Fleming I, Busse R. NO: The primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:5-14.
19. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci.* 2000;113:1671-1676.
20. Sausbier M, Schubert R, Voigt V et al. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res.* 2000;87:825-830.
21. Vecchione C, Brandes RP. Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circ Res.* 2002;91:173-179.
22. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001;88:756-762.
23. Schäfer A, Wiesmann F, Neubauer S et al. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation.* 2004;109:1819-1822.
24. Schäfer A, Alp NJ, Cai S et al. Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1720-1726.
25. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999;43:521-531.
26. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-666.
27. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ et al. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem.* 1996;271:6518-6522.

28. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J et al. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:6448-6453.
29. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999;43:509-520.
30. Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 2002;7:132-147.
31. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. 1997;99:41-46.
32. Kaye DM, Parnell MM, Ahlers BA. Reduced myocardial and systemic L-arginine uptake in heart failure. *Circ Res*. 2002;91:1198-1203.
33. Kaye DM, Ahlers BA, Autelitano DJ et al. In vivo and in vitro evidence for impaired arginine transport in human heart failure. *Circulation*. 2000;102:2707-2712.
34. Pritchard KA, Jr., Groszek L, Smalley DM et al. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res*. 1995;77:510-518.
35. Bauersachs J, Bouloumié A, Fraccarollo D et al. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation*. 1999;100:292-298.
36. Bouloumié A, Bauersachs J, Linz W et al. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced NO synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*. 1997;30:934-941.
37. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*. 1996;33:181-194.
38. Belch JJF, Bridges AB, Scott N et al. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J*. 1991;65:245-248.
39. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1352-1356.
40. Brune B, Schmidt KU, Ullrich V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem*. 1990;192:683-688.
41. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141-1148.

42. Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R et al. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation*. 2002;105:1170-1175.
43. White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR et al. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:8745-8749.
44. Arimura K, Egashira K, Nakamura R et al. Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H68-H75.
45. Bauersachs J, Fleming I, Fraccarollo D et al. Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E. Attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc Res*. 2001;51:344-350.
46. Bauersachs J, Schäfer A. Endothelial dysfunction in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2:115-124.
47. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction: a novel therapeutic target. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:51-60.
48. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:257-265.
49. Mülsch A, Oelze M, Kloss S et al. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation*. 2001;103:2188-2194.
50. Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2000;87:999-1005.
51. Waldmann R, Nieberding M, Walter U. Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Eur J Biochem*. 1987;167:441-448.
52. Reinhard M, Jarchau T, Walter U. Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001;26:243-249.
53. Eigenthaler M, Nolte C, Halbruegge M et al. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets: estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem*. 1992;205:471-481.

54. Schäfer A, Vollkommer T, Burkhardt M et al. Endothelium-dependent and – independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:397-405.
55. Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K et al. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 1998;273:20029-20035.
56. Smolenski A, Poller W, Walter U et al. Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem.* 2000;275:25723-25732.
57. Butt E, Abel K, Krieger M et al. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem.* 1994;269:14509-14517.
58. Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M et al. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO Journal.* 1999;18:37-48.
59. Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M et al. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:8120-8125.
60. Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P et al. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem.* 1994;225:21-27.
61. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol.* 2001;62:1153-1161.
62. Bearer EL, Prakash JM, Manchester RD et al. VASP protects actin filaments from gelsolin: an in vitro study with implications for platelet actin reorganizations. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2000;47:351-364.
63. Harbeck B, Huttelmaier S, Schluter K et al. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem.* 2000;275:30817-30825.
64. Massberg S, Sausbier M, Klatt P et al. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med.* 1999;189:1255-1264.
65. O'Connor CM, Gurbel PA, Serebruany VL. Usefulness of soluble and surface-bound P-selectin in detecting heightened platelet activity in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1999;83:1345-1349.



66. Stumpf C, Lehner C, Eskafi S et al. Enhanced levels of CD154 (CD40 ligand) on platelets in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2003;5:629-637.
67. Ibarra-Alvarado C, Galle J, Melichar VO et al. Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Mol Pharmacol.* 2002;61:312-319.
68. Münzel T, Li H, Mollnau H et al. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res.* 2000;86:E7-E12.
69. Mollnau H, Wendt M, Szocs K et al. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 2002;90:E58-E65.
70. Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R et al. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation.* 2002;105:1170-1175.
71. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:11041-11048.
72. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109:1125-1131.
73. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994;344:1383-1389.
74. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med.* 1998;339:1349-1357.
75. Farmer JA. Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep.* 2000;2:208-217.
76. Inoue I, Goto S, Mizotani K et al. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. *Life Sci.* 2000;67:863-876.
77. Takemoto M, Node K, Nakagami H et al. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 2001;108:1429-1437.

78. Shaul PW. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol*. 2003;547:21-33.
79. Muller-Wieland D, Kotzka J, Krone W. Stabilization of atherosclerotic plaque during lipid lowering. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8:348-353.
80. Muller-Wieland D, Faust M, Kotzka J et al. [Mechanisms of plaque stabilization]. *Herz*. 1999;24:26-31.
81. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA*. 1998;279:1643-1650.
82. Fenton JW, Jr., Shen GX. Statins as cellular antithrombotics. *Haemostasis*. 1999;29:166-169.
83. Thompson PD, Moyna NM, Michael White C et al. The effects of hydroxymethyl-glutaryl co-enzyme A reductase inhibitors on platelet thrombus formation. *Atherosclerosis*. 2002;161:301-306.
84. Corsini A. Inhibitor of proliferation of arterial smooth-muscle cells by fluvastatin. *Lancet*. 1996;348:1584-1585.
85. Corsini A. Effect of the new HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin (BAY W 6228) on migration, proliferation and cholesterol synthesis in arterial myocytes. *Pharmacol Res*. 1996;33:55-61.
86. 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.
87. 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.
88. Laufs U, Gertz K, Huang P et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke*. 2000;31:2437-2449.
89. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension*. 2001;37:1450-1457.
90. Wagner AH, Köhler T, Rückschloss 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.

91. Muller-Wieland D, Faust M, Krone W. [Cholesterol synthesis inhibitors. Clinical studies on lowering coronary risk and plaque stabilization]. *Internist (Berl)*. 1998;39:934-942.
92. Horwich TB, MacLellan WR, Fonarow GC. Statin therapy is associated with improved survival in ischemic and non-ischemic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:642-648.
93. Mozaffarian D, Nye R, Levy WC. Statin therapy is associated with lower mortality among patients with severe heart failure. *Am J Cardiol*. 2004;93:1124-1129.
94. McTaggart F, Buckett L, Davidson R et al. Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Cardiol*. 2001;87:28B-32B.
95. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979;44:503-512.
96. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101:2981-2988.
97. Schäfer A, Fraccarollo D, Hildemann SK et al. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2003;58:655-662.
98. Schwarz UR, Geiger J, Walter U et al. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets. *Thromb Haemost*. 1999;82:1145-1152.
99. Schäfer A, Fraccarollo D, Hildemann S et al. Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by selective aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition: Role of endothelial function and platelet VASP phosphorylation. *Thromb Haemost*. 2003;89:1024-1030.
100. Massberg S, Grüner S, Konrad I et al. Enhanced *in vivo* platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood*. 2004;103:136-142.
101. Anderson RA, Ellis GR, Chirkov YY et al. Determinants of platelet responsiveness to nitric oxide in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2004;6:47-54.
102. Wollert KC, Drexler H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43:838-849.
103. Carson PE. Rationale for the use of combination angiotensin-converting enzyme inhibitor/angiotensin II receptor blocker therapy in heart failure. *Am Heart J*. 2000;140:361-366.

104. Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M et al. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89:2273-2282.
105. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res*. 1985;57:84-95.
106. Hornig B, Landmesser U, Kohler C et al. Comparative effect of ACE inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase. *Circulation*. 2001;103:799-805.
107. Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999;341:709-717.
108. Farquharson CA, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000;101:594-597.
109. Pitt B, Remme W, Zannad F et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348:1309-1321.
110. Luscher TF, Enseleit F, Pacher R et al. Hemodynamic and Neurohumoral Effects of Selective Endothelin A (ETA) Receptor Blockade in Chronic Heart Failure. The Heart Failure ETA Receptor Blockade Trial (HEAT). *Circulation*. 2002;106:2666-2672.
111. Bauersachs J, Fraccarollo D, Schäfer A et al. ACE-inhibition and endothelin-antagonism for endothelial dysfunction in heart failure: mono- or combination therapy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;40:594-600.
112. Hornig B, Arakawa N, Kohler C et al. Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998;97:363-368.
113. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:506-514.
114. Palace VP, Hill MF, Farahmand F et al. Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function after myocardial infarction. *Circulation*. 1998;99:121-126.
115. Kuribayashi Y, Katori M, Majima M et al. Inhibitory effects of a phosphate diester of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid (EPC-K<sub>1</sub>) on myocardial infarction in rats. *Int J Tiss React*. 1996;18:73-79.

116. Klein HH, Pich S, Lindert S et al. Combined treatment with vitamins E and C in experimental myocardial infarction in pigs. *Am Heart J*. 1989;118:667-673.
117. Axford-Gatley RA, Wilson GJ. Reduction of experimental myocardial infarct size by oral administration of  $\alpha$ -tocopherol. *Cardiovasc Res*. 1991;25:89-92.
118. Hambrecht R, Niebauer J, Fiehn E et al. Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles. *J Am Coll Cardiol*. 1995;25:1239-1249.
119. Coats AJ, Adamopoulos S, Meyer TE et al. Effects of physical training in chronic heart failure. *Lancet*. 1990;335:63-66.
120. Sullivan MJ, Higginbotham MB, Cobb FR. Exercise training in patients with severe left ventricular dysfunction. Hemodynamic and metabolic effects. *Circulation*. 1988;78:506-515.
121. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998;98:2709-2715.
122. Hambrecht R, Gielen S, Linke A et al. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. *JAMA*. 2000;283:3095-3101.
123. Miller VM, Vanhoutte PM. Enhanced release of endothelium-derived factor(s) by chronic increases in blood flow. *Am J Physiol*. 1988;255:H446-H451.
124. Ennezat PV, Malendowicz SL, Testa M et al. Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:194-198.
125. Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2004;110:1933-1939.
126. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension*. 2001;37:1450-1457.
127. Vecchione C, Brandes RP. Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circ Res*. 2002;91:173-179.
128. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:729-736.

129. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1712-1719.
130. Delbosc S, Cristol JP, Descomps B et al. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension.* 2002;40:142-147.
131. Koh KK. Effects of HMG-CoA reductase inhibitor on hemostasis. *International Journal of Cardiology.* 2000;76:23-32.
132. Omori H, Nagashima H, Tsurumi Y et al. Direct *in vivo* evidence of a vascular statin: a single dose of cerivastatin rapidly increases vascular endothelial responsiveness in healthy normocholesterolaemic subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2002;54:395-399.
133. Wassmann S, Faul A, Hennen B et al. Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ Res.* 2003;93:e98-103.
134. Tiefenbacher CP, Friedrich S, Blecke T et al. ACE inhibitors and statins acutely improve endothelial dysfunction of human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H1425-H1432.
135. Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M et al. Platelet hyperreactivity after statin treatment discontinuation. *Thromb Haemost.* 2003;90:476-482.
136. Hale LP, Craver KT, Berrier AM et al. Combination of fosinopril and pravastatin decreases platelet response to thrombin receptor agonist in monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1643-1646.
137. Yusuf S, Sleight P, Pogue J et al. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000;342:145-153.
138. Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet.* 2003;362:782-788.
139. Braunwald E, Domanski MJ, Fowler SE et al. Angiotensin-converting-enzyme inhibition in stable coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2004;351:2058-2068.
140. Furberg CD, Pitt B. Are all angiotensin-converting enzyme inhibitors interchangeable? *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1456-1460.
141. Mancini GB, Henry GC, Macaya C et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation.* 1996;94:258-265.

142. Pitt B, O'Neill B, Feldman R et al. The QUinapril Ischemic Event Trial (QUIET): evaluation of chronic ACE inhibitor therapy in patients with ischemic heart disease and preserved left ventricular function. *Am J Cardiol.* 2001;87:1058-1063.
143. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD et al. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation.* 2003;108:2041-2048.
144. Bauersachs J, Galuppo P, Fraccarollo D et al. Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104:982-985.
145. Nahrendorf M, Hu K, Hiller K-H et al. Impact of hydroxymethylglutary coenzyme A reductase inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1695-1700.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Georg Ertl möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I durchzuführen.

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Johann Bauersachs. Ihm bin ich sehr dankbar für die hervorragende Unterstützung, für das Vertrauen in meine Arbeit und für die kritische Korrektur dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Schäfer für seine unentwegte Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und seine äußerst wertvollen Anregungen und Hilfestellungen.

Bei allen Mitgliedern der Forschungsgruppe möchte ich mich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme, das ausgezeichnete Arbeitsklima und die permanente Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich von ganzem Herzen für die uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und der Promotion.