

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluß von Ginkgo biloba EGb 761 auf arteriosklerotische
Nanoplaquebildung und kardiovaskuläres Risikoprofil**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Petra S. Schäfer
aus Stuttgart

Gutachter : 1. Prof. Dr. med. G. Siegel

2. Prof. Dr. med. W. Haverkamp

3. Prof. Dr. B. Kleuser

Datum der Promotion : 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (Abstract)	1
Einleitung und Zielsetzung	2
Methodik	3
Studiendesign	3
Aufbereitung der Blutproben und Nanoplaquemessung mittels Ellipsometrie	4
Biomarkeranalyse	4
Ergebnisse	5
Studie an aortokoronaren Bypass-Patienten	5
Studie an Patienten mit metabolischem Syndrom	5
Diskussion	6
Studie an aortokoronaren Bypass-Patienten	7
Studie an Patienten mit metabolischem Syndrom	8
Zusammenfassung und Ausblick	11
Literaturverzeichnis	12
Abbildungen	17
Tabellen	22
Anteilerklärung	23
Publikationen I - IV.....	24
Lebenslauf	46
Publikationsliste	49
Abstractliste.....	51
Selbständigkeitserklärung	53
Danksagung	54

Einfluß von Ginkgo biloba EGb 761 auf arteriosklerotische Nanoplaquebildung und kardiovaskuläres Risikoprofil

Zwei klinische Studien an Hochrisikopatienten nach aortokoronarer Bypassoperation sowie an Patienten mit metabolischem Anfangssyndrom

Petra S. Schäfer

Abstract

In einer Pilotstudie hatten wir über die positiven Effekte von Ginkgo biloba (EGb 761) auf die arteriosklerotische Nanoplaquebildung und -größe bei kardiovaskulären Hochrisikopatienten berichtet, die sich einer aortokoronaren Bypassoperation unterzogen hatten. Kurz gesagt wurden Nanoplaquebildung und -größe, das Verhältnis oxLDL/LDL und die hoch atherothrombotische Lp(a)-Konzentration substantiell reduziert, während die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) und die Konzentration der gefäßerweiternden Substanzen cAMP und cGMP im Blut hochreguliert wurden. Methodisch wurde das Frühstadium der arteriosklerotischen Plaqueentwicklung durch Einsatz eines neuartigen nanotechnologischen Biosensors auf der Basis ellipsometrischer Techniken gemessen (Patent EP 0 946 876). Diese sogenannte Nanoplaquebildung ist charakterisiert durch den ternären Komplex aus Heparansulfat-Proteoglycanrezeptor, Lipoproteinpartikeln und Calciumionen. Dieses Modell stellt ein validiertes Verfahren dar, das in mehreren klinischen Studien an kardiovaskulären Hochrisikopatienten bestätigt wurde, wobei deren natürliche Lipoproteinfraktionen aus dem Blut eingesetzt wurden. Da die präventive Wirkung von Ginkgoextrakt auf arteriosklerotische Prozesse in dieser Pilotstudie zweifelsfrei belegt wurde, wollten wir diese günstigen Effekte durch eine zweite klinische Beobachtungsstudie erhärten. Die früher verwendeten Meßvariablen wurden durch ein breites, neuartiges Spektrum von Biomarkern für Plaquestabilität und -progression, oxidativen Stress und Inflammation ergänzt.

An elf Patienten mit metabolischem Anfangssyndrom betrug die Reduktion der arteriosklerotischen Nanoplaquebildung $14,3 \pm 2,9\%$ ($p < 0,0077$) und der Nanoplaquegröße $23,4 \pm 3,7\%$ ($p < 0,0004$) nach zweimonatiger Einnahme von Ginkgo biloba-Extrakt. Zusätzlich wurden die Superoxiddismutase (SOD)- und Glutathionperoxidaseaktivität (GPx), Marker für oxidativen Stress, um $19,6 \pm 10,0\%$ ($p < 0,0785$) und $11,6 \pm 2,3\%$ ($p < 0,001$) hochreguliert, der Quotient oxLDL/LDL um $21,0 \pm 4,3\%$ ($p < 0,002$) erniedrigt und die Lipoprotein(a)-Konzentration nahm um $26,3 \pm 4,8\%$ ($p < 0,001$) im Patientenblut ab. Die Konzentration der gefäßerweiternden Substanzen cAMP und cGMP wurde um $43,5 \pm 12,0\%$ ($p < 0,001$) bzw. $32,9 \pm 10,4\%$ ($p < 0,001$) erhöht. Weiterhin konnten wir eine günstige Entwicklung der Biomarker 8-iso-PGF_{2α} (Lipidperoxidation), hs-CRP, IL-6, MPO, TNFα (inflammatorischer Status) sowie von MMP-9 und TGFβ₁ (Plaquestabilität) zeigen. Die hier gewählten Marker eignen sich ausgezeichnet dazu, ein umfassendes Risikoprofil für die Arterioskleroseprävention zu liefern. Im einzelnen fanden wir eine Abnahme von 8-iso-PGF_{2α} um $24,5 \pm 14,5\%$ ($p < 0,00273$), von hs-CRP um $39,3 \pm 9,3\%$ ($p < 0,0049$), von IL-6 um $12,9 \pm 7,0\%$ ($p < 0,0407$), von MPO um $29,6 \pm 8,9\%$ ($p < 0,0137$) und MMP-9 um $32,9 \pm 12,1\%$ ($p < 0,042$). TNFα nahm von $2,76 \pm 0,45$ pg/mL auf $3,75 \pm 0,41$ pg/mL ($p < 0,0028$), TGFβ₁ von $4,457 \pm 0,666$ ng/mL auf $6,505 \pm 1,201$ ng/mL ($p < 0,0126$) zu. Beide Konzentrationszunahmen im Blut erfolgten im physiologischen Regulationsbereich. Schließlich lieferte eine multiple Korrelationsanalyse die Basis für eine mechanistische Erklärung der Nanoplaquereduktion unter der Behandlung mit dem Ginkgo biloba-Extrakt. Der arteriosklerosehemmende Effekt ist bei normaler Calciumkonzentration von $2,52$ mmol/L zu $34,7\%$ auf die Reduktion von

oxLDL/LDL, zu 43,3% auf die Verminderung von Lp(a) und zu 22,0% auf die Zunahme von cGMP zurückzuführen.

Einleitung und Zielsetzung

Die Prävention oder Verlangsamung der Atherogenese ist angesichts der ständig zunehmenden Zahl von Patienten mit metabolischem Syndrom eine der höchst bedeutsamen medizinischen Herausforderungen unter dem Aspekt der Vermeidung von Herzinfarkt, Schlaganfall und Alzheimer-Demenz. Oxidierte LDL (oxLDL)- und Lp(a)-Partikel sind hochatherogen. Deshalb können Phytopharmaka, die der Peroxidation von Blutlipiden über ihre ROS-Fänger-eigenschaften entgegenwirken, in der Therapie hilfreich sein, um dieses prophylaktische Ziel zu erreichen. Auf diesem Hintergrund erforschten wir in zwei klinischen Studien die Wirkung von Ginkgo biloba, dessen antioxidative Eigenschaften in der Literatur gut belegt sind, auf die arteriosklerotische Nanoplaquebildung bei Patienten nach aortokoronarer Bypass-Operation sowie bei Patienten mit metabolischem Anfangssyndrom [36,38,39,46]. Die Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen war die Klärung der Zusammenhänge für die Arterioskleroseentstehung auf der Basis von neuen Biomarkern. Ginkgo biloba wurde bisher zur Behandlung von hirnorganisch bedingten Leistungsstörungen, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Alzheimer-Demenz, sowie bei Tinnitus und Schwindel eingesetzt. In früheren Arbeiten wurden für EGb 761 bereits Radikalfängereigenschaften und antioxidative Effekte [12] sowie protektive Wirkungen auf die Cu^{2+} -induzierte Oxidation von LDL-Partikeln des Menschen untersucht [55].

Durch intensive Literaturrecherchen waren wir in der Lage, ein neues Biomarkerschema zur Risikoprofilanalyse für kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln [39]. Hieraus ist das enge Zusammenspiel zwischen oxidativem Stress, Inflammation und Plaquebildung bzw. -stabilität zu erkennen. Zur Beurteilung des oxidativen Stresses wurde die Enzymaktivität von Superoxiddismutase (SOD) und Glutathionperoxidase (GPx), sowie die Konzentration von oxidiertem LDL (oxLDL), Myeloperoxidase (MPO) und Isoprostan 8-*iso*-PGF_{2α} erfaßt. Der inflammatorische Status wurde durch hochsensitives C-reaktives Protein (hs-CRP), Tumornekrosefaktor α (TNF α), Transforming Growth Factor β_1 (TGF β_1) und Interleukin-6 (IL-6) charakterisiert. Als Maß für die Plaquestabilität wurde die Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) bestimmt. Ergänzend zu der Biomarkerbestimmung wurden Nanoplaquebildung und -größe mittels eines neuen lasergestützten *in vitro*-Biosensormodells [1,42,45] unter Einsatz der atherogenen apoB100-haltigen Lipoproteinfraktion VLDL/IDL/LDL aus dem Blut der Patienten mit ellipsometrischer Meßtechnik erfaßt (Patent EP 0 946 876) [40] (Abb. 1). Dieses Modell hat sich bereits in früheren Untersuchungen zur Klärung des protektiven Effektes von HDL [44,45] und in mehreren klinischen Studien zur Hemmung der Nanoplaquebildung durch Statine bewährt [1,41,42,47]. Hiermit ergibt sich ein völlig neuartiges Studiendesign aus *in vitro*- und *in vivo*-Methodik, das die Möglichkeit für eine schlüssige Erklärung der pathophysiologischen Vorgänge bei der Atherogenese eröffnet. Außerdem kann es unabhängig von jeder Therapieoption verwendet werden. Die Auswahl des Kollektives aus aortokoronaren Bypasspatienten und Patienten mit metabolischem Anfangssyndrom sollte darüber hinaus das Potential von Ginkgo biloba sowohl in Therapie wie in Prävention von cardio-cerebrovaskulären Erkrankungen widerspiegeln. Bypassoperierte Patienten zeigen häufig bereits kurz nach dem Eingriff Restenosen, weshalb wir hier an der Beeinflussung der Plaquebildung durch Ginkgo sehr interessiert waren, zumal es sich um die erste klinische Studie mit einem Phytopharmakon an Hochrisikopatienten handelte. Die darauf folgende Präventionsstudie an Patienten mit metabolischem Anfangssyndrom stellte eine weitere Herausforderung dar, da wir die theoretisch entwickelten Biomarkerkorrelationen klinisch überprüfen konnten. Die

unerwarteten Ergebnisse der Pilotstudie fanden wir noch einmal bestätigt. Eine weitere Fragestellung, die sich erst später ergab, war die Klärung, welchen Inhaltsstoffen aus Ginkgo biloba diese pharmakologischen Wirkungen zugeordnet werden können.

Methodik

Studiendesign

Die im März 2004 begonnene Pilotstudie an kardiovaskulären Hochrisikopatienten, genehmigt durch die Ethikkommission Brandenburg, lief bis zu ihrer Publikation über einen Zeitraum von zwei Jahren. Einschlusskriterium für die neun Patienten (zwei Frauen, sieben Männer) im Alter von 49 bis 72 Jahren war die Bypass-obligatorische, hochgradige CAD. Daneben litten die Patienten unter Hyperthyreose (2), Hypertonie (8), Diabetes Typ I (3), Diabetes Typ II (2), chronischer Niereninsuffizienz (4), Depression (1), COPD (1), und zwei Patienten waren Raucher. Ausschlusskriterium war die präoperative Gabe von Statinen, Calciumantagonisten und Nitropräparaten, da diese Medikation die Simulation der Nanoplaquebildung hätte beeinflussen können. Im Falle einer Statinmedikation wurde eine einmonatige Auswaschphase angesetzt. Die Standardtherapie gemäß den Richtlinien der Disease Management Programme für bypassoperierte Patienten in Form von ASS, Betablockern und ACE-Hemmern wurde eingehalten. Nach Abklingen der akuten Phasereaktion (9 ± 1 Tage) erfolgte die erste Blutabnahme (45 mL) für die Baseline-Messung sowie die Einnahme von Ginkgo biloba-Spezialextrakt (EGb 761, 2×120 mg/Tag Rökan[®] novo, Spitzner Arzneimittel, Ettlingen) über einen Zeitraum von zwei Monaten. Danach wurde erneut Blut abgenommen. Als Prüfparameter wurden die Nanoplaquebildung und -größe, das Lipidprofil (TC, VLDL, IDL, LDL, HDL), Werte für oxidiertes LDL und Lipoprotein(a), die Enzymaktivität von SOD sowie die cAMP- und cGMP-Konzentration im Blut erfasst.

In der darauf folgenden zweiten klinischen Studie (Beginn März 2007) an noch gesunden Probanden mit metabolischem Anfangssyndrom sollten die in der Pilotstudie erzielten Ergebnisse erhärtet und durch weitere Biomarker ergänzt werden. Das elf Probanden umfassende Kollektiv im Alter zwischen 26 und 48 Jahren sollte mindestens zwei Kriterien nach NCEP-III/ATP/IDF für das metabolische Syndrom erfüllen sowie als zusätzliche Risikofaktoren einen Lipoprotein(a)-Wert > 30 mg/dL haben, und alle Studienteilnehmer sollten Raucher sein. Ausschlusskriterium war wiederum die Einnahme von Statinen, Calciumantagonisten und Nitraten. Nach einmonatiger diätetischer run-in-Phase wurde den Patienten zweimal (vor und nach zweimonatiger Therapie mit EGb 761, Dosierung siehe Pilotstudie) 45 mL Blut abgenommen. Wie bereits in der Pilotstudie beschrieben, wurden Nanoplaquebildung und -größe, Lipidprofil, Lipoproteinsubfraktionen (VLDL, IDL, LDL1-6, HDL, oxLDL, Lp(a)), SOD, cAMP- und cGMP-Konzentration im Blut sowie als neue Biomarker GPx, MPO, MMP-9, hs-CRP, 8-iso-PGF_{2α}, IL-6, TNFα und TGFβ₁, bestimmt (Abb. 2). Neben diesen Messungen wurde von den Klinikärzten eine weitere umfangreiche Dokumentation von Parametern, z.B. eine genaue Blutanalyse (RBC, HgB, MCH, MCHC, MCV, HCT, RDW, ALP, ASAT, ALAT, GGT, Bilirubin, Serumcalcium, Albumin) vorgenommen.

Aufbereitung der Blutproben und Nanoplaquemessung mittels Ellipsometrie

Die Blutproben der Patienten (jeweils 45 mL) wurden vor und nach Ginkgobehandlung in EDTA-Sarstedt Monovetten aufgenommen, 10 Minuten lang auf Raumtemperatur gehalten, anschließend bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert und das Plasma in kleine Polyäthylenbehälter abpipettiert. Zur Präparation der Lipidfraktion (VLDL/IDL/LDL) wurden 36 mL benötigt.

Diese wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation bei einem Dichtegradienten von $d < 1,063$ kg/L isoliert. Alle Zentrifugationsschritte (6 mL Polycarbonatfläschchen, 50 TI Rotor) wurden bei 18°C ausgeführt. Um Salzanteile und EDTA zu entfernen, wurde die Lipidfraktion mit salinem Phosphatpuffer versetzt. Schließlich wurde sie in konzentrierter Form in kleinen Glaszylindern (2 mL) gesammelt und unter Stickstoffbegasung mit einer Metallkappe verschlossen, um Oxidationsvorgänge an den Lipiden zu verhindern. Cholesterol und Triglyceride wurden enzymatisch mit der CHOD-PAP beziehungsweise GPO-PAP-Methode (WAKO Chemicals, Japan) bestimmt. Die Apolipoproteinkonzentration wurde turbidimetrisch mit einem Olympus A640 Analyzer (Olympus, Tokio, Japan) unter Verwendung von polyklonalem Antiserum (Rolf Greiner Biochemica) analysiert. Vor der ellipsometrischen Messung wurde die Lipoproteinfraktion erneut über eine mit Krebslösung gefüllte Chromatographiesäule (ECONO-PAC Column 732-2010, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) auf ihre *in vivo*-Konzentration gebracht. Die arteriosklerotische Nanoplaquebestimmung basiert auf einem lasergestützten, ellipsometrischen Meßverfahren (Patent EP 0 946 876) [40,42-45], womit die Bildung der arteriosklerotischen Nanoplaque, des ternären Aggregationskomplexes aus HS-PG-Rezeptor, apoB100-haltiger Lipoproteinfraktion und Calcium, quantitativ bestimmt wird (vgl. Abb. 1). Die Nanoplaque stellt die allererste Stufe der arteriosklerotischen Plauebildung auf Endothelzellen und extrazellulärer Gefäßmatrix dar, noch bevor es zu einer zellulären Reaktion kommt.

Methodisch wird in Ca^{2+} -freier Krebslösung an eine methylierte, hydrophobe Silikatoberfläche natives HS-PG (Molekulargewicht ~ 175 kDa), das der periphere Lipoproteinrezeptor ist, in monomolekularer Schicht adsorbiert [31]. Nach Zugabe der Lipoproteinfraktion VLDL/IDL/LDL wurde Calcium in fünf Titrationsschritten mit den Endkonzentrationen 2,52, 5,04, 7,56, 10,08 und 17,64 mMol/L appliziert. Alle Experimente wurden zunächst in Ca^{2+} -freier Blutersatzlösung mit den Ionenkonzentrationen Na^+ 151,16, K^+ 4,69, Mg^{2+} 1,1, Cl^- 145,4, HCO_3^- 16,31 und H_2PO_4^- 1,38 mMol/L durchgeführt. Die Nanoplaquebildung wurde ellipsometrisch erfaßt. Die Ellipsometrie ist ein optisches Meßverfahren, das auf der Änderung des Polarisationsgrades des an einer Oberfläche reflektierten polarisierten Lichtstrahles beruht und zur Bestimmung der Schichtdicke von dünnen Schichten eingesetzt wird. In unserem Modell verwendeten wir ein Optrel Multiskop (Optrel, Kleinmachnow) mit Nullellipsometrie im Meßbereich 532 nm [41,44]. Erfaßt wurden sowohl adsorbierte Menge Γ (Nanoplaquebildung) wie auch adsorbierte Schichtdicke δ_{el} (Nanoplaquegröße), die numerisch aus Phasenwinkel (Δ), Amplitude (Ψ) und Brechungsindex (n_f) nach De Feijter [8] berechnet werden [26]. Die ellipsometrische Technik ist als physiko-chemisches Biosensorverfahren in mehreren klinischen Studien erprobt worden und statistisch mit einer 5%igen Fehlerquote behaftet, so daß von jedem Patienten verlässliche Daten zu erwarten waren.

Biomarkeranalyse

OxLDL wurde aus EDTA-Plasma mittels Oxidized LDL ELISA (Mercodia, Uppsala, Schweden) unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern 4E6 (aus Mäusen) gegen oxidierte apoB-Moleküle analysiert, SOD- und GPx-Aktivität mittels RANSOD bzw. RANSEL Reagenzkit (Randox Ltd., Ardmore, UK) sowie cAMP- und cGMP-Konzentration über einen kompetitiven ELISA (Biotrak, Amersham Biosciences, Freiburg), wobei cGMP vorher acetyliert wurde. Ebenfalls aus EDTA-Plasma wurde MPO mit einem MPO ELISA (Mercodia, Uppsala, Schweden) und IL-6 mit einem human IL-6 Quantikine[®] Reagenzkit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ermittelt, MMP-9 aus Heparin-Plasma mit dem human MMP-9 Quantikine[®] Reagenzkit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Beide Bestimmungen basieren auf einer quantitativen Sandwich-Enzymimmunoassay-Methode. Hs-CRP (spezifischer Immunoassay CRP U-hs DiaSys, Diagnostic Systems, Holzheim), 8-*iso*-PGF_{2 α} (Isoprostan-Enzymimmunoassay-Kit, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) sowie TNF α und

TGF β_1 (human TNF α und TGF β_1 Sandwich-Enzymimmunoassay Quantikine[®] Reagenzkit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) wurden aus EDTA-Plasma gemessen.

Ergebnisse

Studie an aortokoronaren Bypass-Patienten

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zusammenfassend, daß bei normaler Serum-Ca²⁺-Konzentration die arteriosklerotische Nanoplaquebildung um 11,9% ($p < 0,0078$) und die Nanoplaquegröße um 24,4% ($p < 0,0234$) reduziert war [36,38]. Ferner war die cAMP-Konzentration um 37,5% ($p < 0,0078$) und von cGMP um 27,7% ($p < 0,0156$) im Blut erhöht. Der Quotient oxLDL/LDL sank um 17,0% ($p < 0,0234$) und die SOD-Aktivität stieg um 15,7% ($p < 0,0391$) an. Gleichzeitig nahm die Lipoprotein(a)-Konzentration um 23,4% ($p < 0,0234$) bei einer nicht veränderten apoB100-haltigen Lipidfraktion VLDL/IDL/LDL ab. Exponentielle Korrelationen ergaben sich zwischen den einzelnen Calciumkonzentrationen im Biosensormodell und der prozentualen Reduktion von Nanoplaquebildung und -größe [36]. Durch multiple Korrelationsanalyse zwischen der Nanoplaquereduktion und den drei wichtigsten Risikofaktoren oxLDL/LDL, Lp(a) und apoB100-Fraktion VLDL/IDL/LDL konnte ihr relativer Beitrag zur Nanoplaquebildung abgeschätzt werden. Bei normaler Blut-Ca²⁺-Konzentration ist die Reduktion des oxLDL/LDL-Quotienten zu 35,7%, von Lp(a) zu 58,2% und von VLDL/IDL/LDL zu 6,1% für die verminderte Nanoplaquebildung verantwortlich (Abb. 3). Ferner fanden wir lineare Korrelationen zwischen den prozentualen Änderungen des oxLDL/LDL-Quotienten und der Lp(a)-Konzentration sowie der prozentualen Reduktion der Nanoplaquebildung bei 5,04 mmol/L Ca²⁺-Krebslösung und des Quotienten oxLDL/LDL oder der Lp(a)-Konzentration vor der Behandlung [39].

Studie an Patienten mit metabolischem Syndrom

Diese antiarteriosklerotischen Wirkungen von Ginkgo biloba ließen sich bei Patienten mit metabolischem Anfangssyndrom bestätigen [39,46]. In normaler Ca²⁺-Konzentration ergaben sich eine Reduzierung der Nanoplaquebildung um 14,3% ($p < 0,0077$) und der Nanoplaquegröße um 23,4% ($p < 0,0004$), eine Erhöhung der SOD- und GPx-Aktivität um 19,6% ($p < 0,0785$) bzw. 11,6% ($p < 0,001$) sowie eine Senkung des Quotienten oxLDL/LDL um 21,0% ($p < 0,002$). Ebenso wurde erneut die Lp(a)-Konzentration um 26,3% ($p < 0,001$) und die inflammatorischen Marker IL-6 um 12,9% ($p < 0,0407$) und hs-CRP um 39,3% ($p < 0,0049$) vermindert. TNF α und TGF β_1 nahmen im physiologischen Regulationsbereich um 68,5% ($p < 0,0076$) und 38,4% ($p < 0,0068$) zu. Das für die Lipidperoxidation und den Gefäßtonus verantwortliche Isoprostan 8-*iso*-PGF_{2 α} wurde um 24,5% ($p < 0,0027$) und die Serum-Ca²⁺-Konzentration um 5,4% ($p < 0,0076$) von 2,37 auf 2,24 mmol/L ($p < 0,0069$) gesenkt. Parallel dazu ergab sich eine Reduktion von MPO um 29,6% ($p < 0,0137$) und von MMP-9 um 32,9% ($p < 0,042$). Wie auch in der Pilotstudie an Bypass-Patienten fanden wir eine hier sogar stärkere Hochregulation der vasodilatierenden Substanzen cAMP um 43,5% ($p < 0,001$) und cGMP um 32,9% ($p < 0,001$). Das Gesamtcholesterin blieb unverändert. Die Konzentration von Ginkgo-Bilobalid in der VLDL/IDL/LDL-Lipidfraktion wurde nach zweimonatiger Behandlung im Mittel zu $19,5 \pm 3,8$ (9) $\mu\text{g/L}$ bestimmt. Eine signifikante, lineare Korrelation ergab sich zwischen den Bilobalidkonzentrationen bei den Patienten und deren prozentualen oxLDL/LDL-Abnahmen [46]. Weiterhin waren $\Delta 8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}$ und ΔMPO zu $\Delta\text{oxLDL/LDL}$ linear korreliert und damit auch ΔMPO vs. $\Delta 8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}$ (Abb. 4). Eine multiple Regressionsanalyse zwischen Nanoplaquereduktion und den drei Risikofaktoren oxLDL/LDL, Lp(a) und cGMP ergab bei normaler Ca²⁺-Konzentration (2,52 mmol/L) einen relativen Beitrag von

34,7% durch oxLDL/LDL-Reduktion, von 43,3% durch Lp(a)-Senkung und von 22,0% durch cGMP-Steigerung zu dieser Nanoplaquereduktion (Abb. 5).

Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache in Europa und den USA. Die endotheliale Dysfunktion scheint die „Primärläsion“ in der Pathogenese der Arteriosklerose und vieler kardiovaskulärer Erkrankungen zu sein, die der Bildung arteriosklerotischer Plaques vorausgeht. Sie ist gekennzeichnet durch eine Verringerung oder den vollständigen Verlust der endothelvermittelten Gefäßerweiterung infolge unzureichender NO-Freisetzung sowie durch eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, oxidative Stressbelastung, Inflammation, Hämostase und Thrombose [13]. In der Folge kommt es zu herdförmigen Ablagerungen von Lipiden und kollagenreichem Bindegewebe (Plauebildung), zur Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen sowie zur Calciumeinlagerung in nekrotisierten Plaueanteilen, was zur Lumeneinschränkung und zum Elastizitätsverlust des Gefäßes führen kann. Die wichtigsten Risikofaktoren mit einer 40-60%igen genetischen Komponente sind erhöhte Cholesterinspiegel, Bluthochdruck, Adipositas, Diabetes mellitus, Bewegungsmangel und Rauchen [25]. Das metabolische Syndrom, ein weit verbreiteter Symptomenkomplex, zeichnet sich durch eine Häufung dieser Risikofaktoren aus. Die Manifestation der Arteriosklerose spielt sich in den verschiedensten Gefäßprovinzen (Herzkranzgefäße, Hirngefäße, periphere Arterien) ab, vornehmlich in den großen Arterien, und ist selten isoliert zu finden. Die häufigsten Folgeerkrankungen sind Herzinfarkt und Schlaganfall, daher sollte die Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus ein vorrangiges Ziel sein. Klinisch nachweisbare arteriosklerotische Plaques bestehen überwiegend aus dem peripheren Lipoproteinrezeptor Heparansulfatproteoglykan, dem LDL und seinen Abkömmlingen (oxLDL, glycoxLDL, acetyliertes LDL) sowie Calcium. Dieser ternäre Komplex kann auf molekularer Ebene als arteriosklerotische Nanoplauebildung bezeichnet werden und ist vermutlich für die Primärläsion der Gefäßwand verantwortlich [44], noch ehe eine zelluläre Reaktion eintritt, wie sie von Ross [37] und Luscis [24] charakterisiert wurde. In unserem Biosensormodell haben wir uns auf diese drei Grundkomponenten fokussiert und ihre Beeinflussung durch Ginkgo biloba untersucht.

Die gegenwärtige Literatur zu Ginkgo biloba zeigt, neben den etablierten Indikationen, deutliche pharmakologische Effekte, die den kardiovaskulären Symptomenkomplex beeinflussen können. Hierzu zählen die antioxidativen Wirkungen über eine Änderung der Enzymaktivität von SOD [56,58] und GPx und die direkten ROS-Fängereigenschaften [6,9], sowie die Reduktion inflammatorischer Parameter [16,22,56]. Ferner wurde der Einfluß von Ginkgo auf die Konzentration vasoaktiver Substanzen, wie cAMP, cGMP und NO bereits nachgewiesen [4,10,20]. Der hier untersuchte Ginkgospezialextrakt EGb 761 ist ein Trockenextrakt aus Ginkgo folium [(35-76):1], extrahiert mit Aceton-Wasser und standardisiert auf 22-27% Ginkgoflavonglykoside und 5-7% Terpenlactone (2,8-3,4% Ginkgolide A, B, C und 2,6-3,2% Bilobalid). Die Flavonoide liegen als Flavonol-O-Glykoside vor, sind zu 60% bioverfügbar und zeigen neben Wirkungen auf die Kapillarpermeabilität starke antioxidative Effekte [17,51]. Die Terpenfraktion, die chemisch durch drei Lactonringe und eine ternäre Butylgruppe charakterisiert ist, ist in der Pflanzenwelt nur in Ginkgoblättern zu finden. Das für Ginkgolide spezifische dreidimensionale Molekülgerüst weist eine käfigartige Struktur auf und könnte die für die Bildung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid nötigen Eisenionen (Fenton-Reaktion) abfangen und damit an der antioxidativen Wirkung beteiligt sein [17,51]. In Studien am Menschen konnte für die Ginkgolide eine fast vollständige Resorption und Bioverfügbarkeit im Plasma nachgewiesen werden [51], was unser erstmaliger Nachweis von

Bilobalid, das ebenfalls ein Terpenlacton ist, in der VLDL/IDL/LDL-Lipidfraktion nach zwei-monatiger Behandlung bestätigt [46].

Studie an aortokoronaren Bypass-Patienten

Die Ergebnisse unserer Pilotstudie zeigen nach der Ginkgobehandlung keine signifikanten Änderungen der klassischen Lipidwerte (TC, VLDL, IDL, LDL, HDL, apoB, apoA-I). Es erhebt sich daher die Frage, welcher Mechanismus der Reduktion von Nanoplaquebildung und -größe zugrundeliegt. In unseren Ellipsometriemessungen ergab der Kurvenverlauf der Nanoplaquebildung nach Therapie ein völlig verändertes Andockverhalten der apoB100-haltigen Lipidfraktion (Abb. 6). Das hat zur Folge, daß die Ca^{2+} -abhängige Nanoplaquebildung zwischen 11,9% und 44,5% und noch ausgeprägter, die Nanoplaquegröße zwischen 21,1% und 67,4% reduziert ist. Darüber hinaus illustriert der Kurvenverlauf, daß Nanoplaquebildung und -größe calciumgesteuerte Prozesse sind [36,38]. Beispielsweise ist dies sehr schön am schrittweisen Anstieg der adsorbierten Menge in Abhängigkeit von den Calciumzugaben (2,52; 5,04; 7,56; 10,08 und 17,64 mmol/L) zu beobachten. Besonders bei der höchsten Calciumzugabe auf 17,64 mmol/L war eine deutliche Abnahme der Nanoplaquebildung und -größe nach der Therapie zu erkennen. Damit wird die therapeutische Dimension der Ginkgobehandlung deutlich, denn in unmittelbarer Plaquenähe kommen so hohe extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen vor [27].

Allein schon der Aspekt einer Senkung der stark atherogenen Risikofaktoren oxLDL/LDL und Lp(a) könnte eine Erklärung für die verminderte Nanoplaquebildung liefern. Die in den subendothelialen Raum eingedrungenen LDL-Partikel entwickeln bei längerer Verweildauer durch enzymatische Modifikation oder Oxidation stark atherogene Eigenschaften und induzieren inflammatorische Prozesse. Die Oxidation des LDL ist das Resultat einer lokal erhöhten Produktion von ROS, deren Bildung über die Aktivierung von Lipoxygenasen und NADPH-Oxidasen der Gefäßwandzellen sowie über eingewanderte Leukozyten vermittelt wird. OxLDL befördert die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Zytokinen durch das Endothel und vornehmlich die Bildung und Progression instabiler Plaques via Apoptoseinduktion [14]. Lp(a) gilt heute als Plasmalipoprotein mit atherogener und thrombogener Potenz sowie als Indikator und Mediator für ein erhöhtes Risiko einer koronaren Herzerkrankung (CHD) und zerebralen Durchblutungsstörung. Das neben Apolipoprotein B-100 enthaltene Apolipoprotein(a) weist eine Strukturähnlichkeit zu Plasminogen auf, mit dessen Bindungsstellen es am Endothel konkurriert. Gleichzeitig behindert es die Produktion von Plasminogen-Gewebsaktivator (TPA), was eine Migration von glatten Muskelzellen in die vaskuläre Intima zur Folge hat [15]. Ferner ist bekannt, daß Lp(a), ein zu 73% genetisch determinierter Faktor, direkt mit oxLDL korreliert [48,49]. Wir konnten dies mit einer signifikanten linearen Korrelation bestätigen ($r = -0,84$; $p < 0,0176$). Ein ähnliches Ergebnis erzielte Witztum [54], der zeigte, daß die Atherogenität von oxLDL bei gesteigertem, oxidativem Stress und chronisch erhöhten Lp(a)-Spiegeln von seiner Kapazität als Träger proinflammatorischer Oxidationsnebenprodukte herrührt. Lediglich zwei unserer Patienten hatten Lp(a)-Grenzkonzentrationen von 29 mg/dL, während alle anderen hochpathologische Werte zwischen 37 und 98 mg/dL aufwiesen. Unter mechanistischen Aspekten ist es daher verständlich, daß die Reduktion von oxLDL/LDL und Lp(a) einen ganz dominierenden Einfluß (94%) auf die Nanoplaquereduktion bei normaler Ca^{2+} -Konzentration hatte.

Ferner haben wir eine Erhöhung der Enzymaktivität der antioxidativ wirksamen Superoxid-dismutase (SOD) gemessen. SOD ist in der Lage, Superoxidradikale in einer Dismutationsreaktion in Wasserstoffperoxid zu überführen, das durch die molekular eng benachbarte Katalase in Wasser und Sauerstoff gespalten wird. Die Erhöhung der SOD-Aktivität könnte bedeuten, daß sie durch die Radikalfängereigenschaften von Ginkgoinhaltsstoffen entlastet oder

durch Ginkgo direkt stimuliert wurde. Letzteres wurde durch Zhou *et al.* [56] im Tierversuch bereits bestätigt. Die gesteigerte SOD-Aktivität führt gleichzeitig zur Abnahme der Lipidperoxidation und damit von oxidiertem LDL. Die direkte lineare Korrelation zwischen SOD-Aktivität und oxLDL/LDL-Reduktion unterstützt diese Vorstellung ($r = 0,89$; $p < 0,0077$).

Die massive Erhöhung der vasoaktiven, zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP im Blut unserer Patienten nach 2-monatiger Ginkgobehandlung wurde unseres Wissens nach hier erstmalig beobachtet [36]. Im Tierversuch war dieser Befund bislang nur in glatter Gefäßmuskulatur erhoben worden. So wird die Membrangängigkeit dieser „second messengers“ unterstrichen [29]. Solche Ginkgo-induzierten cAMP- und cGMP-Zunahmen könnten sowohl abluminal (Auslösung einer Vasodilatation) als auch luminal (Reduzierung der Thrombozytenaggregation, Leukozyten- bzw. Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen) wirken, um Blutfluß und Gewebsperfusion zu verbessern. Die unerwartete cGMP-Erhöhung könnte auch für den Schutz von NO gegen den Angriff freier Radikale bedeutsam sein. Der cAMP-Anstieg kann damit erklärt werden, daß die NO-Freisetzung in Blutgefäßen im allgemeinen mit einem Co-release von PGI₂ einhergeht, das über den PGI₂-Rezeptor zu einer sekundären Erhöhung der cAMP-Konzentration führt [5]. Alternativ käme auch eine Hemmung der α_2 -Adrenozeptoren in Frage. Zusammenfassend ist zu sagen, daß bypassoperierte Hochrisikopatienten auf allen Ebenen (Reduzierung des oxidativen Stresses; Vasodilatation; verbesserte Gewebsperfusion; verminderte Plaquebildung und vermindertes Restenosierungsrisiko) von einer zweimonatigen Ginkgotherapie profitierten.

Studie an Patienten mit metabolischem Syndrom

In Anlehnung an die Ergebnisse der Pilotstudie war es Hauptziel der Präventionsstudie zu klären, inwieweit die Ginkgotherapie ein neuer Ansatz für eine Begleittherapie im Rahmen eines ganzheitlichen Therapiekonzeptes bei Patienten mit metabolischem Anfangssyndrom sein könnte. Weiterhin sollten die bisher erhaltenen Daten verifiziert werden. Neben der Bestimmung der Nanoplaques, der Lipidzusammensetzung inklusive von Lp(a), der SOD und der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP stellten wir nach umfangreicher Literaturrecherche ein Muster von neuen Biomarkern zusammen, mit dessen Hilfe sich das kardiovaskuläre Risikoprofil näher eingrenzen lassen sollte. Das Biomarkerdesign unserer Studie ist in Abb. 2 illustriert. Es zeigt die zeitliche Abfolge des miteinander verwobenen und rückgekoppelten Netzwerks der pathophysiologischen Zusammenhänge, die in cardio-cerebro-vaskulären Ereignissen gipfeln können. Ausgehend vom metabolischen Syndrom, charakterisiert durch Adipositas, Diabetes, Hypertonie und Hyperlipidämie, zeigt das als Flußdiagramm dargestellte Geschehen auf einen Blick den fatalen und vorprogrammierten chronologischen Verlauf, angefangen von Symptomlosigkeit über Nanoplaquebildung, einen erhöhten inflammatorischen Status mit Migration glatter Muskelzellen in die Gefäßintima, den Einfluß von oxidativem Stress, eine koronare oder cerebrale Plaquebildung bis hin zur Manifestation eines cardio-cerebro-vaskulären Krankheitsbildes [39].

Als Marker für oxidativen Stress haben wir das Isoprostan 8-*iso*-PGF_{2 α} , den Quotienten oxLDL/LDL, die Aktivität der SOD und eines zweiten, antioxidativen Enzyms, der Glutathionperoxidase (GPx), gemessen. Der inflammatorische Status wurde durch die Bestimmung von hochsensitivem CRP (hs-CRP), Interleukin-6 (IL-6), Myeloperoxidase (MPO) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) charakterisiert. Weiterhin wurde die Gelatinase Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) als Marker für Plaquestabilität sowie Transforming Growth Factor β_1 (TGF β_1) als Marker für Inflammation wie auch Plaquestabilität gemessen. Lp(a) steht in diesem Netzwerk an prominenter Stelle zwischen oxidativem Stress und Inflammation, da es sowohl mit oxLDL als auch mit IL-6 korreliert [23]. Die genannten Marker wurden ganz bewußt ausgewählt, da in der Literatur diverse Korrelationen, wechselseitige Induktionen und

Rückkopplungen bei der Arterioskleroseentstehung beschrieben wurden und somit zum Gesamtbild einer Risikoprofilanalyse beitragen. So sind neben 8-*iso*-PGF_{2α}, oxLDL/LDL und SOD-GPx auch MPO und MMP-9 in ihrer Funktion mit freien Radikalen korreliert. MPO katalysiert das im Rahmen der „Entgiftung“ von Superoxidanionen durch SOD entstehendes Wasserstoffperoxid mittels Chloridionen zur hypochlorigen Säure (HOCl), die ein potentes antibakterielles Agens darstellt. Ferner ist MPO an der enzymatischen Modifizierung von LDL-Partikeln in Makrophagen beteiligt [19] und gleichzeitig mit der Bildung von MMP-9 korreliert [35]. MPO moduliert intravasale Signalkaskaden, oxidiert nach endothelialer Transcytose dort generiertes NO, wirkt leukozytenaktivierend und zytokinartig. Sie wird daher neuerdings als Schlüsselprotein für die Etablierung eines proinflammatorischen Milieus im Gefäß bezeichnet [2]. MMP-9 ist wiederum bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom direkt mit hs-CRP verknüpft [30]. Dies ist ein Hinweis darauf, daß Plaquestabilität und Entzündungsstatus eng zusammenhängen [18]. Eine chinesische Studie zeigte, daß der „macrophage migration inhibiting factor“ (MIF) eine wesentliche Rolle bei der Plaquestabilität durch seine direkte Stimulation der MMP-9-Expression spielt. Interessant ist dabei, daß oxLDL die MIF-Expression über vaskuläre Endothelzellen aufreguliert, womit sich der Kreis zwischen ROS-Status und Plaquestabilität schließt [21]. Ein weiterer Faktor für die Plaquestabilität ist TNF α , der sowohl direkt als auch über die Stimulation von MMP-9 agiert [28]. Neu ist der *in vitro*-Befund, daß TNF α neben IL-1 und IL-6, die durch Proteinkinase C in Makrophagen gebildet werden, für die Kalzifizierung arteriosklerotischer Plaques mitverantwortlich zu sein scheint [28]. In einer finnischen Studie wurde dokumentiert, daß hs-CRP und TNF α direkt korreliert sind und als Prädiktoren für CVD gelten können [50]. Eine weitere Studie ergab eine signifikante Wechselbeziehung zwischen hs-CRP und MMP-9 [30]. Ebenso ist auffallend, daß die beiden Entzündungsmarker, TNF α und TGF β_1 , einen direkten Einfluß auf die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen haben [34,57]. Das in instabilen Plaques gefundene 4-Hydroxynonenal (HNE), ein aldehydisches Endprodukt der Lipidperoxidation von ungesättigten Fettsäuren (PUFA), scheint wiederum die Genexpression und Synthese von TGF β_1 zu stimulieren und damit in den Entzündungsprozeß indirekt einzugreifen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß alle hier diskutierten Biomarker bei cardio-cerebro-vaskulären Ereignissen eng miteinander verzahnt sind. Sowohl ROS-Status als auch Inflammation und Plaquestabilität stellen Faktoren dar, die nicht unabhängig voneinander diskutiert und gewertet werden sollten. In der aktuellen Literatur wurden solche Zusammenhänge bisher nicht in dieser Breite präsentiert. Unabhängig von jeder Therapieoption, ist das von uns entwickelte Biomarkerschema optimal dazu geeignet, eine umfassende Risikostratifikation im Rahmen der Arterioskleroseprävention zu erstellen [46].

Da das metabolische Syndrom mit einem erhöhten Risiko für Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert ist (Abb. 8), war es Ziel unserer zweiten Studie, bei Patienten mit metabolischem *Anfangssyndrom* therapeutisch frühzeitig und nebenwirkungsarm einzugreifen. Der Erfolg einer solchen Therapie sollte labortechnisch verifizierbar sein. Wie bereits in der Pilotstudie gemessen, zeigte sich nach 2-monatiger Ginkgotherapie auch hier eine deutliche Reduktion der Nanoplaquebildung und -größe in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration, eine Reduktion des Quotienten oxLDL/LDL und eine Abnahme von Lp(a). Zusätzlich zur SOD- haben wir die Aktivität des antioxidativen Enzyms GPx bestimmt, die das durch SOD aus Superoxidanionen gebildete Wasserstoffperoxid in einer Redoxreaktion abfängt. Beide Enzymaktivitäten wurden signifikant erhöht. Entweder wirkte Ginkgo direkt stimulierend auf diese Enzyme, oder sie wurden indirekt über seine stark antioxidativen Eigenschaften entlastet. Wie schon beschrieben, könnte der hohe Gehalt an Ginkgoflavonoiden dazu beigetragen haben. Da wir in der aus dem Patientenblut isolierten VLDL/IDL/LDL-Lipidfraktion nach Therapie das Terpenlacton Bilobalid nachgewiesen haben, kann dies als

starker Hinweis auf eine Beteiligung dieser Substanz gewertet werden [46]. Eine weitere Untersuchung zum Andockmechanismus von Bilobalid an den Lipidpartikeln und am Proteoglykanrezeptor ist geplant.

Um den inflammatorischen Status genauer zu beschreiben, bestimmten wir zusätzlich IL-6, hs-CRP, TNF α und TGF β ₁ (Tabelle 1). Die gemessene IL-6-Senkung bestätigt die Untersuchungen von Lippi *et al.* [23], die eine Variation im Lp(a)-Spiegel in Korrelation zu IL-6 bringen, da ererbte Sequenzen innerhalb des apo(a)-Gens IL-6-sensitive Stellen aufweisen. Deshalb spricht der Anstieg von TNF α (2,76 auf 3,75 pg/mL) und TGF β ₁ (4,457 auf 6,505 ng/mL) keineswegs für eine Entzündung, wie durch die gleichzeitige IL-6- und hs-CRP-Erniedrigung belegt ist [33]. Außerdem bewegt sich dieser Anstieg im unteren *physiologischen* Regulationsbereich. Die pleiotrope Wirkung von TNF α wird durch die Bindung an verschiedene Rezeptoren (TNFR₁ und TNFR₂) gesteuert, die zu unterschiedlichen Reaktionen im Körper führt [3]. Unter anderem scheint TNF α in *in vitro*-Untersuchungen zur Kalzifizierung und damit zur Plaquestabilisierung beizutragen [28]. TGF β ₁ ist ebenfalls ein pleiotropes Zytokin, welches je nach Art und Status der Zielzelle unterschiedliche Aktivitäten hat. TGF β ₁ aktiviert SMAD-vermittelt die Gen-Transkription für Kollagen und Fibronectin, weshalb es auch als „wundheilungsförderndes“ Zytokin bezeichnet wird und im Rahmen der „foreign body response“ an der Stabilisierung von Plaques beteiligt sein kann [11]. Die Untersuchungen von Ramharack *et al.* [33] zeigen an Hepatozytenkulturen von Primaten, daß der Lp(a)-Spiegel in Abhängigkeit von der Balance zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Zytokinen reguliert wird, wobei Lp(a) mit IL-6 direkt positiv und mit TNF α und TGF β ₁ negativ korreliert ist. Unsere Ergebnisse beim Menschen scheinen dies zu bestätigen.

Unter der Ginkgotherapie haben wir gleichzeitig eine deutliche Senkung von hs-CRP gemessen. Hs-CRP ist inzwischen der am besten untersuchte Marker als Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Außerdem sind hs-CRP und IL-6, das die CRP-Produktion in der Leber anregt, prognostische Marker für koronare Ereignisse bei instabiler Angina pectoris. Eine hs-CRP-Reduktion ist ferner mit einer Abnahme der Intima-media-Dicke und der Progression arteriosklerotischer Prozesse assoziiert [52]. Zusammenfassend können wir sagen, daß unsere Datenlage die antiinflammatorische Potenz von Ginkgo erhärtet.

Als Biomarker für oxidativen Stress und die direkte Verbindung zwischen oxidativem Stress und Entzündung fungiert das Isoprostan 8-*iso*-PGF_{2 α} , ein stabiles Endprodukt der Lipidperoxidation (Tabelle 2). Es unterstützt als starker Vasokonstriktor und Förderer der Thrombozytenaggregation die Atherogenese. 8-*iso*-PGF_{2 α} ist als zusätzlicher prognostischer Marker für koronare Herzerkrankungen bekannt [53] und wurde vermehrt bei Rauchern, Diabetikern und Patienten mit Hypercholesterinämie gefunden [32]. Seine Konzentration wurde durch Ginkgo signifikant gesenkt. Ferner konnten wir erneut eine Steigerung der vasoaktiven zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP messen. Die Ergebnisse übertrafen sogar die Daten aus unserer Studie an kardiovaskulären Hochrisikopatienten. Der Anstieg von cAMP und cGMP im Blut reflektiert eine entsprechende intrazelluläre Zunahme dieser Botenstoffe in den Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen. Bei den Patienten mit metabolischem Syndrom bedeutet dies vor allem eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion [7]. Ergänzend fördert die Reduktion von 8-*iso*-PGF_{2 α} die durch cAMP und cGMP hervorgerufene Vasodilatation. Dieser Effekt wird zusätzlich durch eine Änderung der Serum-Ca²⁺-Konzentration verstärkt. Überraschenderweise fanden wir eine Erniedrigung der Serum-Ca²⁺-Konzentration um 5,4%. Abgesehen von einem zusätzlichen vasodilatierenden Effekt, beeinträchtigt die erniedrigte extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration die Nanoplaquebildung und -größe. Beides sind Ca²⁺-getriebene Prozesse proportional zur extrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Infolgedessen schwächt diese leichte Erniedrigung im physiologischen Bereich die Nanoplaquebildung ab.

Hinsichtlich einer mechanistischen Erklärung können wir nur spekulieren. Wir vermuten eine Gegenregulation der Nieren zur intrazellulär sehr niedrigen Ca^{2+} -Konzentration in den glatten Gefäßmuskelzellen ($\text{cAMP}\uparrow$, $\text{cGMP}\uparrow$, $8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}\downarrow$), um den transmembranalen Ca^{2+} -Gradienten nicht zu groß werden zu lassen.

Um das Bild der Ginkgoeffekte beim metabolischen Syndrom abzurunden, bestimmten wir zwei neue kardiale Marker, MPO und MMP-9, die in ihrer antioxidativen Funktion korreliert sind. Über die Messung von MPO-Spiegeln ist vorauszusagen, ob ein kardiales Risiko für einen Myokardinfarkt besteht oder in absehbarer Zeit ein kardiales Ereignis bevorsteht [24]. Somit stellt MPO mit seinen bereits beschriebenen Wirkungen eine mechanistische Verbindung zwischen persistierender Inflammation, oxidativem Stress und kardiovaskulären Erkrankungen dar. Der Befund einer signifikanten Reduktion war für uns überraschend, ist jedoch für die Patientenprävention von großem Vorteil. MMP-9 kann durch MPO aktiviert werden, ist ein neuer Prädiktor für kardiovaskuläre Mortalität bei Koronarpatienten und dient einer japanischen Studie zufolge als unabhängiger Marker für Plaquerupturen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und instabiler Angina pectoris. MMP-9 wurde wie MPO signifikant gesenkt, für unsere Patienten eine bedeutsame Risikoreduktion. Zudem ist MMP-9 direkt mit hs-CRP korreliert [30]. Das bestätigt die Bedeutung des inflammatorischen Status für Plaquerupturen. Exemplarisch haben wir drei Biomarker – oxLDL/LDL, MPO und $8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}$, die für die Beurteilung des oxidativen Stresses relevant sind – korreliert und in jedem Fall signifikante Korrelationen erhalten (vgl. Abb. 4). Darüber hinaus ergab sich eine exzellente Beziehung zwischen der Zunahme der Bilobalidkonzentration in den VLDL/IDL/LDL-Partikeln und der Abnahme des oxLDL/LDL-Quotienten ($r = -0,99$; $p < 0,001$). Dies demonstriert, daß die Änderung bereits eines Parameters in unserem Biomarkerschema über gegenseitige Wechselwirkungen auch andere Marker beeinflusst.

Zur mechanistischen Klärung der Nanoplaquereduktion wurde eine multiple Korrelation zwischen Änderungen von Lp(a), oxLDL/LDL und cGMP erstellt, wobei sich zeigte, daß bei normaler Blut- Ca^{2+} -Konzentration die Reduzierung der Risikofaktoren oxLDL/LDL und Lp(a) einen dominierenden Einfluß ausübt. Bei hoher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration, wie sie in unmittelbarer Plaquenähe vorkommt, verschiebt sich der Anteil stark zur Seite der cGMP- und Lp(a)-Konzentration (97,8%). Dies bedeutet, daß Gefäß- und Lipideffekte die Nanoplaquereduktion zu etwa gleichen Teilen beeinflussen. Dadurch wird der Ansatz unseres Biomarkerschemas bestätigt und die Möglichkeit einer therapieunabhängigen Risikoprofilbeurteilung eröffnet.

Zusammenfassung und Ausblick

Sowohl in unserer Studie an bypassoperierten Hochrisikopatienten als auch bei unseren Patienten mit metabolischem Anfangssyndrom konnten wir nach 2-monatiger Ginkgotherapie eine Verringerung der Nanoplaquebildung und -größe beobachten. Bei fast unveränderten Lipidkonzentrationen ist der antiarteriosklerotische Effekt auf eine Hochregulierung der körpereigenen Radikalfängerenzyme und eine Abschwächung der Risikofaktoren oxLDL/LDL und Lp(a) zurückzuführen. Offensichtlich spielt der Lp(a)-Wert eine zentrale Rolle, da er mit dem oxidativen Stress wie mit dem inflammatorischen Status verknüpft ist. Daher sollte diesem Marker in Zukunft mehr Beachtung geschenkt werden. Ginkgo erhöhte außerdem die gefäßerweiternden Nukleotide cAMP und cGMP stark und verbesserte so die endotheliale Dysfunktion. Die inflammatorischen Marker MPO, IL-6, hs-CRP sowie $8\text{-iso-PGF}_{2\alpha}$ konnten signifikant gesenkt werden, nur TNF α und TGF β_1 wurden erhöht, und zwar lediglich im physiologischen Regulationsbereich. MMP-9 als Marker für Plaquestabilität konnte ebenfalls

gesenkt werden und der oxidative Stressstatus konnte deutlich verbessert werden, sichtbar an einer Erhöhung der SOD- und GPx-Aktivität. Bisher nicht publiziert sind die Daten zur Insulinresistenz. Alle Patienten hatten leicht erhöhte Insulinwerte, die während des Studienzeitraumes um 7,1% abnahmen. Hier sind weitere Untersuchungen nötig. Auch stellt sich die Frage, ob der alleinige Ansatz einer Lipidsenkung der einzige Weg zur Arterioskleroseprävention ist, oder ob nicht einer Änderung des Andockverhaltens der Lipide, des oxidativen Stresses und der Inflammation mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden müßte. Insgesamt hatten sowohl die kardiovaskulären Hochrisikopatienten wie auch die Patienten mit metabolischem Anfangssyndrom erhebliche Vorteile von der 2-monatigen Ginkgotherapie durch die Reduzierung ihres cardio-cerebro-vaskulären Risikoprofils, die wir in diesem Ausmaß nicht erwartet hatten. Natürlich sind weitere Untersuchungen zur Bestätigung und Erhärtung dieser Befunde nötig. Der Ginkgoextrakt kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen als Medikament mit komplementären Wirkungen und potentiellm Präventionscharakter eingestuft werden. Beide klinische Studien legten weitere pleiotrope Effekte von Ginkgo im kardiovaskulären Bereich dar und eröffnen damit neue Therapieoptionen für diese alte Heilpflanze.

Literaturverzeichnis

1. Abletshaus, C., Klüßendorf, D., Schmidt, A., Winkler, K., März, W., Buddecke, E., Malmsten, M., Siegel, G.: Biosensing of arteriosclerotic nanoplaque formation and interaction with an HMG-CoA reductase inhibitor. *Acta Physiol. Scand.* 2002; 176:131-145.
2. Baldus, S., Eiserich, J.P., Mani, A., Castro, L., Figueroa, M., Chumley, P., Ma, W., Tousson, A., White, C.R., Bullard, D.C., Brennan, M.-L., Lusis, A.J., Moore, K.P., Freeman, B.A.: Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J. Clin. Invest.* 2001; 108:1759-1770.
3. Boesten, L.S.M., Zadelaar, A.S.M., van Nieuwkoop, A., Gijbels, M.J.J., de Winther, M.P.J., Havekes, L.M., van Vlijmen, B.J.M.: Tumor necrosis factor- α promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-leiden transgenic mice. *Cardiovasc. Res.* 2005; 66:179-185.
4. Campos-Toimil, M., Lugnier, C., Droy-Lefaix, M.T., Takeda, K.: Inhibition of type 4 phosphodiesterase by rolipram and Ginkgo biloba extract (EGb 761) decreases agonist-induced rises in internal calcium in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20:E34-E40.
5. Chatterjee, S.S.: Effects of Ginkgo biloba extract on cerebral metabolic processes. In: Agnoli, A., Rapin, J.R., Scapagnini, V., Weitbrecht, W.V. (Eds.), *Effects of Ginkgo biloba on Organic Cerebral Impairment*. London, Paris: John Libbey, 1985, pp 5-14.
6. Chen, J.-W., Chen, Y.-H., Lin, F.-Y., Chen, Y.-L., Lin, S.-J.: *Ginkgo biloba* extract inhibits tumor necrosis factor- α -induced reactive oxygen species generation, transcription factor activation, and cell adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23:1559-1566.
7. Davignon, J., Ganz, P.: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109:III-27-III-32.
8. De Feijter, J.A., Benjamins, J., Veer, F.A.: Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* 1978; 17:1759-1772.

9. DeFeudis, F.V.: A brief history of EGb 761[®] and its therapeutic uses. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36(Suppl. 1):S2-S7.
10. dell'Agli, M., Galli, G.V., Bosisio, E.: Inhibition of cGMP-phosphodiesterase-5 by biflavones of *Ginkgo biloba*. *Planta Med.* 2006; 72:468-470.
11. DermoTopics 1 (2002): Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β).
12. Dingermann, T., Loew, D.: *Phytopharmakologie. Experimentelle und klinische Pharmakologie pflanzlicher Arzneimittel.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2003.
13. Félétou, M., Vanhoutte, P.M.: Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291:H985-H1002.
14. Glass, C.K., Witztum, J.L.: Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 2001; 104:503-516.
15. Grainger, D.J., Kirschenlohr, H.L., Metcalfe, J.C., Weissberg, P.L., Wade, D.P., Lawn, R.M.: Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science* 1993; 260:1655-1658.
16. Han, Y.: *Ginkgo* terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 2005; 5:1049-1056.
17. Hänsel, R., Sticher, O.: *Pharmakognosie, Phytopharmazie.* Berlin: Springer 2007.
18. Kameda, K., Matsunaga, T., Abe, N., Hanada, H., Ishizaka, H., Ono, H., Saitoh, M., Fukui, K., Fukuda, I., Osanai, T., Okumura, K.: Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. *Eur. Heart J.* 2003; 24:2180-2185.
19. Klebanoff, S.J.: Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 77:598-625.
20. Koltermann, A., Hartkorn, A., Koch, E., Fürst, R., Vollmar, A.M., Zahler, S.: *Ginkgo biloba* extract EGb[®] 761 increases endothelial nitric oxide production *in vitro* and *in vivo*. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007; 64:1715-1722.
21. Kong, Y.-Z., Yu, X., Tang, J.-J., Ouyang, X., Huang, X.-R., Fingerle-Rowson, G., Bacher, M., Scher, L.A., Bucala, R., Lan, H.Y.: Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression: implications for destabilization of human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2005; 178:207-215.
22. Kwak, W.-J., Chang, K.H., Kun, H.S., Hyeun, W.C., Sam, S.K., Byoung, K.P., Hyun, P.K.: Effects of ginkgetin from *Ginkgo biloba* leaves on cyclooxygenases and *in vivo* skin inflammation. *Planta Med.* 2002; 68:316-321.
23. Lippi G, Targher G, Guidi GC. *Ginkgo biloba*, inflammation and lipoprotein(a). *Atherosclerosis* 2007; 195:417-418.
24. Lusis, A.J.: Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241.
25. Lusis, A.J., Fogelman, A.M., Fonarow, G.C.: Genetic basis of atherosclerosis: Part I: New genes and pathways. *Circulation* 2004; 110:1868-1873.
26. Malmsten, M., Siegel, G., Wood, W.G.: Ellipsometry studies of lipoprotein adsorption. *J. Colloid Interface Sci.* 2000; 224:338-346.
27. Manning, G.S.: Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. II. Self-diffusion of the small ions. *J. Chem. Phys.* 1969; 51:934-938.
28. Nadra, I., Mason, J.C., Philippidis, P., Florey, O., Smythe, C.D.W., McCarthy, G.M., Landis, R.C., Haskard, D.O.: Proinflammatory activation of macrophages by basic cal-

- cium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ. Res.* 2005; 96:1248-1256.
29. Nimpf, J., Gries, A., Wurm, H., Kostner, G.M.: Influence of beta 2-glycoprotein-I upon the content of cAMP and cGMP in human blood platelets. *Thromb. Haemost.* 1985; 54:824-827.
 30. Nomoto, K., Oguchi, S., Watanabe, I., Kushiro, T., Kanmatsuse, K.: Involvement of inflammation in acute coronary syndromes assessed by levels of high-sensitivity C-reactive protein, matrix metalloproteinase-9 and soluble vascular-cell adhesion molecule-1. *J. Cardiol.* 2003; 42:201-206.
 31. Öörni, K., Pentikäinen, M.O., Ala-Korpela, M., Kovanen, P.T.: Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J. Lipid Res.* 2000; 41:1703-1714.
 32. Patrono, C., FitzGerald, G.A.: Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17:2309-2315.
 33. Ramharack, A., Barkalow, D., Spahr, M.A.: Dominant negative effect of TGF- β 1 and TNF- α on basal and IL-6-induced lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) mRNA expression in primary monkey hepatocyte cultures. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18:984-990.
 34. Rattazzi, M., Faggin, E., Bertipaglia, B., Pauletto, P.: Innate immunity and atherogenesis. *Lupus* 2005; 14:747-751.
 35. Roberts, C.K., Chen, A.K., Barnard, R.J.: Effect of a short-term diet and exercise intervention in youth on atherosclerotic risk factors. *Atherosclerosis* 2007; 191:98-106.
 36. Rodríguez, M., Ringstad, L., Schäfer, P., Just, S., Hofer, H.W., Malmsten, M., Siegel, G.: Reduction of atherosclerotic nanoplaque formation and size by *Ginkgo biloba* (EGb 761) in cardiovascular high-risk patients. *Atherosclerosis* 2007; 192:438-444.
 37. Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.
 38. Schäfer, P., Rodríguez, M., Just, S., Ullrich, T., Winkler, K., Knes, O., Malmsten, M., Siegel, G.: The effect of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on arteriosclerotic nanoplaque formation and size in a long-term clinical trial. *Desalination* 2006; 191:426-431.
 39. Schäfer, P., Rodríguez, M., Siegel, G.: Atherosclerosis, an inflammatory and fibroproliferative disease. A prophylactic phytochemical approach with *Ginkgo biloba* (EGb 761). *Atherosclerosis* 2007; 195:419-422.
 40. Siegel, G., Malmsten, M., 2005. Molecular model for athero/arteriosclerosis, patent EP 0 946 876.
 41. Siegel, G., Abletshauer, C., Malmsten, M., Klüßendorf, D.: The effect of an HMG-CoA reductase inhibitor on arteriosclerotic nanoplaque formation and size in a biosensor model. *Biosens. Bioelectron.* 2003; 18:635-647.
 42. Siegel, G., Abletshauer, C., Malmsten, M., Schmidt, A., Winkler, K.: Reduction of arteriosclerotic nanoplaque formation and size by fluvastatin in a receptor-based biosensor model. *Cardiovasc. Res.* 2003; 58:696-705.
 43. Siegel, G., Malmsten, M.: Lipoprotein-proteoglycan interactions at a silica surface membrane. *Separation Purification Technol.* 2002; 28:1-11.

44. Siegel, G., Malmsten, M., Klüßendorf, D., Leonhardt, W.: Physicochemical binding properties of the proteoglycan receptor for serum lipoproteins. *Atherosclerosis* 1999; 144:59-67.
45. Siegel, G., Malmsten, M., Klüßendorf, D., Michel, F.: A receptor-based biosensor for lipoprotein docking at the endothelial surface and vascular matrix. *Biosens. Bioelectron.* 2001; 16:895-904.
46. Siegel, G., Rodríguez, M., Sauer, F., Abletshauer, C., de Mey, C., Schötz, K., Ringstad, L., Malmsten, M., Schäfer, P.: Nanotechnologic biosensor ellipsometry and biomarker pattern analysis in the evaluation of atherosclerotic risk profile. *Biosens. Bioelectron.* 2009; 24:1512-1517.
47. Siegel, G., Vogel, M., Abletshauer, C., Mansmann, U., Winkler, K., Malmsten, M.: Receptor-based biosensor assay on the statin-induced inhibition of arteriosclerotic nano-plaque formation in patients with type 2 diabetes. In: *The Ninth World Congress on Biosensors 2006, Delegate Manual*, edited by Turner, A.P.F., p. [O94]. Oxford: Elsevier 2006.
48. Silaste, M.-L., Rantala, M., Alfthan, G., Aro, A., Witztum, J.L., Kesäniemi, Y.A., Hörkkö, S.: Changes in dietary fat intake alter plasma levels of oxidized low-density lipoprotein and lipoprotein(a). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24:498-503.
49. Tsimikas, S., Lau, H.K., Han, K.-R., Shortal, B., Miller, E.R., Segev, A., Curtiss, L.K., Witztum, J.L., Strauss, B.H.: Percutaneous coronary intervention results in acute increases in oxidized phospholipids and lipoprotein(a): Short-term and long-term immunologic responses to oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 2004; 109:3164-3170.
50. Tuomisto, K., Jousilahti, P., Sundvall, J., Pajunen, P., Salomaa, V.: C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as predictors of incident coronary and cardiovascular events and total mortality. A population-based, prospective study. *Thromb. Haemost.* 2006; 95:511-518.
51. van Beek, T.A.: *Ginkgo biloba*. The Gordon and Breach Publishing Group: Harwood Academic 2000.
52. van Wissen, S., Trip, M.D., Smilde, T.J., de Graaf, J., Stalenhoef, A.F.H., Kastelein, J.J.P.: Differential hs-CRP reduction in patients with familial hypercholesterolemia treated with aggressive or conventional statin therapy. *Atherosclerosis* 2002; 165:361-366.
53. Vassalle, C., Botto, N., Andreassi, M.G., Berti, S., Biagini, A.: Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress *in vivo*, in patients with coronary artery disease. *Coron. Artery Dis.* 2003; 14:213-218.
54. Witztum, J.: The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994; 344:793-795.
55. Yan, L.J., Droy-Lefaix, M.T., Packer, L.: Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects human low density lipoproteins against oxidative modification mediated by copper. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1995; 212:360-366.
56. Zhou, Y.-H., Yu, J.-P., Liu, Y.-F., Teng, X.-J., Ming, M., Lv, P., An, P., Liu, S.-Q., Yu, H.-G.: Effects of *Ginkgo biloba* extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. *Mediators Inflamm.* 2006; 2006:1-9.

57. Zhu, C., Ying, D., Zhou, D., Mi, J., Zhang, W., Chang, Q., Li, L.: Expression of TGF-beta1 in smooth muscle cells regulates endothelial progenitor cells migration and differentiation. *J. Surg. Res.* 2005; 125:151-156.
58. Zhu, Q.-X., Shen, T., Tu, D.-Y., Ding, R., Liang, Z.-Z., Zhang, X.-J.: Protective effects of *Ginkgo biloba* leaf extracts on trichloroethylene-induced human keratinocyte cytotoxicity and apoptosis. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2005; 18:160–169.

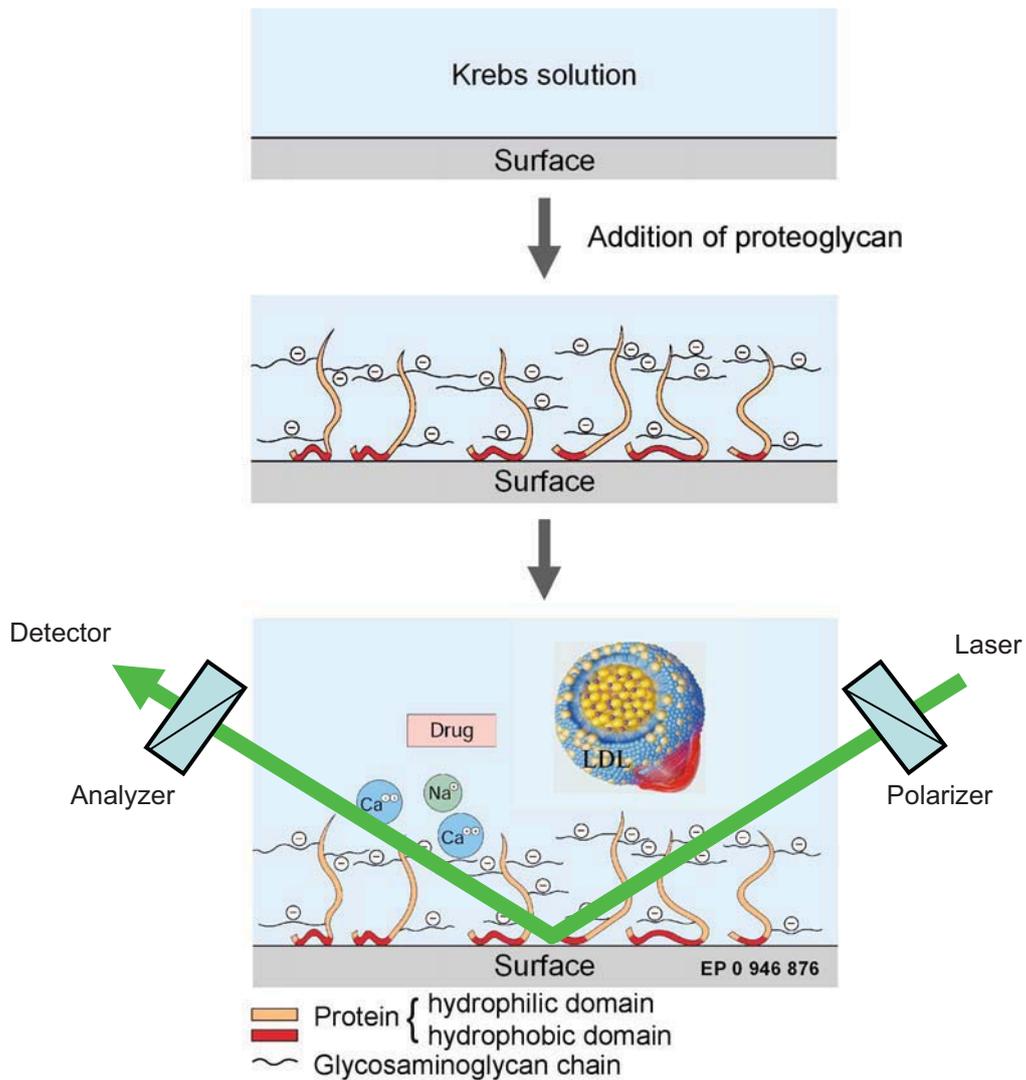


Abb. 1. Monomolekulare Beschichtung einer methylierten Silikatoberfläche mit Proteoheparansulfat-Molekülen und ihre Wechselwirkung sowohl mit Ca^{2+} - und Na^+ -Ionen als auch mit Lipoproteinpartikeln in Blutersatzlösung (nicht maßstabsgerecht). Des weiteren kann auch der Einfluß von Pharmaka in diesem laserbasierten Biosensormodell getestet werden (EP 0 946 876) (aus [46]).

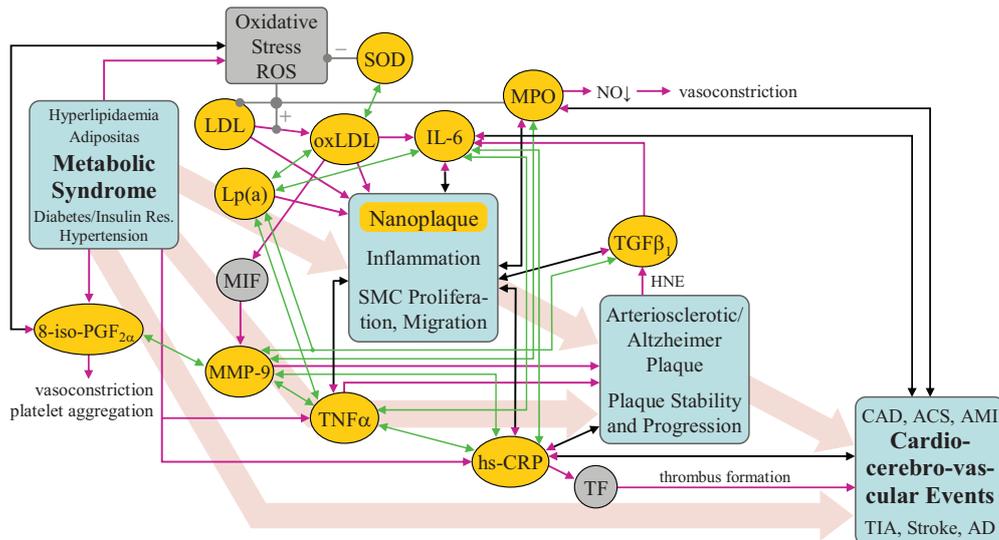


Abb. 2. Ausgehend vom metabolischen Syndrom als einem multiplen Symptomenkomplex, ist die pathophysiologische Entwicklung kardiovaskulärer Ereignisse über atherogene Prozesse in ihrer zeitlichen Abfolge dargestellt (→). Darüber hinaus sind die wesentlichen Biomarker (→) als Folgeprodukte (→) und Zielgrößen (→) dieser pathologischen Prozesse in ihrer gegenseitigen Vernetzung und Korrelation (↔) abgebildet. ● Biomarker und Meßgröße; ■ Krankheitsbilder und Folgen; ● Gewebefaktoren und Radikalstatus; CAD, koronare Herzkrankung; ACS, akutes Koronarsyndrom; AMI, akuter Myokardinfarkt; TIA, transitorische ischämische Attacke; AD, Alzheimerdemenz; ROS, radikale Sauerstoffspezies; MIF, Makrophagen-migrationshemmender Faktor; TF, Gewebefaktor (modifiziert aus [39]).

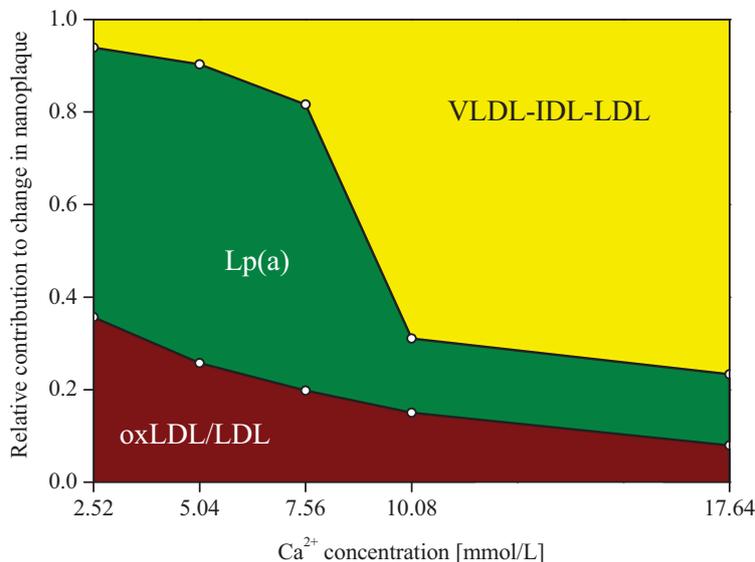


Abb. 3. Relativer Anteil der drei Risikofaktoren oxLDL/LDL, Lp(a) und VLDL/IDL/LDL an den Änderungen der Nanoplaquebildung in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration. Die multiple Korrelation mit allen drei Risikofaktoren über alle Ca²⁺-Konzentrationen ergibt teilweise signifikante Ergebnisse und einen Trend relativer Beiträge (*t*-Werte) mit konsistentem Verlauf (aus [36]).

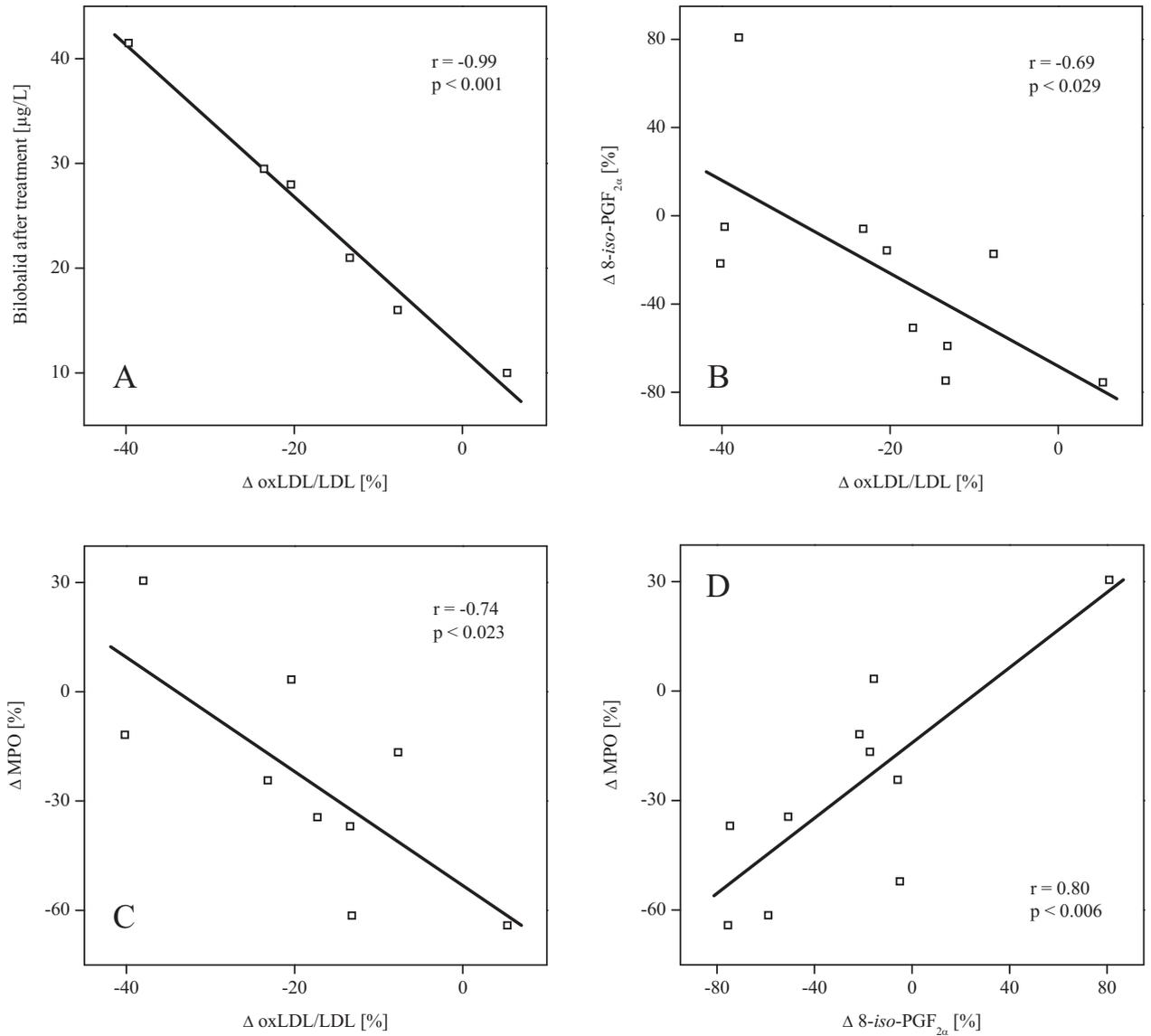


Abb. 4. Signifikante Korrelationen zwischen Änderungen der Bilobalid-Konzentration in den VLDL/IDL/LDL-Partikeln (A), 8-iso-PGF_{2 α} (B) und Änderungen im oxLDL/LDL-Quotienten sowie zwischen Änderungen im MPO und 8-iso-PGF_{2 α} (D). Für die lineare Korrelationsanalyse wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient r berechnet (aus [46]).

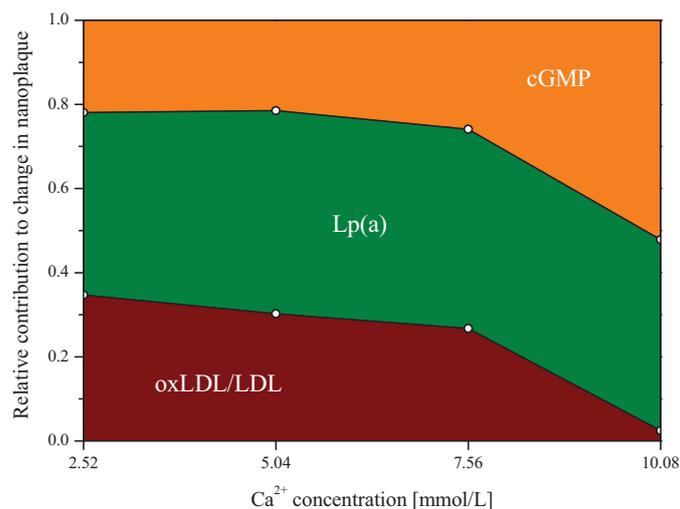


Abb. 5. Relativer Anteil der drei Risikofaktoren oxLDL/LDL, Lp(a) und cGMP an den Änderungen der Nanoplaquebildung in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. Die multiple Korrelation mit allen drei Risikofaktoren über alle Ca^{2+} -Konzentrationen ergibt teilweise signifikante Ergebnisse und einen einheitlichen Trend der relativen Beteiligungen (t -Werte).

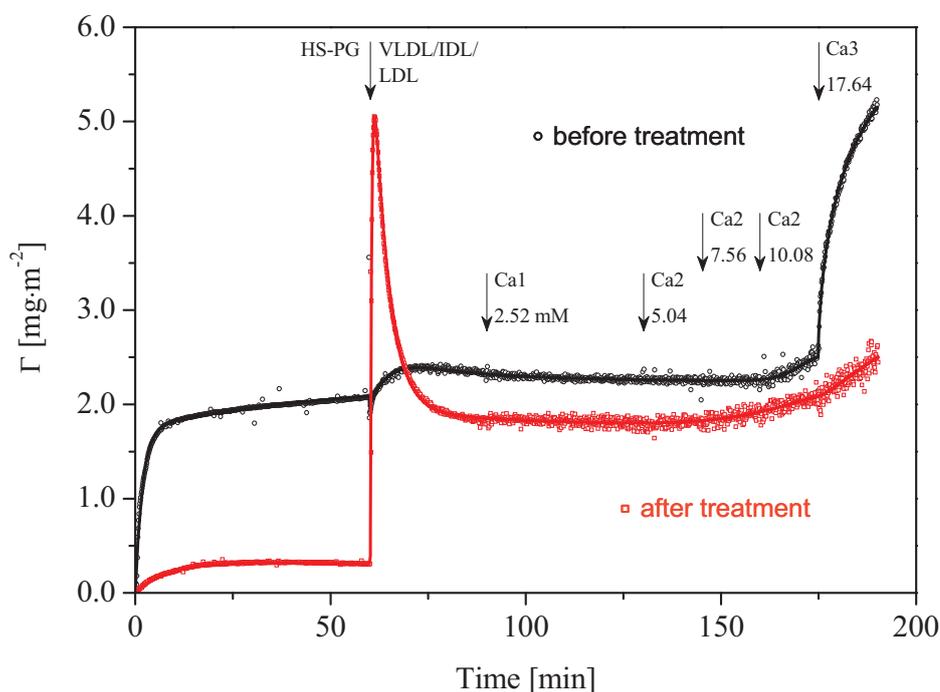


Abb. 6. Gesamte adsorbierte Menge versus Zeit. Zum Zeitpunkt Null wird HS-PG (0,1 mg/mL) an eine hydrophobe Silikatoberfläche aus Ca^{2+} -freier Krebslösung adsorbiert. Der erste Pfeil gibt die Zugabe der VLDL/IDL/LDL-Plasmafraktion in ihrer *in vivo*-Konzentration eines kardiovaskulären Hochrisikopatienten entweder unbehandelt (\circ , schwarze Kurve) oder nach zwei Monaten Behandlung mit täglich 2 x 120 mg Ginkgo biloba-Extrakt (\square , rote Kurve) an. Die Gesamt- Ca^{2+} -Konzentration in Lösung wird durch die Pfeile markiert. Der pH-Wert war 7,40 (\circ) und 7,24 (\square) (aus [38]).

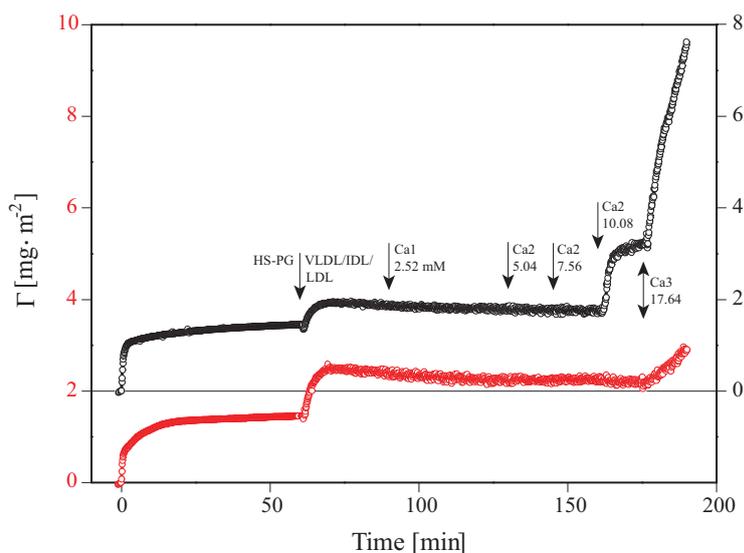


Abb. 7. Gesamte adsorbierte Menge versus Zeit. Zum Zeitpunkt Null wird HS-PG (0,1 mg/mL) an eine hydrophobe Silikatoberfläche aus Ca^{2+} -freier Krebslösung adsorbiert. Der erste Pfeil gibt die Zugabe der VLDL/IDL/LDL-Plasmafraktion in ihrer *in vivo*-Konzentration eines Patienten mit metabolischem Syndrom entweder unbehandelt (\circ , schwarze Kurve) oder nach zwei Monaten Behandlung mit täglich 2 x 120 mg Ginkgo biloba-Extrakt (\circ , rote Kurve) an. Die Gesamt- Ca^{2+} -Konzentration in Lösung wird durch die Pfeile markiert. Der pH-Wert war 7,38 (\circ) und 7,20 (\circ).

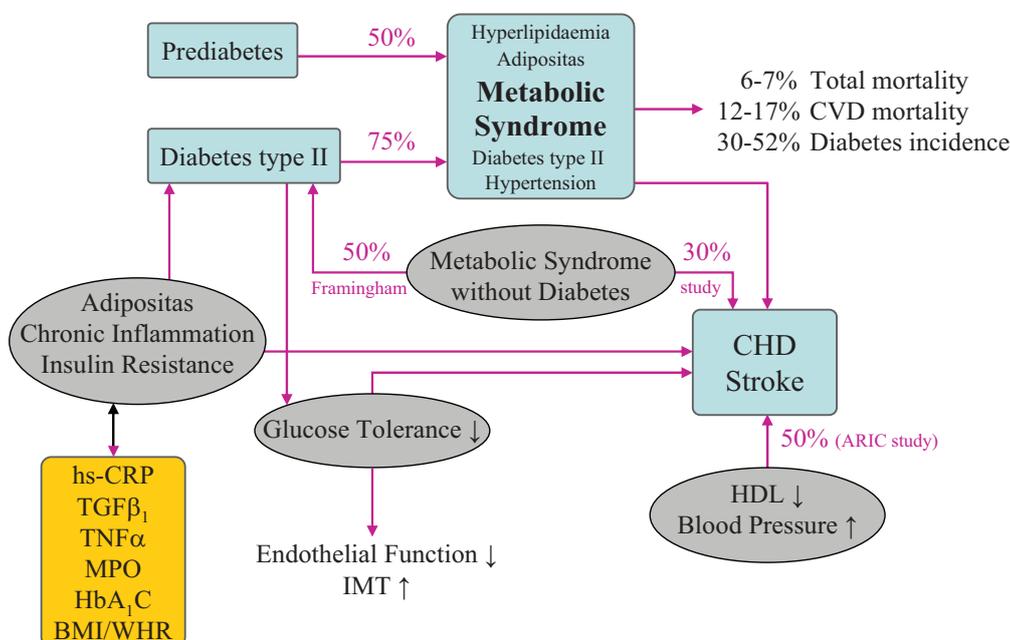


Abb. 8. Korrelation des metabolischen Syndroms mit Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen (Zeichenerklärung siehe Abb. 2).

Tabelle 1. TNF α -, TGF β ₁-, IL-6- und Lp(a)-Blutkonzentrationen von elf Patienten mit metabolischem Syndrom vor und nach zweimonatiger Ginkgotherapie.

Patient	TNF α [pg/mL]			TGF β ₁ [ng/mL]			IL-6 [pg/mL]			Lp(a) [mg/dL]		
	before	after	change [%]	before	after	change [%]	before	after	change [%]	before	after	change [%]
1	2.06	4.42	+114.6	6.737	13.037	+93.5	2.87	1.30	-54.6	31.2	29.0	-7.1
2	5.30	6.48	+22.3	7.351	8.472	+15.2	2.12	1.45	-31.7	22.5	13.3	-40.8
3	1.77	3.24	+83.1	3.762	5.464	+45.2	4.47	3.90	-12.8	54.7	41.7	-23.7
4	2.35	3.53	+50.2	6.394	11.114	+73.8	1.92	1.78	-7.3	77.4	71.7	-7.4
6	0.59	2.65	+349.2	1.924	1.702	-11.5	2.91	2.25	-22.8	75.3	50.6	-32.8
7	0.88	1.47	+67.1	3.069	4.237	+38.0	5.61	5.13	-8.5	64.7	60.0	-7.3
8	2.35	2.65	+12.8	3.011	3.313	+10.0	1.40	0.89	-36.9	40.9	27.1	-33.7
9	4.42	4.12	-6.8	4.376	9.265	+111.7	3.97	3.94	-0.8	51.4	35.7	-30.5
10	4.12	4.12	0.0	7.586	9.767	+28.7	1.23	1.64	+33.3	83.1	61.1	-26.5
12	3.83	5.30	+38.4	3.502	3.730	+6.5	(167.04)	(166.64)	-0.2	5.3	2.1	-59.5
13	2.65	3.24	+22.3	1.315	1.458	+10.9	3.69	3.69	0.0	52.7	42.2	-20.0
Mean (11)	2.76	3.75	+68.5	4.457	6.505	+38.4	3.02	2.60	-12.9	50.8	39.5	-26.3
\pm SEM	0.45	0.41	30.2	0.666	1.201	11.8	0.45	0.46	7.0	7.3	6.3	4.8
Median			+38.4			+28.7			-8.5			-26.5
<i>p</i>	<0.0028	<0.0076		<0.0126	<0.0068		<0.0337	<0.0407		<0.0005	<0.001	

Tabelle 2. cAMP-, cGMP-, 8-*iso*-PGF_{2 α} - und Ca²⁺-Blutkonzentrationen von elf Patienten mit metabolischem Syndrom vor und nach zweimonatiger Ginkgotherapie.

Patient	cAMP [nmol/L]			cGMP [nmol/L]			8- <i>iso</i> -PGF _{2α} [nmol/L]			[Ca ²⁺] _o [mmol/L]		
	before	after	change [%]	before	after	change [%]	before	after	change [%]	before	after	change [%]
1	17.8	43.7	+145.4	5.1	11.4	+123.3	30.2	28.4	-5.9	2.50	2.39	-4.4
2	33.5	57.2	+70.9	7.8	8.9	+14.5	29.4	14.5	-50.8	2.39	2.39	0.0
3	36.1	38.6	+7.1	8.1	9.6	+18.7	15.2	11.9	-21.6	2.33	2.27	-2.6
4	29.6	46.2	+56.3	8.1	10.4	+27.9	19.7	16.3	-17.3	2.25	2.27	+1.1
6	31.7	41.9	+32.2	10.4	12.0	+15.8	10.8	10.3	-5.0	2.39	2.36	-1.3
7	55.3	69.2	+25.2	9.6	12.9	+35.2	14.8	12.5	-15.7	2.42	2.17	-10.3
8	61.7	62.8	+1.9	9.9	12.1	+22.4	22.8	9.4	-59.0	2.43	2.09	-14.0
9	42.4	48.3	+14.0	7.6	9.9	+30.6	32.8	8.0	-75.5	2.27	2.13	-6.2
10	42.8	66.0	+54.2	7.8	12.9	+65.7	60.2	15.2	-74.7	2.57	2.25	-12.5
12	41.8	57.2	+36.7	11.0	11.1	+0.8	(68.8)			2.28	2.25	-1.3
13	50.8	68.4	+34.6	8.0	8.6	+7.6	12.9	23.4	+80.9	2.23	2.05	-8.1
Mean (11)	40.3	54.5	+43.5	8.5	10.9	+32.9	24.9	15.0	-24.5	2.37	2.24	-5.4
\pm SEM	3.8	3.4	12.0	0.5	0.5	10.4	4.6	2.0	14.5	0.03	0.04	1.6
Median			+34.6			+22.4			-19.5			-4.4
<i>p</i>	<0.0002	<0.001		<0.0016	<0.001		<0.0027*	<0.084		<0.0069	<0.0076	

*Exact Wilcoxon signed-rank test

Eingereichte Publikationen und Anteilserklärung

1. **Schäfer, P.**, Rodríguez, M., Just, S., Ullrich, T., Winkler, K., Knes, O., Malmsten, M., Siegel, G.: The effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on arteriosclerotic nanoplaque formation and size in a long-term clinical trial. *Desalination* **191**, 426-431 (2006).

IF: 1.155

Anteil 40% an Planung, Messungen, Auswertung und Veröffentlichung

2. Rodríguez, M., Ringstad, L., **Schäfer, P.**, Just, S., Hofer, H.W., Malmsten, M., Siegel, G.: Reduction of atherosclerotic nanoplaque formation and size by *Ginkgo biloba* (EGb 761) in cardiovascular high-risk patients. *Atherosclerosis* **192**, 438-444 (2007).

IF: 4.601

Anteil 25% an Planung, Messungen, Auswertung und Veröffentlichung

3. **Schäfer, P.**, Rodríguez, M., Siegel, G.: Atherosclerosis, an inflammatory and fibro-proliferative disease. A prophylactic phytochemical approach with *Ginkgo biloba* (EGb 761). *Atherosclerosis* **195**, 419-422 (2007).

IF: 4.601

Anteil 70% an Planung, Messungen, Auswertung und Veröffentlichung

4. Siegel, G., Rodríguez, M., Sauer, F., Abletshauer, C., de Mey, C., Schötz, K., Ringstad, L., Malmsten, M., **Schäfer, P.**: Nanotechnologic biosensor ellipsometry and biomarker pattern analysis in the evaluation of atherosclerotic risk profile. *Biosensors & Bioelectronics* **24**, 1512-1517 (2009).

IF: 5.143

Anteil 40% an Planung, Messungen, Auswertung und Veröffentlichung

29. Juni 2009

Petra Schäfer

Prof. Dr. med. Günter Siegel

PUBLIKATIONEN

1. **Schäfer, P.**, Rodríguez, M., Just, S., Ullrich, T., Winkler, K., Knes, O., Malmsten, M., Siegel, G.: The effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on arteriosclerotic nanoplaque formation and size in a long-term clinical trial. *Desalination* **191**, 426-431 (2006).
2. Rodríguez, M., Ringstad, L., **Schäfer, P.**, Just, S., Hofer, H.W., Malmsten, M., Siegel, G.: Reduction of atherosclerotic nanoplaque formation and size by *Ginkgo biloba* (EGb 761) in cardiovascular high-risk patients. *Atherosclerosis* **192**, 438-444 (2007).
3. **Schäfer, P.**, Rodríguez, M., Siegel, G.: Atherosclerosis, an inflammatory and fibro-proliferative disease. A prophylactic phytochemical approach with *Ginkgo biloba* (EGb 761). *Atherosclerosis* **195**, 419-422 (2007).
4. Siegel, G., Rodríguez, M., Sauer, F., Abletshauser, C., de Mey, C., Schötz, K., Ringstad, L., Malmsten, M., **Schäfer, P.**: Nanotechnologic biosensor ellipsometry and biomarker pattern analysis in the evaluation of atherosclerotic risk profile. *Biosensors & Bioelectronics* **24**, 1512-1517 (2009).

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

1. **Schäfer, P.**, Rodríguez, M., Just, S., Ullrich, T., Winkler, K., Knes, O., Malmsten, M., Siegel, G.: The effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on arteriosclerotic nanoplaque formation and size in a long-term clinical trial. *Desalination* **191**, 426-431 (2006).
IF: 1.155
2. Siegel, G., **Schäfer, P.**, Just, S., Malmsten, M., Winkler, K.: Prevention of arteriosclerosis and promotion of well-aging. A phytochemical approach with Ginkgo biloba (EGb 761). *phytotherapie* **7**, 3-11 (2007).
3. Rodríguez, M., Ringstad, L., **Schäfer, P.**, Just, S., Hofer, H.W., Malmsten, M., Siegel, G.: Reduction of atherosclerotic nanoplaque formation and size by *Ginkgo biloba* (EGb 761) in cardiovascular high-risk patients. *Atherosclerosis* **192**, 438-444 (2007).
IF: 4.601
4. Siegel, G., **Schäfer, P.**, Winkler, K., Malmsten, M.: Ginkgo biloba (EGb 761) in arteriosclerosis prophylaxis. *Wien. Med. Wochenschr.* **157**, 288-294 (2007).
5. Siegel, G., **Schäfer, P.**, Rodríguez, M., Weber, T., Malmsten, M.: New developments in phytochemical nutrition for anti-aging: prevention of atherosclerosis. *Anti-Aging Therap.* **9**, 313-333 (2007).
6. **Schäfer, P.**, Rodríguez, M., Siegel, G.: Atherosclerosis, an inflammatory and fibroproliferative disease. A prophylactic phytochemical approach with *Ginkgo biloba* (EGb 761). *Atherosclerosis* **195**, 419-422 (2007).
IF: 4.601
7. Siegel, G., Ringstad, L., Rodríguez, M., **Schäfer, P.**, Just, S., Winkler, K., Schmidt, A., Malmsten, M.: Reduction of arteriosclerotic nanoplaque formation and size by Ginkgo biloba (EGb 761) in a long term clinical trial. In: *Arteriosklerose: Neue Aspekte aus der Hämostasiologie, Lipidologie und Gefäßwandbiologie*, edited by Heinle, H., Schulte, H., Schäfer, J., pp. 179-181. Tübingen: Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2008.
8. Siegel, G., Sauer, F., **Schäfer, P.**, Winkler, K., Ringstad, L., Malmsten, M., Just, S.: Ginkgo in der Mikro- und Makrozirkulation, bei peripheren und zentralen Durchblutungsstörungen. *phytotherapie* **8**, 8-11 (2008).
9. Siegel, G., Sauer, F., Ringstad, L., Malmsten, M., Hofer, H.W., Just, S., **Schäfer, P.**: Prophylaxis of atherosclerosis and promotion of well-aging in patients with metabolic syndrome: A phytotherapeutic approach. *Anti-Aging Therap.* **10**, 247-264 (2008).
10. Siegel, G., Sauer, F., **Schäfer, P.**, Malmsten, M., Hofer, H.W., Just, S., Ringstad, L.: The importance of scavenging reactive oxygen species in anti-aging medicine. In: *Technische Systeme für die Lebenswissenschaften*, edited by Beckmann, D., Meister, M., pp. 25-49. Heilbad Heiligenstadt: Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik 2008.

11. Siegel, G., Rodríguez, M., Sauer, F., Abletshauser, C., de Mey, C., Schötz, K., Ringstad, L., Malmsten, M., **Schäfer, P.**: Nanotechnologic biosensor ellipsometry and biomarker pattern analysis in the evaluation of atherosclerotic risk profile. *Biosensors & Bioelectronics* **24**, 1512-1517 (2009).
IF: 5.143
12. Siegel, G., **Schäfer, P.**, Schmidt, A., Buddecke, E., Ringstad, L., Hofer, H.W., Malmsten, M.: Prophylaxis of arteriosclerosis in patients with metabolic syndrome: a phytotherapeutic approach. In: *Neue Aspekte der Arterioskleroseforschung - Beiträge zur 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2008*, edited by Heinle, H., Schulte, H., Schäfer, J., pp. 79-82. Tübingen: Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2009.

Abstracts

1. Rodríguez, M., Just, S., **Schäfer, P.**, Hofer, H.W., Winkler, K., Malmsten, M., Siegel, G.: Reduction of arteriosclerotic nanoplague formation and size in cardiovascular high-risk patients under Ginkgo biloba (EGb 761) medication. *Acta Physiol.* **186** (Suppl. 1), 252 (2006).
2. **Schäfer, P.**, Rodríguez, M., Just, S., Hofer, H.W., Winkler, K., Malmsten, M., Siegel, G.: Effects of ginkgo biloba (EGb 761) on arteriosclerotic nanoplague formation and size in cardiovascular high-risk patients. In: Proc. 1st Int. Conf. on Hypertension, Lipids, Diabetes and Stroke Prevention, edited by Bornstein, N.M., pp. 39-40. Paris: Final Program and Book of Abstracts 2006.
3. **Schäfer, P.**, Rodríguez, M., Just, S., Hofer, H.-W., Ringstad, L., Malmsten, M., Siegel, G.: Effects of *Ginkgo biloba* (EGb 761) on arteriosclerotic nanoplague formation and size in cardiovascular high-risk patients. In: The Ninth World Congress on Biosensors 2006, Delegate Manual, edited by Turner, A.P.F., p. [P270]. Oxford: Elsevier 2006.
4. Siegel, G., Ringstad, L., Rodríguez, M., **Schäfer, P.**, Just, S., Winkler, K., Schmidt, A., Malmsten, M.: Reduction of arteriosclerotic nanoplague formation and size by Ginkgo biloba (EGb 761) in a long-term clinical trial. *Perfusion* **20**, 73-74 (2007).
5. **Schäfer, P.**, Ringstad, L., Just, S., Winkler, K., Siegel, G.: Ginkgo biloba (EGb 761) reduces arteriosclerotic nanoplague formation and size in cardiovascular high-risk patients. In: Abstracts of the Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Annual Conference 2007, p. 62. Dallas: American Heart Association 2007.
6. **Schäfer, P.**, Ringstad, L., Just, S., Winkler, K., Siegel, G.: Ginkgo biloba (EGb 761) reduces arteriosclerotic nanoplague formation and size in cardiovascular high-risk patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, e-66 (2007).
7. Siegel, G., **Schäfer, P.**, Sauer, F., Ringstad, L., Hofer, H.W., Malmsten, M.: Prophylaxis of atherosclerosis in patients with metabolic syndrome: A phytotherapeutic approach. *Z. Phytother.* **29**, S16-S17 (2008).
8. Sauer, F., Hofer, H.W., Malmsten, M., Winkler, K., Just, S., **Schäfer, P.**, Siegel, G.: Prophylaxis of arteriosclerosis by Ginkgo biloba in patients with metabolic syndrome. *Acta Physiol.* **192** (Suppl. 663), 186 (2008).
9. Siegel, G., **Schäfer, P.**, Schmidt, A., Buddecke, E., Ringstad, L., Hofer, H.W., Malmsten, M., Sauer, F.: Prophylaxis of atherosclerosis in patients with metabolic syndrome: a phytotherapeutic approach. *Perfusion* **21**, 24-25 (2008).
10. Siegel, G., Sauer, F., Ringstad, L., Malmsten, M., Hofer, H., Just, S., **Schäfer, P.**: Prophylaxis of atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. *Diabetes, Stoffwechsel und Herz* **17**, 15-16 (2008).
11. Siegel, G., **Schäfer, P.**, Schmidt, A., Malmsten, M.: Plasma lipoprotein(a) lowering is dependent on decreases in oxLDL/LDL and IL-6. In: Final Program and Abstracts of the Quality of Care and Outcomes Research in Cardiovascular Disease and Stroke Conference 2009, p. 79. Dallas: American Heart Association 2009.

12. Siegel, G., **Schäfer, P.**, Schmidt, A., Malmsten, M.: Plasma lipoprotein(a) lowering is dependent on decreases in oxLDL/LDL and IL-6. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* **2**, e42 (2009).

Erklärung

„Ich, Petra Schäfer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluß von Ginkgo biloba EGb 761 auf arteriosklerotische Nanoplaquebildung und kardiovaskuläres Risikoprofil“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

29. Juni 2009

Petra Schäfer

Danksagung

Mein größter Dank gilt allen Menschen, die mir diese Arbeit ermöglicht haben und mich darin unterstützt haben das Vorhaben über die vielen Jahre berufsbegleitend zu vollenden.

Besonderen Dank verdient mein Doktorvater, **Prof. Dr. med. Günter Siegel**, der mir nach meiner langjährigen praktischen Tätigkeit als Offizinapothekerin die Chance gegeben hat noch einmal wissenschaftlich zu arbeiten, was immer mein großer Wunsch war. Mit viel Geduld und großer Unterstützung hat er mich in seine Forschungsvorhaben integriert und mich hilfreich begleitet, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Frau **Angela Becker** danke ich für ihre Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten.

Frau **Eveline Hofmann** danke ich für Ihre unermüdliche Bereitschaft mir bei der Erstellung von Publikationen und Schreibaarbeiten behilflich zu sein.

Herrn **Dr. Miguel Rodriguez** danke ich für seinen statistischen Sachverstand und die professionelle Hilfe bei der Suche nach statistischen Signifikanzen und Korrelationen in unserem Datenschungel.

Vielen Dank auch an unsere schwedischen Kooperationspartner der Universität Uppsala **Prof. Dr. Martin Malmsten** und **Dr. Lovisa Ringstad**, die uns in Ihrem Labor die ellipsometrischen Messungen ermöglicht und uns in jeder Form unterstützt haben. Die langen Wochenenden mit Lovisa im Labor haben mir viel Spaß gemacht und sind unvergesslich.

Herrn **Dr. Sören Just** vom Herzzentrum im Bernau danke ich für die bereitwillige Unterstützung bei unserer Pilotstudie mit Bypass-Patienten.

Zuallerletzt danke ich meiner Familie, meinem Mann **Bernhard** und meinem Sohn **Valentin**, für die unendliche Geduld, die sie mit einer selten anwesenden und immer beschäftigten Frau und Mutter hatten. Danke für die vielen Wochen Apothekenvertretungen, die mein Mann zusammen mit meinen Mitarbeitern der b33 Apotheke geleistet hat, damit ich mich unbelastet der Forschung und Wissenschaft widmen konnte.

Petra Schäfer , Rinteln den 28.9.09