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

# DISSERTATION

Zur Wirkung vaskulärer Adrenorezeptoren in der High-Density-Lipoproteininduzierten Relaxation menschlicher Koronararterien

> zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Krohn aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis			
Abstral	kt (D	eutsch)	7
Abstrac	ct (E	nglish)	8
1. Ein	nleitu	ing	10
1.1.	Zur	Epidemiologie des High Density Lipoprotein (HDL)	10
1.2.	Lip	oproteine	12
1.3.	Zus	ammensetzung und strukturelle Heterogenität der HDL-Partikel	13
1.4.	Fur	ktionelle Heterogenität der HDL-Partikel	15
1.5.	Gef	äßprotektion durch HDL	17
1.5	.1.	Reverser Cholesterintransport	17
1.5	.2.	HDL und Arteriosklerose	18
1.5	.3.	Pleiotrope HDL-Effekte	20
1.6.	HD	L-induzierte Vasorelaxation	22
1.6	.1.	Flussabhängige Regulation der Gefäßweite	22
1.6	.2.	Molekulare Mechanismen des vaskulären Tonus	23
1.6	.3.	Vaskuläre Adrenorezeptoren	25
1.6.4. Evidenz klinischer Studien zur HDL-induzierten Vasorelaxation		Evidenz klinischer Studien zur HDL-induzierten Vasorelaxation	27
1.6.5. Evidenz experimenteller Studien zur HDL		Evidenz experimenteller Studien zur HDL-induzierten Vasorelaxation	29
1.7.	Her	leitung der Hypothese und Zielsetzung der Arbeit	30
2. Ma	teria	al und Methoden	32
2.1.	Stu	dienkriterien	32
2.2.	Cha	arakteristika des Patientenkollektivs	33
2.3.	Prä	paration der Koronararterien	33
2.4.	Vei	rsuchslösungen	34
2.4	.1.	Krebs-Lösung	34
2.4	.2.	HDL-Akquise	34
2.4	.3.	Pharmakologische Blockade der Adrenorezeptoren	35
2.5.	Me	chanische Messungen	37

	2.5.1	Versuchsaufbau	37
	2.5.2	Registrierung des Vasotonus	37
	2.6.	Potenzialmessungen	39
	2.6.1	Messinstrumente	39
	2.6.2	Versuchshergang	39
	2.7.	Nukleotidkonzentrationen	40
	2.7.1	Gewebeaufschluss der Proben	40
	2.7.2	Konzentrationsbestimmung von cAMP	41
	2.7.3	Konzentrationsbestimmung von cGMP	43
	2.7.4	Auswertung der Botenstoffkonzentration	44
	2.8.	Messreihen, Datenauswertung und Statistik	45
3	. Erge	bnisse	46
	3.1.	Charakteristika des Kollektivs	46
	3.2.	Kontrollversuche zur intrinsischen Aktivität der Blockadesubstanzen	48
	3.3.	Elektromechanisches Gefäßverhalten unter HDL	50
	3.3.1	Vasomechanik unter HDL-Einfluss	50
	3.3.2	Potenzialmessungen unter HDL und Kontrolle	52
	3.4.	Gefäßverhalten unter HDL und Blockade der Adrenorezeptoren	54
	3.4.1	Elektromechanik unter HDL und simultaner $\alpha$ - und $\beta$ -Blockade	54
	3.4.2	Elektromechanik unter HDL und $\alpha$ -Einzelblockade	57
	3.4.3	Elektromechanik unter HDL und $\beta$ -Einzelblockade	60
	3.5.	Effektanalyse der Vasomechanik	63
	3.6.	Quantitative Reduktion der HDL-induzierten Vasorelaxation	64
	3.7.	Flussabhängige Wichtung	66
	3.8.	Messungen der Nukleotidkonzentrationen	67
	3.8.1	Korrelation von Vasomechanik und Nukleotidkonzentrationen	67
	3.8.2	Vergleich der Nukleotidkonzentrationen	69
	3.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
4	. Disk	ission	73
	4.1.	nterpretation der Ergebnisse	73

4.1.1. Wirkung von HDL an den Adrenorezeptoren					
4.1.2. Vorschlag eines Wirkungsmechanismus					
4.2. Diskussion der Wirkungshypothese	78				
4.2.1. Funktionelle Aspekte bei der Interpretation	78				
4.2.2. Einbindung in die aktuelle mechanistische Konzeption	79				
4.3. Methodische Reflexionen	81				
4.3.1. Experimentelle Aspekte	81				
4.3.2. Studienlimitationen					
4.4. Funktionelle HDL-Heterogenität hinsichtlich der Vasorelaxation 85					
4.5. Ausblick im klinischen Kontext 85					
4.5.1. Dysfunktionalitätshypothese mit Schwerpunkt auf Vasomotorik 85					
4.5.2. HDL als therapeutischer Angriffspunkt 8'					
4.6. Gesamtbewertung – Integrative Funktion der pleiotropen HDL-Effekte 91					
5. Literaturverzeichnis 92					
Eidesstattliche Versicherung					
Lebenslauf					
Publikationsliste					
Anteilserklärung					
Danksagung					

# Abkürzungsverzeichnis

Zur besseren Lesbarkeit sind nichtstandardsprachliche Abkürzungen jeweils am Anfang eines Gedankenabschnittes ausgeschrieben, sofern sich die Bedeutung nicht aus dem Text ergibt.

ABCA 1	ATP-binding cassette transporter A 1
Аро	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
BVAD	Biventricular Assist Device
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CREB	cAMP response element-binding protein
DAG	Diacylglycerin
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FVD	Flussvermittelte Dilatation
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High Density Lipoprotein
ICD	Implantable Cardioverter Defibrillator
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
КНК	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LVAD	Left Ventricular Assist Device
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase / myosin light chain kinase
MLCP	$Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase \ / \ myosin \ light \ chain \ phosphatase$
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
oxLDL	Oxidiertes LDL
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PKA	Proteinkinase A

PKG	Proteinkinase G
RCT	Reverser Cholesterintransport
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SR BI	Scavenger Receptor B I
SEM	Standard Error of the Mean
TMB	Tetramethylbenzidin
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Zur Verbesserung des Textflusses finden personenbezogene Substantive in grammatikalisch männlicher Form Verwendung. Selbstverständlich sind hiermit immer auch Patientinnen, Kolleginnen etc. gemeint.

#### Abstrakt (Deutsch)

Hintergrund: Epidemiologische Studien haben eine niedrige Plasmakonzentration des High Density Lipoprotein (HDL) mehrfach als unabhängigen Risikofaktor für arteriosklerotisch bedingte Krankheiten bestätigt. Eine medikamentöse HDL-Anhebung hat bisher jedoch nicht zu einer Mortalitätsreduktion geführt. Ein Erklärungsansatz liegt in der funktionellen Komplexität der HDL-Partikel. Die antiatherogenen Eigenschaften des HDL werden klassischerweise dem reversen Cholesterintransport zugeschrieben. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass HDL eine Vielzahl pleiotroper vasoprotektiver Effekte vermittelt. Hierzu zählt insbesondere eine HDLinduzierte Vasorelaxation, die der endothelialen Dysfunktion als arteriosklerotischer Primärläsion entgegenwirkt. In der Regulation des Gefäßtonus kommt den vaskulären Adrenorezeptoren des sympathischen Nervensystems eine fundamentale Rolle zu. Ein Zusammenhang zur HDL-induzierten Vasorelaxation wurde jedoch bisher nicht untersucht.

**Methoden**: Anhand von flussabhängigen isometrischen Tonusmessungen, glattmuskulären Potenzialableitungen und Bestimmung der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP in explantierten menschlichen Koronararterien (n=22 Transplantationspatienten) untersuchten wir eine Interaktion zwischen Adrenorezeptoren und der HDL-induzierten Vasorelaxation. Wir applizierten gepooltes HDL gesunder Probanden in einer Konzentration von 50 mg/dL.

**Ergebnisse**: Die HDL-Einwirkung resultierte in einer für alle Flussraten (3–100 mL/min) signifikanten Vasorelaxation gegenüber der Kontrolle. Dies ging mit einer glattmuskulären Hyperpolarisation und Erhöhung der cAMP- und cGMP-Spiegel einher. Der maximale relaxierende bzw. hyperpolarisierende HDL-Effekt fand sich bei der höchsten Flussrate. HDL verbesserte die flussvermittelte Tonusminderung bzw. Hyperpolarisation um mehr als 30 %. Zudem zeigte sich unter HDL ein Zusammenhang zwischen Nukleotidkonzentration und Gefäßtonus im Sinne einer chemomechanischen Kopplung.

Die Blockade der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenorezeptoren mit Phentolamin und Propranolol führte zu einer flussabhängigen Reduktion der HDL-induzierten Vasorelaxation. Bei der höchsten Flussrate waren über zwei Drittel des relaxierenden HDL-Effektes aufgehoben. Quantitativ stand für diese Aufhebung die  $\alpha$ -Blockade im Vordergrund.

Interessanterweise setzte sich der Effekt der simultanen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade nicht aus den Effekten der Einzelblockaden zusammen. So konnte eine alleinige  $\alpha$ -Blockade die HDLinduzierte Relaxation bei hohen Flussraten sogar in eine Konstriktion umwandeln, was mit einer

7

starken Erniedrigung der cAMP- und cGMP-Spiegel einherging. Aufgrund dieser nicht-additiven Dynamik führten wir eine deskriptive Wichtungsrechnung durch. Nach diesem qualitativen Modell ist die Interaktion zwischen  $\beta$ -Rezeptoren und HDL bei niedrigen Flussraten am stärksten ausgeprägt, während die Interaktion zwischen HDL und  $\alpha$ -Rezeptoren bei hohen Flussraten am stärksten zum Tragen kommt.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Arbeit liefert erstmals Evidenz für eine Interaktion zwischen HDL-Partikeln und vaskulären Adrenorezeptoren. Wir folgern, dass ein Teil der HDLinduzierten Vasorelaxation auf einer flussabhängigen Inaktivierung vasokonstriktorischer  $\alpha$ -vermittelter Signalkaskaden bzw. Aktivierung relaxierender  $\beta$ -vermittelter Signalkaskaden beruht. Dies ergänzt die mechanistische Konzeption der HDL-induzierten Vasorelaxation um eine neue Wirkungshypothese und erfordert im Lichte neuer HDL-basierter Therapieoptionen dringend weitere Untersuchungen.

# Abstract (English)

**Background:** Epidemiological studies have repeatedly confirmed low plasma levels of High Density Lipoprotein (HDL) as an independent risk factor for arteriosclerotic diseases. However, drug-induced HDL elevation has not yet culminated in reduced clinical mortality. This may be explained by the functional complexity of HDL particles, whose antiatherogenic properties are traditionally attributed to reverse cholesterol transport. In contrast, recent evidence suggests a wide range of pleiotropic HDL effects in vascular protection. This includes HDL-induced vasorelaxation, which counteracts endothelial dysfunction as the primary lesion of arteriosclerosis. While sympathetic adrenergic receptors play a fundamental role in the determination of vascular tone, a link to HDL-induced vasorelaxation has not yet been investigated.

**Methods:** Flow-dependent isometric tension, smooth muscle membrane potential and cAMP/cGMP levels were measured in coronary artery segments from 22 patients undergoing heart transplantation. HDL from healthy donors was pooled and applied at a concentration of 50 mg/dL.

**Results:** Exposure to HDL resulted in a significant vasorelaxation at all flow rates (3-100 mL/min), paralleled by smooth muscle hyperpolarization and cAMP/cGMP elevation. The relaxing and hyperpolarizing effect of HDL was greatest at the highest flow rate, leading to an increment of more than 30 % for both flow-mediated relaxation and flow-mediated hyperpolarization, respectively. Furthermore, cyclic nucleotide concentrations and vascular tone were chemo-mechanically coupled under the influence of HDL.

Blockade of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors through phentolamine and propranolol led to a flowdependent reduction of HDL-induced vasorelaxation. At the highest flow rate more than two thirds of the relaxing effect was abolished. In quantitative analysis, this was mainly due to  $\alpha$ blockade. Interestingly, the effect of simultaneous  $\alpha$ - and  $\beta$ -blockade was not comprised of the effects of individual  $\alpha$ - and  $\beta$ -blockade. Indeed, sole  $\alpha$ -blockade resulted in a reversal of HDLinduced relaxation into vasoconstriction at higher flow rates with substantial decrease of cAMP and cGMP levels. This non-additive dynamic prompted us to conduct a descriptive weighting analysis, according to which interaction of HDL with  $\beta$ -receptors is strongest at low flow whereas HDL interaction with  $\alpha$ -receptors is most pronounced at high flow.

**Conclusion**: For the first time, this study provides evidence for an interaction of HDL particles with vascular adrenergic receptors. We conclude that HDL-induced vasorelaxation is in part based on flow-dependent inactivation of vasoconstrictive  $\alpha$ -mediated signal transduction and activation of relaxing  $\beta$ -mediated cascades. This adds a novel hypothesis to the mechanistic conception of HDL-induced vasorelaxation and necessitates further studies in the light of new HDL-based therapies.

# 1. Einleitung

# **1.1.** Zur Epidemiologie des High Density Lipoprotein (HDL)

Kürzlich veröffentlichte Mortalitätsangaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für 2012 zeigen auf, dass arteriosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen weiterhin die weltweit häufigsten Todesursachen darstellen.<sup>1</sup> Zudem lässt die aktuelle Datenanalyse erkennen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen 2008 für 17,3 Millionen beziehungsweise 30% der weltweiten Todesfälle verantwortlich waren, wovon 7,3 Millionen allein auf die koronare Herzkrankheit (KHK) sowie 6,2 Millionen auf cerebrale Perfusionsstörungen entfielen.<sup>2</sup> Darüber hinaus werden nach WHO-Schätzungen bis zum Jahre 2030 etwa 23,6 Millionen Menschen jährlich an den Folgen kardiovaskulärer Krankheiten sterben.<sup>2</sup>

Auch in der Europäischen Union erliegen aktuell jedes Jahr etwa 2 Millionen Menschen den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen, die mit 40% auch hier den größten Teil aller Todesursachen ausmachen.<sup>3</sup> In Deutschland waren 2012 fünf der zehn häufigsten Todesursachen dem kardiovaskulären Bereich zuzuordnen, wobei die KHK (8,2% aller Todesfälle), der akute Myokardinfarkt (6,0%) sowie die Herzinsuffizienz (5,3%) die drei häufigsten Todesursachen bildeten.<sup>4</sup>

Des Weiteren zeigten Murray et al. 2013, dass die arteriosklerotisch bedingten Erkrankungen – allen voran die KHK – auch im Hinblick auf die individuelle Morbidität der Patienten im Sinne einer eingeschränkten Lebensqualität führend sind.<sup>5</sup> Dieser hohen Sterblichkeit und schwerwiegenden Morbidität stehen ferner auch gesellschaftliche Folgen gegenüber. So belaufen sich die kardiovaskulär verursachten Gesamtkosten in der E.U. derzeit auf 196 Milliarden Euro jährlich.<sup>3</sup>

Nicht zuletzt in dieser herausragenden epidemiologischen Bedeutung begründen sich die intensiven wissenschaftlichen Bemühungen um ein besseres Verständnis der Pathophysiologie arteriosklerotisch bedingter Krankheiten. In diesem Zusammenhang ist die Forschung zum High Density Lipoprotein (HDL) eines der wichtigsten Felder. Die epidemiologische Rolle des HDL als protektiver Faktor für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen findet heute breite Anerkennung.<sup>6</sup> Obgleich Barr et al. bereits 1951 erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen HDL und der KHK lieferten, gelang es erst Miller und Miller 1975 die breite wissenschaftliche Aufmerksamkeit zu erregen, indem sie erniedrigte HDL-Konzentrationen in Patienten mit KHK nachwiesen und eine Inzidenzkorrelation vorlegten.<sup>6,7</sup> In einer Reihe prospektiver Untersuchungen wie der Framingham Heart Study festigte sich dann die Bedeutung

10

eines niedrigen HDL-Spiegels als Prädiktor für die KHK.<sup>8</sup> Die inverse Korrelation von HDL-Konzentration und Inzidenz arteriosklerotischer Erkrankungen besteht hierbei unabhängig von den Konzentrationen der anderen Lipoproteine und weiterer Risikofaktoren, sodass eine niedrige gilt.<sup>6</sup> HDL-Konzentration als eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor Für präventivtherapeutische Zwecke steht insbesondere das Verhältnis der LDL- zur HDL-Konzentration oder besser der Apolipoprotein-B- zur Apolipoprotein-A-Konzentration im Vordergrund, wobei sich vor allem letztere in praxi noch nicht flächendeckend durchgesetzt hat.<sup>9,10</sup> Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass die HDL-Konzentration nicht nur die Inzidenz stenosierender Gefäßerkrankungen positiv beeinflusst, sondern auch deren Folgeschäden attenuiert. So arbeiteten Miller et al. in Langzeituntersuchungen heraus, dass KHK-Patienten mit hohen HDL-Konzentrationen eine geringere Rate an Myokardinfarkten und eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen.<sup>11</sup> In der Tat demonstrierten Gordon et al. in einer Metaanalyse von zwei populationsbasierten Untersuchungen (Framingham Heart Study und Lipid Research Clinics Prevalence Mortality Follow-up Study) sowie zwei randomisierten klinischen Studien (Coronary Primary Prevention Trial und Multiple Risk Factor Intervention Trial), dass eine Erhöhung des zirkulierenden HDL von 1 mg/dL mit einer 2- bis 3-prozentigen Reduktion der KHK-Inzidenz und einer bis zu 4,7-prozentigen Verminderung der kardiovaskulären Mortalitätsrate assoziiert ist.<sup>12</sup> Eine aktuelle Metaanalyse acht großer randomisierter Studien von Boekholdt et al. lässt zudem erkennen, dass HDL und insbesondere das Apolipoprotein A I auch bei guter LDL-Senkung noch mit einer deutlichen Reduktion von Herzinfarktraten, cerebralen Ischämien und der kardiovaskulären Sterblichkeit einhergeht.<sup>13</sup>

Gleichwohl muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass sich diese positiven epidemiologischen Zusammenhänge für HDL bisher noch nicht in einer veritablen therapeutischen Option für den kardiovaskulären Patienten niedergeschlagen haben (vgl. Abs. 4.5.2). Zum anderen wecken neue genetische Studien mittels der Mendel'schen Randomisierung Zweifel daran, dass sich eine hohe Plasma-HDL-Konzentration generell und kausal in ein vermindertes Arteriosklerose-Risiko übersetzen lässt. Im Gegenteil zeigen aktuelle Untersuchungen der Gruppen um Voight bzw. Haase an genetischen HDL-Polymorphismen, dass der HDL-Metabolismus zu komplex ist, um von einer reinen Erhöhung der HDL-Menge auf einen allgemeinen Schutz vor Arteriosklerose zu schließen.<sup>14,15</sup>

Die physiologische Aufklärung der HDL-vermittelteten Vasoprotektion bildet daher die Grundlage für ein besseres Verständnis arteriosklerotisch verursachter Erkrankungen und die Optimierung therapeutischer Strategien. Aus mechanistischer Sicht wurden die antiatherogenen Eigenschaften des HDL primär dem Cholesterin-Rücktransport zugeschrieben (vgl. Abs. 1.5.1). Allerdings zeigen neuere Erkenntnisse, dass dieser von einer Vielzahl pleiotroper vasoprotektiver Effekte ergänzt wird, zu denen auch eine HDL-induzierte Gefäßrelaxation gehört (s. Abs. 1.6). Letztere steht im Fokus dieser experimentellen Arbeit.

# 1.2. Lipoproteine

Aufgrund ihrer überwiegend hydrophoben Lösungseigenschaften werden mit Ausnahme der wenigen nichtveresterten Fettsäuren alle Lipide im Blut in Bindung an amphiphile, lösungsvermittelnde Lipoprotein-Partikel transportiert.<sup>16</sup>

Diese unterscheiden sich strukturell nach Form, Durchmesser und Zusammensetzung und werden klassischerweise anhand ihrer Dichte in die fünf Hauptgruppen Chylomikronen, Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Intermediate Density Lipoprotein (IDL), Low Density Lipoprotein (LDL) sowie High Density Lipoprotein (HDL) eingeteilt.<sup>17</sup> Die in den Partikeln enthaltenen einzelnen Proteine werden als Apolipoproteine bezeichnet. Ihr Vorkommen variiert zwischen den Lipoproteinklassen. Die Apolipoproteine der Gruppen A, C, D und E sind dabei das Subjekt von verschiedenen Austauschprozessen, während die Apolipoproteine B<sub>48</sub> und B<sub>100</sub> nicht austauschbar sind.<sup>16</sup> Neben den fünf klassischen Lipoproteinen findet sich noch das Lipoprotein Lp(a), welches strukturell dem LDL ähnelt, jedoch ein zusätzliches Apolipoprotein Apo(a) aufweist, dessen genaue Funktion noch unzureichend geklärt ist.<sup>17,18</sup> Ein positiver epidemiologischer Zusammenhang zur Arteriosklerose-Inzidenz ist hingegen gut belegt, wobei oxidierte Phospholipide für den insgesamt noch wenig erforschten Pathomechanismus von Lp(a) eine Rolle zu spielen scheinen.<sup>18</sup>

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, stellt HDL die Partikelfraktion mit der höchsten Dichte, dem größten Proteinanteil und dem kleinsten Partikeldurchmesser dar. Im folgenden Abschnitt soll jedoch näher behandelt werden, wie heterogen und komplex zusammengesetzt sich die HDL-Partikel neueren Erkenntnissen zufolge tatsächlich darstellen.

Partikel	Dichte [g/mL]	Durchmesser [nm]	Elektrophorese	Wichtiges Apolipoprotein	Verhältnis Lipid/Protein	Hauptlipid
Chylomikronen	0,93	75-1200	statisch	Apo B 48	99:1	Triglyceride
VLDL	0,93 - 1,006	30-80	prä-β	Apo B 100	90:10	Triglyceride
IDL	1,006 - 1,019	25-35	prä-β	Apo B 100	85:15	Cholesterin
LDL	1,019 - 1,063	18-25	β	Apo B 100	80:20	Cholesterin
Lp(a)	1,050 - 1,120	25	prä-β	Apo B 100 Apo(a)	71:29	Cholesterin
HDL	1,063 - 1,210	5-12	α	Apo A I	50:50	Phospholipide

**Tabelle 1**. Charakteristika der Lipoproteinfraktionen. Basierend auf "Harrison's Principles of Internal Medicine" (McGraw-Hill) sowie "Labormedizin" (Schattauer).<sup>17,19</sup>

#### 1.3. Zusammensetzung und strukturelle Heterogenität der HDL-Partikel

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre machen deutlich, dass es sich bei den HDL-Partikeln nicht um eine biochemisch einheitliche Entität handelt. Vielmehr bildet HDL eine Partikelfamilie, die sich nach Größe, Dichte, Ladung und Zusammensetzung in verschiedene komplexe Subgruppen untergliedert. Neben der strukturellen Heterogenität selbst besteht ein Problem hinsichtlich der biochemischen Beschreibung auch in der Klassifikationsmethodik. Hierfür kommen vielfältige Extraktions- und Messverfahren zum Einsatz, deren Einteilungen und Terminologien nicht konsistent aufeinander übertragbar sind: Zu diesen Klassifikationsmethoden zählen neben Ultrazentrifugation und Gel-Elektrophorese auch die Immunoaffinitätsverfahren Elektronenmikroskopie, sowie Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie.<sup>20</sup>

Auf Basis der Partikelgröße lassen sich in menschlichem Plasma fünf Subpopulationen per Gel-Elektrophorese unterscheiden:  $HDL_{2B}$  ( $\emptyset$  10,6 nm),  $HDL_{2A}$  (9,2 nm),  $HDL_{3A}$  (8,4 nm),  $HDL_{3B}$  (8,0 nm) sowie  $HDL_{3C}$  (7,6 nm).<sup>21</sup>

Demgegenüber können durch sequenzielle Ultrazentrifugation, die auch unserer HDL-Akquise zugrunde liegt, die zwei Hauptdichtefraktionen HDL<sub>2</sub> mit 1,063 > d > 1,125 g/mL sowie HDL<sub>3</sub> mit 1,125 > d > 1,21 g/mL isoliert werden.<sup>21</sup>

Des Weiteren lassen sich die HDL-Partikel nach ihrer Form (diskoidal vs. sphärisch, vgl. Abs. 1.5.1, Reverser Cholesterintransport) oder der Zusammensetzung der Apolipoproteine unterteilen (beispielsweise Apo-A-I-haltig und/oder Apo-A-II-haltig).<sup>20,22</sup>

Der Großteil der HDL-Partikel beinhaltet einen apolaren Kern mit Cholesterinestern und Triacylglyceriden, der von einer Schicht aus Phospholipiden, unverestertem Cholesterin und Proteinkomponenten umgeben wird.<sup>22</sup> Abbildung 1 zeigt diesen Partikelaufbau in schematischer Form. Proteine machen dabei etwa die Hälfte der Partikelmasse aus, während auf die Phospholipide circa ein Viertel der Masse entfällt.<sup>22</sup> Je höher der Proteinanteil eines Partikels, desto größer stellt sich auch die Partikeldichte dar.



Abbildung 1. Schema zur Partikelstruktur von HDL. Dargestellt sind die Phospholipidschicht mit unverestertem Cholesterin und Proteinen sowie der apolare Partikelkern. Erstellt durch den Autor.

Mit Fortschritten in den Bereichen HDL-proteomics und –lipidomics sind inzwischen über 80 verschiedene Proteine und Peptide sowie mehr als 200 Lipide als Bestandteil von HDL-Partikeln beschrieben.<sup>20</sup> Die quantitativ wichtigste Proteinkomponente der HDL-Partikel bildet das Apolipoprotein A I (Apo A-I), welches mit zwei bis fünf Molekülen im Großteil aller HDL-

Partikel vorhanden ist und insgesamt etwa 70 % der HDL-gebundenen Proteine ausmacht.<sup>20,22</sup> Apolipoprotein A II (Apo A-II) ist mit 15-20 % der durchschnittlich zweithäufigste Proteinanteil im HDL, wobei aber mindestens ein Viertel aller Partikel kein Apo A-II enthält.<sup>22</sup> Darüber hinaus existieren HDL-Partikel, die vor allem Apolipoprotein A IV oder Apolipoprotein E (auch als HDL<sub>1</sub> bezeichnet) aufweisen.<sup>16,22</sup> Während Apo A-I und Apo A-II unter anderem eine wichtige Rolle in der Partikelstruktur zugeschrieben wird, teilen sich die restlichen 10% des Proteinanteils in eine funktionell äußerst heterogene Gruppe auf: Neben weiteren Apolipoproteinen wie Apo C I-IV, D, E, F, H, J oder M, deren Funktionen zum Teil noch unvollständig verstanden sind, finden sich hier metabolisch bedeutsame Enzyme wie die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) oder das Cholesterinester-Transferprotein (CETP, vgl. Abs. 1.5.), aber auch eine Reihe oxidationswirksamer Enzyme wie die Glutathionperoxidase, die Myeloperoxidase oder die Paraoxonasen 1 und 3, denen nach heutigem Verständnis eine protektive Rolle in der LDL-Oxidation zukommt.<sup>20</sup> Im Falle der LCAT und des CETP tragen diese auch selbst zur Diversifizierung der HDL-Partikel bei.<sup>21</sup> Weitere HDL-gebundene Proteine beinhalten unter anderem das Serumamyloid A, Fibrinogen und die Komplementfaktoren C3 und C4, was bereits die funktionelle Komplexität der HDL-Partikel erahnen lässt.<sup>20</sup>

Mit Bezug auf die Lipidbestandteile finden sich in HDL neben Triglyceriden und Cholesterin auch Gallensäuren, Steroidhormone und Vitaminderivate wie Retinoide.<sup>20</sup> Hervorgehoben seien auch die Phospholipide wie Phosphatidylcholin (entspricht Lecithin) und hier Phosphatidylinositol sowie die Sphingolipide wie Sphingosin-1-Phosphat, da diese für einige HDL-Funktionen relevant zu sein scheinen und Phospholipide zudem den Großteil der HDL-Lipide bilden (vgl. Abs. 1.6.5, Evidenz experimenteller Studien).<sup>20</sup> Eine besonders interessante neue Erkenntnis besteht ferner darin, dass auch Mikro-RNA in HDL-Partikeln zu finden ist; erste Studien weisen darauf hin, dass diese durch HDL von einer Sender- zur Empfängerzelle transportiert werden, wo sie eine interzelluläre Genregulation bewirken könnten.<sup>20,23,24</sup>

# 1.4. Funktionelle Heterogenität der HDL-Partikel

Im Hinblick auf die strukturelle HDL-Heterogenität stellt sich die Frage, ob sich die verschiedenen Subpopulationen auch funktionell unterscheiden. Vorangestellt sei die Beobachtung, dass viele der selteneren Proteine nicht gleichmäßig auf die verschiedenen

Partikelpopulationen verteilt sind, sondern im Gegenteil in Clustern auftreten. So sind die Paraoxonasen 1 und 3, die selteneren Apolipoproteine J und L1 oder auch die LCAT insbesondere in den kleinen und dichten Partikeln der  $HDL_{3C}$ -Population zu finden, während die Apolipoproteine E und C I-III in den größeren Partikeln der  $HDL_{2}$ -Fraktion anzutreffen sind.<sup>25</sup>

Ähnliches gilt auch für die Verteilung der Lipide. So ist beispielsweise das bioaktive Sphingosin-1-Phosphat insbesondere in den Partikeln der HDL<sub>3</sub>-Population lokalisiert.<sup>25</sup> Eine funktionelle Spezifität der Subpopulationen scheint aufgrund dieser Cluster derzeit durchaus plausibel, allerdings sind die klinischen Untersuchungen in diesem Zusammenhang bisher nicht eindeutig. Eine Assoziation zwischen größeren HDL-Partikeln und kardiovaskulärem Risiko wurde mehrfach gezeigt; allerdings sind die kausalen Zusammenhänge dieser Beobachtung unklar.<sup>25</sup> Wie kürzlich von Camont et al. zusammengetragen, haben mehrere große Studien in widersprüchlicher Weise entweder der HDL<sub>2</sub>- oder der HDL<sub>3</sub>-Fraktion die relevante kardiovaskuläre Schutzfunktion zugeschrieben.<sup>25</sup> Williams und Kollegen wiesen demgegenüber in einer prospektiven Studie von 2011 nach, dass niedrige HDL<sub>2</sub>- wie auch HDL<sub>3</sub>-Populationen beide das KHK-Risiko in über 1900 Männern voraussagten, wenngleich die Risikosenkung pro mg/dL für HDL<sub>2</sub> höher war.<sup>26</sup>

Amouyel et al. kamen ferner anhand einer kardiovaskulären Risikokohorte zu dem Ergebnis, dass vor allem Apo-A-I-Partikel, nicht aber Apo-A-I/Apo-A-II-Partikel eine kardiovaskuläre Schutzwirkung vermitteln.<sup>27</sup> So wird derzeit diskutiert, ob in erster Linie der Apo-A-I-Gehalt für den Schutzeffekt entscheidend ist, was sich in größeren klinischen Untersuchungen aber nicht ließ.<sup>25,28</sup> reproduzieren Bezüglich der uneingeschränkt biologischen Rolle als Cholesterinakzeptor scheinen jedoch in der Tat insbesondere Apo A-I und Apolipoproteine mit strukturähnlichen Helixdomänen entscheidend zu sein (z.B. Apo A-II, Apo E).<sup>28</sup> Im Hinblick auf die HDL-induzierte Vasorelaxation besteht ebenfalls Evidenz für eine funktionelle Heterogenität, worauf an entsprechender Stelle eingegangen wird (vgl. Abs. 4.4). Insgesamt steht ein umfassendes Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehung für HDL noch aus.

# **1.5.** Gefäßprotektion durch HDL

#### **1.5.1.** Reverser Cholesterintransport

Cholesterol ist ein wesentlicher Bestandteil tierischer Zellmembranen und dient unter anderem der Biosynthese von Gallensäuren und Steroidhormonen, kann in kritischer Menge jedoch zelltoxische Effekte verursachen.<sup>29</sup> Die Ringstruktur des Cholesterins kann zellulär nicht aufgebrochen und daher auch nicht zu Wasser und CO<sub>2</sub> verstoffwechselt werden, woraus sich die wichtige Rolle des reversen Cholesterintransportes (RCT) für die Cholesterinhomöostase in Säugetieren ergibt.<sup>29</sup> Überschüssiges Cholesterin kann so von der Peripherie zur Leber transportiert werden, um dort zur biliären Exkretion zu gelangen.<sup>29</sup>

HDL bewerkstelligt dabei in einem komplexen metabolischen Prozess die Aufnahme von Cholesterin aus extrahepatischem Gewebe, wobei sich die oben beschriebenen Subpopulationen teilweise im Verlauf der Biosynthese ergeben: Leber- und Dünndarmzellen sezernieren lipidarme Apo-A-I-Vorläuferpartikel, die auch als prä- $\beta$ -HDL bezeichnet werden und als Akzeptoren für nichtverestertes Cholesterin und Phospholipide fungieren.<sup>30</sup> Diese werden von peripheren Zellen vor allem über ATP-binding cassette transporter A 1 (ABCA 1) auf die naszierenden HDL-Partikel übertragen, die daraufhin zu diskoidal geformten Apo-A-I-haltigen HDL-Partikeln werden.<sup>30</sup>

Mithilfe des Apo A-I kann das von der Leber sezernierte Plasma-Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) gebunden werden, welches die Bildung von Cholesterinestern aus Cholesterin katalysiert.<sup>30</sup> Diese Cholesterinester migrieren in den apolaren Partikelkern, sodass auf der HDL-Oberfläche ein Gradient für die weitere Einlagerung von Cholesterin entsteht.<sup>16</sup> Durch diesen Umlagerungsschritt der Cholesterinester nach innen werden aus den diskoidalen nun die sphärischen, auch als "reif" bezeichneten Partikel der HDL<sub>3</sub>-Population.<sup>29</sup> Die LCAT sorgt durch weitergehende Einlagerung von Cholesterinestern für eine Größenzunahme des Partikelkerns, wodurch die Subpopulation der elektrophoretisch größeren HDL<sub>2</sub>-Partikel entsteht.<sup>29</sup> Hierzu steuert auch die Übertragung von VLDL-Phospholipiden auf HDL durch das Phospholipid-Transferprotein (PLTP) bei; zudem werden auch Apolipoproteine C und E auf HDL<sub>2</sub>-Partikel übertragen.<sup>16</sup>

Die Rückaufnahme des Cholesterins aus HDL-Partikeln in die Leber erfolgt über verschiedene Wege: Über den Scavenger Receptor B I (SR BI) der Hepatozyten werden Cholesterin, Cholesterinester und Phospholipide des zirkulierenden HDL nach intrazellulär aufgenommen und unter Wiederfreisetzung von prä-β-HDL-Partikeln der weiteren hepatischen Verstoffwechselung zugeführt.<sup>31,32</sup> Andererseits überträgt das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) HDL-gebundene Cholesterinester auf Apolipoprotein-B-haltige Partikel; diese werden dann über den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen, sodass HDL-Cholesterin auch auf indirektem Wege zur hepatischen Aufnahme gelangen kann.<sup>32</sup>

Das CETP ist ein hepatisch synthetisiertes Protein, das im Blut hauptsächlich an HDL gebunden zirkuliert.<sup>33</sup> Die erwähnte Übertragung von HDL-Cholesterinestern auf Apolipoprotein-B-haltige Partikel wie LDL und VLDL erfolgt im Austausch gegen Triacylglyceride; da LDL und VLDL das Cholesterin in erster Linie wieder in die Peripherie transportieren, wird diese Funktion auch als proatherogene CETP-Aktivität gewertet und bildet eine Rationale für Therapieversuche mit CETP-Inhibitoren (vgl. Abs. 4.5.2, HDL als therapeutischer Angriffspunkt).<sup>16,34</sup> Darüber hinaus fördert der Cholesterintransfer durch CETP die Dissoziation von Apo A-I und HDL, was als weiterer proatherogener Mechanismus angesehen wird.<sup>34</sup> Die CETP-Aktivität resultiert gleichzeitig in einer Beladung der HDL<sub>2</sub>-Partikel mit Triacylglyceriden; diese werden dann in den Leberkapillaren durch die hepatische Lipase hydrolysiert, was zu einer Wiederfreisetzung von kleineren HDL<sub>3</sub>-Partikeln oder diskoidalem HDL führt.<sup>16</sup> Ferner ist eine direkte hepatische Aufnahme von HDL<sub>2</sub> über Apo-E-Rezeptoren beschrieben, wobei HDL auch zum endozytotischen Recycling von Apo E beiträgt.<sup>16,35</sup> Zudem kann Apo A-I über eine ATP-ase auf der Zelloberfläche die Endozytose von HDL-Partikeln in Hepatozyten vermitteln.<sup>20</sup>

# 1.5.2. HDL und Arteriosklerose

Pathophysiologisch betrachtet liegt dem Großteil der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität ein arteriosklerotischer Prozess zugrunde.<sup>36</sup> Die Arteriosklerose ist gekennzeichnet durch ein komplexes, multifaktoriell bedingtes Zusammenspiel pathogenetischer Faktoren, zu denen die Aufhebung der physiologischen Gefäßreaktionen, chronische Inflammation, strukurelle Umbauprozessen und in letzter Konsequenz der Verlust der vital notwendigen Transportfunktion des Gefäßes gehören.

Das Initialereignis in der Pathogenese der Arteriosklerose besteht nach heutigem Verständnis in der endothelialen Dysfunktion.<sup>10</sup> Diese ist durch eine Dysbalance in der Regulation vasorelaxierender und –konstriktorischer Gefäßreaktionen gekennzeichnet, beinhaltet aber auch einen proinflammatorischen und prothrombotischen Zustand sowie eine reduzierte

Barrierefunktion.<sup>37,38</sup> Letzteres führt zu einer zunächst extrazellulären Lipidablagerung, die klinisch als "fatty streaks" sichtbar sein kann.<sup>10</sup> LDL und IDL akkumulieren hierbei dosisabhängig an der Basalmembran und den Matrixproteinen der Intima und luminalen Media.<sup>10</sup>

Eine pathophysiologische Schlüsselrolle kommt der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zu, die in Abs. 1.6.2 (Molekulare Mechanismen des vaskulären Tonus) genauer besprochen ist. Während die eNOS unter endothelialer Homöostase vor allem NO produziert, setzt sie bei Aktivierung des Endothels vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei, was auch als eNOS-Entkopplung bezeichnet wird.<sup>37</sup> ROS führen bei Übersteigen der antioxidativen Kapazität des Endothels zur Oxidation der eingelagerten LDL-Partikel.<sup>39</sup> Für dieses oxLDL finden sich spezielle Rezeptoren (LOX-1-Rezeptor) auf Endothelzellen, Makrophagen und im glatten Gefäßmuskel.<sup>40</sup> OxLDL führt unter anderem zu einer vermehrten Expression von endothelialen Zelladhäsionsmolekülen wie dem Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM 1), an welches sich T-Zellen und Monozyten anlagern, die dann unter Zytokineinfluss in das subendotheliale Gewebe migrieren.<sup>39</sup> Unter Einwirkung von Macrophage-Colony-Stimulating Factor (M-CSF) differenzieren sich die Monozyten zu interstitiellen Makrophagen, was von einer Hochregulation ihrer Toll-like-Rezeptoren und Scavenger Rezeptoren begleitet ist.<sup>39</sup> Über letztere werden neben Zellfragmenten auch oxLDL-Partikel internalisiert; sind die Makrophagen im Verlauf mit Cholesterin überladen, ergibt sich aufgrund der zytosolischen Lipidtröpfchen das mikroskopische Bild einer Schaumzelle.<sup>39</sup> Aufgrund der zelltoxischen Wirkung von nichtverestertem Cholesterin fallen die Schaumzellen letztlich der Apoptose anheim, wobei ihre Zellrückstände den Prozess der Plaqueformation weiter unterhalten und zudem zur Instabilität der arteriosklerotischen Plaques beisteuern.<sup>31</sup>

Aktivierte Makrophagen sezernieren zudem neben proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  auch selbst ROS sowie proteolytische Enzyme, die zum Abbau der extrazellulären Matrix und damit zum strukturellen atheromatösen Umbau beitragen.<sup>39</sup> Biochemische Analysen manifester arteriosklerotischer Plaques zeigen, dass diese in erster Linie Lipoproteine, Proteoglykane und Calcium enthalten.<sup>10</sup>

Demgegenüber wird die vasoprotektive Funktion des HDL klassischerweise darin gesehen, dass HDL im Rahmen des RCT das überschüssige Cholesterin aus aktivierten Makrophagen mobilisieren und so die Entstehung von Schaumzellen unterdrücken kann.<sup>20</sup> Diese Cholesterinübertragung auf HDL erfolgt sowohl passiv als auch durch ATP-binding cassette transporter A 1 und G1 (ABCA 1, ABCG 1) sowie SR BI.<sup>20</sup>

Die HDL-Partikel werden hierfür per endothelialer Transzytose in das subendotheliale Gewebe geschleust und fließen nach Cholesterinaufnahme über Lymphgefäße ab.<sup>10,20</sup> In der Tat konnten Khera und Kollegen kürzlich eine inverse Assoziation zwischen subklinischer wie auch manifester Arteriosklerose und der Cholesterinmobilisation aus Makrophagen durch HDL feststellen; der Zusammenhang galt unabhängig vom Gesamt-HDL und der Apo-A-I-Menge.<sup>41</sup> Dies deutet schon an, dass die funktionelle HDL-Kapazität offenbar entscheidender für die Gefäßprotektion ist als die Menge an zirkulierendem HDL. Diese funktionelle Kapazität des HDL beschränkt sich jedoch nicht auf den Cholesterintransport, wie im folgenden Abschnitt näher erläutert.

# 1.5.3. Pleiotrope HDL-Effekte

Die Forschungsergebnisse der vergangen zwei Jahrzehnte lassen erkennen, dass die antiatherogene Wirkung des HDL nicht ausschließlich im reversen Cholesterintransport anzusiedeln ist. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Vielzahl der pleiotropen HDL-Effekte, die synergistisch vasoprotektiv wirken.

Es wird deutlich, dass HDL nicht nur der vaskulären Lipideinlagerung entgegenwirkt, sondern auf nahezu jeder pathogenetischen Stufe der Arteriosklerose positive Effekte vermittelt – vom Risikofaktor (antidiabetisch) bis zur Restitution (postischämische Revaskularisierung). Insbesondere nimmt HDL mit seiner vasorelaxierenden Wirkung auch eine Schutzfunktion gegenüber der endothelialen Dysfunktion als Primärläsion der Arteriosklerose wahr. Die HDLinduzierte Vasorelaxation ist daher ein zentraler Gegenstand in der Aufklärung des HDLvermittelten Gefäßschutzes und Fokus der vorliegenden Arbeit. **Tabelle 2**. Zusammenfassung pleiotroper HDL-Effekte und gegenwärtiger mechanistischer Vorstellungen. Basierend auf Subedi et al. (2014), Rye/Barter (2014), Annema/von Eckardstein (2013), Camont/Chapman/Kontush (2011).<sup>20,25,28,42</sup> Abkürzungen: ABCA1: ATP-binding cassette transporter A 1; DHCR24: 24-Dehydrocholesterol-Reduktase; eNOS: endotheliale NO-Synthase; EPC: endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark; ICAM: Intercellular Cell Adhesion Molecule; PAF-AH: Platelet-activating Factor-Acetylhydrolase; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies; S1P: Sphingosin-1-Phosphat; SR BI: Scavenger Receptor B I; VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule.

Effektart	Wirkung	Mechanismus/Molekulare Korrelate			
Antioxidativ	LDL-Oxidation↓ ROS↓	Übertragung von Phospholipid-Peroxiden auf HDL und Inaktivierung durch Methioninreste von Apo A I Antioxidative Wirkung von Paraoxonase 1, LCAT, PAF-AH			
Antiinflammatorisch	Leukozytenadhäsion↓ Proinflammatorische Zytokine↓	Phosphatidylcholin-abhängig VCAM↓, ICAM↓, E-Selektin↓ DHCR24-Aktiverung			
Antithrombotisch	Profibrinolytisch Hemmung der Plättchenaggregation	Thrombin↓, Thromboxan-A2-Regulation, Prostacyclin↑, Tissue Factor↓ Aktivierung von Protein S und C			
Zytoprotektiv	Verbesserte endotheliale Integrität und Barrierefunktion	Hemmung der oxLDL-induzierten Apoptose (S1P) SR BI-abhängige Migration gesunder Endothelzellen Förderung der endothelialen Reparatur durch EPC Glattmuskuläre Migration↓			
Antiinfektiös	Immunwirkung gegen Bakterien und Parasiten	Trypanosome Lytic Factor Bindung von Lipopolysacchariden (Apo A I)			
Angiogenetisch	Revaskularisierung ischämischer Areale	Kapillarformation (eNOS- und Akt-abhängig)			
Antiproliferativ	Regulation einer systemischen Leukozytose	Unterdrückung der Neutrophilen- und Monozytenproliferation im Knochenmark (Apo A I und Apo E)			
Antidiabetisch	Wirkung auf Blutglucose	SR BI- und ABCA1-vermittelte Insulinproduktion↑ Apoptoserate von β-Zellen↓ Muskuläre Glucose-Aufnahme↑ (Apo A I)			
Vasorelaxierend	siehe folgende Abschnitte				

#### 1.6. HDL-induzierte Vasorelaxation

Im Folgenden sind zunächst einige grundlegende Aspekte für die Herleitung der Hypothese vorgestellt. Darauf folgt ein Überblick über die klinische und experimentelle Evidenz zur HDL-induzierten Vasorelaxation.

# 1.6.1. Flussabhängige Regulation der Gefäßweite

Die Regulation der arteriellen Gefäßweite ist ein entscheidender Faktor zur Konstanthaltung der Durchblutung und Sicherung des Sauerstoffbedarfs der abhängigen Gewebe. Man kann den Gefäßtonus als Summe systemischer und autoregulatorischer Mechanismen auffassen. Zu letzteren gehören zwei gegenläufige Prozesse. Als Bayliss-Effekt bezeichnet man eine myogene Kontraktion als Antwort auf einen Dehnungsreiz, wie etwa einen Blutdruckanstieg.<sup>43</sup> Dieser ist besonders für distale Arterien und Arteriolen relevant und wird nach heutigem Verständnis unabhängig von der sympathischen Innervation durch dehnungssensitive glattmuskuläre Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vermittelt, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führen.<sup>43</sup> Auf der anderen Seite wurde bereits im frühen 20. Jahrhundert beobachtet, dass ein erhöhter Durchfluss durch ein Blutgefäß zu einer flussabhängigen Weitstellung des Gefäßes führen kann.<sup>44</sup> Diese flussabhängige Vasodilatation beruht auf einer autoregulativen endothelialen Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), die direkt von der luminal einwirkenden Scherkraft (shear stress) des Blutes abhängig ist.<sup>44</sup>

Siegel et al. konnten zeigen, dass das viskoelastische Heparansulfat-Proteoglykan (HS-PG) als flussabhängiger mechanoelektrischer Transduktor am Endothel und damit als Biosensor für die Flussrate fungiert. Das Makromolekül in der luminalen Zellmembran der Endothelzelle liegt unter flussarmen Konditionen als Zufallsknäuel vor.<sup>45</sup> Bei Flusserhöhung geht HS-PG in eine entfaltete stretch-Konformation über, wodurch anionische Bindungsstellen für Na<sup>+</sup> freigelegt werden, das damit die Rolle eines first messengers für die flussvermittelte Dilatation einnimmt.<sup>45</sup> Darauf folgt ein Kationeneinstrom, der zu einer endothelialen Depolarisation, einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und über eine Ca<sup>2+</sup>-/Calmodulin-Interaktion zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) führt, was in der flussvermittelten NO-Freisetzung und Vasorelaxation resultiert.<sup>45</sup>

#### 1.6.2. Molekulare Mechanismen des vaskulären Tonus

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) stellt eines von vier Isoenzymen dar, welche die Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin unter Abspaltung von NO katalysieren; hierfür wirken O<sub>2</sub>, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat sowie Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) als Cofaktoren.<sup>46</sup> Daneben wurden neuronale (nNOS), mitochondriale (mNOS) und induzierbare (iNOS) Stickstoffmonoxidsynthasen identifiziert, wobei die durch die Nomenklatur suggerierte Gewebespezifität nicht absolut ist.<sup>47</sup> Die eNOS wird konstitutiv exprimiert und befindet sich unter physiologischen Bedingungen im subzellulären Kompartiment der Plasmamembran-Caveolae.<sup>46,47</sup>

Die Entdeckung, dass Acetylcholin die Ausschüttung einer damals noch als Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF) und später als NO identifizierten Substanz nach sich zieht, geht bereits auf die Arbeiten von Furchgott und Zawadzki von 1980 zurück.<sup>48</sup> Furchgott erhielt für seine Entdeckungen zusammen mit Louis Ignarro und Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin.<sup>47</sup> In vivo verhält sich NO äußerst reaktiv und besitzt aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit von etwa 6 Sekunden insbesondere auto- und parakrine Funktionen: So stimuliert NO im Endothel autokrin die weitere Freisetzung von NO und BH<sub>4</sub>.<sup>47,49</sup> Zudem diffundiert es als Gas über die Zellmembranen hinweg in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand, wo es über die Bindung an eine hämhaltige Gruppe der löslichen Guanylylcyclase eine aktivierende Konformationsänderung des katalytischen Zentrums und damit eine gesteigerte Produktionsrate des zyklischen Guanosin-3<sup>c</sup>-5<sup>c</sup>-monophosphates (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) bewirkt.<sup>37</sup>

Sowohl im Endothel als auch in der glatten Muskelzelle findet sich zudem eine membranständige Adenylylcyclase, welche in analoger Weise Adenosintriphosphat (ATP) in den Botenstoff zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP) umwandelt.<sup>50</sup> Die Adenylylcyclase wird ihrerseits durch eine Reihe von Mediatoren aktiviert, insbesondere auch durch Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>, entspricht Prostacyclin).<sup>44</sup> In menschlichem Endothel werden sowohl die Cyclooxygenase-I (COX-I, konstitutiv) als auch die COX-II (induktiv) exprimiert; beide sind an der Prostacyclin-Produktion beteiligt, wobei unter physiologischen Bedingungen quantitativ wahrscheinlich die COX-I im Vordergrund steht.<sup>51</sup> Interessanterweise findet sich in arteriosklerotischen Plaques eine erhöhte COX-II-Expression, die offenbar mit einer vermehrten Produktion von atherogenen und vasokonstriktorischen Prostaglandinen wie PGE<sub>2</sub> einhergeht.<sup>51</sup> NO und Prostacyclin werden unter Vermittlung der Phospholipase C (PLC) zusammen aus dem Endothel freigesetzt (synergistischer co-release).<sup>44</sup>

Die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP wirken als sekundäre Botenstoffe auf den vaskulären Tonus. Während cGMP insbesondere die Proteinkinase G (PKG) aktiviert, bindet cAMP vorrangig an die Proteinkinase A (PKA), wobei konzentrationsabhängige Kreuzaktivierungen möglich sind.<sup>44,52</sup> PKG und PKA phosphorylieren vielfältige target-Proteine wie die plasmalemmale Ca<sup>2+</sup>-ATPase, sarkolemmale Ca<sup>2+</sup>-Pumpen oder Ca<sup>2+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle, was im glatten Muskel neben einer Hyperpolarisation eine Senkung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bewirkt.<sup>44</sup>

Calciumionen binden im Zytosol der glatten Muskelzellen an das Protein Calmodulin.<sup>50</sup> Dieser Ca<sup>2+</sup>-/Calmodulin-Komplex bewirkt eine Aktivierung der Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK), welche die regulatorisch bedeutsame leichte Kette des Myosinmoleküls phosphoryliert.<sup>44,50</sup> In dieser Form bewirkt die leichte Kette eine Freilegung des Myosinkopfes und ermöglicht die ATP-abhängige Kontraktion.<sup>44</sup> Interessanterweise aktiviert der Ca<sup>2+</sup>-/Calmodulin-Komplex nicht nur die MLCK, sondern auch die eNOS, sodass eine Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Kontraktion durch eine erhöhte NO-Freisetzung wieder ausbalanciert wird.<sup>46</sup> Im Gegenzug vermittelt die Myosin-Light-Chain-Phosphatase (MLCP) die Abspaltung der Phosphatgruppe aus der leichten Myosinkette und sorgt so für ein niedrigeres Kontraktionsniveau.<sup>44</sup> Der glattmuskuläre Netto-Tonus ergibt sich so aus dem Phosphorylierungsgrad des Myosins und daher aus dem relativen Verhältnis von MLCK- und MLCP-Aktivität.<sup>44</sup>

Während cAMP und cGMP die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration senken, erfolgt eine Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung vor allem durch folgende intrazelluläre Signalwege: Nach einem extrazellulären Signal wird über die Phospholipase C das membranständige Phosphatidylinositolbisphosphat gespalten - zum einen zu Diacylglycerin (DAG), welches die Proteinkinase C aktiviert, und zum anderen zu Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>), das Ca<sup>2+</sup> aus dem sarkoplasmatischen Reticulum mobilisiert (vgl. Wirkung der  $\alpha_1$ -Rezeptoren, folgender Abschnitt).<sup>50,53</sup> Calcium kann durch Bindung an den Ryanodinrezeptor auch selbst eine weitere Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum fördern.<sup>53</sup> Andererseits entsteht über eine GTPase der aktive Faktor Rho, der über die Rho-Kinase zu einer Inaktivierung der MLCP führt, sodass sich die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der Filamente erhöht.<sup>53</sup>

Die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität ergibt sich aus dem Aktivierungszustand von MLCK und MLCP und bildet einen weiteren Angriffspunkt der zyklischen Nukleotide. So steigern cGMP und cAMP über PKG bzw. PKA die Aktivität der MLCP, sodass auch höhere Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nicht zwangsläufig zu einem erhöhten Phosphorylierungsgrad des Myosins führen.<sup>53</sup> Zudem vermittelt cAMP eine inhibierende Phosphorylierung der MLCK, was ebenfalls deren Aktivierung durch Ca<sup>2+</sup>-/Calmodulin und damit die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität einschränkt.<sup>44</sup>

Zusammenfassend vermindern cAMP und cGMP im glatten Muskel sowohl die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration als auch die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität und erfüllen daher im vaskulären System eine synergistische vasorelaxierende Funktion. Sie können deshalb als experimentelle biochemische Marker für eine Vasorelaxation angesehen werden und finden zu diesem Zweck in unseren Versuchen Verwendung.

# 1.6.3. Vaskuläre Adrenorezeptoren

Das sympathische Nervensystem stellt eine vegetative Schnittstelle zwischen neuronalen und endokrinen Regulationsmechanismen dar und dient als fundamentales Steuerungssystem des Gefäßtonus.

Auf den Vasotonus wirkt der Sympathikus über Noradrenalin als Neurotransmitter und humorales Adrenalin aus dem Nebennierenmark.<sup>54</sup> Beide fungieren als Agonisten an den zellulären Adrenorezeptoren, allerdings mit subtypabhängiger Affinität.<sup>54</sup> Bei den adrenergen Rezeptoren handelt es sich um membranständige, G-Protein-gekoppelte, heptahelikale Proteine, die durch Ahlquist nach pharmakologischen Gesichtspunkten bereits 1948 in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren unterschieden wurden.<sup>54,55</sup> Aktuell sind neun Rezeptorsubtypen sicher bekannt:  $\alpha_1$  mit Subtypen  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  und (aus historischen Gründen)  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_2$  mit den Subtypen A-C sowie  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptoren.<sup>54,56</sup> Während Adrenalin und Noradrenalin  $\alpha_1$ - und  $\beta_3$ -Rezeptoren etwa gleich stark ansprechen, ist die Affinität der  $\beta_1$ -Rezeptoren zu Noradrenalin höher.<sup>57</sup> Umgekehrt wirkt Adrenalin stärker auf  $\alpha_2$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren.<sup>57</sup>

Mikroanatomisch lassen sich adrenerge Rezeptoren sowohl auf dem Endothel als auch auf den glatten Muskelzellen nachweisen, wobei nach gegenwärtigem Verständnis auf dem Endothel  $\alpha_2$ sowie  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptoren vorherrschen, während sich auf den glatten Muskelzellen insbesondere  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Rezeptoren befinden.<sup>58</sup> Allerdings ist die Subtypenverteilung der Adrenorezeptoren nicht konserviert, sondern spiegelt nur eine präferenzielle Verteilung wider und scheint insbesondere unter pathologischen Bedingungen wie arteriosklerotischem Befall variabel zu sein.<sup>58,59</sup> Des Weiteren finden sich Adrenorezeptoren auch an den postganglionären

Varikositäten des Sympathikus. Diese bilden knospenartige synaptische Auftreibungen an der Grenze zwischen Media und Adventitia und tragen Noradrenalin-Speichervesikel, deren Ausschüttung durch  $\alpha_2$ - und  $\beta_2$ -vermittelte Feedback-Signale gesteuert wird.<sup>57</sup>

 $\alpha_1$ -Rezeptoren sind an ein G<sub>q</sub>-Protein gekoppelt, welches die Phospholipase C aktiviert; diese katalysiert die Bildung von IP<sub>3</sub>, das plasmalemmale und sarkolemmale Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aktiviert und über Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in einer Vasokonstriktion resultiert.<sup>57</sup> Zudem entsteht DAG, welches über die Proteinkinase C eine Hemmung der MLCP vermittelt; dies führt zu einem höheren Phosphorylierungsgrad des Myosins und trägt so ebenfalls zur Vasokonstriktion bei.<sup>53</sup> Der  $\alpha_{1A}$ -Subtyp ist zudem direkt an einen spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanal gekoppelt.<sup>44</sup>

 $\alpha_2$ -Rezeptoren führen über ein inhibitorisches G-Protein zur Deaktivierung der Adenylylcyclase und damit zu einem Absinken des cAMP-Spiegels; dies bewirkt eine verminderte PKA-Aktivität und in der Folge eine Reduktion der eNOS-vermittelten NO-Freisetzung.<sup>50,60</sup> Andererseits lassen neuere Ergebnisse darauf schließen, dass  $\alpha_2$ -Rezeptoren über eine Aktivierung des Akt-Kinase-Weges auch zu einer Erhöhung der eNOS-Aktivität und einer Freisetzung von Prostacyclin führen können, was in einer vasorelaxierenden Wirkung resultiert.<sup>58,61</sup>

β-adrenerge Rezeptoren wirken hingegen über stimulatorische G-Proteine auf die Adenylylcyclase, wodurch sie den zellulären cAMP-Spiegel erhöhen und so die PKA aktivieren.<sup>60</sup> Dies bewerkstelligt eine erhöhte endotheliale NO-Freisetzung und hat im glatten Gefäßmuskel eine Ca<sup>2+</sup>-Absenkung mit Vasorelaxation zur Folge.<sup>50,58,60</sup> Darüber hinaus scheint die β<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelte Vasorelaxation mit einer Ausschüttung des Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) in Verbindung zu stehen; dieser öffnet im Endothel Ca<sup>2+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle, was zu einer endothelialen Hyperpolarisation führt, die sich über gap junctions in die glatte Muskelzelle fortleitet.<sup>58</sup> Für unsere Studie ist auch insbesondere von Bedeutung, dass die Vasodilatation durch Stimulation von β-Rezeptoren einen Zusammenhang zwischen endothelabhängigen und -unabhängigen Mechanismen darstellen könnte. Während β<sub>1</sub>-Rezeptoren in einer Arbeit von Wang et al. einen cAMP-Anstieg über G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelte Aktivierung der Adenylylcyclase (endothelunabhängig) vermittelten, resultierte eine Stimulation der β<sub>2</sub>-Rezeptoren in einer vermehrten NO- und letztlich cGMP-Produktion über eine G<sub>i</sub>-Protein-und Akt-basierte Signaltransduktion (endothelabhängig).<sup>62</sup>

## 1.6.4. Evidenz klinischer Studien zur HDL-induzierten Vasorelaxation

Ein Zusammenhang zwischen HDL und einer flussvermittelten arteriellen Dilatation (FVD) wurde in der bestehenden Literatur bereits mehrfach postuliert. Während die FVD hierbei als endothelvermittelt und daher als Parameter für die endotheliale Funktion gilt, wird die Reaktion auf exogene NO-Applikation – meist in Form von Nitroglyzeringabe – als Maß für die endothelunabhängige Vasoreaktivität aufgefasst. Ferner gilt auch die Infusion von Acetylcholin als etabliertes, allerdings invasives Verfahren zur Evaluierung der endothelialen Funktion.<sup>63</sup>

Grundsätzlich kommen neben direkten Messungen an den Koronararterien insbesondere auch FVD-Messungen an der Arteria brachialis als Surrogatparameter für das gesamte arterielle System zum Einsatz.<sup>63</sup> Brachialismessungen bilden die derzeit am häufigsten eingesetzte nichtinvasive Methode zur Evaluation der Endothelfunktion.<sup>63</sup> Hierbei gilt die Gefäßreaktion im Rahmen einer reaktiven Hyperämie nach suprasystolischer Okklusion als etabliertes Maß für die endothelabhängige flussvermittelte Vasodilatation.<sup>63</sup> Methodisch erwähnenswert ist unter diesem Aspekt, dass Anderson et al. einen expliziten Zusammenhang zwischen der vasomotorischen Reagibilität der Koronarien auf Acetylcholin und der postokklusiven Dilatation der A. brachialis in denselben Patienten feststellen konnten.<sup>64</sup> Eine flussvermittelte Dilatation der Brachialarterie von weniger als 3 % der Ausgangsweite ging in dieser Studie mit einem positiv prädiktiven Wert von 95 % für das gleichzeitige Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion an den Koronarien einher.<sup>64</sup>

Die Arbeitsgruppe um Kuhn beschrieb einen Zusammenhang zwischen HDL-Konzentration und vasomotorischer Reaktion der Koronararterien in Patienten mit Indikation zur elektiven Angiografie. Eine positive Korrelation zwischen HDL-Konzentration und Vasodilatation nach Acetylcholingabe bestand bemerkenswerterweise nicht nur für angiografisch gesunde, sondern auch für arteriosklerotisch veränderte Koronarsegmente.<sup>65</sup> Zudem hatten Patienten mit einer normalen dilatierenden Reaktion auf Acetylcholin ein signifikant höheres HDL-Level als solche mit einer paradoxen Vasokonstriktion.<sup>65</sup>

Zeiher et al. machten in Koronarangiografie und -ultraschall die bestätigende Beobachtung, dass höhere HDL-Werte mit einer Verbesserung der vasomotorischen Reagibilität einhergehen: In Patienten mit fokaler koronarer Arteriosklerose war ein HDL-Level über der 75. Perzentile ein Prädiktor für eine verbesserte Vasodilatation bzw. verminderte Vasokonstriktion; dies galt sowohl in Reaktion auf Acetylcholin als auch auf den Eiswassertest als Maß für die Reaktion nach sympathischer Aktivierung.<sup>66</sup> Diese Korrelation galt ebenfalls unabhängig vom Vorhandensein und Ausmaß der atheromatösen Wandverdickung in den untersuchten Koronarsegmenten.<sup>66</sup>

Eine weitere Untermauerung dieses Zusammenhangs fanden Li et al. in ultraschallbasierten Messungen an der Arteria brachialis. HDL zeigte dabei sowohl in Patienten mit Koronarer Herzerkrankung als auch in der Kontrollgruppe eine signifikante Korrelation zur Dilatation der A. brachialis bei postokklusiver reaktiver Hyperämie.<sup>67</sup> Die Arbeitsgruppe um Toikka fand in 20 jungen Männern ohne sonstige kardiovaskuläre Risikofaktoren ebenfalls eine signifikante Korrelation von HDL und FVD an der Brachialarterie.<sup>68</sup> Zudem ging niedriges HDL hier mit einer erhöhten oxLDL-Menge einher, welche wiederum ebenfalls mit einer Verschlechterung der FVD korreliert war.<sup>68</sup> Besonderes Augenmerk fällt in jener Studie auch darauf, dass die Autoren ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen HDL und der endothelunabhängigen Dilatation nach exogener NO-Zufuhr feststellen konnten.<sup>68</sup>

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Kuvin et al. in einer methodisch analog aufgebauten Studie: Patienten mit einem HDL von  $\geq 40$  mg/dL hatten dabei eine hochsignifikant bessere flussabhängige Dilatation der A. brachialis als solche mit niedrigeren HDL-Mengen.<sup>69</sup> HDL war in dieser Studienpopulation von Patienten mit Indikation zur nuklearmedizinischen Koronarevaluation ein unabhängiger Prädiktor der flussabhängigen Dilatation, während dies insbesondere für das Gesamtcholesterin und LDL nicht galt.<sup>69</sup> In jener Untersuchung war HDL ebenfalls signifikant mit der endothelunabhängigen Dilatation assoziiert.<sup>69</sup>

Bisoendial und Kollegen führten Untersuchungen an Patienten durch, die einen heterozygoten Allelstatus für eine Mutation des ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) aufwiesen, was klinisch in isoliert niedrigen HDL-Werten bei sonstiger Normocholesterinämie resultiert.<sup>70</sup> Im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten diese Patienten eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation im Brachialgebiet, die interessanterweise durch Infusion von Apolipoprotein A I und Phosphatidylcholin wieder normalisiert werden konnte.<sup>70</sup> Die endothelunabhängige Gefäßreaktivität nach NO-Applikation war hier unverändert.<sup>70</sup>

Analoge Ergebnisse fanden auch Spieker et al. in einer Gruppe von klinisch gesunden Männern mit LDL-Erhöhung. Hier war ebenfalls die endothelabhängige, nicht jedoch die endothelunabhängige Vasodilatation am Arm beeinträchtigt, was durch Infusion von Apolipoprotein A I und Phosphatidylcholin reversibel war.<sup>71</sup>

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der positive Zusammenhang zwischen HDL und der endothelabhängigen Dilatation in Koronar- wie auch in Brachialarterien mehrfach gezeigt wurde. Dies gilt sowohl in gesunden als auch in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen und sowohl mediator- als auch flussvermittelt.

Weiterhin besteht teilweise Evidenz für einen ähnlichen Zusammenhang zwischen HDL und der endothelunabhängigen Vasodilatation, wenngleich sie weniger häufig untersucht wurde und uneinheitliche Ergebnisse vorliegen.

#### 1.6.5. Evidenz experimenteller Studien zur HDL-induzierten Vasorelaxation

Eine Reihe experimenteller Studien deutet darauf hin, dass Modulationen der eNOS eine wichtige Rolle in der HDL-vermittelten Vasodilatation einnehmen.

Uittenbogaard et al. zeigten, dass oxLDL die physiologische Lokalisation der eNOS in Plasmamembran-Caveolae stört, während eine HDL-Einwirkung die subzelluläre Positionierung von eNOS und die physiologische NO-Produktion SR-BI-vermittelt wieder normalisiert.<sup>72</sup>

Zudem wirkt HDL über eine komplexe Kaskade als Agonist auf die enzymatische Aktivität der eNOS. HDL bewirkt eine Akt-basierte Phosphorylierung der eNOS am funktionell bedeutsamen Serin 1177, was zu einer Aktivierung des Enzyms führt.<sup>73</sup> Die Signaltransduktion verläuft über die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src, welche die Phosphoinositid-3-Kinase (PI<sub>3</sub>-Kinase) aktiviert; diese wiederum sorgt für aktivierende Phosphorylierungen von Proteinkinase B (Akt) und Mitogen-activated-Proteinkinasen (MAP-Kinasen), welche beide für die HDL-induzierte eNOS-Aktivierung notwendig sind.<sup>74</sup> Interessanterweise konnte umgekehrt in transgenen Mäusen eine Abhängigkeit zwischen dem Apo-A-I-Trägerstatus und der Phosphorylierung von Akt und MAP-Kinasen festgestellt werden.<sup>75</sup>

Yuhanna et al. zeigten weiter, dass die HDL-basierte eNOS-Aktivierung die Anwesenheit von Scavenger Receptor B I (SR BI) und Apo A-I, nicht aber Apo A-II erfordert; Apo A-I allein konnte in dieser Studie keine eNOS-Aktivierung auslösen, sodass die Autoren die Anwesenheit von Apo A-I als notwendiges, aber nicht hinreichendes Kriterium interpretierten.<sup>76</sup> Die Arbeitsgruppe um Nofer untersuchte daher mögliche andere bioaktive HDL-Bestandteile und fand, dass HDL-assoziierte Lipide, insbesondere Sphingosylphosphorylcholin, Sphingosin-1-Phosphat und Lysosulfatid, eine Akt-basierte Aktivierung von eNOS auslösen können.<sup>77</sup> Zudem konnten die Autoren Hinweise darauf finden, dass die HDL-induzierte NO-Freisetzung abhängig von einer Erhöhung der endothelialen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ist.<sup>77</sup>

Des Weiteren führt HDL auch zu einer intrazellulären Akkumulation von eNOS, wie die Arbeitsgruppe um Rämet zeigte; dies basiert interessanterweise wie die aktivierende Phosphorylierungskaskade ebenfalls auf einer Aktivierung von Akt und MAP-Kinasen.<sup>78</sup> Dieser Mechanismus beruht den Autoren zufolge auf einer Verminderung des Abbaus und damit einer Verlängerung der eNOS-Halbwertszeit, während die eNOS-Expression unverändert bleibt.<sup>78</sup>

Von diesen positiven Effekten auf die eNOS abgesehen machten Fleischer at el. die Beobachtung, dass eine Inkubation mit menschlichem HDL zu einer dosisabhängigen Erhöhung der PGI<sub>2</sub>-Produktion in endothelialen wie auch glattmuskulären Zellkulturen vom Schwein führt.<sup>79</sup> Während eine Apolipoprotein-Aufbereitung des HDL auch allein eine PGI<sub>2</sub>-Erhöhung zur Folge hatte, wies LDL keine derartigen Effekte auf.<sup>79</sup> Viñals und Kollegen fanden in einem Modell glattmuskulärer Zellen vom Hasen, dass die PGI<sub>2</sub>-Erhöhung durch speziesgleiches HDL mit einer vermehrten COX-II-Expression einhergeht und durch einen irreversiblen COX-II-Hemmer aufgehoben werden kann.<sup>80</sup> Auch sie fanden eine Abhängigkeit von der HDL-Dosis.<sup>80</sup>

In der Zusammenschau lässt sich konstatieren, dass die mechanistischen Vorstellungen zur HDL-induzierten Vasorelaxation vor allem eine Erhöhung der NO- und Prostacyclin-Freisetzung umfassen. Untersuchungen zu einer möglichen HDL-Wirkung über Adrenorezeptoren und zyklische Nukleotide stehen nach Kenntnis des Autors noch aus.

# 1.7. Herleitung der Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Zusammenfassend liegen der Fragestellung dieser Arbeit folgende Überlegungen zugrunde:

- HDL zeigt in klinischen wie experimentellen Studien flussabhängige gefäßrelaxierende Effekte, deren Mechanismen aktuell intensiver Forschung unterliegen.
- Sympathische α- und β-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die den Vasotonus über eine Regulation der endothelialen und glattmuskulären cAMP/cGMP-Spiegel regulieren.
- Vorangegangene, methodisch analoge Untersuchungen an unserem Institut zeigten:

1. Eine Regulation des koronaren Tonus, glattmuskulären Membranpotenzials sowie der cAMP- und cGMP-Konzentrationen unter Einwirkung von Adrenalin bzw. Noradrenalin.<sup>59,81</sup>

2. Die effektive Wirkung einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade auf Tonus, Membranpotenzial und Nukleotidkonzentrationen.<sup>59</sup>

3. Einen elektromechanisch nachweisbaren flussabhängigen Einfluss von LDL und VLDL auf die Gefäßweite.<sup>82-84</sup>

4. Sowie eine damit einhergehende Beeinflussung des Membranpotenzials und der intrazellulären Konzentrationen von cAMP und cGMP.<sup>82-84</sup>

Wir stellten daher die Hypothese auf, dass eine flussabhängige Interaktion zwischen den HDL-Partikeln und den Adrenorezeptoren des sympathischen Nervensystems besteht und dass ein Teil der HDL-vermittelten Gefäßrelaxation über diese Interaktion vermittelt ist.

Die Ziele dieser Arbeit umfassen daher

- Eine Untersuchung von HDL-vermittelten elektromechanischen Effekten an menschlichen Koronararterien in Abhängigkeit von der Flussrate,
- Eine Analyse des Einflusses von α- und β-Blockade auf das elektromechanische Gefäßverhalten unter HDL,
- Die Quantifizierung einer möglichen adrenergen Interaktion,
- Eine Korrelation von Nukleotidkonzentrationen und Elektromechanik
- Sowie eine Einbindung der Ergebnisse in die aktuelle Konzeption der HDL-induzierten Vasorelaxation.

# 2. Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit umfasst Experimente zu Gefäßmechanik, Membranpotenzialen und biochemischer Bestimmung von intrazellulären Botenstoffen. Sämtliche Versuche wurden an Koronararterien des Menschen aus explantierten Herzen durchgeführt. Die Präparation der Gefäße erfolgte im Rahmen von Herztransplantationen am Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) im Zeitraum von 2007 bis 2012. Die Einverständniserklärung der Patienten zur wissenschaftlichen Nutzung der explantierten Herzen wurde während des stationären Aufenthaltes im DHZB eingeholt.

## 2.1. Studienkriterien

Patienten wurden unabhängig von Alter, Geschlecht, Medikation, Wartezeit auf der Transplantationsliste, Stadium der Herzinsuffizienz sowie Nebendiagnosen eingeschlossen.

Die führende kardiale Diagnose stellte kein zwingendes Ausschlusskriterium dar: Lag der Transplantationsindikation allerdings eine Kardiomyopathie ischämischer Genese zugrunde, so wurden die Koronargefäße nur verwendet, wenn ein Mindestabstand von 5 mm zu makroskopisch sichtbaren arteriosklerotischen Plaques eingehalten werden konnte. Zeiher et al. konnten zeigen, dass auch in arteriosklerotisch veränderten Arterien diejenigen Gefäßabschnitte ohne arteriosklerotische Läsionen ein normales fokales Reaktionsverhalten aufweisen.<sup>66</sup> Bei der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie kann darüber hinaus prinzipiell von einer altersentsprechenden Normalsituation der Koronarien ausgegangen werden.<sup>85</sup>

Die Herzkranzgefäße von Patienten mit kombinierter Herz-Lungen- oder Herz-Nieren-Transplantation wurden für die Studie grundsätzlich berücksichtigt. Weiterhin war die Implantation von ventrikelunterstützenden Systemen wie LVAD (Left Ventricular Assist Device) oder BVAD (Biventricular Assist Device) sowie elektrokardialen Systemen wie ICD (Implantable Cardioverter-Defibrillator) für diese Studie nicht ausschlussrelevant.

Bypass-Gefäße waren grundsätzlich von der Studie ausgeschlossen. Ebenso wurden keine Gefäßstücke aus arteriellen Aufzweigungspunkten verwendet. Gefäße oder Gefäßabschnitte, in denen bei der Makropräparation ein Mindestabstand von 5 mm von etwaigen Stents oder Bypass-Gefäßen nicht eingehalten werden konnte, fanden in der Studie keine Verwendung. Dies betraf einen Koronarienstamm von einem Patienten. Gefäßsegmente mit Stentversorgung oder

großen arteriosklerotischen Plaques wurden bei der Feinpräparation mit 5 mm Abstand herausgeschnitten und verworfen.

Nach Anwendung dieser Kriterien kamen in der vorliegenden Studie die Koronararterien von insgesamt n = 22 Transplantationspatienten zur Verwendung.

## 2.2. Charakteristika des Patientenkollektivs

Die Erfassung der Patientendaten stützte sich auf die letzte ärztliche Dokumentation zum Zeitpunkt der Transplantation. Zu den aufgezeichneten Merkmalen zählen Alter, Geschlecht, Medikation, Implantation von Unterstützungssystemen, Gefäßzustand sowie die führende kardiale Erkrankung, die die Transplantationsindikation bedingte. Die Daten wurden zur Auswertung anonymisiert.

# 2.3. Präparation der Koronararterien

Die chirurgische Präparation der Koronararterien führten wir unter sterilen Bedingungen in den Operationssälen des DHZB durch. Dies geschah bis spätestens 45 Minuten nach Entnahme des plegierten Herzens. Zur Vitalitätserhaltung des Gewebes wurde das Herz für den Zeitraum der Gefäßpräparation in eine Nierenschale mit gekühlter isotoner Kochsalzlösung verbracht.

Mit Blick auf die Schonung der Aortenklappe und des Endothels wählten wir den epikardialen Zugangsweg zur Lokalisation der Koronarsinus und Extraktion der Gefäße. Die Instrumente umfassten stumpfe Pinzetten, ein bis zwei chirurgische Scheren (stumpf-stumpf) sowie ein Skalpell oder eine scharfe Schere. Das Präparat wurde lediglich an den Rändern scharf abgesetzt, ansonsten wurde eine mechanische Beeinträchtigung des Gewebes vermieden.

Soweit anatomisch möglich, umfasste die Präparation beide proximalen Hauptstämme der Arteria coronaria dextra bzw. sinistra sowie ihre Hauptäste Ramus interventricularis posterior bzw. Rami interventriculares anterior et circumflexus, wobei mindestens 3 cm der jeweiligen Arterie im Verlauf dargestellt wurden. Intramurale Arterienäste kamen nicht zum Einsatz, da bei ihrer Extraktion mit einer stärkeren mechanischen Beeinträchtigung gerechnet werden musste. Im Anschluss an die Präparation wurden die Koronarien ohne Verzögerung in Krebslösung überführt und bis zum Transport in das Labor bei 2 - 8 Grad Celsius gekühlt gelagert. Bis zum Beginn der Versuche vergingen maximal 36 Stunden.

Im Vorfeld der Versuchsdurchführung erfolgte die Feinpräparation der Gefäßstücke, die der Ablösung von perivaskulären Fett- und Bindegewebsresten diente. Das Feinpräparat wurde für die Versuche in 1 - 3 cm große Stücke geschnitten.

Die qualitative Einteilung des Gefäßzustandes folgte der makroskopischen Beurteilung bei der Feinpräparation. Gefäße ohne augenfällige Veränderungen wurden als ,zart' klassifiziert, solche mit geringfügigen altersentsprechenden Veränderungen (z.B. Lipidstreifen, ,fatty streaks') als ,normal'. Das Vorliegen eines oder mehrerer makroskopisch sichtbarer arteriosklerotischer Plaques oder Stents führte zur Einteilung des Präparates als ,sklerotisch'. War das Gefäß sklerotisch bedingt fokal rigide oder das Lumen durch Plaques deutlich verengt, entsprach dies der Klassifikation ,stark sklerotisch'.

## 2.4. Versuchslösungen

#### 2.4.1. Krebs-Lösung

Die nach Krebs modifizierte Versuchslösung (im Folgenden: Krebslösung) eignet sich zur Untersuchung glattmuskulärer Systeme und diente in dieser Arbeit als Blutersatzlösung, Transportmedium und Kontrollvehikel.<sup>82</sup>

Die Solute waren wie folgt zusammengesetzt: Na<sup>+</sup> 151,16 mmol/L; K<sup>+</sup> 4,69 mmol/L; Ca<sup>2+</sup> 2,52 mmol/L; Mg<sup>2+</sup> 1,1 mmol/L; Cl<sup>-</sup> 145,4 mmol/L; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 16,31 mmol/L; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1,38 mmol/L sowie Glucose 7,77 mmol/L.<sup>86</sup>

Die Versuchsbedingungen umfassten eine Temperatur von 37 Grad Celsius und einen pH-Wert von 7,35 unter Begasung mit einem Gasgemisch aus 95%  $O_2$  und 5%  $CO_2$  (Carbogen). Jedes Präparat wurde vor Versuchsbeginn mindestens zwei Stunden lang unter pH-Kontrolle äquilibriert.

# 2.4.2. HDL-Akquise

Das HDL für die experimentelle Verarbeitung wurde aus Blutproben von gesunden und nüchternen Freiwilligen extrahiert. Die HDL-Fraktionen verschiedener Spender wurden dabei zusammengeführt ("gepoolt"). Dies erfolgte mit dem Ziel, eine für die Versuche ausreichende HDL-Menge zu gewinnen und gleichzeitig eine möglichst bevölkerungsrepräsentative Versuchslösung in Bezug auf Zusammensetzung und Allelverteilung der HDL-Partikel herzustellen.

Die Aufreinigung und Extraktion des HDL erfolgten wie bereits beschrieben in Zusammenarbeit mit dem Lipidlabor der Universität Freiburg.<sup>82,86</sup> Das Probandenblut wurde hierfür in EDTA-Röhrchen abgenommen und bei Raumtemperatur und 4000 Umdrehungen pro Minute (rpm) 10 Minuten lang vorzentrifugiert, um Plasmaüberstände zu gewinnen. Diese wurden dann in Polyethylen-Röhrchen überführt, welche der weiteren sequenziellen Ultrazentrifugation bei 120000 rpm und 18 Grad Celsius dienten. Hierfür kam eine Optima<sup>TM</sup> TLX-Ultrazentrifuge mit Rotor TLA-120.2 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA) zum Einsatz. Für die Aufbereitung von HDL wurde eine Dichte von d < 1,21 kg/L bei einer Zentrifugationsdauer von 260 Minuten verwendet. Nach Durchlaufen aller Zentrifugationsschritte wurden Kochsalz und EDTA per Ionenaustauscher gegen Krebslösung ersetzt. Die Applikation von gasförmigem Stickstoff diente dazu, das Risiko einer möglichen Lipidoxidation zu minimieren. Cholesterin und Triglyceride wurden enzymatisch bestimmt und die Apolipoproteinkonzentration per turbimetrischer Partikelmessung mit einem Olympus A640 Analysator (Olympus, Tokyo, Japan) erfasst.

Für die Versuchsansätze verdünnten wir das aufgereinigte HDL mit Krebslösung auf eine Konzentration von 50 mg/dL.

# 2.4.3. Pharmakologische Blockade der Adrenorezeptoren

Zur Blockade der  $\alpha$ -Rezeptoren verwendeten wir Phentolamin-hydrochlorid in 10<sup>-7</sup>-molarer Konzentration als nicht-selektiven und kompetitiven  $\alpha$ -Rezeptor-Antagonisten.<sup>59,87</sup> Zu den klinischen Einsatzgebieten von Phentolamin zählen beispielsweise die Behandlung des Phäochromozytoms oder die Aufhebung einer Lokalanästhesie, insbesondere bei Weichteiloperationen.<sup>87</sup> Darüber hinaus finden  $\alpha$ -Rezeptor-Antagonisten Verwendung in der Therapie der benignen Prostatahyperplasie, der erektilen Dysfunktion sowie der arteriellen Hypertonie.<sup>87</sup> Bemerkenswert ist im Hinblick auf die vorliegende Fragestellung, dass eine Medikation mit  $\alpha$ -Rezeptor-Antagonisten bei einigen Patienten auf bisher ungeklärte Weise zu einer Erhöhung des HDL-Spiegels führen kann.<sup>87</sup> Des Weiteren setzten wir Propranolol-hydrochlorid in einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> mol/L als kompetitiven Antagonisten an β-Adrenorezeptoren ein.<sup>59,87</sup> Propranolol eignete sich für unsere Fragestellung, da die Substanz weder eine Selektivität für β-Rezeptorsubtypen noch relevante Interaktionen mit α-Rezeptoren aufweist.<sup>87</sup> Zudem besitzt Propranolol keine partialagonistischen Eigenschaften an den β-Rezeptoren.<sup>87</sup> Zu den zahlreichen klinischen Einsatzgebieten für Propranolol gehören neben der KHK und Zustand nach Myokardinfarkt auch die portale Hypertension bei Leberzirrhose, die Hyperthyreose und die Behandlung von Tremor- und Migräneleiden.<sup>87</sup> Außerdem stellt der Einsatz von β-Rezeptor-Antagonisten eines der wichtigsten Therapieprinzipien in der Behandlung der kompensierten Herzinsuffizienz dar.<sup>88</sup> Insbesondere in Kombination mit einer KHK oder Herzinsuffizienz finden sie darüber hinaus Anwendung in der Therapie der arteriellen Hypertonie.<sup>89</sup> Auffällig ist ferner, dass die Dauermedikation mit β-Blockern auf metabolischer Seite eine Erniedrigung des HDL-Spiegels hervorrufen kann.<sup>87</sup>

Zur Dosisfindung für Phentolamin und Propranolol gingen der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung dieser Pharmaka an menschlichen Koronarien voraus.<sup>59</sup> Die Blockadesubstanzen kamen je nach Versuchsansatz einzeln oder kombiniert zur Anwendung ( $\alpha$ -Einzelblockade,  $\beta$ -Einzelblockade, simultane  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade). Obgleich weder bestehende Veröffentlichungen noch vorherige Studien aus unserem Institut eine versuchsrelevante intrinsische Aktivität dieser Substanzen vermuten ließen, ging den HDL-Versuchen eine Reihe von Kontrollexperimenten mit Propranolol und Phentolamin voraus (vgl. Abs. 3.2).<sup>59,90</sup>
### 2.5. Mechanische Messungen

### 2.5.1. Versuchsaufbau

Der instrumentelle Aufbau der Versuchsapparatur ist in Abbildung 2 dargelegt.



Abbildung 2. Schematischer Versuchsaufbau für Messungen der Gefäßmechanik. Pfeile zeigen die Flussrichtung der Versuchslösungen an. Abkürzungen:  $\vartheta$ : Celsiustemperatur.  $CO_2/O_2$ : Carbogen. Erstellt durch den Autor.

#### 2.5.2. Registrierung des Vasotonus

Für jeden Versuch wurde ein Gefäßstück aus der feinpräparierten Arterie herausgeschnitten und in Längsrichtung gespalten, sodass sich ein flaches, etwa 0,5 cm x 1,5 cm großes Präparat ergab. Da die glattmuskulären Zellen der arteriellen Tunica media zirkulär angeordnet sind, entspricht die Zugrichtung eines aufgeklappten Gefäßrings der Längsachse der Messkammer und kann so als axiale Spannung gemessen werden.<sup>91</sup> Hierfür wurde das Präparat mit den Schnittenden in die beiden verschraubbaren Halteklemmen der Messkammer eingespannt. Dabei zeigte die luminale (endotheliale) Seite nach oben. Das Präparat wurde nur an den Schnittflächen mit einer Bogenpinzette berührt. Das Einspannen erfolgte unter Krebslösung bei einem Fluss von 3 mL/min. Die linke Messklemme diente dabei der Fixierung, während die rechte mit einem Kraftaufnehmer samt digitaler Messverstärkung (KWS 522.C, K 52 C; Hottinger-Baldwin, Darmstadt, Deutschland) verbunden war.

Zehn Minuten vor Versuchsbeginn wurde das Präparat in Schritten von 400 mg pro Minute mechanisch auf einen Anfangswert von 2 g vorgedehnt. Dies erfolgte zur Simulation eines mittleren arteriellen Blutdrucks von 100 mmHg.<sup>82</sup> Anschließend hielten wir das Präparat durch feine Nachjustierung weitere 5 Minuten auf diesem Ausgangswert. Die Aufzeichnung der mechanischen Spannung erfolgte daraufhin sowohl computergestützt als auch manuell in 5-minütigen Intervallen. Die mechanischen Messungen wurden als annähernd isometrisch betrachtet, da selbst eine maximale Verkürzung des Präparates eine Längenänderung von höchstens 1 % im Vergleich zur Ausgangslänge erwarten ließ.<sup>59,82,91</sup> Eine Gefäßrelaxation entsprach daher einem schwächeren Zug auf den Kraftabnehmer und folglich einer Reduktion des aufgenommenen Spannungswertes in Gramm. Eine Kontraktion führte in entgegengesetzter Weise zur Erhöhung des registrierten Spannungswertes.

Zur Untersuchung des flussabhängigen mechanischen Gefäßtonus wurde der Durchfluss der Versuchslösungen durch die Messkammer im Versuchsverlauf alle 10 Minuten erhöht. Hierzu diente ein vor der Messkammer angebrachter Flussregler. Es wurde das Verhalten des Präparats bei Flüssen von respektive 3, 5, 20, 40 und 100 mL/min untersucht. Die korrekte Einstellung des jeweiligen Flusses wurde durch Messung des nach einer Minute durch die Messkammer gelaufenen Volumens überprüft und gegebenenfalls nachjustiert.

Nach Versuchsende wurde das jeweilige Präparat ohne Verzögerung mit einer Schutzfolie versehen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Bestimmung der cAMP- und cGMP-Konzentrationen bei -80°C gelagert.

### 2.6. Potenzialmessungen

#### 2.6.1. Messinstrumente

Die elektrischen Messungen erfolgten bei grundsätzlich gleichem Versuchsaufbau wie für die oben beschriebenen Tonusversuche. Zur Ableitung des glattmuskulären Membranpotenzials kamen intrazellulär platzierte Mikroelektroden zur Anwendung. Diese Mikroelektroden wurden jeweils vor den elektrophysiologischen Messungen in unserem Institut angefertigt. Sie wurden hierfür durch einen Horizontal*puller* (T. Chowdhury Pipette Puller, ISEW, Kalkutta) aus einem Spezialglas (Pyrex Brand K2916 Corning Glass Works, New York; Innen-/Außendurchmesser 1,8/3,0 mm) ausgezogen. Dieser Extraktionsvorgang der Mikroelektroden erfolgte innerhalb von 2 Minuten bei 6,8 A Heizstrom. Zu den Charakteristika der hier verwendeten Elektroden zählen Spitzendurchmesser von < 1  $\mu$ m, eine Füllung mit 3-molarer KCl-Lösung sowie elektrische Widerstände von 60 bis 100 M $\Omega$ .

Eine Agar-Brücke (KCl 3 mol/L) diente als indifferente Elektrode und Verbindung zwischen Messkammer und einem 3-molaren KCl-Reservoir, welches an einen Messverstärker angeschlossen war. Dieser gab das aufgenommene Signal in 10-facher Verstärkung auf einem Großbildoszilloskop (SGM 43 BN901 s/N293, Knott, München) aus. Die Erfassung der Messdaten erfolgte sowohl manuell als auch elektronisch über einen Analog/Digital-Digital/Analog-Wandler (DT 2821, Data Translation, Marlboro, Massachusetts, USA) mit Echtzeit-Darstellung. Die Daten wurden mithilfe der Software Win ADDA<sup>™</sup> (V.1.31, Mikrotaurus, Berlin) ebenfalls in Echtzeit gespeichert.

# 2.6.2. Versuchshergang

Vor den elektrophysiologischen Versuchen wurde das Gefäßpräparat wie oben beschrieben in die Messkammer eingespannt. Die Ausrichtung der Messelektrode erfolgte anhand eines speziellen Mikromanipulators. Die Elektrode wurde dem Gefäßpräparat dabei von oben und senkrecht zur endothelialen Seite angenähert. Durch vorsichtiges Beklopfen des Anti-Vibrationstisches wurde daraufhin das Durchstechen von Endothel, Basalmembran und proximaler Zellmembran der glatten Muskelzelle gewährleistet. Ein korrekter Einstichvorgang in die Muskelzelle stellte sich dabei im Großbildoszilloskop als steiler Potenzialabfall im Bereich zwischen -50 mV und -80 mV dar. Um Messwerte endothelialen Ursprungs auszuschließen, wurden positivere Potenzialwerte (> -50 mV) verworfen.

Vor jedem erneuten Einstichvorgang wurde die Position der Elektrode in horizontaler Richtung verändert, um repräsentative Messergebnisse eines Präparates zu gewährleisten. Zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Versuchsserien diente ferner die Überprüfung von Tip-Potenzial und Widerstand der jeweiligen Elektrode nach Versuchsende. Nur bei gegenüber Versuchsbeginn unveränderten Parametern wurde die entsprechende Messreihe verwertet. Ferner diente dies der Qualitätskontrolle, da negativere Spitzenpotenziale ein höheres Risiko für eine Verfälschung des Membranpotenzials mit sich bringen.<sup>92</sup>

Während der Versuchsdurchführung wurden Gefäßtonus und Membranpotenzial simultan registriert. Dies geschah bei grundsätzlich gleichem Versuchsaufbau und unter gleichen Bedingungen wie für die mechanischen Messungen beschrieben. Die Ableitung der Membranpotenziale erfolgte analog zu den Mechanikmessungen in Flussabhängigkeit, wobei die gewählten Flussraten denjenigen der Tonuserfassung entsprachen. Die Potenzialableitung wurde jeweils 10 Minuten nach Einstellung der Flussrate durchgeführt. Diese zeitliche Differenz diente zur Einstellung eines mechanischen steady-state, in dem sich Kraftzunahme und -abnahme der kontraktilen Filamente in der Summe ausgleichen, sodass insgesamt von einem mechanisch stabilen Zustand ausgegangen werden kann.<sup>82</sup>

Am Beginn jedes Versuchs stand die Ableitung des Membranpotenzials in Krebslösung als Referenzversuch. Daraufhin schlossen sich die Messungen in den Versuchslösungen und bei unterschiedlichen Flussraten an.

#### 2.7. Nukleotidkonzentrationen

Die Bestimmung der Botenstoffe cAMP und cGMP erfolgte per Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und wurde im Anschluss an die Tonusmessungen an denselben Gefäßpräparaten durchgeführt.

#### 2.7.1. Gewebeaufschluss der Proben

Zunächst wurden die einzelnen Gewebeproben für die spätere Konzentrationsbestimmung mit einer Spezialwaage abgewogen, wobei jedem Wiegevorgang eine Kalibration der Waage vorausging. Die Gefäßpräparate wurden zum Wiegen aus der Schutzfolie in ein vorgekühltes 1,5-mL-Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend ohne Verzögerung wieder in flüssigen Stickstoff verbracht. Zur Untersuchung der zyklischen Nukleotide erfolgte eine mechanische Auftrennung des Probengewebes, welche die Destruktion der Endothel- bzw. Muskelmembranen zum Ziel hatte. Hierzu diente ein 2-mL-Glas-Potter-Homogenisator mit 6% iger Trichloressigsäure als Lyse-Agens. Insgesamt applizierten wir 400 µL Lyselösung in zwei Schritten. Die mechanische Auftrennung des Gewebes erfolgte durch vorsichtige Drehbewegungen des Glasmörsers. Das Lysat wurde daraufhin in ein 1,5-mL-Eppendorf-Gefäß pipettiert und präzipitierte Anteile durch Zentrifugation (15 Minuten bei 23 000 g) sedimentiert.<sup>82</sup> Die Trichloressigsäure wurde daraufhin durch Zugabe von 4 mL Diäthyläther in den Überstand überführt und letzterer abgetrennt. Darauf folgten die Gefriertrocknung der übrigen wässrigen Phase sowie die Inkubation der löslichen Sedimente in 200 µL des Testpuffers zur ELISA-Messung (50 mmol Natriumacetat; pH 5,8; bovines Serumalbumin 0,02 %).<sup>52</sup> Der Ansatz verblieb bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gekühlt.

# 2.7.2. Konzentrationsbestimmung von cAMP

Die Konzentrationsmessungen für cAMP erfolgten unter Zuhilfenahme eines Amersham-cAMP-Biotrak<sup>TM</sup>-Enzymeimmunoassay-Systems der Firma GE Healthcare.<sup>52</sup>

Das Messprinzip ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abbildung 3. Prinzip des Enzymimmunoassays. Abkürzungen: TMB: Tetramethylbenzidin;  $H_2O_2$ : Wasserstoffperoxid. Erstellt durch den Autor, modifiziert nach Herstellerinformationen.<sup>52</sup>

Als feste Phase für die Untersuchung kam eine ELISA-Platte mit 96 Wells zum Einsatz, auf der vom Esel stammende IgG-Antikörper gegen Kaninchenantikörper verankert waren. Mit Zugabe des Antiserums wurden diese kaninchenbasierten cAMP-spezifischen Antikörper auf der Wellplatte gebunden. Das Messprinzip basierte im Folgenden auf einer kompetitiven Bindung zwischen freiem cAMP aus Standard- oder Gewebeproben und Peroxidase-gekoppeltem cAMP in bekannter Menge.<sup>52</sup>

Zum Vergleich mit den Gewebewerten diente eine Verdünnungsreihe eines cAMP-Standards, ausgehend von einer Stammlösung mit einer cAMP-Konzentration von 32 nmol/L. Die entsprechenden Konzentrationen der Verdünnungsreihe waren 0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 beziehungsweise 3200 fmol/L. Die Wells der ELISA-Platte wurden in vier Messtypen aufgeteilt: leer ("Blank" B-Wells, n=2); unspezifische Bindung ("Non-specific binding" NSB-Wells, n=2); Standard (0-3200 fmol/L, n=20) sowie Gewebeprobe ("Sample", n=72).

In die Standard- und Probe-Wells wurden 100  $\mu$ L Standardlösung bzw. 80  $\mu$ L Testpuffer mit 20  $\mu$ L Probelösung pipettiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung kamen 200  $\mu$ L Testpuffer zum Einsatz. Anschließend wurden alle Slots außer den B- und NSB-Wells mit 100  $\mu$ L Antiserum versetzt und für 120 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden jeder Position mit Ausnahme der B-Wells 50  $\mu$ L Antiserum hinzugefügt, woran sich eine weitere 60-minütige Inkubationsphase bei 4°C anschloss. Darauf folgte ein vierfacher Waschvorgang; der hierfür verwendete Waschpuffer (pH = 7,5) enthielt 0,01-molaren Phosphatpuffer sowie 0,05 Volumenprozent Polysorbat 20 (kommerziell Tween 20) zur Minimierung von Proteininteraktionen und unspezifischer Bindung.<sup>52,93</sup> Daraufhin wurde der Ansatz getrocknet.

Durch anschließende Zugabe von 150  $\mu$ L Tetramethylbenzidin (TMB)-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in alle Wells begann dann die Umsetzungsreaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu 2 H<sub>2</sub>O durch die cAMP-gekoppelte Peroxidase.<sup>52</sup> TMB fungierte für diese Reaktion als Elektronendonor.<sup>94</sup> Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur und drückte sich als makroskopisch sichtbare Blaufärbung des Ansatzes aus (Schritt B in Abb. 4).



**Abbildung 4**. Reaktionsprinzip der Tetramethylbenzidin-Umsetzung. Modifiziert von Muhammad et al., 2011, mit Genehmigung von Bio Med Central nach Creative Commons License.<sup>95,96</sup>

Die Inkubationszeiten variierten zwischen 10 und 120 Minuten, da auf eine Einstellung der optimalen Blaufärbung des Nullstandards für die nachfolgende Absorptionsmessung bei  $\lambda = 450$  nm gezielt wurde.<sup>82,94</sup> Zuletzt wurde die Reaktion durch Ansäuerung mit 100 µL 1-molarer Schwefelsäure unterbrochen (C in Abb. 4), was als Gelbumschlag der Lösung erkennbar war. Die Absorptionsmessungen schlossen sich dann innerhalb der Stabilitätsphase von 1 Stunde an und erfolgten mittels eines ELISA Readers beziehungsweise eines Perkin-Elmer Victor ELISA Platten Photometer.<sup>82</sup>

### 2.7.3. Konzentrationsbestimmung von cGMP

Messprinzip und -methode entsprachen grundsätzlich dem oben dargestellten Verfahren zur cAMP-Bestimmung. Allerdings ging den cGMP-Messungen ein Acetylierungsschritt voraus.<sup>97</sup> Hierzu diente ein Acetylierungsreagenz aus einem Volumenteil Essiganhydrid und zwei Volumenteilen Triäthylamin.<sup>97</sup> Dieses Vorgehen bewirkte aufgrund der höheren Affinität des cGMP-Antiserums zu acetylierten Zyklonukleotiden eine Sensitivitätssteigerung der Messmethode um etwa eine Zehnerpotenz.<sup>97</sup>

Das Acetylierungsreagenz wurde den Standard- und Gewebeproben im Volumenverhältnis von 1:10 zugesetzt und fünf Minuten lang inkubiert. Die Zusammensetzung war hierbei 100  $\mu$ L Gewebeprobe + 10  $\mu$ L Testpuffer + 11  $\mu$ L Acetylierungsreagenz beziehungsweise 500  $\mu$ L Standardlösung (512 fmol/L) + 50  $\mu$ L Acetylierungs-Reagenz.

Die Standardverdünnungsreihe für cGMP wurde analog zur obigen Beschreibung erstellt und wies Konzentrationen von 0; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 beziehungsweise 512 fmol/L auf.

Die Plattenbelegung der Wells war mit jener der cAMP-Versuche identisch. Zunächst wurden jeweils 100 µL des cGMP-Antiserums in alle Wells außer vom B- und NSB-Typ überführt.

Danach wurden aliquote Teile von jeweils 50  $\mu$ L Gewebe- respektive Standardprobe in die entsprechenden Wells verbracht. B-Wells (Blank) blieben über den gesamten Versuchsablauf leer, und NSB-Wells enthielten 150  $\mu$ L Testpuffer. Nach zweistündiger Inkubation bei 4°C erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ L cGMP-Peroxidase-Konjugat in alle ansatzenthaltenden Wells, woran sich eine einstündige Inkubationsphase anschloss. Nach dem anschließenden Waschvorgang wurden den Wells jeweils 200  $\mu$ L TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hinzugefügt. Der restliche Versuchsablauf erfolgte in Analogie zum cAMP-Protokoll.

### 2.7.4. Auswertung der Botenstoffkonzentration

Über die Standardverdünnungsreihen der Botenstoffe konnte eine Eichkurve erstellt werden, die die Ermittlung der Botenstoffkonzentration in den Gewebeproben erlaubte. In der hierfür genutzten Beziehung

$$f(x) = \frac{a*b}{(b+x)} + c$$

waren

x: Bekannte Botenstoffmenge im Standard [fmol]
f(x): Absorption bei λ = 450 nm
a, b, c: Fitparameter.

Nach Erstellung der Standardfunktion mit den Fitparametern konnte die Gleichung wie folgt umgestellt werden:

$$x' = \frac{a \cdot b}{(f(x') - c)} - b$$

mit

x': Unbekannte Botenstoffmenge in Gewebeprobe [fmol]
f(x'): Zugehörige Absorption bei λ = 450 nm
a, b, c: Fitparameter.

Hierüber konnte nun die in einer Gewebeprobe enthaltene Menge des Botenstoffes errechnet werden, die nach Multiplikation mit dem Faktor  $F = \frac{Gesamtvolumen [\mu L]}{Probevolumen [\mu L] * Probengewicht [mg]}$  die Konzentration des Botenstoffs in der Einheit [nmol/kg] ergab. Grundsätzlich muss bei der Auswertung der Stoffkonzentration aufgrund strukturell-chemischer Verwandtschaft eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen den zyklischen Botenstoffen untereinander sowie mit anderen mono-, di- und triphosphathaltigen Nukleotiden (z.B. GTP, AMP etc.) beachtet werden. Die prozentuale Kreuzreaktivität in unseren Ansätzen beträgt jedoch nach Herstellerangaben maximal 3\*10<sup>-2</sup> für cAMP und 8\*10<sup>-5</sup> für acetyliertes cGMP.<sup>52,97</sup>

#### 2.8. Messreihen, Datenauswertung und Statistik

Die Versuche der vorliegenden Arbeit zu Vasotonus, Membranpotenzial und Nukleotidkonzentration umfassten folgende Messansätze: Kontrolle unter Krebslösung, HDL allein, HDL mit  $\alpha$ -Blockade, HDL mit  $\beta$ -Blockade sowie HDL mit simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade. Zur Vermeidung systematischer Fehler wurde die Abfolge der Messreihen für jeden Versuch in einem vorher festgelegten Schema verändert.

Die Darstellung der Messergebnisse folgt dem Muster *arithmetischer Mittelwert* ± *SEM*. Die mittleren Tonuswerte sind dabei auf drei Nachkommastellen gerundet, die Membranpotenziale und Nukleotidkonzentrationen bis zur ersten Nachkommastelle aufgeführt. Die grafische Darstellung der Tonuskurven erfolgt zur besseren Vergleichbarkeit im einheitlichen Ordinatenintervall. Die Potenzialkurven sind hingegen in demjenigen Abschnitt der Voltskala dargestellt, in dem sich der Flussverlauf optimal beurteilen lässt. Grundsätzlich dienen die Grafiken der Beurteilung der funktionellen flussabhängigen Entwicklung, während die tabellarischen Aufstellungen neben exakten Messwerten die Stichprobenanzahl, abgeleitete Größen und Irrtumswahrscheinlichkeiten enthalten.

Für die statistische Signifikanztestung mit dem t-Test nach Student für unverbundene Zufallsstichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten wurde ein Signifikanzniveau von p<0,05 festgelegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in den Intervallen p>0,05; p<0,05; p<0,01 und p<0,0001 angegeben. Exakte p-Werte sind für Irrtumswahrscheinlichkeiten aufgeführt, die nah an den Intervallgrenzen liegen. Für abgeleitete Größen wurden normalverteilte Messabweichungen angenommen und eine Fehlerfortpflanzung nach Gauß errechnet. Herleitungen und Formeln finden sich an entsprechender Stelle des Auswertungsteils.

#### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakteristika des Kollektivs

Eine klinische Beschreibung des Patientenkollektivs dieser Studie ist in Tabelle 3 zusammengefasst. Die klinischen Daten hierfür entsprangen dem aktuellen Arztbrief zum Zeitpunkt der Transplantation. Für einen Patienten lagen zu diesem Zweck nur ungenügende Angaben vor, für einen weiteren fehlte eine ausreichend klassifizierte kardiale Diagnose.

Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Transplantation im NYHA-Stadium III oder IV. Die Geschlechterverteilung in unserem Kollektiv folgt einem Verhältnis von 3:1 zugunsten männlicher Patienten.

Die Indikation zur Herztransplantation beruhte auf unterschiedlichen kardialen Grundleiden: Die häufigste Diagnose entfiel dabei auf die dilatative Kardiomyopathie. Für drei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sowie für einen Patienten mit restriktiver Kardiomyopathie konnte eine Virusassoziation nachgewiesen werden. Bei beiden Patienten mit restriktiver Kardiomyopathie (weiblich, 10 Jahre, sowie männlich, 22 Jahre) fanden sich keine systemischen Grundleiden und makroskopisch unauffällige Koronarien. Bei den angeborenen Vitien handelte es sich in beiden Fällen (beide männlich, 30 Jahre) um einen schwerwiegenden Ventrikelseptumdefekt, in einem Fall kombiniert mit einer linksventrikulären Hypoplasie und im anderen mit einer hochgradigen Mitralklappeninsuffizienz.

Von den sieben Patienten mit ischämisch bedingter Kardiomyopathie wurde bei vier Herzen eine 3-Gefäß-KHK klassifiziert. Ein Herz nach ausgedehntem Vorderwandinfarkt und ein Herz mit mehrfacher Bypass-Versorgung fielen ebenfalls in diese Kategorie. Ein anderes Herz wurde als ischämisch bedingte Kardiomyopathie klassifiziert, während sich die Koronarienpräparate dieses Patienten als makroskopisch weitgehend normal darstellten. Der Gefäßzustand der Präparate wurde wie bereits beschrieben bewertet; trafen in unterschiedlichen Gefäßarealen verschiedene Definitionen zu, wurde jeweils ein Punkt für den makroskopischen Zustand vergeben. Alle drei Koronarienpräparate, die als "stark sklerotisch" eingestuft wurden, gehörten zu Herzen mit ischämisch bedingter Kardiomyopathie. Alle Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sowie vier Patienten mit Kardiomyopathien ischämischer Genese waren mit einem ICD versorgt. Ein links- oder biventrikuläres Unterstützungssystem fand sich in acht der explantierten Herzen.

Für vier Patienten war keine aktuelle Medikation zu eruieren. Unter den antiadrenergen Therapeutika war Metoprolol vorherrschend (7/12 Patienten). Carvedilol und Bisoprolol

gehörten ferner zur Medikation von jeweils zwei Patienten. Reine α-antiadrenerge Substanzen kamen hingegen bei keinem Patienten zum Einsatz. Zwei Patienten waren darüber hinaus mit Phosphodiesterase-Inhibitoren vortherapiert. Im Vorfeld der Transplantation standen insgesamt sechs Patienten unter perfusorgestützter positiv inotroper Kathecholamindauertherapie.

Tabelle 3.	Zusammenfassung	der	Patientencharakteristika.	Abkürzungen:	EBV:	Ebstein-Barr-Virus;	ICD:
Implantable	Cardioverter Defibr	illat	or; <b>KMP</b> : Kardiomyopath	nie.			

Merkmal	Ausprägung im Kollektiv
Alter	10 - 61 Jahre (44,6 ± 5,3)
Geschlecht	16 männlich, 5 weiblich
Kardiale Grunderkrankung	
Dilatative KMP	9 Patienten (2 Patienten Parvovirus B 19; 1 Patient EBV)
Ischämische KMP	7 Patienten
Angeborenes Vitium	2 Patienten
Restriktive KMP	2 Patienten (1 Patient Parvovirus B19)
ICD-Implantation	13 Patienten
Ventricular Assist Devices	8 Patienten
Medikation	
Dobutamintherapie	6 Patienten
β-Blocker	12 Patienten
α-Blocker	0 Patienten
Gefäßzustand	
Zart	2 Präparate
Normal	18 Präparate
Sklerotisch	7 Präparate
Stark Sklerotisch	3 Präparate

### 3.2. Kontrollversuche zur intrinsischen Aktivität der Blockadesubstanzen

Den Versuchen mit HDL ging zunächst die Untersuchung einer möglichen intrinsischen Aktivität der Blockersubstanzen Phentolamin und Propranolol voraus.

Abbildung 5 zeigt die flussabhängige Vasomechanik in insgesamt n = 61 Versuchen an Koronarpräparaten aus demselben Patientenkollektiv und unter denselben Bedingungen wie für die HDL-Versuche. Das Ordinatenintervall zur Darstellung ist demgemäß mit 1,9 g < y < 1,2 g in Anlehnung an die HDL-Versuche gewählt. Als Trägerlösung kam Krebslösung in folgenden Ansetzungen zum Einsatz: Krebs ohne Blocker, Krebs mit Phentolamin, Krebs mit Propranolol sowie Krebs mit Phentolamin und Propranolol. Jede dieser vier Messreihen zeigt einen hyperbelartigen Tonusabfall mit Erhöhung der Flussrate. Unter zweiseitiger Testung ergeben sich für keinen Messpunkt bzw. für keine Flussrate signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Tonuswerten der vier Messreihen.



**Abbildung 5**. Flussabhängige Tonusentwicklung der Kontrollmessreihen unter Krebslösung (n=14), Krebslösung mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade (n=15), Krebslösung mit alleiniger  $\alpha$ -Blockade (n=16) sowie Krebslösung mit alleiniger  $\beta$ -Blockade (n=16).

Analog zu den Versuchen unter HDL-Einfluss untersuchten wir auch die Kontrollpräparate auf Unterschiede in den cAMP- und cGMP-Konzentrationen als Ausdruck einer möglichen intrinsischen Aktivität.

Tabelle 4 zeigt die Messergebnisse: Es liegen weder für die cAMP- noch für cGMP-Spiegel signifikante Unterschiede zwischen den vier Versuchsreihen vor. Für Krebs vs. Krebs + Phentolamin/Propranolol (p = 0,0521) bzw. Krebs + Propranolol vs. Krebs + Phentolamin/Propranolol (p = 0,0847) errechnet sich in der cAMP-Reihe zwar eine gewisse statistische Tendenz; diese wird in den cGMP-Messungen jedoch nicht bestätigt (p>0,14 bzw. p>0,43 für die entsprechenden cGMP-Messreihen).

Tabelle 4. Kontrollmessungen der zyklischen Nukleotide.

	cAMP [nmol/kg] (n)	cGMP [nmol/kg] (n)
Krebs	43,6 ± 1,6 (96)	4,2 ± 0,3 (96)
Krebs + α-Blockade	36,5 ± 2,9 (8)	3,3 ± 0,7 (7)
Krebs + β-Blockade	42,0 ± 2,9 (16)	4,0 ± 1,1 (16)
Krebs + α-/β-Blockade	35,4 ± 2,3 (16)	3,0 ± 0,5 (14)

### 3.3. Elektromechanisches Gefäßverhalten unter HDL

#### 3.3.1. Vasomechanik unter HDL-Einfluss

Abbildung 6 zeigt den flussabhängigen Verlauf des mittleren Gefäßtonus für die HDL- und die Kontrollmessreihen unter Krebslösung.

Die Applikation von HDL resultiert bei allen Flussraten in einer deutlichen Verminderung des Vasotonus gegenüber den Kontrollversuchen. Diese Vasorelaxation unter HDL-Einwirkung erreicht für jede Flussrate Signifikanzniveau (Tab. 5).

Bildet man für eine bestimmte Flussrate die Differenz aus den mittleren Tonuswerten der HDL-Reihe und den Kontrollmessungen, erhält man ein Maß für die HDL-abhängige *absolute* Tonusminderung bei dieser Flussrate:

Für Flussrate X: 
$$\Delta T_{absolut} = T_{HDL} - T_{Krebs}$$

Die absolute HDL-induzierte Relaxation beträgt für unsere Versuche im Mittel -0,236 g. Dieser relaxierende Effekt unterliegt allerdings selbst einer Flussabhängigkeit, mit dem Minimum für  $\Delta T_{absolut}$  bei einer Flussrate von 3 mL/min und dem Maximum bei der höchsten Flussrate von 100 mL/min (s. Tab. 5 und Abs. 3.5, Effektanalyse der Vasomechanik).

Des Weiteren ergibt sich für jede Messreihe ein Tonusintervall von  $T_{3mL/min}$  bis  $T_{100mL/min}$  (Abb. 6). Aufgrund des hyperbelartigen Tonusabfalls im Verlaufe der Flusssteigerung errechnet sich die *flussvermittelte* Tonusminderung entsprechend über:

Für Messreihe Y:  $\Delta T_{flow} = T_{3mL/min} - T_{100mL/min}$ 

Sie beträgt für die Kontrollversuche in Krebslösung  $\Delta T_{flow} = 0,300 \pm 0,030$  g sowie für HDL  $\Delta T_{flow} = 0,395 \pm 0,107$  g. Diese Verstärkung der flussvermittelten Relaxation unter HDL bemisst entsprechend 95 mg bzw. 32 %.



Abbildung 6. Flussabhängige Tonusentwicklung unter HDL und Kontrolle mit Krebslösung.

**Tabelle 5.** Auswertungstabelle für vasomechanische Messungen unter HDL-Einwirkung und Kontrollbedingungen.IrrW: Irrtumswahrscheinlichkeit.  $\Delta T_{absolut}$ : Tonusdifferenz der Mittelwerte.

	Tension								
Flow	3 ml/min	5 ml/min	20 ml/min	40 ml/min	100ml/min				
Krebs [g] (n)	1,889 ± 0,025 (20)	1,788 ± 0,020 (20)	1,679 ± 0,015 (20)	1,619 ± 0,009 (20)	1,589 ± 0,016 (20)				
<b>HDL</b> [g] (n)	1,708 ± 0,100 (6)	1,584 ± 0,050 (6)	1,410 ± 0,054 (6)	1,369 ± 0,027 (6)	1,313 ± 0,039 (6)				
$\Delta T_{absolut}[g]$	$-0,181 \pm 0,103$	$-0,204 \pm 0,054$	$-0,269 \pm 0,056$	$-0,250 \pm 0,028$	$-0,276 \pm 0,042$				
IrrW	p = 0,0158	p = 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001				

#### **3.3.2.** Potenzialmessungen unter HDL und Kontrolle

In Entsprechung zur Vasomechanik findet sich bei Ableitung des glattmuskulären Membranpotenzials unter HDL-Einfluss eine fortlaufende Hyperpolarisation mit Erhöhung der Flussraten (Abb. 7 und 8). Auch in den Kontrollversuchen mit Krebslösung zeigt sich ein entsprechender Potenzialabfall bei Flusserhöhung, sodass sich ein Kurvenverlauf ähnlich dem der mechanischen Kurven ergibt. Die Potenzialwerte der Kontrollmessungen sind allerdings stets positiver als die HDL-Potenziale: Es findet sich eine bei allen Flussraten hochsignifikante HDL-induzierte Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen gegenüber der Kontrolle (Tab. 6).

Die mittlere HDL-abhängige Hyperpolarisation kann den Tonusdifferenzen entsprechend berechnet werden und bemisst hier  $\Delta V_{absolut} = 1,9$  mV. Auch bei der Potenzialnegativierung zeigt sich eine Flussabhängigkeit; die stärkste HDL-induzierte Hyperpolarisation findet sich bei der maximalen Flussrate von 100 mL/min (Tab. 6).

Die *flussvermittelte* Hyperpolarisation lässt sich der Mechanik analog mittels  $\Delta V_{flow} = V_{3mL/min} - V_{100mL/min}$  bestimmen. Sie beläuft sich für Krebs auf  $\Delta V_{flow} = 2,4 \pm 0,3$  mV beziehungsweise auf  $\Delta V_{flow} = 3,2 \pm 0,1$  mV für HDL. In der elektrischen Ableitung zeigt sich damit wie für die flussvermittelte Vasorelaxation  $\Delta T_{flow}$  eine Zunahme der flussvermittelten Hyperpolarisation von 0,8 mV bzw. 32 % unter HDL-Einfluss (p<0,01 für den Unterschied in  $\Delta V_{flow}$ ).



Abbildung 7. Flussabhängige Potenzialentwicklung unter Kontrollbedingungen mit Krebslösung.



Abbildung 8. Flussabhängige Potenzialentwicklung unter HDL-Einwirkung.

**Tabelle 6.** Auswertungstabelle glattmuskulärer Membranpotenziale unter Krebslösung und HDL-Einwirkung.IrrW: Irrtumswahrscheinlichkeit.  $\Delta V_{absolut}$ : Potenzialdifferenz der Mittelwerte.

	Potential									
Flow	3 mL/min	5 mL/min	20 mL/min	40 mL/min	100 mL/min					
Krebs [mV] (n)	-47,7 ± 0,2 (51)	-48,6 ± 0,3 (41)	-49,4 ± 0,2 (47)	-49,7 ± 0,2 (71)	-50,1 ± 0,2 (57)					
<b>HDL</b> [mV] (n)	-49,2 ± 0,03 (70)	-50,6 ± 0,01 (65)	-51,1 ± 0,1 (75)	-51,6 ± 0,1 (85)	-52,3 ± 0,1 (80)					
$\Delta V_{absolut} [mV]$	$1,5 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$					
IrrW	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001					

### 3.4. Gefäßverhalten unter HDL und Blockade der Adrenorezeptoren

#### **3.4.1.** Elektromechanik unter HDL und simultaner α- und β-Blockade

Abbildung 9 zeigt die mittleren Tonuswerte der Koronariensegmente unter HDL und gleichzeitiger Applikation von Propranolol und Phentolamin.

Es fällt auf, dass der vasorelaxierende Einfluss von HDL unter Blockade von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren in flussabhängiger Weise vermindert wird. Während sich der Gefäßtonus bei den niedrigeren Flüssen noch weniger stark von der Messreihe unter alleiniger HDL-Applikation unterscheidet, nähern sich die Messdaten bei höheren Flussraten deutlich den Tonuswerten der Kontrolle an (Tab. 7). Dies erreicht für die vasomechanischen Messungen ab einer Flussrate von 40 mL/min statistische Signifikanz, während die Potenzialableitungen bereits ab einem Fluss von 5 mL/min signifikant positivere Werte als die HDL-Messreihe aufweisen (Tab. 7 und 8). Die Abschwächung der HDL-induzierten Gefäßrelaxation unter adrenerger Blockade entspricht in den elektrophysiologischen Versuchen daher einer Depolarisation im Vergleich zu den HDL-Potenzialen. Bei maximalem Fluss sind die Potenzialwerte unter  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade schließlich so viel positiver als die HDL-Potenziale, dass sie sich nicht mehr signifikant von den Kontrollversuchen unterscheiden (Tab. 8).

Des Weiteren ist unter a- und B-Blockade ein Verlust der kontinuierlichen flussvermittelten Vasorelaxation  $\Delta T_{flow}$  zu beobachten, wie sie oben für die Elektromechanik sowohl unter HDL als auch unter Kontrollbedingungen beschrieben ist. Hingegen sind das elektrische wie auch das mechanische Minimum unter HDL und adrenerger Blockade bei einer Flussrate von 40 mL/min zu verzeichnen. Besonders deutlich wird das unterschiedliche Verhalten unter HDL mit Blockade, vergleicht flussabhängigen Kurvenverlauf man den der zugehörigen Potenzialmessungen mit den HDL-Potenzialen (Abb. 8 und 10). Hier negativieren sich die mittleren Potenzialwerte unter HDL bei den letzten beiden Flusssteigerungen um -0,5 mV und -0,7 mV, während unter α- und β-Blockade das Potenzial bei der Flusserhöhung von 20 mL/min auf 40 mL/min mit -0,1 mV Veränderung nahezu stagniert und bei Steigerung auf 100 mL/min mit +0,3 mV sogar leicht depolarisiert. Hieraus ergibt sich dann auch der unterschiedliche Kurvenverlauf mit einem Nichtabfallen bzw. Wiederanstieg der Tonus- und Potenzialkurven unter HDL und adrenerger Blockade. Aufgrund dieses Anstiegs bei der höchsten Flussrate ist die flussvermittelte Relaxation für HDL und Blockade mit  $\Delta T_{flow} = 0,219 \pm 0,087$  g auch um 27 %

im Vergleich zur Kontrolle sowie um 45 % im Vergleich zu HDL vermindert. Die flussvermittelte Potenzialnegativierung ( $\Delta V_{flow} = 1,6 \pm 0,2$  mV für HDL und Blockade) erfährt gleichsam eine Reduktion von 32 % verglichen mit Krebslösung sowie von 48 % gegenüber HDL allein. Der Unterschied in  $\Delta V_{flow}$  ist allerdings nur gegenüber den HDL-Versuchen signifikant (p=0.1131 bzw. p<0,0001): Die flussvermittelte Hyperpolarisation wird unter HDL mit gleichzeitiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade auf dem Niveau der Kontrollversuche gemessen.



Abbildung 9. Flussabhängige Tonusentwicklung unter Applikation von HDL und simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade. Zum Vergleich sind die Tonuskurven für HDL allein und Krebslösung ebenfalls dargestellt.

**Tabelle 7.** Auswertungstabelle zur Vasomechanik unter HDL und simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade. IrrW: Irrtumswahrscheinlichkeit.

		Tension								
Flow		3 mL/min	5 mL/min	20 mL/min	40 mL/min	100 mL/min				
HDL und α/β - Blockade [g] (n)		1,720 ± 0,081 (7)	1,602 ± 0,015 (7)	1,513 ± 0,038 (7)	1,483 ± 0,042 (7)	1,501 ± 0,033 (7)				
IrrW	vs. Krebs	p = 0,0127	p < 0,0001	p < 0,0001 p < 0,0001		p < 0,05				
	vs. HDL	p > 0,05	p > 0,05	p = 0,1389	p < 0,05	p < 0,01				



Abbildung 10. Flussabhängige Potenzialentwicklung unter HDL und simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade.

Tabelle8.	Auswertungstabelle	zu glattmuskulären	Membranpotenzialen	unter	HDL	und	simultaner	α-	und	β-
Blockade. I	rrW: Irrtumswahrsch	einlichkeit.								

		Potential								
Flow	3 mL/min	5 mL/min	20 mL/min	40 mL/min	100 mL/min					
HDL und α/β - Blockade [mV] (n)	-49,1 ± 0,1 (15)	-50,1 ± 0,1 (18)	-50,9 ± 0,1 (19)	-51,0 ± 0,1 (20)	-50,7 ± 0,1 (21)					
IrrW vs. Krebs	p < 0,0001	p < 0,01	p < 0,0001	p < 0,01	p > 0,05					
vs. HDL	p > 0,05	p < 0,0001	p< 0,05	p< 0,05	p < 0,0001					

#### **3.4.2.** Elektromechanik unter HDL und α-Einzelblockade

Zunächst kann festgehalten werden, dass sich sowohl die mechanischen als auch die elektrischen Messergebnisse für HDL mit  $\alpha$ -Blockade insgesamt signifikant von den Ergebnissen für HDL mit gleichzeitiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade unterscheiden (Tab. 9 und 10).

Die singuläre Blockade der  $\alpha$ -Adrenorezeptoren durch Phentolamin führt zu einer deutlichen Aufhebung der HDL-induzierten Gefäßrelaxation: Ab einer Flussrate von 5 mL/min liegt der Vasotonus unter HDL und  $\alpha$ -Blockade signifikant höher als unter alleiniger HDL-Einwirkung (Tab. 9). Ergänzend hierzu lässt sich in den korrespondierenden Potenzialmessungen eine hochsignifikante Depolarisation gegenüber den HDL-Potenzialen bei allen Flussraten feststellen (Tab. 10).

Bei niedrigen Flussraten führt die  $\alpha$ -Blockade dazu, dass sich Tonus- und Potenzialwerte so sehr an die Kontrolle unter Krebslösung annähern, dass sie sich nicht mehr signifikant von ihr unterscheiden (Tab. 9 und 10). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass das Gefäßverhalten unter  $\alpha$ -Blockade bei Flussraten ab 20 mL/min von einer bloßen Aufhebung der HDL-induzierten Relaxation sogar in eine Kontraktion gegenüber den Kontrollversuchen umschlägt (Abb. 11). Während sich die Tonuswerte bei 3 – 20 mL/min auf dem Niveau der Kontrollversuche bewegen, liegen sie bei 40 und 100 mL/min signifikant höher als in den Kontrollmessungen (Tab. 9). Ein ähnliches Ergebnis ist in den entsprechenden Potenzialmessungen zu beobachten, wobei hier erst bei maximalem Fluss eine signifikante Depolarisation gegenüber Krebslösung zu verzeichnen ist (Tab. 10).

Betrachtet man des Weiteren die Entwicklung von Gefäßtonus bzw. Membranpotenzial im Verlauf der Flusssteigerungen, fällt für beide Messgrößen unter HDL mit α-Blockade ein annähernd horizontaler Kurvenverlauf ab einer Flussrate von 20 mL/min auf (Abb. 11 und 12). Hieraus ergibt sich eine Attenuierung der flussvermittelten Tonusminderung  $\Delta T_{flow}$ beziehungsweise der flussvermittelten Potenzialnegativierung  $\Delta V_{flow}$ . Unter HDL mit  $\alpha$ -Blockade beträgt  $\Delta T_{flow} = 0,141 \pm 0,087$  g, was einer Abnahme des flussvermittelten Tonusabfalls von 53 % im Vergleich zu Kontrollbedingungen bzw. 64 % verglichen mit alleiniger HDL-Einwirkung entspricht (p<0,05 bzw. p=0,0752 für Unterschiede in  $\Delta T_{flow}$ ). In sich für HDL mit  $\alpha$ -Blockade analoger Weise errechnet eine flussvermittelte Potenzialnegativierung von  $\Delta V_{flow} = 1.2 \pm 0.2$  mV; dies kommt einer Reduktion von 50 % gegenüber Krebslösung bzw. 62 % gegenüber den HDL-Versuchen gleich (p<0,01 bzw. p<0,0001 für Unterschiede in  $\Delta V_{flow}$ ). Im Vergleich zu  $\Delta V_{flow}$  unter gleichzeitiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade besteht jedoch interessanterweise kein signifikanter Unterschied (p=0,0993), d.h. die Attenuierung der flussvermittelten Hyperpolarisation erfolgt durch alleinige  $\alpha$ - sowie durch simultane  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade in vergleichbarem Ausmaß.



Abbildung 11. Flussabhängige Tonusentwicklung unter Applikation von HDL und  $\alpha$ -Blockade. Zum Vergleich sind die Tonuskurven für HDL allein und Krebs ebenfalls dargestellt.

	Tension									
Flow	3 mL/min	5 mL/min	20 mL/min	40 mL/min	100 mL/min					
HDL und α-Blockade [g] (n)	1,866 ± 0,084 (7)	1,763 ± 0,034 (7)	1,737 ± 0,038 (7)	1,720 ± 0,045 (7)	1,725 ± 0,023 (7)					
IrrW vs. Krebs	p > 0,05	p > 0,05	p = 0,0964	p < 0,01	p < 0,0001					
vs. HDL	p > 0,05	p = 0,0119	p = 0,0004	p < 0,0001	p < 0,0001					
vs. HDL + α/β-Blockade	p > 0,05	p < 0,01	p < 0,0001	p < 0,01	p < 0,0001					

Tabelle 9. Auswertungstabelle für die vasomechanischen Messungen unter HDL und  $\alpha$ -Blockade. IrrW: Irrtumswahrscheinlichkeit.



Abbildung 12. Flussabhängige Potenzialentwicklung unter HDL und α-Blockade.

		Potential								
Flow	3 mL/min	5 mL/min	20 mL/min	40 mL/min	100 mL/min					
HDL und α-Blockade [mV] (n)	-47,9 ± 0,1 (25)	-48,8 ± 0,1 (23)	-49,1 ± 0,1 (23)	-49,1 ± 0,1 (26)	-49,1 ± 0,1 (17)					
IrrW vs. Krebs	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p = 0,0927	p = 0,0161					
vs. HDL	p < 0,0001									
vs. HDL + α/β-Blockade	p < 0,0001									

Tabelle 10. Auswertungstabelle für glattmuskuläre Membranpotenziale unter HDL und  $\alpha$ -Blockade. IrrW: Irrtumswahrscheinlichkeit.

#### **3.4.3.** Elektromechanik unter HDL und β-Einzelblockade

Grundsätzlich ist festzustellen, dass sich die Messwerte unter  $\beta$ -Einzelblockade von den Messreihen unter singulärer  $\alpha$ -Blockade bzw. gleichzeitiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade unterscheiden, was für die Potenzialmessungen bei sämtlichen Flussraten Signifikanzniveau erreicht (Tab. 12). Im Gegensatz zur Einzelblockade der  $\alpha$ -Rezeptoren ist das Verhalten der Gefäßspannung unter alleiniger Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren mit Propranolol vergleichbar mit den HDL-Versuchen (Abb. 13). So liegen sowohl die Tonus- als auch die Potenzialwerte unter HDL und  $\beta$ -Blockade für alle Flussraten signifikant niedriger als unter Kontrollbedingungen. Insbesondere für Flussraten ab 20 mL/min bleibt die HDL-induzierte Vasorelaxation bzw. Hyperpolarisation somit weitgehend erhalten (Tab. 11 und 12). Für die niedrigeren Flussraten von 3 und 5 mL/min ist eine stärkere Aufhebung der HDL-induzierten Vasorelaxation zu beobachten, die jedoch aufgrund der verhältnismäßig hohen Streuung für die HDL-Messungen bei niedrigen Flüssen nicht signifikant ist. Im Gegenzug findet sich für 3 und 5 mL/min in den Potenzialmessungen allerdings doch eine signifikante Depolarisation im Vergleich zu HDL, d.h. eine Aufhebung der HDL-induzierten Hyperpolarisation für niedrige Flussraten (Tab. 12).

Des Weiteren weist der Kurvenverlauf unter HDL und β-Blockade eine interessante Besonderheit auf (Abb. 13 und 14): Bei niedrigen Flussraten sind Tonus und Potenzial der Kontrolle angenähert und liegen entsprechend über den HDL-Werten. Bei hohen Flussraten unterscheiden sich die elektromechanischen Messungen unter HDL und ß-Blockade dann nicht mehr signifikant von den HDL-Versuchen; beide liegen jedoch hochsignifikant unter den Kontrollmessungen (Tab. 11 und 12). Hieraus ergibt sich, dass die flussvermittelte Tonusabnahme bzw. die flussvermittelte Hyperpolarisation unter HDL und β-Blockade die höchsten Werte verglichen mit allen anderen Messreihen (Kontrolle, HDL, HDL +  $\alpha$ -Blockade, HDL +  $\alpha$ -/ $\beta$ -Blockade) annehmen. Für die flussvermittelte Tonusabnahme ergibt sich dabei  $\Delta T_{flow} = 0.442 \pm 0.041$  g, was signifikant höher als der entsprechende Kontrollwert ist (p=0,0139). Gegenüber den HDL-Messungen ist  $\Delta T_{flow}$  unter HDL und  $\beta$ -Blockade hingegen nicht signifikant unterschiedlich. Weiterhin besteht eine signifikante Erhöhung gegenüber alleiniger  $\alpha$ -Blockade sowie gleichzeitiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade (p<0,01 bzw. p<0,05), die  $\Delta T_{flow}$ beide vermindern, wie oben beschrieben. Auch für die flussvermittelte Hyperpolarisation findet sich mit  $\Delta V_{flow} = 3.5 \pm 0.2$  mV ein signifikant höherer Wert als unter Kontrollbedingungen (p<0,05), während kein Unterschied gegenüber  $\Delta V_{flow}$  in den HDL-Messungen besteht (p=0,0808). Gegenüber  $\alpha$ -Einzelblockade bzw. simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade ist  $\Delta V_{flow}$  unter

alleiniger  $\beta$ -Blockade hingegen deutlich gesteigert (p<0,0001 für beide). Zusammengefasst bleiben flussvermittelte Tonusabnahme und Potenzialnegativierung daher unter  $\beta$ -Blockade erhalten, während sie unter  $\alpha$ -Blockade und simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade vermindert sind.



Abbildung 13. Flussabhängige Tonusentwicklung unter Applikation von HDL und  $\beta$ -Blockade. Zum Vergleich sind die Tonuskurven für HDL allein und Krebs ebenfalls dargestellt.

	Tension								
Flow	3 mL/min	5 mL/min	20 mL/min	40 mL/min	100 mL/min				
HDL und ß-Blockade [g] (n)	1,788 ± 0,039 (7)	1,651 ± 0,020 (7)	1,466 ± 0,067 (7)	1,378 ± 0,026 (7)	1,346 ± 0,012 (7)				
IrrW vs. Krebs	p = 0,0465	p = 0,0008	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001				
vs. HDL	p > 0,05								
vs. HDL + α/β-Blockade	p > 0,05	p = 0,0736	p > 0,05	p = 0,0550	p = 0,0008				
vs. HDL + α-Blockade	p > 0,05	p = 0,0149	p < 0,01	p < 0,0001	p < 0,0001				

Tabelle 11. Auswertungstabelle für die vasomechanischen Messungen unter HDL und  $\beta$ -Blockade. IrrW: Irrtumswahrscheinlichkeit.



Abbildung 14. Flussabhängige Potenzialentwicklung unter HDL und  $\beta$ -Blockade.

Tabelle 12. Auswertungstabelle für glattmuskuläre Membranpotenziale unter HDL und  $\beta$ -Blockade. IrrW: Irrtumswahrscheinlichkeit.

	Potential								
Flow	3 mL/min	5 mL/min	20 mL/min	40 mL/min	100 mL/min				
HDL und ß-Blockade [mV] (n)	-48,5 ± 0,2 (18)	-49,5 ± 0,1 (23)	-51,3 ± 0,1 (22)	-51,8 ± 0,1 (26)	-52,0 ± 0,2 (13)				
IrrW vs. Krebs	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001				
vs. HDL	p < 0,0001	p < 0,0001	p > 0,05	p > 0,05	p = 0,0815				
vs. HDL + α/β-Blockade	p < 0,05	p < 0,01	p = 0,0174	p < 0,0001	p < 0,0001				
vs. HDL + α-Blockade	p < 0,01	p = 0,0005	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001				

#### 3.5. Effektanalyse der Vasomechanik

Abbildung 15 zeigt die Effekte von HDL allein und unter adrenerger Blockade als mechanische Spannungsdifferenz gegenüber den entsprechenden Werten in Krebslösung. So entspricht die flussabhängige Relaxation in Krebslösung in dieser Abbildung der Abszisse, d.h. y-Werte  $\neq 0$  stellen Mehreffekte gegenüber der Kontrolle bei der jeweiligen Flussrate dar.

Bezieht man sich auf das Gefäßverhalten in den verschiedenen Versuchsansätzen, so fällt zunächst auf, dass die HDL-induzierte Vasorelaxation selbst einer Flussabhängigkeit unterliegt, mit einer maximalen Relaxation bei einem Fluss von 100 mL/min. Dabei ist die Steigerung der Relaxation von 5 mL/min auf 20 mL/min mit 65 mg zusätzlichem Tonusabfall am größten.

Auch unter Blockade der Adrenorezeptoren ist eine Abhängigkeit des vasomotorischen Verhaltens von der Flussrate zu beobachten. Dem Verlauf der HDL-Kurve ähnlich, steigert sich der relaxierende Effekt unter HDL und  $\beta$ -Blockade bei den niedrigen Flüssen (76 mg Mehrrelaxation beim Umschalten von 5 mL/min auf 20 mL/min Durchfluss); bei den höheren Flussraten verbleibt er nahezu konstant. Die Inhibition der HDL-induzierten Relaxation durch  $\beta$ -Blockade ist daher vor allem bei einem Fluss von 3 und 5 mL/min zu beobachten. Im Gegensatz hierzu weist die vasomechanische Effektkurve unter HDL und  $\alpha$ -Blockade einen konträren Verlauf auf und ist durch den Verlust der flussabhängigen Relaxation gekennzeichnet. Da der Vasotonus ab einem Fluss von 20 mL/min trotz ansteigender Flussraten konstant bleibt, ergibt sich eine relative Kontraktion gegenüber der flussabhängigen Relaxation unter Krebslösung. Diese relative Kontraktion nimmt bei Flusssteigerung noch zu, da sich die Differenz zwischen Relaxation unter Krebslösung und konstantem Tonus unter HDL und  $\alpha$ -Blockade immer weiter vergrößert. Die  $\alpha$ -Blockade resultiert daher nicht nur in einer Reduktion der HDL-induzierten Relaxation, sondern kehrt diese darüber hinaus in eine Kontraktion um.

Hieraus wird augenfällig, dass die Kurvenverläufe unter  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade zueinander gespiegelt erscheinen: Der Effekt von HDL allein und HDL mit  $\beta$ -Blockade kann als flussabhängig relaxierend beschrieben werden, während sich der Effekt unter HDL und  $\alpha$ -Blockade als flussabhängig kontrahierend gegenüber der Kontrolle darstellt.

Unter gleichzeitiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade lässt sich demgegenüber festhalten, dass die Effektkurve ab 5 mL/min eine flussabhängige Tonuszunahme aufweist und sich somit dem Verlauf der Kurve unter alleiniger  $\alpha$ -Blockade annähert. Diese Tonuszunahme bei höheren Flussraten erklärt sich wie für die  $\alpha$ -Blockade durch den Verlust der flussvermittelten Relaxation (s. Abs. 3.4.1). Interessanterweise liegt der Effekt unter gleichzeitiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade ab 20 mL/min zwischen den Effektkurven der Einzelblockaden. Dies veranlasste uns zur Quantifizierung der Blockade-Effekte gegenüber der HDL-induzierten Gefäßrelaxation.



Abbildung 15. Vasomotorische Effekte von HDL allein und unter Blockade der Adrenorezeptoren.

## 3.6. Quantitative Reduktion der HDL-induzierten Vasorelaxation

Abbildung 16 zeigt die prozentuale Reduktion des relaxierenden HDL-Effektes durch Blockade der Adrenorezeptoren. Hierfür ist die HDL-induzierte Vasorelaxation bei der jeweiligen Flussrate als 100 % definiert.

Es wird ersichtlich, dass die Reduktion des HDL-Effektes durch die verschiedenen Blockadeansätze je nach Flussrate variiert. So resultiert die singuläre  $\beta$ -Blockade in einer Aufhebung des HDL-Effektes von 44 % bei 3 mL/min und 33 % bei 5 mL/min, zeigt mit  $\leq 21$  % bei höheren Flüssen aber sinkende Tendenz im Flussverlauf. Unter  $\alpha$ -Blockade hingegen steigert sich die Aufhebung des HDL-Effektes von 87 % bei 3 mL/min auf 149 % bei 100 mL/min. Hierbei entsprechen Reduktionswerte >100 % einer Umkehrung des relaxierenden HDL-Effektes in eine Kontraktion. Die simultane  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade hat ebenfalls eine im Flussverlauf zunehmende Aufhebung des HDL-Effektes zur Folge. Die Reduktion beträgt hierbei <10 % bei 3 und 5 mL/min und erreicht 68 % bei maximalem Fluss von 100 mL/min.

Hieraus folgt, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade in ihrem simultanen Zusammenwirken interessanterweise keinem additiven Schema folgen: Die größte Inhibition der relaxierenden HDL-Wirkung erfolgt nach unseren Messungen nicht durch gemeinsame  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade, sondern durch alleinige  $\alpha$ -Blockade; die zusätzliche Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren erzeugt keine weitere Inhibition der HDL-Wirkung, sondern vermindert diese. Die Interaktion zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade weist demgemäß keine additiven, sondern vielmehr modulatorisch-ausgleichende Eigenschaften auf.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass in der Reduktion der relaxierenden HDL-Wirkung quantitativ der Effekt der  $\alpha$ -Blockade im Vordergrund steht.



Abbildung 16. Prozentuale Aufhebung der flussabhängigen HDL-induzierten Vasorelaxation durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - sowie gleichzeitige  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade.

### 3.7. Flussabhängige Wichtung

Die unterschiedlichen Flusseigenschaften in der Analyse der Blockadeeffekte sowie das nichtadditive, ausgleichende Zusammenwirken bei simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade veranlassten uns zu einer qualitativen Wichtungsrechnung. Diese dient einer modellhaften Einschätzung des flussabhängigen Ansprechens der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren im Gesamteffekt der HDL-Interaktion. Hierzu wurde der Effekt unter simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade gleich 1 definiert und der erste Messpunkt zur besseren Darstellung so normiert, dass er in das Intervall zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Effekt fiel. So ergeben sich die relativen Wichtungskoeffizienten für das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ansprechen bei einer bestimmten Flussrate über:

 $\Delta Wges = \Delta W\alpha + \Delta W\beta$ 

 $\wedge \qquad \Delta Wges * \omega \alpha = \Delta W \alpha$ 

 $\wedge \qquad \mathbf{1} = \boldsymbol{\omega}\boldsymbol{\alpha} + \boldsymbol{\omega}\boldsymbol{\beta}$ 

## $\Rightarrow \qquad \Delta Wges = \omega \alpha * \Delta Wges + \omega \beta * \Delta Wges$

mit  $\Delta Wges$ : Summe der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Wirkung im Gesamteffekt der Blockade  $\Delta W\alpha$ : Wirkungsfaktor  $\alpha$  als Blockadeeffekt<sub> $\alpha/\beta</sub> – Blockadeeffekt<sub><math>\beta$ </sub>  $\Delta W\beta$ : Wirkungsfaktor  $\beta$  als Blockadeeffekt<sub> $\alpha/\beta$ </sub> – Blockadeeffekt<sub> $\alpha/\beta$ </sub>  $\omega\alpha$  und  $\omega\beta$ : Flussabhängige Wichtungskoeffizienten.</sub>

Abbildung 17 zeigt, dass das Ansprechen der  $\beta$ -Rezeptoren im Gesamteffekt rechnerisch am höchsten bei den niedrigeren Flussraten ist, während dies für  $\alpha$ -Rezeptoren umgekehrt bei den höheren Flüssen der Fall ist. Für das Verständnis der Abbildung sei erwähnt, dass es sich hierbei um ein qualitatives Modell handelt, d.h. um relatives Ansprechen, da der Effekt der Gesamtblockade wie oben beschrieben quantitativ nicht gleich verteilt ist, sondern in erster Linie einen Effekt der  $\alpha$ -Blockade darstellt (vergl. Abs. 3.6).

Die Wichtungskurve deckt sich mit der stärkeren HDL-Aufhebung durch  $\beta$ -Blockade bei niedrigen Flussraten bzw. der ausgeprägten Reduktion des HDL-Effektes durch  $\alpha$ -Blockade bei hohen Flussraten. Zudem steht das flussabhängige Ansprechen der adrenergen Rezeptoren in Einklang mit dem Kurvenverlauf in der Effektanalyse der simultanen Blockade: Bei Flussraten  $\geq 20 \text{ mL/min}$  überwiegt das Ansprechen der  $\alpha$ -Rezeptoren, was sich aufgrund ihrer größeren quantitativen Auswirkung des  $\alpha$ -Effektes (s. oben) als flussabhängig kontrahierender Effekt ähnlich der  $\alpha$ -Blockade äußert. Überdies erklärt sich in diesem Modell der Verlust der flussvermittelten Relaxation  $\Delta T_{\text{flow}}$ , wie er für den Vasotonus unter  $\alpha$ - sowie unter simultaner Blockade gemessen wurde, ebenfalls durch das erhöhte Ansprechen der  $\alpha$ -Rezeptoren bei hohen Flüssen. Dies gilt in entsprechender Weise auch für den Verlust der flussvermittelten Hyperpolarisation  $\Delta V_{\text{flow}}$  unter  $\alpha$ - bzw. simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade.



Abbildung 17. Relative Wichtungskoeffizienten des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ansprechens im Gesamteffekt der Blockade in Abhängigkeit von der Flussrate. a.u.: arbitrary units, dimensionslos.

### 3.8. Messungen der Nukleotidkonzentrationen

#### **3.8.1.** Korrelation von Vasomechanik und Nukleotidkonzentrationen

In Abbildung 18 ist der mechanische Gefäßtonus in Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration aufgetragen. Es wird ersichtlich, dass höhere intrazelluläre cAMP-Spiegel mit einem signifikant niedrigeren Vasotonus einhergehen. Umgekehrt entsprechen niedrigere cAMP-Konzentrationen einer höheren mechanischen Gefäßspannung. Diese Beziehung entspricht einer chemomechanischen Kopplung und folgt einer nicht-linearen Proportionalität, die sich grafisch als hyperbelförmige Kurve darstellt. Dies bedeutet, dass ein Anstieg des cAMP-Spiegels insbesondere im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 20 nmol/kg mit einer vergleichsweise stärkeren Vasorelaxation als bei höheren Konzentrationen ab 35 nmol/kg einhergeht.

Wie in Abbildung 19 dargelegt, findet sich eine analoge Beziehung auch für die cGMP-Messungen im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 7 nmol/kg.

Durch diesen Zusammenhang von Tonus und Nukleotidkonzentration lassen sich die cAMP- und cGMP-Werte nicht nur als biochemische Botenstoffe und Steuerungsmoleküle der intrazellulären Signalkaskaden interpretieren, sondern auch als Surrogatparameter für den Vasotonus betrachten.



Abbildung 18. Gefäßtonus in Abhängigkeit von der intrazellulären cAMP-Konzentration.



Abbildung 19. Gefäßtonus in Abhängigkeit von der intrazellulären cGMP-Konzentration.

## 3.8.2. Vergleich der Nukleotidkonzentrationen

Tabelle 13 zeigt die cAMP- und cGMP-Konzentrationen unter Kontrollbedingungen, HDL-Einwirkung sowie unter HDL mit Blockade der Adrenorezeptoren.

Zunächst fällt auf, dass sowohl die cAMP- als auch die cGMP-Spiegel unter HDL-Einwirkung signifikant höher sind als unter Kontrollbedingungen. Die Konzentrationserhöhung gegenüber Krebslösung beträgt dabei  $\Delta c = 15,7 \pm 5,0$  nmol/kg ( $\triangleq +42,1$  %) für cAMP bzw.  $\Delta c = 3,9 \pm 0,85$  nmol/kg für cGMP ( $\triangleq +95,1$  %). Die HDL-Einwirkung induziert somit einen deutlichen Anstieg der zyklischen Nukleotide, was sich unter Berücksichtigung der chemomechanischen Korrelation im niedrigeren Vasotonus und ferner im negativeren Membranpotenzial in den HDL-Messungen widerspiegelt.

Die HDL-Applikation mit gleichzeitiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade resultiert wiederum in signifikant verminderten Nukleotidkonzentrationen gegenüber alleiniger HDL-Wirkung: Während die

cGMP-Konzentration hierbei zwischen den Werten der Kontrolle und der HDL-Messreihe liegt ( $\Delta c = -2.6 \pm 0.85$  nmol/kg bzw. -32,5% gegenüber HDL), ist der cAMP-Spiegel unter simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade nicht mehr signifikant verschieden von den Kontrollversuchen ( $\Delta c = -10.7 \pm 4.0$  nmol/kg bzw. -20,2 % gegenüber HDL).

Unter alleiniger Blockade der  $\alpha$ -Rezeptoren findet sich darüber hinaus eine massive Erniedrigung der Nukleotidkonzentrationen: So sind im Vergleich zu HDL sowohl der cAMP-Spiegel ( $\Delta c = -37,0 \pm 4,9$  nmol/kg bzw. -69,8%) als auch die cGMP-Konzentration ( $\Delta c = -6,9 \pm 0,9$  nmol/kg bzw. 86,2%) hochsignifikant vermindert. Interessanterweise sind die Nukleotidkonzentrationen jedoch nicht nur gegenüber HDL verringert, sondern liegen auch signifikant niedriger als unter Kontrollbedingungen. In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, dass sich die Nukleotidbestimmungen an die elektromechanischen Messungen bei maximalem Fluss von 100 mL/min anschlossen. Die verminderten cAMP-und cGMP-Spiegel sind daher im Lichte der flussabhängigen Kontraktion zu bewerten, die in Abschnitt 3.4.2 näher erläutert ist.

Bei singulärer Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren bewegen sich die cAMP- und cGMP-Konzentrationen hingegen auf dem Niveau der Kontrollmessungen. Gegenüber alleiniger HDL-Einwirkung ergibt sich hierbei eine Reduktion von  $\Delta c = -9,0 \pm 7,5$  nmol/kg bzw. -17,0% für cAMP, was bei verhältnismäßig großer Streuung keine Signifikanz erreicht. Für cGMP resultiert die  $\beta$ -Blockade in einer signifikanten Konzentrationsabnahme gegenüber alleiniger HDL-Wirkung mit  $\Delta c = -3,7$  $\pm 1,1$  nmol/kg bzw. -46,3%.

Versuchsreihe	Messwerte (n) [nmol/kg]	IrrW vs. Krebs	vs. HDL	vs. HDL + α/β-Blockade	vs. HDL + α-Blockade	vs. HDL + β-Blockade
Krebs cAMP	37,3 ± 3,7 (32)	-	*			
Krebs cGMP	4,1 ± 0,3 (12)	-	**			
HDL cAMP	53,0 ± 3,4 (8)	*	-			
HDL cGMP	8,0 ± 0,8 (12)	**	-			
HDL cAMP + α/β- Blockade	42,3 ± 2,2 (12)	NS	**	-		
HDL cGMP + α/β- Blockade	5,4 ± 0,3 (8)	**	*	-		
HDL cAMP + α-Blockade	16,0 ± 3,6 (14)	**	***	***	-	**
HDL cGMP + α-Blockade	1,1 ± 0,4 (14)	***	***	***	-	*
HDL cAMP + β-Blockade	44,0 ± 6,7 (20)	NS	NS	NS	**	-
HDL cGMP + β-Blockade	4,3 ± 0,8 (32)	NS	**	NS	*	-

Tabelle	13.	Konzentrationsmessungen	für	cAMP	und	cGMP	in	den	verschiedenen	Versuchsreihen.	IrrW:
Irrtumswahrscheinlichkeit. p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,0001 (***); NS: Tendenz / nicht signifikant.											

## **3.9.** Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Untersuchung einer Interaktion zwischen HDL-Partikeln und den Adrenorezeptoren des sympathischen Nervensystems in Koronararterien des Menschen. Die Hauptergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Wir konnten eine HDL-abhängige Vasorelaxation an humanen Koronarien laborexperimentell nachweisen. Diese spiegelt sich in einer HDL-induzierten Hyperpolarisation der glattmuskulären Zellen sowie in einem HDL-induzierten Anstieg der second messenger cAMP und cGMP wider.
- Die HDL-vermittelte Vasorelaxation ist flussabhängig (größter relaxierender Effekt bei höchster Flussrate).

- Auch die Fähigkeit der Arterie, mit einer Relaxation auf ansteigende Flussraten zu reagieren (flussvermittelte Relaxation bzw. flussvermittelte Hyperpolarisation), wird durch HDL verbessert (über 30 %).
- Eine Blockade der Adrenorezeptoren resultiert in einer flussabhängigen Aufhebung der HDL-induzierten Gefäßrelaxation.
- Die HDL-abhängige Erhöhung der flussvermittelten Relaxation bzw. flussvermittelten Hyperpolarisation wird durch Blockade der Adrenorezeptoren rückgängig gemacht.
- Für den Verlust der flussvermittelten Relaxation bzw. Hyperpolarisation ist in erster Linie die Blockade der α-Rezeptoren verantwortlich; unter β-Blockade ist diese weitgehend erhalten.
- Bei gleichzeitiger Blockade der α- und β-Adrenorezeptoren wird die stärkste Reduktion der HDL-induzierten Gefäßrelaxation bei der höchsten Flussrate erzielt (bis zu zwei Drittel).
- Quantitativ steht bei der Aufhebung der HDL-induzierten Gefäßrelaxation die α-Blockade im Vordergrund.
- Der Effekt der simultanen α- und β-Blockade setzt sich nicht aus den Effekten der Einzelblockaden zusammen (kein additives Prinzip).
- Die Blockade der α-Rezeptoren kehrt die HDL-induzierte Relaxation bei hohen Flussraten in eine Konstriktion um; dies geht mit einer ausgeprägten Depolarisation der glattmuskulären Zellen sowie einem massiven Abfall der cAMP- und cGMP-Spiegel einher.
- Im qualitativen Modell ist die Interaktion zwischen β-Rezeptoren und HDL bei niedrigen Flussraten am stärksten ausgeprägt; die Interaktion zwischen HDL und α-Rezeptoren kommt hingegen bei hohen Flussraten am stärksten zum Tragen.
#### 4. Diskussion

#### 4.1. Interpretation der Ergebnisse

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine Interaktion zwischen HDL-Partikeln und den Adrenorezeptoren des sympathischen Nervensystems in Koronararterien des Menschen. Bei Abschluss der Monografie waren nach Kenntnis des Autors keine Studien über HDL und Adrenorezeptoren zum Vergleich vorhanden.

#### 4.1.1. Wirkung von HDL an den Adrenorezeptoren

Die Vasorelaxation als pleiotroper HDL-Effekt ist in der bestehenden Literatur für verschiedene arterielle Stromgebiete beschrieben (s. Einleitung, Abs. 1.6.4). In klinischen Studien kommen aufgrund des einfachen Zugangsweges und der nichtinvasiven dopplergestützten Untersuchungsmöglichkeit vor allem Messungen an den Brachialarterien zum Einsatz.

Eine HDL-induzierte Vasorelaxation konnten wir für menschliche Koronarien laborexperimentell bestätigen. Diese war elektromechanisch an eine Hyperpolarisation gekoppelt und ging außerdem mit einer Erhöhung der cAMP- und cGMP-Konzentrationen einher (chemomechanische Kopplung). Des Weiteren fanden wir einen positiven Zusammenhang zwischen relaxierendem HDL-Effekt und der Höhe der Flussrate. Dies steht in Einklang mit klinischen Untersuchungen, die eine verbesserte flussvermittelte Dilatation (FVD) bei hohen HDL-Werten nachweisen konnten. Da die Fähigkeit des Gefäßes, auf eine erhöhte Flussrate mit einer Dilatation zu reagieren, durch das Endothel vermittelt ist, gilt die FVD als klinischer Surrogatparameter für eine gute endotheliale Funktion. In unserer Methodik entspricht die FVD der flussvermittelten Tonusminderung  $\Delta T_{flow}$  bzw. der flussvermittelten Hyperpolarisation  $\Delta V_{\text{flow}}$ . Beide waren in unseren Messungen unter HDL um mehr als 30% erhöht, was ebenfalls auf eine Verbesserung der endothelialen Funktion unter HDL hinweist. Hierfür spricht auch der signifikante Anstieg des cGMP-Spiegels unter HDL, da dieser essenziell von der endothelialen NO-Freisetzung durch die eNOS abhängt (s. Abs. 1.6.2).

Die HDL-induzierte Vasorelaxation konnte durch Blockade der Adrenorezeptoren in flussabhängiger Weise aufgehoben werden. Daraus schließen wir, dass der relaxierende

vasomotorische Effekt der HDL-Partikel an menschlichen Koronarien zum Teil über eine flussabhängige Interaktion mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren vermittelt ist.

Quantitativ ist diese Aufhebung der HDL-vermittelten Relaxation bei hohen Flussraten am höchsten, woraus wir folgern, dass die Interaktion von HDL mit den Adrenorezeptoren insgesamt bei höheren Flussraten am stärksten ausgeprägt ist.

Da sich die Ergebnisse der Messreihen für HDL und α-Blockade, HDL und β-Blockade sowie HDL und simultaner  $\alpha$ -/ $\beta$ -Blockade jeweils signifikant voneinander unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei nicht um unspezifische Blockadeeffekte handelt. Eine intrinsische Aktivität der Substanzen wurde zudem in einer Serie von Kontrollversuchen ausgeschlossen. Die Blockade der α-Rezeptoren hatte hierbei die stärkste Aufhebung der HDLvermittelten Relaxation zur Folge; dies resultierte für hohe Flussraten sogar in einer Umkehr der Relaxation in eine Kontraktion. Hieraus schließen wir, dass die Interaktion zwischen HDL und den α-Rezeptoren quantitativ einen stärkeren Einfluss hat als die β-Blockade. Für letztere war die Aufhebung der Relaxation bzw. Hyperpolarisation vor allem bei niedrigen Flussraten relevant. Denkbar ist, dass die weitgehend erhaltende Vasorelaxation unter HDL und Propranolol Ausdruck einer HDL-Wirkung an den  $\beta_3$ -Rezeptoren ist. Diese wurden in jüngerer Zeit im Endothel humaner Koronarien nachgewiesen und führen bei Aktivierung zu einer glattmuskulären Hyperpolarisation und NO-abhängigen Vasodilatation (Näheres hierzu in Abs. 4.3).<sup>98</sup> Außerdem weist Propranolol eine hohe Lipophilie auf.<sup>87</sup> Vorstellbar ist daher auch eine Einlagerung von Blockermolekülen in die HDL-Partikel, wodurch die Interaktion zwischen HDL und den β-Rezeptoren weniger effektiv geblockt sein könnte.

Die Messungen unter simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade und alleiniger  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Blockade lieferten das überraschende Ergebnis, dass sich die HDL-aufhebenden Effekte von  $\alpha$ -Blockade und  $\beta$ -Blockade bei gleichzeitiger Applikation nicht addieren, sondern ausgleichen, sodass der Effekt der gleichzeitigen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade zwischen den Effekten der Einzelblockaden liegt. Dieses Ergebnis bestätigte sich sowohl in den Potenzialmessungen als auch in den cAMP- und cGMP-Werten. Der Grund hierfür ist nicht offensichtlich und bedarf in jedem Fall weiterer Untersuchungen. In Frage kommen unter anderem Proteininteraktionen zwischen Partikel und Rezeptor, allosterische HDL-Anlagerung, Einlagerungseffekte der Blockadesubstanzen, Bindung des HDL an andere Membranstrukturen wie den Flow-Sensor oder den Scavenger Receptor B I sowie eine ausgleichende Nettowirkung der intrazellulären Signalkaskaden. Andererseits ließ sich über eine modellhafte Wichtungsrechnung ein stärkeres Ansprechen der  $\beta$ -Rezeptoren für niedrige Flussraten und ein stärkeres Ansprechen der  $\alpha$ -Rezeptoren für hohe Flussraten beschreiben. Dies könnte in der Folge bedeuten, dass in den kleineren Gefäßen und der Mikrozirkulation, wo die Flussraten in vivo niedriger sind, die Interaktion von HDL und  $\beta$ -Rezeptoren relevant ist. Umkehrt wäre in den größeren Conduit-Arterien mit höheren physiologischen Flussraten die  $\alpha$ -Wirkung entscheidend. In der Tat bewirken  $\alpha$ -Agonisten an diesem Arterientypus eine besonders starke glattmuskuläre Kraftsteigerung über intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung.<sup>44</sup> Da unsere Versuche in epikardialen und hauptstammnahen Koronarsegmenten erfolgten, könnte dies auch erklären, warum in unseren Messungen die  $\alpha$ -Blockade bei der Aufhebung der HDL-induzierten Vasorelaxation quantitativ im Vordergrund stand.

Im Hinblick auf die direkten vasomotorischen HDL-Wirkungen am glatten Gefäßmuskel sind die klinischen Studien uneinheitlich. In früheren Untersuchungen an unserem Institut zeigte sich, dass VLDL auch noch in endothelfreien Koronarpräparaten die flussabhängige Vasorelaxation reguliert.<sup>82</sup> Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen dagegen, dass der glatte Gefäßmuskel als reiner Effektor des Endothels fungiert. Der starke cAMP-Anstieg und die hochsignifikante glattmuskuläre Hyperpolarisation unter HDL-Wirkung waren durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade reversibel. Bekanntermaßen finden sich auf der glattmuskulären Zellmembran  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Rezeptoren, über die die sympathische Regulation der Gefäßweite ebenfalls erfolgt.<sup>58</sup> Bezüglich einer Interaktion zwischen HDL und dem sympathischen Nervensystem ist daher nicht einleuchtend, warum diese nur an endothelialen Adrenorezeptoren erfolgen sollte.

# 4.1.2. Vorschlag eines Wirkungsmechanismus

In Anbetracht der Ergebnisse liefern wir mit der vorliegenden Arbeit erstmals Hinweise auf eine Interaktion zwischen den Adrenorezeptoren des sympathischen Nervensystems und HDL-Partikeln im Menschen.<sup>99</sup>

Diese Interaktion trägt zur gefäßrelaxierenden Wirkung der HDL-Partikel an Koronararterien bei und ist für Flussraten ab 20 mL/min besonders ausgeprägt. Auf Basis unserer Ergebnisse schlagen wir als Mechanismus eine Anlagerung der HDL-Partikel an die Adrenorezeptoren mit flussabhängiger Wirkung vor, die in einer verminderten Aktivität der vasokonstriktorischen Signalkaskaden und einer Aktivierung der relaxierenden Signalkaskaden resultiert.

Die Darstellung in Abbildung 20 zeigt demgemäß für die β-Adrenorezeptoren eine G-Proteinvermittelte Aktivierung der Adenylylcyclase mit Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel und Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die über eine Phosphorylierung der eNOS zur erhöhten NO-Freisetzung aus dem Endothel und Aktivierung der Guanylylcyclase im glatten Muskel führt. Der cGMP-Gehalt steigt daraufhin an und resultiert in einer Aktivierung der Proteinkinase G, die zusammen mit der Proteinkinase A zu einer kanalvermittelten Hyperpolarisation, einem verminderten intrazellulären Calciumspiegel und damit letztlich zur Vasorelaxation führt. Für  $\beta_1$ -Rezeptoren bedeutet dies zudem eine PKA-vermittelte Hyperpolarisation durch K<sup>+</sup>-Ausstrom und Ca<sup>2+</sup>-Senkung. Diese Vorstellung deckt sich mit unseren Ergebnissen, in denen HDL einen Tonusabfall, eine Hyperpolarisation und einen Anstieg von cAMP und cGMP induzierte.

Demgemäß könnte HDL am glatten Muskel eine verminderte Aktivität der  $\alpha_1$ -vermittelten Signalkaskade bewirken, was mit einer verminderten Produktion des Botenstoffs IP<sub>3</sub> und damit in einer Unterdrückung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms von extrazellulär und aus dem sarkoplasmatischen Retikulum einherginge.

Für die  $\alpha_2$ -Rezeptoren ist klassischerweise eine vasokonstriktorische Wirkung über ein inhibitorisches G-Protein mit verminderter Aktivität der Adenylylcyclase beschrieben.<sup>44,100</sup> Allerdings liegen inzwischen auch Hinweise auf eine dilatatorische Wirkung über die Akt-Kinase mit Aktivierung der eNOS und erhöhter Prostacyclin-Freisetzung vor.<sup>58</sup> Hierzu muss jedoch einschränkend angemerkt werden, dass die betreffenden Studien vor allem an Rattengefäßen erfolgten.<sup>61,101</sup> Die Problematik der speziesabhängigen Adrenorezeptor-Verteilung ist im Abschnitt 4.3.1 ausführlicher erläutert. Andererseits ist der  $\alpha_2$ -Agonist Clonidin ein potentes Antihypertensivum, und es ist durchaus plausibel, dass dieser Effekt nicht nur präsynaptisch und zentralnervös, sondern auch direkt endothelial vermittelt wird.<sup>61</sup> Im Hinblick auf unsere Ergebnisse ist daher eine aktivierende Wirkung mit erhöhter Freisetzung von Prostacyclin und Aktivierung der eNOS denkbar; ebenso könnte jedoch eine Disinhibition der Adenylylcyclase-Aktivität eine relaxierende Wirkung mit verursachen. Vorstellbar ist ferner auch eine partialagonistische Wirkung, wie sie bei pharmakologischer Blockade vorkommt, oder eine Beeinflussung beider Effekte.



Abbildung 20. Wirkungshypothese zur Interaktion von HDL und Adrenorezeptoren. Demnach bewirken HDL-Partikel je nach Rezeptortyp eine Aktivierung ( $\rightarrow$ ) oder Inaktivierung ( $\downarrow$ ) der intrazellulären Signalkaskaden. Die entsprechenden G-Proteine sind mit ihren a-, β- und γ-Untereinheiten dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen transzelluläre Effekte an. Grün unterlegte Parameter wurden in unseren Messungen erfasst. Abbildung durch den Autor erstellt. Abkürzungen:  $a_s / a_i$ : aktivierende bzw. inhibitorische  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine; AC: Adenylylcyclase; Akt: Proteinkinase B, die als Mediator der PI<sub>3</sub>K wirkt; AA: Arachidonsäure; ATP: Adenosintriphosphat; CAM: Calmodulin; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; COX: Cyclooxygenase; CREB: cAMP response element-binding protein; DAG: Diacylglycerol; EC: Endothelzelle; eNOS: endotheliale NO-Synthase; GC: Guanylylcyclase; GTP: Guanosintriphosphat; IP3: Inositoltrisphosphat; L-Arg: Aminosäure L-Arginin; MLCK: Myosin-Leichtketten-Kinase; MLCP: Myosin-Leichtketten-Phosphatase; NO: Stickstoffmonoxid; PCS: Prostacyclinsynthase; PGH2: Prostacyclin; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PIP2: Membranlipid Prostaglandin H2; **PGI2**: Phosphatidylinositolbisphosphat, aus welchem DAG und  $IP_3$  als second messenger abgespalten werden; PKA: Proteinkinase A; PKG: Proteinkinase G; PL: Phospholipide; PL-A2: Phospholipase A2; PLC: Phospholipase C; SR: sarkoplasmatisches Reticulum; VSM: vaskulärer glatter Muskel.

# 4.2. Diskussion der Wirkungshypothese

#### 4.2.1. Funktionelle Aspekte bei der Interpretation

Eine wichtige Konsequenz unserer Wirkungshypothese besteht darin, dass eine HDL-induzierte relaxierende Signalkaskade über cAMP nicht nur die akuten Effekte auf Membranpotenzial und Vasotonus beinhaltet, sondern über den Transkriptionsfaktor cAMP response element-binding protein (CREB) auch Effekte auf die Proteinbiosynthese vermitteln könnte. In der Tat zeigten Schauer et al. kürzlich, dass die Einwirkung von oxLDL im glatten Gefäßmuskel der Ratte zu einer Verminderung der CREB-Expression führt; interessanterweise resultierte neben der Fettstoffwechselstörung auch ein Bluthochdruck in der CREB-Downregulation.<sup>102</sup> CREB wirkt Expression von Wachstums-, Migrationsund reguliert die und antiapoptotisch Proliferationsgenen in glatten Muskelzellen; ein niedriger CREB-Spiegel ist hingegen mit Hyperglykämie, oxidativem Stress und einem proliferativen Phenotyp der glatten Muskelzellen assoziiert und scheint in der arteriosklerotischen Plaqueprogression mitzuwirken.<sup>103</sup> Viele der CREB-Regulationsvorgänge sind  $Ca^{2+}$ -abhängig und erfolgen bei intrazellulärem  $Ca^{2+}$ -Anstieg zusammen mit der glattmuskulären Kontraktion.<sup>103</sup> In unseren Messungen resultierte die HDL-Einwirkung in einem signifikanten cAMP-Anstieg, der durch Adrenorezeptorblockade reversibel war. Wir vermuten daher eine HDL-induzierte Erhöhung des CREB-Gehaltes mit dem Potenzial einer antiatherogenen Genregulation. Dies bedarf dringend weiterer Untersuchungen und lässt zelluläre Langzeitwirkungen der HDL-Adrenorezeptor-Interaktion erwarten, deren Folgen im Hinblick auf die kardiovaskuläre Pharmakotherapie sowie auf die Pathogenese der Arteriosklerose nicht abzuschätzen sind.

Ein komplexer Aspekt in der mechanistischen Interpretation der Ergebnisse ergibt sich durch die Tatsache, dass eine Interaktion der HDL-Partikel mit den postganglionären Varikositäten des Sympathikus nicht auszuschließen ist. Diese bilden an der Media-Adventitia-Grenze variable synaptische Verbindungen mit den glatten Muskelzellen und enthalten Noradrenalinvesikel und  $\alpha_2$ - sowie  $\beta_2$ -Rezeptoren (s. Einleitung, Abs. 1.6.3).<sup>57</sup> In unseren Versuchen ist eine Interaktion der HDL-Partikel mit den Adrenorezeptoren der Varikositäten vorstellbar, da die Versuchslösungen in der Messkammer nicht nur die luminale, endotheliale Seite, sondern auch die untere, adventitia-Grenze mit den präsynaptischen Rezeptoren interagieren können, ist fraglich und daher für den physiologischen Effekt der HDL-induzierten Vasorelaxation vermutlich von untergeordneter Bedeutung.

Da die Blockade der Adrenorezeptoren mit einer Verminderung der HDL-induzierten Vasorelaxation einhergeht, ist primär davon auszugehen, dass die Interaktion über diejenigen Bindungsstellen an den Adrenorezeptoren vermittelt ist, an denen auch die Blockadesubstanzen angreifen. Insbesondere im Hinblick auf das komplexe, nichtadditive Zusammenwirken bei simultaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockade ist jedoch eine nichtorthosterische Partikelbindung an einer anderen oder einer weiteren Rezeptordomäne (allosterische Bindung) nicht unwahrscheinlich. In der Tat veröffentlichten Staus et al. im März 2014 eine Arbeit, in der am Beispiel des  $\beta_2$ -Rezeptors deutlich wird, dass die Aktivität der G-Protein-vermittelten Signalkaskade von der Konformation des Rezeptors abhängt und dass diese durch allosterische Bindung am Rezeptor fixiert werden kann.<sup>104</sup>

# 4.2.2. Einbindung in die aktuelle mechanistische Konzeption

Insgesamt muss auf dem jetzigen Stand davon ausgegangen werden, dass die HDL-induzierte Vasorelaxation das Ergebnis einer Summation verschiedener komplexer Interaktionen ist. Für das Zusammenwirken mit den Adrenorezeptoren bedeutet dies, dass sich die HDL-Wirkungen an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen offenbar zu einem Nettowert von Membranpotenzial und Vasotonus summieren. Neben der adrenergen Interaktion gehören aber insbesondere auch eine Wirkung am Flow-Sensor, der Einfluss bioaktiver Lipide sowie Scavenger-Receptor-B-I-(SR BI)-vermittelte Effekte auf die eNOS zu diesen Summationsfaktoren.

So zeigten Siegel et al. in einem ellipsometrischen Modell der endothelialen Glykokalix, dass HDL mit der höchsten Affinität aller Lipoproteine an Heparansulfatketten von Proteoglykanen bindet und dort die LDL-induzierte Bildung von Ca<sup>2+</sup>-haltigen Nanoplaques verhindert.<sup>105</sup> Neben dieser Rezeptorfunktion für Lipoproteine, über die auch eine Apolipoprotein-E-abhängige zelluläre Aufnahme der Partikel vermittelt wird, erfüllen Heparansulfat-Proteoglykane die Rolle eines endothelialen Flusssensors.<sup>10,91,106</sup> Für die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass die HDLinduzierte Erhöhung der flussvermittelten Vasorelaxation  $\Delta T_{flow}$  wahrscheinlich durch die Bindung der Partikel am Flow-Sensor mitbedingt war. Andererseits war  $\Delta T_{flow}$  unter Blockade der Adrenorezeptoren vermindert, was dafür spricht, dass die Interaktion von HDL mit den αund β-Rezeptoren ebenfalls einen Einfluss auf die flussvermittelte Relaxation hat. Hier besteht kein Widerspruch: Die Aktivierung des Flusssensors resultiert in einer Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Prostacyclin.<sup>10</sup> und Dem oben Freisetzung von NO vermittelten postulierten Wirkungsmechanismus zufolge führt auch die HDL-Interaktion mit den Adrenorezeptoren zu einer erhöhten NO- und Prostacyclin-Produktion, sodass beide Mechanismen über dieselbe intrazelluläre Endstrecke synergistisch zusammenwirken könnten.

Des Weiteren konnten Nofer et al. nachweisen, dass auch bioaktive Lipide - insbesondere Sphingosin-1-Phosphat (S1P) – in humaner Zellkultur eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige und Akt-Kinasevermittelte eNOS-Aktivierung bewirken.<sup>77</sup> Die bioaktiven Lipide konnten in dieser Arbeit auch allein eine eNOS-Aktivierung auslösen, allerdings in 30-fach höherer Konzentration als sie in nativem HDL vorkommen.<sup>77</sup> Im Rattenmodell konnten Nofer et al. hingegen 50-60 % der HDLinduzierten Vasorelaxation durch Ausschaltung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors aufheben.<sup>77</sup> Dies spricht für die Vorstellung, dass die vasorelaxierende Wirkung von HDL über verschiedene Mechanismen vermittelt ist, die in einer gemeinsamen intrazellulären Kaskade zusammenlaufen. In der Tat ist S1P im Plasma zu 60 - 85% an HDL gebunden und bildet einen potenziellen Mediator für viele pleiotrope HDL-Effekte - vasomotorische, antithrombotische, antioxidative und antiapoptotische Wirkungen eingeschlossen.<sup>107,108</sup> Theilmeier et al. bestätigten dies mit der Beobachtung im Mausmodell, dass HDL die ischämische Läsion bei kardialer Minderperfusion verringern konnte, was ebenfalls S1P-abhängig und NO-vermittelt war.<sup>109</sup> Insgesamt zeigt sich mit Bezug auf unsere Ergebnisse, dass auch hinsichtlich der S1P-Wirkungen eine gemeinsame intrazelluläre Endstrecke über die eNOS besteht. Zudem sei hier auf die indirekt vasorelaxierende Wirkung des a2-Rezeptors verwiesen, die eine weitere gemeinsame Signalkaskade über die Akt-Kinase darstellen könnte.

Überdies liegt experimentelle Evidenz dafür vor, dass eine HDL-induzierte eNOS-Aktivierung über die Bindung an den SR BI erfolgt und die Anwesenheit von Apolipoprotein A I erfordert.<sup>76</sup> Interessanterweise fanden Li et al. in Ovarialzellen vom Hamster, dass die eNOS-Aktivierung über den SR BI weder über Ca<sup>2+</sup> noch über die Akt-Kinase vermittelt war, sondern mit einer Erhöhung der intrazellulären Ceramide als bioaktive Lipide einherging.<sup>110</sup> Obwohl auch Ca<sup>2+</sup>- unabhängige Mechanismen der eNOS-Aktivierung bekannt sind, steht dies im Widerspruch zu den bisher postulierten Wirkungsmechanismen und ist eventuell mit der Auswahl des Zellmodells und der verhältnismäßig niedrigen HDL-Konzentration ( $\leq 5$  mg/dL) in Verbindung zu bringen.<sup>110</sup>

Insgesamt ist auch vorstellbar, dass die Bindung an den SR BI erfolgt, um eine Freisetzung anderer Mediatoren wie S1P erst zu ermöglichen. Dies ist auch für die Interaktion mit den Adrenorezeptoren plausibel und würde etwa erklären, warum eine längere Inkubationszeit mit HDL einen Einfluss auf unsere Messungen bei den ersten Messzeitpunkten gehabt haben könnte (s. Studienlimitationen, Abs. 4.3.2).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass HDL offenbar mit verschiedenen Rezeptoren interagiert, zu denen der Flusssensor, der Sphingosin-1-Phosphatrezeptor 3, der Scavenger Receptor B I und die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren gehören. Nach derzeitigem Stand scheinen sie über synergistische intrazelluläre Endstrecken auf die eNOS und über zyklische Nukleotide zu wirken. Unsere Ergebnisse fügen sich damit gut in die aktuellen mechanistischen Vorstellungen zur HDL-induzierten Vasorelaxation ein und ergänzen diese um einen weiteren Wirkungsansatz.

#### 4.3. Methodische Reflexionen

### 4.3.1. Experimentelle Aspekte

Im Folgenden sollen einige Gesichtspunkte zu den Vor- und Nachteilen unserer experimentellen Vorgehensweise beleuchtet werden.

Einen grundsätzlichen Vorteil stellt hierbei die Forschung an menschlichem Gewebe dar. Hierzu gewannen wir Koronarienpräparate von Transplantationspatienten wie im Methodikteil näher beschrieben. Dieses Verfahren weist zwei wesentliche Vorzüge auf: Zum einen erhöht die Forschung an menschlichem Gewebe die Aussagekraft der Ergebnisse, will man sie als Teil der menschlichen Physiologie interpretieren; diese Übertragbarkeit auf den Menschen ist für tierexperimentelle Versuche zu Adrenorezeptoren nur äußerst eingeschränkt gegeben (s. folgende Abschnitte). Zum anderen betreffen die Experimente an Koronarien von Herzinsuffizienten eine Patientengruppe, die langfristig von den grundlagenwissenschaftlichen Untersuchungen und den darauf aufbauenden Erkenntnissen profitieren soll.

Gleichwohl soll erwähnt werden, dass die verschiedenen klinischen Merkmale des Patientenkollektivs als potenzielle Confounder in Betracht gezogen werden müssen. Hierzu zählen insbesondere die adrenotrope Vormedikation der Patienten, Alter, Geschlecht sowie die der Herztransplantation zugrundeliegende Pathologie. Auf Letzteres wurde bereits in Abschnitt 2.1 eingegangen, wobei insbesondere die Verwendung von plaquefreien Segmenten aus fokal arteriosklerotischen Gefäßen methodisch gerechtfertigt ist. Die Vormedikation der Patienten hatte in vorangegangen Experimenten unseres Institutes keinen signifikanten Einfluss auf die Gefäßreagibilität der Koronarien.<sup>59</sup> Alter und Geschlecht sind hingegen grundlegende physiologische Variablen, deren Einfluss immer mehr im Fokus der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit steht.<sup>111</sup> In der Tat zeigten frühere Experimente unserer Arbeitsgruppe, dass die Koronarien jüngerer Patienten tendenziell einen niedrigeren Ruhetonus aufweisen.<sup>59</sup> Für eine präzise Korrelation der laborexperimentellen Ergebnisse mit Alter und Geschlecht wäre jedoch eine größere Zahl an Patienten erforderlich, die angesichts des aktuellen Transplantations-aufkommens kaum zu realisieren scheint (s. Studienlimitationen).

Zwar wären Versuche an tierischen Gefäßen eine grundsätzliche Möglichkeit, die Stichprobenanzahl zu erhöhen, allerdings gibt es für unsere Zwecke wichtige Argumente gegen ihre Anwendung. Die Verteilung der Adrenorezeptortypen in den arteriellen Gefäßen verschiedener Säugetierspezies stellt sich außerordentlich heterogen dar.<sup>54</sup> Dies resultiert in einer speziesabhängigen Reaktion auf katecholaminerge Stimuli. In einer Vergleichsstudie von Toda et al. reagieren Koronarien vom Menschen und Affen beispielsweise mit einer Kontraktion auf die Applikation von Dopamin, während diese beim Hund eine Relaxation auslöst.<sup>112</sup> Durch die unterschiedliche Rezeptorverteilung bei Ratte, Kaninchen, Schwein, Hund und Mensch lässt ein tierexperimenteller Ansatz in der Untersuchung der Adrenorezeptoren nur sehr eingeschränkt sinnvolle Rückschlüsse auf die physiologischen Mechanismen beim Menschen zu.<sup>54,58,59</sup>

Unklar bleibt des Weiteren der Einfluss eventuell vorhandener Antikörper gegen Adrenorezeptoren. Insbesondere Antikörper gegen  $\beta_1$ -Rezeptoren sind Gegenstand aktueller Forschung – vor allem im Hinblick auf die dilatative Kardiomyopathie, an welcher der Großteil unseres Patientenkollektivs litt.<sup>113</sup> In den fortgeschrittenen Krankheitsstadien, die zur Indikation einer Herztransplantation führen, werden  $\beta_1$ -Rezeptoren-Antikörper in 80-90% der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nachgewiesen.<sup>114</sup> Es existiert Evidenz dafür, dass die chronische Stimulation der  $\beta_1$ -Rezeptoren durch diese Antikörper unter anderem zu einer Downregulation der Rezeptorendichte und einer Desensitivierung der Rezeptoren führt.<sup>115</sup> Eine chronische Einwirkung von  $\beta_1$ -Antikörpern könnte daher dazu führen, dass unsere Messergebnisse bezüglich des HDL-Effektes und der adrenergen Blockade im Mittel geringer ausfallen als im kardiovaskulär gesunden Menschen.

Dies hängt ebenfalls mit der Frage zusammen, welche Subtypen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren hauptsächlich für die gemessene Interaktion mit den HDL-Partikeln verantwortlich sind. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit vorherigen Studien aus unserem Institut setzten wir in unseren

Versuchen nichtselektive Blockadesubstanzen ein. Dies hatte außerdem den Vorteil, dass wir nur zwei verschiedene Substanzen applizieren mussten und somit eine mögliche Interaktion in jeder Blockade-Messreihe mit höherer Fallzahl untersucht werden konnte. Offen bleibt daher jedoch auf dem aktuellen Stand, welche Rezeptorsubtypen für die HDL-Interaktion entscheidend sind. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die potenzielle Rolle der noch weniger gut untersuchten  $\beta_3$ -Rezeptoren, die in vielen Modellen eine vasodilatatorische Wirkung zeigen und durch Propranolol nicht umfassend antagonisiert werden.<sup>58,116</sup> Zudem zeigen neuere Erkenntnisse, dass Phentolamin zwar alle Subtypen der  $\alpha_1$ -Rezeptoren blockt, allerdings mit etwas unterschiedlicher Affinität (am höchsten für  $\alpha_{1A}$ ).<sup>54,117</sup>

Ein wichtiger methodischer Vorteil unserer Arbeit besteht im Vergleich mit ähnlichen Experimenten in der Tatsache, dass die Vorspannung der Gefäße auf Blutdruckniveau nicht pharmakologisch, sondern mechanisch erfolgte. Für eine chemische Vorkontraktion der Gefäße ist die Applikation von hochdosiertem Kalium oder Sympathikomimetika wie Phenylephrin ein gängiges Verfahren.<sup>59</sup> Dies hat jedoch zum Nachteil, dass von einer Manipulation der intrazellulären Signalkaskaden ausgegangen werden muss, die es ja gerade zu untersuchen gilt. Exemplarisch fanden etwa Chen et al., dass eine Vorspannung mit Phenylephrin die arterielle Reagibilität für Serotonin im Kaninchen erhöht.<sup>118</sup> Insbesondere eine katecholaminbasierte Vorspannung der Gefäße erscheint für unsere Versuche nicht sinnvoll, da es die Interpretation der Ergebnisse unter HDL und Blockade der Adrenorezeptoren unmöglich machen würde. Zudem kann man argumentieren, dass eine mechanische Vorspannung dem physiologischen Spannungszustand als Korrelat zum Blutdruck eher entspricht als der Einsatz von vasokonstriktorischen Substanzen.

Ein ähnlicher Gesichtspunkt findet sich in Bezug auf die HDL-Konzentrationen. Wir setzten hier mit c = 50 mg/dL eine Konzentration im physiologischen Bereich ein. Vergleichbare Studien arbeiten teilweise mit sehr hohen (100 mg/dL) oder sehr niedrigen HDL-Konzentrationen (1-5 mg/dL).<sup>110,119</sup> Dies ist einerseits hinsichtlich der mechanistischen Vergleichbarkeit problematisch und wirft andererseits die Frage auf, inwiefern die so gefunden HDL-Effekte auf die physiologische Funktion in vivo übertragbar sind.

#### 4.3.2. Studienlimitationen

Eine methodenspezifische Limitation dieser experimentellen Studie besteht in der verglichen mit klinischen Untersuchungen niedrigeren Fallzahl von insgesamt 22 Patienten. Dies steht insbesondere im Zusammenhang mit der abnehmenden Rate an Herztransplantationen. Kürzlich veröffentlichten Daten der Deutschen Stiftung Organtransplantation und Eurotransplant zufolge belief sich die Zahl aller Herztransplantationen in Deutschland für das Jahr 2013 auf 313; im Vergleich hierzu waren es 2010 noch 393 durchgeführte Eingriffe.<sup>120</sup>

Bei Betrachtung der Messergebnisse fällt auf, dass für die Tonuswerte bei der initialen Flussrate von 3 mL/min (1. Messpunkt) eine verhältnismäßig größere Streuung zu verzeichnen ist als für die darauf folgenden Flussraten. Dies führt für die Messwerte bei niedrigen Flussraten sowie für abgeleitete Größen wie die flussvermittelte Tonusminderung  $\Delta T_{flow}$  teilweise zu nicht signifikanten Irrtumswahrscheinlichkeiten. Die größere könnte Streuung damit zusammenhängen, dass zum Zeitpunkt der Erfassung des Messwertes für 3 mL/min erst eine HDL-Einwirkung von 10 Minuten bestand. Denkbar ist daher, dass die HDL-induzierte Vasorelaxation eine minimale Inkubationszeit benötigt, die für die früheren Messzeitpunkte zu unsichereren Werten führt. Dies ist insofern plausibel, als dass die luminale Gefäßwand in vivo ständig mit zirkulierendem HDL in Kontakt treten kann, während wir Präparation, Lagerung, Transport und Vorbereitung der Koronarien in HDL-freier Blutersatzlösung durchführten.

Eine wichtige Studienlimitation qualitativer Art ergibt sich ferner bei der mechanistischen Für Interpretation der Ergebnisse. die Interaktion zwischen HDL-Partikeln und Adrenorezeptoren stellt sich die Frage, welche Partikelkomponenten oder welche Subpopulation für das molekulare Zusammenwirken mit den Adrenorezeptoren entscheidend sind. Für die Partikelanteile kommen hier neben Lipiden (vor allem Phospholipide) und Apolipoproteinen (insbesondere Apo A-I) auch HDL-assoziierte Enzyme und Plasmaproteine in Betracht. Da wir in unseren Experimenten gepooltes HDL von verschiedenen gesunden Probanden verwendeten, lässt sich hierzu keine spezifische Aussage treffen. Allerdings hat dieses Verfahren den Vorteil, dass Messverfälschungen durch dysfunktionale HDL-Partikel unwahrscheinlich sind (s. Abs. 4.5.1). Ferner könnten auch die Genotypen der Apolipoprotein-Allele einen Einfluss auf die Rezeptorinteraktion haben. Für den Apo-E-Genotyp in VLDL-Partikeln wurde ein Effekt auf die Gefäßreagibilität von menschlichen Koronarien bereits an unserem Institut gezeigt.<sup>82</sup> Bezüglich der HDL-induzierten Gefäßreaktionen stellt sich daher die Frage nach der funktionellen Relevanz der strukturellen HDL-Heterogenität, was im folgenden Abschnitt genauer beleuchtet werden soll.

# 4.4. Funktionelle HDL-Heterogenität hinsichtlich der Vasorelaxation

Wie in Abschnitt 1.4 der Einleitung ausgeführt, zeigt die HDL-Fraktion nicht nur eine Bezug strukturelle, sondern auch eine funktionelle Diversität in auf die Partikelzusammensetzung. Hierzu sind bisher erst wenige Untersuchungen veröffentlicht. Diese zeigen jedoch in Ansätzen, dass die heterogene Partikelkomposition offenbar auch für die HDLinduzierte Vasorelaxation relevant ist. So findet sich das bioaktive Sphingosin-1-Phosphat, für das eine Mediatorfunktion in der HDL-induzierten Vasorelaxation postuliert wird (s. Abs. 4.2.2), vor allem in der dichteren und kleineren HDL<sub>3</sub>-Population.<sup>25</sup> Dies ist allerdings nur eingeschränkt konsistent mit Ergebnissen zur HDL-vermittelten Produktion von Arachidonsäurederivaten. Während die HDL<sub>2</sub>- und die HDL<sub>3</sub>-Populationen die Freisetzung von relaxierendem Prostacyclin in vergleichbarem Maße fördern, wird die Produktion des vasokonstriktorischen Thromboxan A2 durch die HDL<sub>2</sub>-Fraktion gehemmt, durch die HDL<sub>3</sub>-Fraktion jedoch aktiviert.<sup>121</sup>

Weitere Untersuchungen müssen diese Struktur-Funktions-Beziehung für die Interaktion von HDL und Adrenorezeptoren, aber auch für die HDL-induzierte Vasorelaxation allgemein klären. Insbesondere hinsichtlich der Apolipoprotein-Zusammensetzung liegen hierzu noch keine gesicherten Erkenntnisse vor.<sup>28</sup> Dass diese Struktur-Funktions-Beziehung allerdings nicht nur grundlagenwissenschaftlich relevant ist, zeigt sich unter pathologischen Bedingungen, wenn die HDL-Partikel ihre vasorelaxierende Wirkung verlieren.

#### 4.5. Ausblick im klinischen Kontext

## 4.5.1. Dysfunktionalitätshypothese mit Schwerpunkt auf Vasomotorik

Neuere Erkenntnisse zu den funktionellen Eigenschaften der HDL-Partikel implizieren, dass die gefäßprotektiven Effekte von HDL unter verschiedenen pathologischen Bedingungen verloren gehen oder sogar in eine paradoxe proatherogene Wirkung umschlagen können. Zu diesen

Effekten zählen neben einer verschlechterten Cholesterinaufnahme auch eine reduzierte Apoptoseinhibition und negative Auswirkungen auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen – eine Zusammenfassung bietet eine aktuelle Übersichtsarbeit von Annema und von Eckardstein.<sup>20</sup> Auch die antioxidativen HDL-Eigenschaften sind deutlich beeinträchtigt. So zeigen Untersuchungen von Navab et al. sowie Patel und Kollegen, dass die HDL-vermittelte Inhibition der LDL-Oxidation in Patienten mit KHK bzw. akutem Koronarsyndrom vermindert ist.<sup>122,123</sup> Dies scheint insbesondere auf einer verringerten Aktivität der HDL-gebundenen antioxidativen Paraoxonase 1 zu beruhen.<sup>122</sup> Ein verminderter Schutz vor LDL-Oxidation findet sich auch für HDL-Partikel von Patienten mit rheumatoider Arthritis, dialysepflichtiger Niereninsuffizienz, arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus vom Typ II.<sup>124-127</sup>

In Bezug auf die positiven vasomotorischen HDL-Effekte ist vor allem die gesteigerte NO-Freisetzung von einem Funktionsverlust betroffen: So zeigten Besler et al. kürzlich, dass die Stimulation der endothelialen NO-Freisetzung durch HDL in Patienten mit stabiler KHK oder akutem Koronarsyndrom vermindert ist, was die Autoren mit einer Störung der Akt-vermittelten eNOS-Phosphorylierung und einer hierdurch reduzierten eNOS-Aktivität in Verbindung bringen konnten.<sup>128</sup> Einen ähnlichen Pathomechanismus fanden Speer et al. 2013 für die HDL-Partikel von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Hier bestand nach HDL-Einwirkung ebenfalls eine defiziente Phosphorylierungskette zwischen Akt und eNOS, die allerdings durch Toll-like Rezeptoren vermittelt war und interessanterweise durch symmetrisches Dimethylarginin als methyliertes L-Arginin-Analogon ausgelöst werden konnte.<sup>129</sup> In Patienten mit Anti-Phospholipid-Syndrom, die häufig bereits frühzeitig arteriosklerotische Veränderungen aufweisen, fanden Charakida et al. ebenfalls eine Reduktion der flussvermittelten Vasodilatation und eine Verminderung der HDL-induzierten NO-Produktion.<sup>130</sup>

Besonders relevant erscheint der Einfluss einer diabetischen Stoffwechsellage auf die verschlechterte Vasomotorik. Nach Sorrentino et al. ist die endotheliale NO-Produktion durch HDL-Partikel von Typ-II-Diabetikern im Vergleich zur NO-Freisetzung durch HDL von gesunden Probanden signifikant vermindert.<sup>131</sup> Zudem konnte HDL von Gesunden eine dosisabhängige und eNOS-vermittelte Vasodilatation in Mäusegefäßen auslösen, was unter HDL von diabetischen Patienten nicht nachzuweisen war.<sup>131</sup> Perségol et al. untersuchten des Weiteren die Verschlechterung der endothelvermittelten Vasodilatation durch oxidiertes LDL im Kaninchen: Während HDL von Nichtdiabetikern diese Verschlechterung wieder rückgängig

machen konnte, wiesen weder HDL-Partikel von Typ-I- noch von Typ-II-Diabetikern eine derartige Eigenschaft auf.<sup>132,133</sup>

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, inwiefern unter pathologischen Bedingungen auch die Interaktion zwischen HDL und Adrenorezeptoren von dysfunktionalen Partikeln betroffen ist. Ein proatherogener Effekt wäre insofern von großer klinischer Relevanz, als dass insbesondere β-Blocker zu den Standardtherapeutika verschiedenster Erkrankungen zählen.

## 4.5.2. HDL als therapeutischer Angriffspunkt

Aus der herausragenden pathophysiologischen Rolle des HDL ergeben sich intensive Bemühungen, HDL als Zielstruktur zur Prävention und Therapie arteriosklerosebedingter Pathologien zu nutzen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann dieser Bereich nur skizziert werden, soll aber aufgrund des enormen klinischen Potenzials nicht unerwähnt bleiben.

Eine primäre Strategie in der Lipidtherapie besteht in der medikamentösen Senkung des LDL-Cholesterins, wozu insbesondere Inhibitoren der  $\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-( $\beta$ -HMG-CoA)-Reduktase in Form der Statine gehören.<sup>134</sup> Ihr Einsatz hat eine Reduktion der kardiovaskulären Events von 20 - 40 % zur Folge.<sup>134</sup> Allerdings persistieren trotz optimierter Differenzialtherapie Morbidität und Mortalität der arteriosklerosebedingten Gefäßerkrankungen, sodass HDL aufgrund seiner multiplen vasoprotektiven Effekte großes Interesse als alternatives therapeutisches Target erfährt.

Prinzipiell lassen sich die verschiedenen HDL-basierten Therapeutika in vier Gruppen einteilen, zu denen direkte Apo-A-I-Erhöher, indirekte Apo-A-I- und HDL-Erhöher, Apo-A-I-Funktionsanaloga sowie Verstärker des reversen Cholesterintransportes gehören.<sup>33,135</sup>

Direkte Apo-A-I-Erhöhung kann durch intravenöse Applikation von biotechnologisch hergestelltem Apo A-I oder autologer Plasmaaufbereitung und anschließender Reinfusion bewerkstelligt werden.<sup>33</sup> Zur indirekten Apo-A-I- und HDL-Erhöhung wird häufig Niacin eingesetzt, das zum Vitamin-B-Komplex gehört und dessen potente Wirkung auf den Lipidstoffwechsel durch Nebenwirkungen wie eine Flush-Symptomatik limitiert wird.<sup>33</sup> Ein weiteres Forschungsfeld besteht in Apo-A-I-analogen kurzen Peptiden, die Apo-A-I-Effekte imitieren.<sup>33</sup> Eine Verstärkung des reversen Cholesterintransportes soll insbesondere mit Hemmstoffen des Cholesterinester-Transferproteins (CETP) bewirkt werden. Wie in Abs. 1.5.1 (reverser Cholesterintransport) näher beschrieben, tauscht CETP Triglyceride (v.a. aus VLDL und LDL) gegen Cholesterinester (v.a. aus HDL) aus. Dies führt zu einem erhöhten Abbau von

HDL und hat eine Begünstigung des atherogenen Cholesterintransportes in die Peripherie durch LDL zur Folge – die Rationale ist daher eine Inhibition des CETP, was zudem mit einem verminderten HDL-Katabolismus und höheren HDL-Spiegeln einhergeht.<sup>33</sup>

Tabelle 14 zeigt wichtige klinische Studien zur Untersuchung HDL-basierter Therapieperspektiven. Die Zusammenstellung der Originalarbeiten basiert auf aktuellen Übersichtspublikationen von Degoma et al., Gadi et al. sowie Wright.<sup>33,135,136</sup>

Obwohl bekannt ist, dass Niacin HDL-erhöhende und LDL-senkende Effekte aufweist, zeigten zwei große klinische Studien bei gleichzeitiger Statintherapie keinen zusätzlichen Nutzen im kardiovaskulären Outcome. Im Gegenteil wurden beide Studien aufgrund erhöhter Komplikationsraten vorzeitig beendet. Kleinere probatorische Untersuchungen hatten positive physiologische Effekte ergeben: So zeigten etwa Kuvin und Kollegen, dass bereits eine dreimonatige Niacingabe bei strenger LDL-Kontrolle eine Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation von über 10% erzeugen konnte.<sup>137</sup> Diese Erkenntnisse ließen sich jedoch nicht in ein verbessertes klinisches Outcome übertragen. Überdies setzten sich die enttäuschenden klinischen Ergebnisse zunächst auch bei der Erprobung der CETP-Inhibitoren der ersten Generation fort. Die Wirstoffe Anacetrapib und Evacetrapib hingegen weisen eine gute Verträglichkeit bei effektiver HDL-Erhöhung auf und werden derzeit in klinischen Outcomestudien evaluiert.<sup>138</sup>

Die pharmakologische Therapieforschung ist im Hinblick auf unsere Ergebnisse auch mechanistisch interessant. In mehreren Studien zeigt sich ein fehlender positiver Effekt auf die Gefäßreagibilität oder sogar eine Blutdruckerhöhung als Nebenwirkung (s. Tab. 14). Im Lichte der positiven endothelialen HDL-Wirkungen und der Interaktion mit den sympathischen Adrenorezeptoren stellt sich die Frage, warum eine effektive HDL-Erhöhung nicht vielmehr zu einer Blutdrucksenkung führt. Eine mögliche Antwort wäre, dass die getesteten Substanzen zwar den HDL-Spiegel erhöhen, nicht jedoch die Funktionalität der Partikel.

Auch in genetischen Untersuchungen finden sich Hinweise darauf, dass die Qualität der Partikel für HDL-basierte Therapieansätze entscheidender ist als die Quantität. So zeigen Menschen mit der Milano-Variante des Apolipoproteins A I zwar sehr niedrige HDL-Konzentrationen im Blut (<20 mg/dL), weisen aber trotzdem eine Arterioskleroseresistenz und eine veränderte Partikelstruktur auf.<sup>139</sup> Ferner kann durch Infusion von rekombinantem Apo-A-I-Milano eine signifikante Plaquereduktion in Patienten mit akutem Koronarsyndrom erzielt werden.<sup>140</sup> Ein weiteres Beispiel hierfür ist der Morbus Tangier, dem eine homozygote Mutation des ATP-

binding cassette transporter A 1 (ABCA 1) zugrunde liegt.<sup>141</sup> Diese Patienten zeigen minimale Konzentrationen von Apolipoprotein A I und HDL, ohne dass dies zwangsläufig mit einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose einherginge.<sup>141</sup> Auf der anderen Seite häufen sich die Anzeichen dafür, dass besonders hohe HDL-Spiegel (>70 mg/dL) eher mit einer Partikeldysfunktion und einem höheren kardiovaskulären Risiko assoziiert sind.<sup>33</sup>

Insgesamt müssen weitere Studien zeigen, ob die HDL-induzierte Vasorelaxation und die Interaktion mit Adrenorezeptoren durch medikamentös veränderte Partikelkomposition negativ beeinflusst werden. Einen Hinweis auf solch einen pharmakologischen Zusammenhang bietet die Erkenntnis, dass eine medikamentöse  $\alpha$ -Blockade in einigen Patienten zur Anhebung der HDL-Spiegel führt, während eine Therapie mit  $\beta$ -Blockern eine reduzierte HDL-Konzentration im Blut zur Folge haben kann.<sup>87,142</sup>

Tabelle 14. Zusammenfassung größerer klinischer Studien zu HDL-basierten Therapieoptionen. Die Jahresangabe gibt den Zeitpunkt der ergebnisrelevanten Veröffentlichung an. Abkürzungen: ACS: Akutes Koronarsyndrom; BD: Blutdruck; CVS: Cerebrovaskuläre Stenosen; DM: Diabetes Mellitus; EP: Endpunkt; FVD: Flussvermittelte Dilatation; KHK: Koronare Herzkrankheit; MI: Myokardinfarkt; pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit; TIA: Transitorische ischämische Attacke. Studienabkürzungen: CDP: Coronary Drug Project. ARBITER 2: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol 2. AIM HIGH: Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes. HPS-2 THRIVE: Heart Protection 2 - Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events. ILLUMINATE: Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events. DEFINE: Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib. REVEAL: Randomized EValuation of the Effects of Anacetrapib Through Lipid-modification. ACCELERATE: Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition With Evacetrapib in Patients at a High-Risk for Vascular Outcomes.

Studie	Jahr	n	Substanz	+Statin	Kollektiv	Endpunkte	Ergebnis
CDP <sup>143</sup>	1986	3908	Niacin	nein	Z.n. MI	Mortalität; Lipidkontrolle	HDL↑; Späte Gesamtmortalitätsreduktion (11%); MI- Rezidiv-Risiko↓
ARBITER 2 <sup>144</sup>	2004	167	Niacin	ja	$KHK + HDL {\downarrow}$	Intima-Media-Dicke (Carotis communis)	HDL↑; Plaqueprogression↓ mit EP als Parameter
AIM HIGH <sup>145</sup>	2011	3414	Niacin	ja	KHK, pAVK, CVS	Kardiovaskulärer Tod, MI, Stroke, ACS, Revaskularisierung	HDL↑; Abbruch (kein EP-Vorteil, Tendenz zu Stroke)
HPS-2 THRIVE <sup>146</sup>	2013	25673	Niacin + Laropiprant	ja	MI, Stroke, TIA, DM	Kardiovaskuläres Ereignis	HDL↑; Abbruch: Kein EP-Vorteil; Hautirritationen, Infektionen, Myopathien, DM, Blutungsrate ↑
ILLUMINATE <sup>147</sup>	2007	15067	Torcetrapib	ja	Dyslipidämie, HDL↓	Zeit bis kardiovaskuläres Ereignis/Tod	HDL↑; Abbruch: Mortalität ↑, Kaliumstörung, Systolischer BD↑
dal-VESSEL <sup>148</sup>	2012	476	Dalcetrapib	ja	KHK oder KHK-Risiko	Ambulanter BD; brachiale FVD	HDL <sup>†</sup> ; Keine signifikanten Unterschiede in den EP
dal-OUTCOMES I <sup>149</sup>	2012	15871	Dalcetrapib	ja	Z.n. ACS	Kardiovaskuläres Ereignis/Tod	HDL↑; Kein signifikanter Effekt auf EP; Abbruch wegen fehlender Wirksamkeit; BD↑
DEFINE <sup>150</sup>	2010	1623	Anacetrapib	ja	KHK oder KHK-Risiko	% Veränderung LDL und HDL	LDL↓; HDL↑; keine überzufälligen Nebenwirkungen oder kardiovaskulären Ereignisse
REVEAL <sup>151</sup>	laufend	30624	Anacetrapib	ja	Z.n. MI, pAVK, KHK, CVS	MI, letale KHK, koronare Revaskularisation	voraussichtlich 2017
ACCELERATE <sup>152</sup>	laufend	≈12000	Evacetrapib	ja	Z.n. ACS, CVS, pAVK, KHK+DM	Zeit bis kardiovaskuläres Ereignis/Tod	voraussichtlich 2016

## 4.6. Gesamtbewertung – Integrative Funktion der pleiotropen HDL-Effekte

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen auf, dass HDL in Metabolismus, Partikelstruktur und physiologischer Funktion einer großen Komplexität unterliegt.

Zu den Risikofaktoren der Arteriosklerose gehören neben der Dyslipidämie auch die arterielle Hypertonie, eine diabetische Stoffwechsellage, das vaskuläre Koagulationsgleichwicht sowie oxidativer Stress, die pathophysiologisch synergistisch auf eine endotheliale Dysfunktion als Primärläsion hinwirken.

In der Gesamtbetrachtung der pleiotropen HDL-Effekte fällt auf, dass HDL auf jeden dieser Einzelfaktoren einen regulativen Effekt ausübt und gleichzeitig selbst durch sie beeinflusst wird. Den vasorelaxierenden, antithrombotischen und antioxidativen Eigenschaften des HDL stehen ein Funktionsverlust der Partikel bei Diabetikern oder die Beeinflussung der HDL-Spiegel durch adrenotrope Medikamente gegenüber.

Gelten die Arteriosklerosefaktoren klassischerweise als unabhängig, so scheint es sich im Lichte neuerer Erkenntnisse zu HDL eher um ein Interdependenzverhältnis verschiedener Funktionssysteme zu handeln. In Bezug auf die vorliegende Arbeit bedeutet eine Interaktion zwischen HDL und den Adrenorezeptoren des sympathischen Nervensystems, dass HDL als physiologische Schnittstelle zwischen dem Lipidmetabolismus und dem Blutdruck fungieren könnte. Dies wäre eine neue Betrachtungsweise, die vor allem hinsichtlich der medikamentösen Behandlung der Dyslipidämie sowie der arteriellen Hypertonie weitere Studien unbedingt notwendig macht.

# 5. Literaturverzeichnis

- 1. Cause-specific mortality estimates. WHO, 2012. (Accessed January 5th, 2015, at http://www.who.int/healthinfo/global\_burden\_disease/estimates/en/index1.html.)
- 2. WHO fact sheet N°317. Cardiovascular diseases (CVDs). 2013. (Accessed January 5th, 2015, at <u>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html.</u>)
- 3. European cardiovascular disease statistics. European Society of Cardiology, 2012. (Accessed January 5th, 2015, at <u>http://www.escardio.org/about/documents/eu-cardiovascular-disease-statistics-2012.pdf.</u>)
- 4. Todesursachen in Deutschland. Sterbefälle insgesamt 2012 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10. Statistisches Bundesamt, 2013. (Accessed January 5th, 2015, at <u>https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursach en/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html.</u>)
- 5. Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. N Engl J Med 2013;369:448-57.
- 6. Franceschini G. Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. Am J Cardiol 2001;88:9-13.
- 7. Miller GJ, Miller NE. Plasma-High-Density-Lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. Lancet 1975;305:16-9.
- 8. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. Am J Med 1977;62:707-14.
- 9. Fernandez ML, Webb D. The LDL to HDL cholesterol ratio as a valuable tool to evaluate coronary heart disease risk. J Am Coll Nutr 2008;27:1-5.
- 10. Siegel G, Malmsten M, Ermilov E. Anionic biopolyelectrolytes of the syndecan/perlecan superfamily: physicochemical properties and medical significance. Adv Colloid Interface Sci 2014;205:275-318.
- 11. Miller M, Seidler A, Kwiterovich PO, Pearson TA. Long-term predictors of subsequent cardiovascular events with coronary artery disease and 'desirable' levels of plasma total cholesterol. Circulation 1992;86:1165-70.
- 12. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. Circulation 1989;79:8-15.
- 13. Boekholdt SM, Arsenault BJ, Hovingh GK, et al. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. Circulation 2013;128:1504-12.
- 14. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. Lancet 2012;380:572-80.
- 15. Haase CL, Tybjaerg-Hansen A, Qayyum AA, Schou J, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. J Clin Endocrinol Metab 2012;97:E248-56.

- Löffler G. Lipoproteine Transportformen der Lipide im Blut. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L, eds. Löffler/Petrides Biochemie & Pathobiochemie. 9th ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2014:300-7.
- 17. Rader D, Hobbs H. Disorders of Lipoprotein Metabolism. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al., eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. New York: McGraw-Hill; 2008:2416-29.
- 18. Dube JB, Boffa MB, Hegele RA, Koschinsky ML. Lipoprotein(a): more interesting than ever after 50 years. Curr Opin Lipidol 2012;23:133-40.
- 19. Aufenanger J. Lipidstoffwechselstörungen. In: Bruhn H, Schäfer H, Junker R, Schreiber S, eds. Labormedizin. 3rd ed. Stuttgart: Schattauer; 2011:228-49.
- 20. Annema W, von Eckardstein A. High-density lipoproteins. Multifunctional but vulnerable protections from atherosclerosis. Circ J 2013;77:2432-48.
- 21. Rye KA, Barter PJ. Predictive value of different HDL particles for the protection against or risk of coronary heart disease. Biochim Biophys Acta 2012;1821:473-80.
- 22. Phillips MC. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins: Thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism. J Lipid Res 2013;54:2034-48.
- 23. Creemers EE, Tijsen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? Circ Res 2012;110:483-95.
- 24. Wagner J, Riwanto M, Besler C, et al. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2013;33:1392-400.
- 25. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. Trends Mol Med 2011;17:594-603.
- 26. Williams PT, Feldman DE. Prospective study of coronary heart disease vs. HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort. Atherosclerosis 2011;214:196-202.
- 27. Amouyel P, Isorez D, Bard JM, et al. Parental history of early myocardial infarction is associated with decreased levels of lipoparticle AI in adolescents. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1993;13:1640-4.
- 28. Rye KA, Barter PJ. Cardioprotective functions of HDLs. J Lipid Res 2014;55:168-79.
- 29. Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. J Clin Invest 2006;116:1226-9.
- 30. Calabresi L, Gomaraschi M, Simonelli S, Bernini F, Franceschini G. HDL and atherosclerosis: Insights from inherited HDL disorders. Biochim Biophys Acta 2014:Epub ahead of print.
- 31. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage Reverse Cholesterol Transport: Key to the Regression of Atherosclerosis? Circulation 2006;113:2548-55.
- 32. Fisher EA, Feig JE, Hewing B, Hazen SL, Smith JD. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012;32:2813-20.
- 33. Gadi R, Amanullah A, Figueredo VM. HDL-C: does it matter? An update on novel HDLdirected pharmaco-therapeutic strategies. Int J Cardiol 2013;167:646-55.

- 34. Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:160-7.
- 35. Rohrl C, Stangl H. HDL endocytosis and resecretion. Biochim Biophys Acta 2013;1831:1626-33.
- 36. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. Pharmacol Rev 2006;58:342-74.
- 37. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. Circulation 2007;115:1285-95.
- 38. Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, de Kreutzenberg S, Fadini GP. Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. Diabetes Care 2011;34 Suppl 2:S285-90.
- 39. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. Annu Rev Pathol 2006;1:297-329.
- 40. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. Mediators Inflamm 2013;2013:152786.
- 41. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, et al. Cholesterol efflux capacity, highdensity lipoprotein function, and atherosclerosis. N Engl J Med 2011;364:127-35.
- 42. Subedi BH, Joshi PH, Jones SR, Martin SS, Blaha MJ, Michos ED. Current guidelines for high-density lipoprotein cholesterol in therapy and future directions. Vasc Health Risk Manag 2014;10:205-16.
- 43. Brandes R, Busse R. Kreislauf. In: Schmidt R, Lang F, Heckmann M, eds. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 31st ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2011:572-628.
- 44. Siegel G. Vascular smooth muscle. In: Greger R, Windhorst U, eds. Comprehensive human physiology. 1st ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 1996:1941-64.
- 45. Siegel G, Walter A, Kauschmann A, Malmsten M, Buddecke E. Anionic biopolymers as blood flow sensors. Biosens Bioelectron 1996;11:281-94.
- 46. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. Annu Rev Physiol 2002;64:749-74.
- 47. Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. Cardiology 2012;122:55-68.
- 48. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-6.
- 49. Griffith TM. Studies of endothelium-derived relaxant factor (EDRF), its nature and mode of action. Eur Heart J 1985;6:37-49.
- 50. Pfitzer G. Die glatte Muskulatur. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L, eds. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2014:805-16.
- 51. Flavahan NA. Balancing prostanoid activity in the human vascular system. Trends Pharmacol Sci 2007;28:106-10.

- 52. Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System product booklet RPN225. Little Chalfont, Buckinghamshire, UK: GE Healthcare UK Limited; 2009.
- 53. Linke W, Pfitzer G. Kontraktionsmechanismen. In: Schmidt R, Lang F, Heckmann M, eds. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 31st ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2011:99-127.
- 54. Michelotti GA, Price DT, Schwinn DA. Alpha 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. Pharmacol Ther 2000;88:281-309.
- 55. Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. Am J Physiol 1948;153:586-600.
- 56. Cotecchia S, Stanasila L, Diviani D. Protein-protein interactions at the adrenergic receptors. Curr Drug Targets 2012;13:15-27.
- 57. Jänig W. Vegetatives Nervensystem. In: Schmidt R, Lang F, Heckmann M, eds. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 31st ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2011:403-34.
- 58. Rath G, Balligand JL, Dessy C. Vasodilatory mechanisms of beta receptor blockade. Curr Hypertens Rep 2012;14:310-7.
- 59. Jumar A. Wirkung von Katecholaminen auf Koronararterien des Menschen: Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2011.
- 60. Staiger H, Stefan N, Kellerer M, Häring H. Glucagon und Katecholamine. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L, eds. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 2014:458-65.
- 61. Figueroa XF, Poblete MI, Boric MP, Mendizabal VE, Adler-Graschinsky E, Huidobro-Toro JP. Clonidine-induced nitric oxide-dependent vasorelaxation mediated by endothelial alpha(2)-adrenoceptor activation. Br J Pharmacol 2001;134:957-68.
- 62. Wang YG, Dedkova EN, Steinberg SF, Blatter LA, Lipsius SL. β2-Adrenergic Receptor Signaling Acts via No Release to Mediate Ach-Induced Activation of Atp-Sensitive K+ Current in Cat Atrial Myocytes. J Gen Physiol 2002;119:69-82.
- 63. Al-Qaisi M, Kharbanda RK, Mittal TK, Donald AE. Measurement of endothelial function and its clinical utility for cardiovascular risk. Vasc Health Risk Manag 2008;4:647-52.
- 64. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. J Am Coll Cardiol 1995;26:1235-41.
- 65. Kuhn FE, Mohler ER, Satler LF, Reagan K, Lu DY, Rackley CE. Effects of high-density lipoprotein on acetylcholine-induced coronary vasoreactivity. Am J Cardiol 1991;68:1425-30.
- 66. Zeiher AM, Schachlinger V, Hohnloser SH, Saurbier B, Just H. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans. Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. Circulation 1994;89:2525-32.
- 67. Li XP, Zhao SP, Zhang XY, Liu L, Gao M, Zhou QC. Protective effect of high density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilatation. Int J Cardiol 2000;73:231-6.
- 68. Toikka JO, Ahotupa M, Viikari JSA, et al. Constantly low HDL-cholesterol concentration relates to endothelial dysfunction and increased in vivo LDL-oxidation in healthy young men. Atherosclerosis 1999;147:133-8.

- 69. Kuvin JT, Patel AR, Sidhu M, et al. Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function. Am J Cardiol 2003;92:275-9.
- 70. Bisoendial RJ, Hovingh GK, Levels JH, et al. Restoration of endothelial function by increasing high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. Circulation 2003;107:2944-8.
- 71. Spieker LE, Sudano I, Hurlimann D, et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. Circulation 2002;105:1399-402.
- Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High Density Lipoprotein Prevents Oxidized Low Density Lipoprotein-induced Inhibition of Endothelial Nitricoxide Synthase Localization and Activation in Caveolae. J Biol Chem 2000;275:11278-83.
- 73. Mineo C, Shaul PW. Novel Biological Functions of High-Density Lipoprotein Cholesterol. Circ Res 2012;111:1079-90.
- 74. Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW. High Density Lipoprotein-induced Endothelial Nitric-oxide Synthase Activation Is Mediated by Akt and MAP Kinases. J Biol Chem 2003;278:9142-9.
- 75. Norata GD, Callegari E, Marchesi M, Chiesa G, Eriksson P, Catapano AL. High-Density Lipoproteins Induce Transforming Growth Factor-β2 Expression in Endothelial Cells. Circulation 2005;111:2805-11.
- 76. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. Nat Med 2001;7:853-7.
- 77. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. J Clin Invest 2004;113:569-81.
- 78. Rämet ME, Rämet M, Lu Q, et al. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. J Am Coll Cardiol 2003;41:2288-97.
- 79. Fleisher LN, Tall AR, Witte LD, Miller RW, Cannon PJ. Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. J Biol Chem 1982;257:6653-5.
- 80. Viñals M, Martínez-González J, Badimon JJ, Badimon L. HDL-Induced Prostacyclin Release in Smooth Muscle Cells Is Dependent on Cyclooxygenase-2 (Cox-2). Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:3481-8.
- 81. Jumar A, Grün D, Lendner J, et al. The Effect of Catecholamines in Human Coronary Arteries. American Heart Association. Chicago: Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011;219:P637.
- 82. Schlangen J. Die Wirkung von VLDL-Isoformen auf die flussabhängige Dilatation an Koronararterien des Menschen: Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2010.
- 83. Grün D, Lendner J, Krohn S, et al. Interaction between LDL and Sympathetic Adrenoreceptors. Basic Cardiovascular Sciences. New Orleans: Circ Res 2012;111:A166.
- 84. Lendner J, Krohn S, Jumar A, et al. Blood Lipoproteins May Be Implicated in Blood Pressure Regulation. Scientific Sessions. Dallas: Circ Res 2013;113:A111.
- 85. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. N Engl J Med 1994;331:1564-75.

- 86. Siegel G, Abletshauser 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.
- 87. Robertson D, Biaggioni I. Adrenoceptor Antagonist Drugs. In: Katzung B, Masters S, Trevor A, eds. Basic and Clinical Pharmacology. 12th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011:151-68.
- 88. Zafrir B, Amir O. Beta blocker therapy, decompensated heart failure, and inotropic interactions: current perspectives. Isr Med Assoc J 2012;14:184-9.
- 89. James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). JAMA 2014;311:507-20.
- 90. Reiter MJ. Cardiovascular drug class specificity: β-blockers. Prog Cardiovasc Dis 2004;47:11-33.
- 91. Siegel G, Malmsten M, Klussendorf D, Walter A, Schnalke F, Kauschmann A. Bloodflow sensing by anionic biopolymers. J Auton Nerv Syst 1996;57:207-13.
- 92. Küchler G, Beyer H, Himmel M, Merrem B. Zur Frage der Übertragungseigenschaften von Glasmikroelektroden bei der intracellulären Membranpotentialmessung. Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere 1964;280:210-23.
- 93. Kerwin BA. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. J Pharm Sci 2008;97:2924-35.
- 94. Josephy PD, Eling T, Mason RP. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. J Biol Chem 1982;257:3669-75.
- 95. Muhammad N, Dworeck T, Fioroni M, Schwaneberg U. Engineering of the E. coli outer membrane protein FhuA to overcome the hydrophobic mismatch in thick polymeric membranes. J Nanobiotechnology 2011;9:8.
- 96. Bhattacharyya T. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. JAMA 2008;299:1265-76.
- 97. Amersham cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System product booklet RPN226. Little Chalfont, Buckinghamshire, UK: GE Healthcare UK Limited 2009.
- 98. Dessy C, Moniotte S, Ghisdal P, Havaux X, Noirhomme P, Balligand JL. Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. Circulation 2004;110:948-54.
- 99. Krohn S, Jumar A, Grün D, et al. A New Perspective on HDL: Potential Navigation of Blood Pressure via Adrenoreceptor Regulation. High Blood Pressure Research. Washington, D.C.: Hypertension 2012;60:A526.
- 100. Heusch G, Baumgart D, Camici P, et al. α-Adrenergic Coronary Vasoconstriction and Myocardial Ischemia in Humans. Circulation 2000;101:689-94.
- 101. Egleme C, Godfraind T, Miller RC. Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. Br J Pharmacol 1984;81:16-8.
- 102. Schauer IE, Knaub LA, Lloyd M, et al. CREB downregulation in vascular disease: a common response to cardiovascular risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30:733-41.

- 103. Kudryavtseva O, Aalkjær C, Matchkov VV. Vascular smooth muscle cell phenotype is defined by Ca2+-dependent transcription factors. FEBS Journal 2013;280:5488-99.
- 104. Staus DP, Wingler LM, Strachan RT, et al. Regulation of β2-Adrenergic Receptor Function by Conformationally Selective Single-Domain Intrabodies. Mol Pharmacol 2014;85:472-81.
- Siegel G, Malmsten M, Klussendorf D, Michel F. A receptor-based biosensor for lipoprotein docking at the endothelial surface and vascular matrix. Biosens Bioelectron 2001;16:895-904.
- 106. Al-Haideri M, Goldberg IJ, Galeano NF, et al. Heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of apolipoprotein E-triglyceride-rich lipoprotein particles: a major pathway at physiological particle concentrations. Biochemistry 1997;36:12766-72.
- 107. Egom EE, Mamas MA, Soran H. HDL quality or cholesterol cargo: what really mattersspotlight on sphingosine-1-phosphate-rich HDL. Curr Opin Lipidol 2013;24:351-6.
- 108. Murata N, Sato K, Kon J, et al. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. Biochem J 2000;352:809-15.
- 109. Theilmeier G, Schmidt C, Herrmann J, et al. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. Circulation 2006;114:1403-9.
- 110. Li XA, Titlow WB, Jackson BA, et al. High density lipoprotein binding to scavenger receptor, Class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. J Biol Chem 2002;277:11058-63.
- 111. Oertelt-Prigione S, Parol R, Krohn S, Preissner R, Regitz-Zagrosek V. Analysis of sex and gender-specific research reveals a common increase in publications and marked differences between disciplines. BMC Med 2010;8:70.
- 112. Toda N, Enokibori M, Matsumoto T, Okamura T. Responsiveness to dopamine of isolated epicardial coronary arteries from humans, monkeys, and dogs. Anesth Analg 1993;77:526-32.
- 113. Patel PA, Hernandez AF. Targeting anti-beta-1-adrenergic receptor antibodies for dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2013;15:724-9.
- 114. Dandel M, Wallukat G, Potapov E, Hetzer R. Role of β1-adrenoceptor autoantibodies in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. Immunobiology 2012;217:511-20.
- 115. Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Anti–β1-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. J Clin Invest 2004;113:1379-82.
- 116. MacDonald A, McLean M, MacAulay L, Shaw AM. Effects of propranolol and L-NAME on beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat carotid artery. J Auton Pharmacol 1999;19:145-9.
- 117. Bavadekar SA, Hong S-S, Lee S, II, Miller DD, Feller DR. Bioisosteric phentolamine analogs as selective human  $\alpha 2$  versus  $\alpha 1$ -adrenoceptor ligands. Eur J Pharmacol 2008;590:53-60.
- 118. Chen J, Yildiz O, Purdy RE. Phenylephrine precontraction increases the sensitivity of rabbit femoral artery to serotonin by enabling 5-HT1-like receptors. J Cardiovasc Pharmacol 2000;35:863-70.

- 119. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, et al. Suppression of Endothelial Cell Apoptosis by High Density Lipoproteins (HDL) and HDL-associated Lysosphingolipids. J Biol Chem 2001;276:34480-5.
- 120. Hess R, Biet T, Dunkel A, Waage P, Bloome B. Organspende und Transplantation in Deutschland - Jahresbericht 2013. Frankfurt am Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation; 2014. (Accessed January 5th, 2015, at http://www.dso.de/uploads/tx\_dsodl/JB\_2013\_Web\_05.pdf.)
- 121. Oravec S, Demuth K, Myara I, Hornych A. The effect of high density lipoprotein subfractions on endothelial eicosanoid secretion. Thromb Res 1998;92:65-71.
- 122. Navab M. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. J Lipid Res 2000;41:1495-508.
- 123. Patel PJ, Khera AV, Jafri K, Wilensky RL, Rader DJ. The anti-oxidative capacity of high-density lipoprotein is reduced in acute coronary syndrome but not in stable coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 2011;58:2068-75.
- 124. Watanabe J, Charles-Schoeman C, Miao Y, et al. Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2012;64:1828-37.
- 125. Moradi H, Pahl MV, Elahimehr R, Vaziri ND. Impaired antioxidant activity of highdensity lipoprotein in chronic kidney disease. Transl Res 2009;153:77-85.
- 126. Chen X, Wu Y, Liu L, et al. Relationship between high density lipoprotein antioxidant activity and carotid arterial intima-media thickness in patients with essential hypertension. Clin Exp Hypertens 2010;32:13-20.
- 127. Nobecourt E, Jacqueminet S, Hansel B, et al. Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. Diabetologia 2005;48:529-38.
- 128. Besler C, Heinrich K, Rohrer L, et al. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. J Clin Invest 2011;121:2693-708.
- 129. Speer T, Rohrer L, Blyszczuk P, et al. Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of Toll-like receptor-2. Immunity 2013;38:754-68.
- 130. Charakida M. Vascular abnormalities, paraoxonase activity, and dysfunctional HDL in primary antiphospholipid syndrome. J Am Med Assoc 2009;302:1210-7.
- 131. Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, et al. Endothelial-vasoprotective effects of highdensity lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. Circulation 2010;121:110-22.
- 132. Persegol L, Foissac M, Lagrost L, et al. HDL particles from type 1 diabetic patients are unable to reverse the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent vasorelaxation. Diabetologia 2007;50:2384-7.
- 133. Persegol L, Verges B, Foissac M, Gambert P, Duvillard L. Inability of HDL from type 2 diabetic patients to counteract the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent vasorelaxation. Diabetologia 2006;49:1380-6.
- 134. Chyu KY, Peter A, Shah PK. Progress in HDL-based therapies for atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep 2011;13:405-12.

- 135. DeGoma EM, Rader DJ. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. Nat Rev Cardiol 2011;8:266-77.
- 136. Wright RS. Recent clinical trials evaluating benefit of drug therapy for modification of HDL cholesterol. Curr Opin Cardiol 2013;28:389-98.
- 137. Kuvin JT, Ramet ME, Patel AR, Pandian NG, Mendelsohn ME, Karas RH. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. Am Heart J 2002;144:165-72.
- 138. Nicholls SJ, Brewer H, Kastelein JP, et al. Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: A randomized controlled trial. J Am Med Assoc 2011;306:2099-109.
- 139. Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, 2nd, Weisgraber KH, Mahley RW. A-I Milano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. J Clin Invest 1980;66:892-900.
- 140. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. J Am Med Assoc 2003;290:2292-300.
- 141. Rader DJ, deGoma EM. Approach to the patient with extremely low HDL-cholesterol. J Clin Endocrinol Metab 2012;97:3399-407.
- 142. Rabkin SW. Mechanisms of action of adrenergic receptor blockers on lipids during antihypertensive drug treatment. J Clin Pharmacol 1993;33:286-91.
- 143. Canner PL, Berge KG, Wenger NK, et al. Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. J Am Coll Cardiol 1986;8:1245-55.
- 144. Taylor AJ, Sullenberger LE, Lee HJ, Lee JK, Grace KA. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a doubleblind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. Circulation 2004;110:3512-7.
- 145. Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. N Engl J Med 2011;365:2255-67.
- 146. HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. Eur Heart J 2013;34:1279-91.
- 147. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. N Engl J Med 2007;357:2109-22.
- 148. Luscher TF, Taddei S, Kaski JC, et al. Vascular effects and safety of dalcetrapib in patients with or at risk of coronary heart disease: the dal-VESSEL randomized clinical trial. Eur Heart J 2012;33:857-65.
- 149. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. N Engl J Med 2012;367:2089-99.
- 150. Cannon CP, Shah S, Dansky HM, et al. Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. N Engl J Med 2010;363:2406-15.

- 151. REVEAL: Randomized EValuation of the Effects of Anacetrapib Through Lipidmodification. A Large-scale, Randomized Placebo-controlled Trial of the Clinical Effects of Anacetrapib Among People With Established Vascular Disease. University of Oxford. (Accessed January 5th, 2015, at <u>http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01252953.</u>)
- 152. Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition With Evacetrapib in Patients at a High-Risk for Vascular Outcomes. (Accessed January 5th, 2015, at <u>http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01687998.</u>)

# **Eidesstattliche Versicherung**

"Ich, Stephan Krohn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Zur Wirkung vaskulärer Adrenorezeptoren in der High-Density-Lipoprotein-induzierten Relaxation menschlicher Koronararterien" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum

Unterschrift

# Lebenslauf

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

#### Publikationsliste

**Stephan Krohn**, Agnes Jumar, Daniel Grün, Janna Lendner, Andreas Zakrzewicz, Eugeny Ermilov, Günter Siegel. A New Perspective on HDL: Potential Navigation of Blood Pressure via Adrenoreceptor Regulation. High Blood Pressure Research. Washington, D.C.: Hypertension 2012;60:A526.

Janna Lendner, **Stephan Krohn**, Agnes Jumar, Daniel Grün, Andreas Zakrzewicz, Eugeny Ermilov, Günter Siegel. Blood Lipoproteins May Be Implicated in Blood Pressure Regulation. Scientific Sessions. Dallas: Circulation Research 2013;113:A111.

Daniel Grün, Janna Lendner, **Stephan Krohn**, Agnes Jumar, Andreas Zakrzewicz, Eugeny Ermilov, Günter Siegel. Interaction between LDL and Sympathetic Adrenoreceptors. Basic Cardiovascular Sciences. New Orleans: Circulation Research 2012;111:A166.

Agnes Jumar, Daniel Grün, Janna Lendner, **Stephan Krohn**, Andreas Zakrzewicz, Eugeny Ermilov, Günter Siegel. The Effect of Catecholamines in Human Coronary Arteries. American Heart Association. Chicago: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2011;219:P637.

Sabine Oertelt-Prigione, Roza Parol, **Stephan Krohn**, Robert Preißner, Vera Regitz-Zagrosek. Pilot Project Gender Medicine. Organization for the Study of Sex Differences. Poster Session. Toronto, 2009.

Sabine Oertelt-Prigione, Roza Parol, **Stephan Krohn**, Robert Preißner, Vera Regitz-Zagrosek. Analysis of sex and gender-specific research reveals a common increase in publications and marked differences between disciplines. BMC Medicine 2010;8:70.

**Stephan Krohn**. Terminal (2008); Doves and Pigeons (2006); A Break from a Walk in the Park (2006). In the Silence a Whisper - Selections from the Daniil Pashkoff Prize: Westermann-Verlag; 2008.

# Anteilserklärung

Herr Stephan Krohn hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Stephan Krohn**, Agnes Jumar, Daniel Grün, Janna Lendner, Andreas Zakrzewicz, Eugeny Ermilov, Günter Siegel. A New Perspective on HDL: Potential Navigation of Blood Pressure via Adrenoreceptor Regulation. High Blood Pressure Research. Washington, D.C.: Hypertension 2012;60:A526.

Beitrag im Einzelnen: Studienplanung; Präparation der Koronararterien im DHZB mit Erfassung der klinischen Daten; Vorbereitung und Durchführung der Experimente zu Elektromechanik und Nukleotidkonzentrationen; Auswertung und Datenanalyse; grafische Darstellung, Verfassung des Textes und Vorstellung der Ergebnisse.

Janna Lendner, **Stephan Krohn**, Agnes Jumar, Daniel Grün, Andreas Zakrzewicz, Eugeny Ermilov, Günter Siegel. Blood Lipoproteins May Be Implicated in Blood Pressure Regulation. Scientific Sessions. Dallas: Circulation Research 2013;113:A111.

Beitrag im Einzelnen: Studienplanung; Präparation der Koronararterien im DHZB mit Erfassung der klinischen Daten; Vorbereitung und Durchführung der Experimente zu Elektromechanik und Nukleotidkonzentrationen.

Daniel Grün, Janna Lendner, **Stephan Krohn**, Agnes Jumar, Andreas Zakrzewicz, Eugeny Ermilov, Günter Siegel. Interaction between LDL and Sympathetic Adrenoreceptors. Basic Cardiovascular Sciences. New Orleans: Circulation Research 2012;111:A166.

Beitrag im Einzelnen: Studienplanung; Präparation der Koronararterien im DHZB mit Erfassung der klinischen Daten; Vorbereitung und Durchführung der Experimente zu Elektromechanik und Nukleotidkonzentrationen.

Agnes Jumar, Daniel Grün, Janna Lendner, **Stephan Krohn**, Andreas Zakrzewicz, Eugeny Ermilov, Günter Siegel. The Effect of Catecholamines in Human Coronary Arteries. American Heart Association. Chicago: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2011;219:P637.

Beitrag im Einzelnen: Studienplanung; Präparation der Koronararterien im DHZB mit Erfassung der klinischen Daten; Vorbereitung und Durchführung der Experimente zu Elektromechanik und Nukleotidkonzentrationen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

# Danksagung

Die Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.
Die Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.