

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

DISSERTATION

**Der Einfluß von Fluvastatin auf die flußabhängige Dilatation menschlicher Hirngefäße**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christiane Sokol  
aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	4
<b>Summary/Abstract</b>	6
<b>1. Einleitung</b>	7
<b>2. Grundlagen</b>	8
2.1. Die flußabhängige Vasodilatation	8
2.2. Fluvastatin und seine pleiotropen Effekte	14
<b>3. Material und Methoden</b>	15
3.1. Bestimmung des Gefäßtonus	16
3.2. Intrazelluläre Membranpotentialableitung	17
3.3. Datenaufnahme	18
3.4. cAMP- und cGMP-Bestimmung	18
3.4.1. Homogenisieren des Gewebes	18
3.4.2. Bestimmung der cAMP-Konzentration mittels ELISA	18
3.4.3. Bestimmung der cGMP-Konzentration mittels ELISA	19
3.4.4. Auswertung mittels Kalibrierungskurve	20
3.5. Ellipsometrie	20
3.5.1. Allgemeine Grundlagen der ellipsometrischen Messungen	20
3.5.2. Ellipsometrische Versuchsdurchführung	23
3.6. Auswertung und Statistik	23
<b>4. Ergebnisse</b>	24
4.1. Die flußabhängige Dilatation der Kontrollpräparate	24
4.2. Die flußabhängige Dilatation der mit Fluvastatin behandelten Präparate	25
4.3. Gegenüberstellung der Potentialwerte aus Kontrollmessungen und Messungen mit Fluvastatin	25
4.4. Gegenüberstellung der Tonusergebnisse aus Kontroll- und Fluvastatinpräparaten	26
4.5. cAMP- und cGMP-Konzentrationen	28
4.6. Ellipsometrie	28
<b>5. Diskussion</b>	29
5.1. Zielsetzungen	29
5.1.1. Die flußabhängige Tonusbestimmung	30
5.1.2. Intrazelluläre Membranpotentialbestimmung	31

5.1.3	Ellipsometrie	31
5.2.	Einordnung der Versuchsergebnisse	31
5.2.1.	Der funktionelle Einfluß des Fluvastatins	32
5.2.1.1.	Diskussion der intrazellulären Wirkungsmechanismen des Fluvastatins	33
5.2.1.2.	Das Rezeptormodell und die Einordnung der ellipsometrischen Ergebnisse	34
5.3.	Die klinische Relevanz	37
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>39</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>46</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>47</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>48</b>
	<b>Publikation</b>	<b>50</b>
	<b>Anteilerklärung</b>	<b>51</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
A./Aa.	Arterie/Arterien
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Demenz
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
APP	A $\beta$ -amyloid precursor protein
bFGF	basic fibroblast growth factor
CAM	cell adhesion molecule
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FDD	flow-dependent dilatation
GAG	Glycosaminoglycan
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	high-density lipoprotein
HMG-CoA	Hydroxy-methylglutaryl-Coenzym A
HS-PG	Heparansulfat-Proteoglykan
Hsp	heat-shock-protein
IDL	intermediate-density lipoprotein
KCl	Kaliumchlorid
LDL	low-density lipoprotein
MAP	Mitogen-aktivierte Proteine
min	Minute
mL	Milliliter
MRI	magnetic resonance imaging
mV	Millivolt
NO	Stickstoffmonoxid
PG	Prostaglandin
PIP	Phosphatidylinositolphosphat

PK	Proteinkinase
Pt	Platin
SEM	standard error mean
VLDL	very low-density lipoprotein

## **Summary/Abstract**

The flow-dependent dilatation of blood vessels is an important mechanism for the regulation of blood flow. Simultaneously, it is linked to an intact endothelial function.

In our experiments, we have shown that cerebral vessels have the capacity for such a flow-dependent vasodilatation and this can be influenced by fluvastatin.

Even a short contact time of a few minutes between vessel and fluvastatin is sufficient to obtain a significant augmentation of flow-dependent dilatation.

Furthermore, we were able to prove the direct binding of fluvastatin to heparan sulfate proteoglycan (HS-PG) by ellipsometric techniques.

The receptor HS-PG has been described, which mediates the pleiotropic effects of fluvastatin. The attachment to HS-PG results in an activation of eNOS and thus in increased nitric oxide synthesis and release. NO is a known mediator of smooth muscle cell relaxation via cGMP elevation.

In addition, increase of eNOS activity is equivalent to an improvement of endothelial function.

In this context, two syndromes counteract the physiologic function of cerebral blood flow. Both in Alzheimer's disease and in ischemic stroke, the benefits of statin administration have been described in several clinical trials. This also applies to the prophylactic use of statins against progression or slowing of post-infarct rehabilitation.

## 1. Einleitung

Hirnerkrankungen wie die Demenz vom Alzheimer-Typ (AD) und der ischämische Schlaganfall stellen in unserer immer älter werdenden Gesellschaft einen häufigen Grund für eingeschränkte Lebensqualität und Pflegebedürftigkeit dar [49]. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken beschäftigen sich Forschungsgruppen mit der Suche nach geeigneten Präventions- und Therapiemitteln. Dabei wird zunehmend häufig ein positiver Effekt unter Statineinnahme diskutiert.

Die Hauptwirkung der Statine besteht in der Hemmung der Cholesterinsynthese und der damit verbundenen Senkung des LDL-Spiegels. Daneben besitzen sie so genannte pleiotrope, cholesterinunabhängige Effekte, deren Erforschung Gegenstand zahlreicher Studien ist [10, 21, 68, 85]. Sie zeigen, daß Statine der Arteriosklerose über verschiedene Mechanismen entgegenwirken, die so bedeutende endotheliale Funktionen verbessern und möglicherweise vor einer Alzheimer-Demenz schützen beziehungsweise ihre Progression verzögern können [38, 49, 85, 90]. Sicherlich beruhen diese, in Bezug auf die Alzheimerdemenz gemachten Beobachtungen, nicht nur auf einem einzigen Statineffekt.

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir einen dieser möglichen Mechanismen herausgegriffen und diesen an isolierten Hirngefäßen nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um die flußabhängige Dilatation (FDD) der Gefäße, die durch Fluvastatin deutlich verbessert wird. Sie steht für eine Wiederherstellung der endothelialen Schutzfunktion und eine bessere Hirndurchblutung. Vermittelt wird diese über eine Aktivierung der eNOS, welche NO produziert. Dieses gelangt in die unter dem Endothel liegende glatte Muskelschicht und vermittelt hier unter Bildung von cGMP eine Myozytenrelaxation [71].

Zudem soll ein möglicher Rezeptor, über den Fluvastatin seine Wirkungen am Gefäß vermitteln könnte, aufgezeigt werden. Es handelt sich hierbei um die Proteoglykane, welche Bestandteil der Zellmembran und der extrazellulären Matrix sind. Neben einer einfachen Stützfunktion sind sie an weiteren Vorgängen wie der Modulation von Zytokin-Wirkungen und der Differenzierung und Integrität der Gewebe beteiligt. Es lassen sich zudem verschiedene Untergruppen abgrenzen, die sich im Proteincore, den Seitenketten und im Vorkommen unterscheiden. Hinsichtlich der vorliegenden Arbeit sind die Syndecane 1-4 (in der Membran der Endothel- und glatten Muskelzellen) und die Perlecanine (in der vaskulären Matrix) hervor-

zuheben. Für diese Untergruppen ist sowohl die Fähigkeit zum flow-sensing als auch zur Bindung von Molekülen und Partikeln (z.B. Zytokine, Lipoproteine) im Sinne eines Rezeptors nachgewiesen [27,43,71,73,77].

Anhand der Ellipsometrie, einem laserbasierten, optischen Meßverfahren zur Bestimmung absorbierter Mengen und von dünnen Schichtdicken, zeigen wir, daß Fluvastatin an Heparansulfat-Proteoglykan (HS-PG) bindet. Wir postulieren eine direkte Interaktion zwischen dem Proteoglykan und der Wirksubstanz Fluvastatin.

## **2. Grundlagen**

Über die A. carotis und die A. vertebralis gelangt das Blut in die Hirngefäße und versorgt unser Gehirn mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die cerebralen Gefäße sind zu einer starken Autoregulation der Gefäßweite befähigt, was eine konstante Hirndurchblutung bei schwankenden systemischen Blutdrücken gewährleistet [64]. Daneben reagieren aber auch die Cerebralarterien auf metabolische (O<sub>2</sub>-Mangel) und mechanische Stimuli (Schubspannung).

### *2.1. Die flußabhängige Vasodilatation*

Das strömende Blut erzeugt an der Gefäßwand einen viskoelastischen Zug, der als Schubspannung (shear stress) bezeichnet wird. Bei einer Erhöhung der Blutflußgeschwindigkeit kommt es zu einer Relaxation der Gefäßmuskelzellen im betroffenen Gefäßabschnitt. Eine, in ihrer Ausprägung dem shear stress angepaßte Vasodilatation resultiert [31,66].

Von den meisten Autoren wird das Vorhandensein einer intakten Endothelschicht als Voraussetzung für die Aufnahme des shear stress und die nachfolgende FDD bezeichnet [39,57]. Bevan et al. [5] konnten dagegen auch nach Entfernung des Endothels noch eine abgeschwächte FDD nachweisen. Dies könnte bedeuten, daß die Schubspannung nicht nur von endothel-gebundenen Rezeptoren, sondern auch von der darunter liegenden Matrix wahrgenommen und zu einem Signal weiterverarbeitet werden kann.

Dafür, daß es sich um einen komplexen, rezeptorvermittelten Prozeß handelt, sprechen Faktoren wie die strenge Ortsgebundenheit, die Beobachtung, daß NO, cGMP und auch Calcium



unter shear stress (intrazellulär) ansteigen sowie Änderungen der Genexpression und die Aktivierung von Kinasen [16,56,84,87]. Betrachtet werden müssen demnach potentielle *Rezeptoren*, die den Fluß erfassen und ein Signal nach intrazellulär weitergeben, die vermittelnden *Mediatoren* und die *Signalkaskade*, die letztendlich zu einer Relaxation der Myozyten führt.

Im Bereich der luminalen Gefäßoberfläche wird eine Struktur vermutet, die einerseits die Größe der mechanischen Kräfte (ausgeübt durch den Blutfluß) erfassen kann und andererseits diese an die intrazelluläre Signalverarbeitung weitergeben kann. Dies entspricht einem Rezeptor. Wie dieser Rezeptor beschaffen ist und wo er genau liegt, wird derzeit in vielen Studien untersucht. In der Literatur werden folgende Strukturen als mögliche Fluß-Sensoren bezeichnet:

- Integrine [36],
- Caveolae [65],
- Ionenkanäle [12],
- G-Proteine [24],
- Proteoglykane [73].

Auf die Gruppe der Proteoglykane möchte ich im Folgenden genauer eingehen, da sie neben der Funktion als möglicher Fluß-Sensor auch Moleküle binden können, welche in der vorliegenden Arbeit eine wesentliche Rolle spielen [71,74]. “Proteoglykane” stellt einen Oberbegriff für eine Substanzgruppe dar, die sich aus einem variablen Proteincore und daran gebundene Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten zusammensetzen. Durch ihre Eigenschaft als Polyelektrolyt fungieren die GAG-Seitenketten in Zellmembran und Basalmembran als Ionenaustauscher. Zudem haben sie Einfluß auf den transmembranalen Ionentransport und das Membranpotential. Über die funktionellen Domänen der Proteincores erfolgen die Verankerung mit der Zelloberfläche und der Kontakt zu Makromolekülen der Matrix sowie zu anderen interagierenden Proteinen wie Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen (CAMs).

Je nach Proteincore, Seitenkette und Vorkommen werden sie bestimmten Untergruppen zugeordnet. Interessant sind im Hinblick auf die Funktion als Fluß-Sensor vor allem die Proteohe-

paransulfate “Syndecan 1-4” (auf dem Endothel und in glatten Muskelzellen) und Perlecan (in der vaskulären Matrix). Während Perlecan nur Heparansulfat-Seitenketten besitzt, kommen beim Syndecan sowohl Heparansulfat als auch vermindert Chondroitinsulfat vor. Die Zahl der Seitenketten, ihre Länge und der Sulfatierungsgrad sind stark variabel und von äußeren Stimuli abhängig. Sie bieten damit einer Vielzahl von Liganden eine geeignete spezifische Bindungsstelle. Als strukturbeeinflussende Faktoren sind Alterungsvorgänge, Erkrankungen und genetische Defekte bekannt [47,67].

Gebildet werden diese Moleküle in fast allen eukaryotischen Zellen, wobei die Synthese unter anderem durch den Platelet-derived-growth-factor (PDGF) und verschiedene Zytokine reguliert wird. Sie sind Bestandteil der Zellmembran, der endo- und epithelialen Basalmembran und der extrazellulären Matrix. Neben einer einfachen mechanischen Stützfunktion sind sie an weiteren Vorgängen wie der Modulation von Zytokin-Wirkungen, der Zelladhäsion, -beweglichkeit und -proliferation sowie der Differenzierung und Integrität der Gewebe beteiligt.

Im speziellen weist Perlecan folgende Funktionen auf: Zelladhäsion durch  $\beta_1$ -Integrine, Kontrolle der Ladungs-selektiven glomerulären Ultrafiltration und Speicherung von Wachstumsfaktoren [37]. Werden Wachstumsfaktoren von Zellen freigesetzt, können diese an basische Domänen der GAG-Seitenketten gebunden und nachfolgend in die extrazelluläre Matrix aufgenommen werden. Diese Speicherfunktion dient zur Feinregulation der Zytokindiffusion und -wirkstärke. Hierüber werden ganz verschiedene Systeme beeinflusst, wie z.B. die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und -bewegung, die Leukozytenmigration und -funktion, die Zahl der hämatopoetischen Zellen, die Temperaturregulation, die Akute-Phase-Reaktion, Gewebeumbauvorgänge und das Überleben der Zellen. Die Struktur des Perlecans wurde auch elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei konnten mehrere Domänen identifiziert werden, deren Zusammensetzung experimentell bestimmt wurde. Die Domäne II des Proteincores wird aufgrund ihrer elektrostatischen Eigenschaften als LDL-Bindungsstelle diskutiert.

Syndecan ist, wie bereits erwähnt, ein HS/CS-Hybridproteoglykan. Zu den extrazellulären Liganden, welche u.a. die Zusammensetzung der GAG-Seitenketten beeinflussen, gehören Kollagene (Typ I, III und V), Fibronectin, Laminin und Thrombospondin. Mit der HS-Seitenkette bindet es extrazellulär an verschiedene interstitielle Matrixbestandteile und an bFGF. Es kann die Konformation und die Präsentation des Wachstumsfaktors zu seinem FGF-Rezeptorprotein verändern. Seine intrazelluläre Domäne interagiert mit dem Cytoskelett, was die Bildung

und Auflösung von Zellverbänden beeinflusst. Weiterhin ist die Bindung von Lipoproteinen sowie deren Beeinflussung bezüglich Aufnahme, lysosomaler Freisetzung und ihres Abbaus zu erwähnen. Daneben existieren noch mehrere weitere Funktionen, die u.a. die Wundheilung und die Adhäsion von Fibroblasten sowie Lymphozyten betreffen [71].

Entsprechend den Anforderungen an ein Sensormolekül tragen diese Proteoglykane folgende Eigenschaften:

- hohes Bindungsvermögen von hydrophilen Molekülen in der extrazellulären Matrix, vermittelt durch einen hohen Polymerisationsgrad,
- als anionische Polyelektrolyte eine hohe Kationenbindungskapazität,
- ubiquitäres Vorkommen in verbundenen Geweben (als integrales Membranprotein),
- Mechanotransduktionsfähigkeit,
- Viskoelastizität und die Fähigkeit zur Konformationsänderung unter mechanischen und/oder elektrostatischen Einflüssen.

Heparansulfat-Proteoglykane (HS-PG) stellen den wichtigsten Lipidrezeptor der peripheren Arterienwand dar. Im Gegensatz zur Leber, wo die LDL-Aufnahme hauptsächlich über die LDL-Rezeptoren erfolgt, ist in der Peripherie HS-PG zu ca. 80-90% an der Lipidaufnahme beteiligt und stellt damit auch ein wichtiges Molekül in der Pathogenesekette der Arteriosklerose dar [43]. In der Betrachtung des HS-PG als Rezeptor ist neben den extrazellulären luminalen Komponenten auch der Kontakt zur Endothelzelle wichtig. Hier besitzen die Syndecane drei transmembranäre Tyrosinreste, die für die weitere Signalverarbeitung in Form von Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen oder Interaktionsstellen mit dem Zytoskelett von Bedeutung sein können. Im “no flow”-Zustand liegt Syndecan als Zufallsknäuel (random coil) vor, dessen anionische Seitenketten mit Natrium- und Calciumionen beladen sind. Bei zunehmendem Fluß kommt es zu einer Ausstreckung des Moleküls und die Calciumionen dissoziieren von den Bindungsstellen. Syndecan bindet in diesem Zustand nur Natriumionen. Diese wandern entlang der Polysaccharidkette und passieren durch benachbarte Ionenkanäle in die Endothelzelle. Diese wird depolarisiert und es erfolgt ein temporärer Calciumeinstrom, der wiederum die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) aktiviert. Das gebildete NO diffundiert zu den darunterliegenden glatten Muskelzellen und führt über eine Membranhyperpolarisation zur Relaxation [27,71,73,74,77].

Man geht heute davon aus, daß neben NO mindestens zwei weitere Mediatoren an der FDD beteiligt sind und diese jeweils abhängig vom Organ und von anderen noch unbekanntem Faktoren einen unterschiedlich großen Anteil an der Myozytenrelaxation haben. Das NO stellt wohl den bekanntesten Mediator für eine Vasodilatation dar. Es soll vorrangig an Koronar- und Mesenterialarterien seine Wirkung entfalten [23]. Prostaglandine wie PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> vermitteln über Aktivierung der Adenylatcyclase die Relaxation der Gefäßmuskulatur [32, 62]. Daneben gibt es Studien, in denen shear stress eine Hyperpolarisation auslösen konnte, die weder NO- noch prostaglandinvermittelt war. Dieser dritte Mediator wird als "endothelium derived hyperpolarizing factor" bezeichnet [50]. Für keinen der genannten Mediatoren ist die Signalkaskade, die zur Beeinflussung des Myozytentonus führt, vollständig aufgeklärt. Im Falle der NO-vermittelten Relaxation gibt es aber bereits genaue Vorstellungen, wie diese Signaltransduktion ablaufen könnte.

Einen Hauptbestandteil der Kaskade stellt die exklusiv im Endothel vorkommende eNOS dar. Sie synthetisiert aus L-Arginin unter Bildung von Citrullin den Botenstoff NO. Die Regulation ihrer enzymatischen Aktivität und ihres intrazellulären Gehaltes scheinen eine wesentliche Rolle in der Vermittlung zwischen shear stress einerseits und der Myozytenrelaxation andererseits zu spielen. Berk et al. [4] formulierten ein Mechanotransduktionsmodell, welches in Endothelzellen sowohl Calcium-abhängige als auch Calcium-unabhängige Proteinkinase-Pathways beinhaltet. Der Calcium-abhängige Weg involviert eine Phospholipase C-Aktivierung und die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub>. Daraus resultiert ein intrazellulärer Calciumanstieg und wiederum die Stimulierung von Kinasen wie Calcium-Calmodulin und PKC. Dieser Signalweg wird für die schnelle Antwort mit Aktivierung der eNOS verantwortlich gemacht.

Der Calcium-unabhängige Signalweg beschreibt die Aktivierung eines kleinen GTP-bindenden Proteins und die Stimulierung von Calcium-unabhängigen PKC und MAP-Kinasen. Er initiiert die langsame Antwort auf shear stress und führt zu einer anhaltenden Aktivierung der eNOS, Veränderungen in der Zellmorphologie und Genexpression. Auch andere Studien sprechen für die Existenz von Calcium-abhängigen und Calcium-unabhängigen Signalwegen. So konnten Fleming und Busse [17] zeigen, daß bei steigendem intrazellulären Calcium eine Aktivierung der eNOS durch Bildung des Calcium-Calmodulin-Komplexes möglich ist. Jedoch stellten sie fest, daß auf den shear stress-Reiz eine lang anhaltende NO-Produktion mit nur transientem Calcium-Anstieg zu beobachten war. Zudem konnte auch unter Anwesenheit von

Calmodulin-Antagonisten eine shear stress-stimulierte NO-Produktion ausgelöst werden, welche aber wiederum durch Tyrosinkinase-Inhibitoren, Hsp 90-bindende Proteine und PIP3-kinase-Inhibitoren hemmbar war. Dies spricht dafür, daß an der Calcium-unabhängigen Aktivierung der eNOS Phosphorylierungen durch Tyrosinkinasen beteiligt sind. Corson et al. [11] konnten in ihren Versuchen zeigen, daß shear stress im Vergleich mit Agonisten, welche den intrazellulären Calciumspiegel erhöhen, eine weitaus höhere NO-Freisetzung bewirkt. Sie stellten auch fest, daß es bei der Initiierung des Flusses zu einem kurzen intrazellulären Calciumanstieg kommt, bei einer weiteren Erhöhung des Flusses jedoch nicht mehr. Dies könnte bedeuten, daß der Calcium-abhängige Weg wichtig ist, um auf die kleinen physiologischen Änderungen der Blutflußgeschwindigkeit schnell reagieren zu können.

Wenn also die Phosphorylierung der eNOS eine zentrale Rolle in der Modulation der NO-Produktion darstellt, so stellt sich die Frage, welche Struktur durch welche phosphoryliert wird. Die Arbeitsgruppe um Gallis [20] hat hierzu Phosphoaminosäureanalysen mittels Kapillarelektrophorese und Tandemmassenspektroskopie durchgeführt. Unter shear stress-Bedingungen konnte eine Phosphat-Inkorporation in zwei spezifische tryptische Peptide der eNOS, 30 s nach Initiierung des Flusses, nachgewiesen werden. Die Peptide konnten mittels der genannten Verfahren identifiziert werden. Sie lauten: TQpSFSLQER und KLQTRPpSPGPPPA-EQLLSQAR. Das erste enthält eine Bindungsstelle für PKB/Akt. Im Zusammenhang damit konnten die Autoren zeigen, daß die Hemmung der PKB-Aktivierung durch LY294002 zu einer Hemmung der flußabhängigen eNOS-Aktivierung von 97% und der NO-Produktion um 68% führt. Umgekehrt erbrachte die in vitro-Stimulation der eNOS mittels PKB eine um 15-20-fach erhöhte enzymatische Aktivität der eNOS. Neben der PKB/Akt-abhängigen Phosphorylierung der eNOS wiesen Boo et al [6] auch auf einen PKA-abhängigen Phosphorylierungsvorgang hin. Mit dem PKA-selektiven Inhibitor H89 wurde die shear stress-abhängige Phosphorylierung der eNOS an Ser1179 und damit auch die NO-Produktion weitgehend gehemmt.

In der Frage, wie das gebildete NO zur Relaxation der Myozyten führt, besteht bisher noch keine Übereinkunft. Es wird davon ausgegangen, daß NO die lösliche Guanylatcyclase aktiviert, welche daraufhin in den Myozyten cGMP bildet. Dieses führt Archer et al. [2] zufolge zu einer Proteinkinase-abhängigen Aktivierung eines Calcium-abhängigen Kalium-Kanals. Der resultierende Kaliumausstrom bedingt eine Hyperpolarisation und damit den Schluß des inward-rectified Calciumkanals. Die Myozyten relaxieren [53]. Neben der Senkung des cytoplasmatischen Calciumgehaltes wird auch eine von der Calciumkonzentration unabhängige,

NO-vermittelte Vasodilatation diskutiert. Hierbei kommt es unter Fluß zur verminderten Calciumsensitivität des kontraktilen Apparates und somit zur Myozytenrelaxation [88].

## *2.2. Fluvastatin und seine pleiotropen Effekte*

Das in unseren Experimenten verwendete Fluvastatin gehört zur Substanzgruppe der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktasememmer. Sie vermindern die intrazelluläre Cholesterinbiosynthese und führen über eine dadurch gesteigerte Expression von LDL-Rezeptoren zu einer Senkung der LDL-Konzentration im Blut [8].

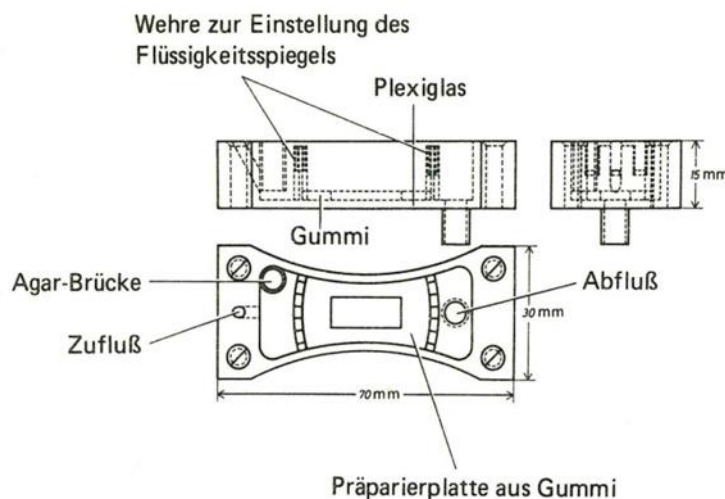
Neben dieser Hauptwirkung besitzen Statine so genannte pleiotrope Wirkungen, die nicht mit der Senkung des LDL-Spiegels in Zusammenhang stehen. Bislang konnten folgende pleiotropen Wirkungen bezüglich der Gefäßwand nachgewiesen werden: Statine wirken der Progression der Arteriosklerose entgegen [68,85]. Sie fördern den vasodilatatorischen Effekt von Acetylcholin und mindern die vasokonstriktorischen Wirkungen von Angiotensin II und Noradrenalin [55,83]. Als weitere Effekte sind eine plaquestabilisierende Wirkung, die Hemmung der LDL-Oxidation, Verminderung der Monocytenadhäsion am Gefäßendothel und eine Verzögerung der Myozytenproliferation zu nennen [7,35,63,89]. Auch direkte Effekte auf intrazelluläre Proteine werden beschrieben. Diese führen zu einer verzögerten Plättchenaggregation, einer erleichterten Fibrinolyse und über eine gesteigerte eNOS-Aktivität zu einer konsekutiven Vasodilatation [14,42,54]. Zudem wirken Statine antiinflammatorisch und senken unter anderem das hs-CRP [59]. Die genauen Wirkungsmechanismen, über die diese pleiotropen Effekte zustande kommen, sind derzeit noch unbekannt.

In mehreren klinischen Studien wurde der Einfluß der Statine auf das Auftreten und den Progreß einer Alzheimerdemenz untersucht. In der Mehrzahl der Studien ergab sich ein signifikanter Vorteil unter Statintherapie [21,25]. Ausgehend von diesen Ergebnissen und der Annahme, daß eine verbesserte Hirndurchblutung zu einer besseren kognitiven Leistung führt, wollten wir a) erstmals die Existenz der flußabhängigen Vasodilatation an Hirngefäßen und b) den Einfluß von Fluvastatin auf die selbige nachweisen.

### 3. Material und Methoden

Für unsere Versuche verwendeten wir ausschließlich menschliche Hirngefäße. Sie stammten von Patienten, die aufgrund eines Hirntumors operiert wurden. Da bei der Exzision des Tumorgewebes teilweise auch gesunde Gefäßabschnitte reseziert werden mußten, konnten uns diese zur Verfügung gestellt werden. Die kurzen Gefäßresektate wurden im Operationssaal in eine auf 5°C gekühlte modifizierte Krebslösung (Zusammensetzung in mmol/L: Na<sup>+</sup> 151,16; K<sup>+</sup> 4,69; Ca<sup>2+</sup> 2,52; Mg<sup>2+</sup> 1,1; Cl<sup>-</sup> 145,4; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 6,31; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1,38, Glucose 7,7) überführt und in einem geeigneten Behältnis umgehend in das Labor transportiert.

Mindestens zwei Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Gefäßabschnitte in ein Äquibrierbad mit frischer modifizierter Krebslösung überführt und darin unter ständiger Oxygenierung mittels eines Carbogen-Gasgemisches (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) von 5°C auf 37°C langsam erwärmt. Dies erfolgte zur Wiederherstellung physiologischer Bedingungen. Unmittelbar vor dem Versuch wurde ein ca. 4-5 mm langer Gefäßzylinder aus der Äquibrierlösung entnommen und unter dem Mikroskop (Vergrößerung) in Längsrichtung aufgeschnitten. Die freien Enden mit den an den Schnittflächen quer angeschnittenen Myozyten wurden in die von modifizierter Krebslösung perfundierte Meßkammer eingespannt (Abb. 1). Die Mus-



**Abb. 1.** Meßkammer, dargestellt in Grund-, Auf- und Seitenriß. Die sich in ihrem zentralen Anteil verjüngende Form der Kammer wurde so konstruiert, um bei laminarem Fluß eine hohe Strömungsgeschwindigkeit am Präparat zu erzielen.

kelzellen verlaufen somit in Längsrichtung. Hierbei wurde ein Ende in einer feststehenden Klemme und das andere an einen Meßarm eines isometrischen Kraftaufnehmers (KWS 522.C, K52C; Hottinger-Baldwin, Darmstadt, Germany) fixiert. Während der Einspann- und

der folgenden Vorspannphase lag die Flußgeschwindigkeit der modifizierten Krebslösung bei 3 mL/min. Die verwendete Lösung wurde stets frisch angesetzt und in einem Vorratsgefäß ständig mit Carbogen durchperlt. Hieraus erfolgte der Zufluß über ein beheiztes Schlauchsystem, angetrieben von einer Rollpumpe, in die Meßkammer. Eine konstante Temperatur von 37°C (Haake-Thermostat) und ein physiologischer pH von 7,2-7,4 wurden laufend aufrechterhalten und mit geeigneten Meßvorrichtungen kontrolliert (pH-Elektrode in Meßkammer: U402-M3, Ingold, Frankfurt/Main und pH-Meter: 645, Knick, Berlin).

Ein digitaler Meßverstärker (KWS 522.C, K52C; Hottinger Baldwin Meßtechnik, Darmstadt, Germany) wandelte die vom isometrischen Kraftaufnehmer weitergeleiteten Signale in einen Tonuswert in Gramm-Kraft (g, entspricht 9,81 mN) um. Dieser wurde von uns abgelesen und protokolliert [78]. Nach dem Einspannen wurde der Gefäßstreifen innerhalb von 5 min auf eine Vorspannung von 1,500 g vorgedehnt und anschließend für weitere 5 min bei diesem Wert gehalten. Dies sollte die *in vivo* bestehende Spannung, die durch den arteriellen Blutdruck erzeugt wird, nachahmen.

### *3.1. Bestimmung des Gefäßtonus*

Bei den Kontrollversuchen wurde nach der Vordehnungsphase und einer anschließenden 5-minütigen Anpassungsphase bei unveränderter Flußrate die Flußgeschwindigkeit der modifizierten Krebslösung im Abstand von jeweils 10 Minuten in folgenden Schritten erhöht: von 3 auf 5, 20, 40, 100 mL/min. Die Ergebnisse dieser Versuche spiegelten die flußabhängige Vasodilatation der Hirngefäße wieder. Sie dienten als Vergleichswert für die analog mit Fluvastatin-Lösung durchgeführten Versuche.

Die Präparate, an denen die FDD unter Fluvastatingabe gemessen werden sollte, wurden ebenfalls in modifizierter Krebslösung vorgespannt. Danach erfolgte die Umstellung des Meßkammerdurchflusses auf die Fluvastatinlösung. Modifizierte Krebslösung mit 2,2 µmol/L Fluvastatin wurde vor Versuchsbeginn frisch angesetzt und in einem Vorratsbehälter (2 Liter) unter ständiger Carbogenzufuhr bereitgehalten. Über das beheizte Schlauchsystem wurde die Lösung in die Meßkammer geleitet. Dabei wurden Temperatur und pH-Wert, wie bei der Krebslösung beschrieben, eingestellt und kontrolliert. Die Flußgeschwindigkeit der Fluvastatinlösung wurde nach demselben Schema wie in den Kontrollversuchen schrittweise erhöht.



### 3.2. Intrazelluläre Membranpotentialableitung

Die Versuche zur Bestimmung des intrazellulären Membranpotentials wurden nach dem gleichen Schema wie die vorab beschriebene Tonusbestimmung durchgeführt. Simultan zu den Potentialmessungen wurden auch hier die Tonuswerte erfaßt und protokolliert. Die intrazelluläre Ableitung des Membranpotentials erfolgte mit Glasmikroelektroden, welche mit 3 molarer KCl-Lösung gefüllt waren. Sie wurden aus Pyrex Glaskapillaren (Pyrex Brand, K2916, Corning Glass, Außendurchmesser 3 mm, Innendurchmesser 1,8 mm) mit einem Horizontalpuller (T. Chowdhury Pipette Puller, ISEW, Indianapolis, USA) bei 6,8 A Heizstrom und 2 min Ausziehzeit hergestellt. Der Durchmesser der verwendbaren Elektrodenspitzen lag hier nach bei  $< 1 \mu\text{m}$ . Dies wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Der Elektrodenwiderstand wies Werte zwischen 60-100  $\text{M}\Omega$  auf, die Tip-Potentiale betragen -40 bis -80 mV. Diese Werte wurden sowohl vor dem Einstechen in die Muskelzelle als auch nach den Versuchen überprüft. Nur bei unveränderten Widerständen und Tip-Potentialen wurden die Versuche in die Auswertung aufgenommen [78].

Das zu messende Membranpotential ergab sich aus der Potentialdifferenz zwischen intrazellulär eingestochener Mikroelektrode und einer Ag/AgCl/Pt-Referenzelektrode. Diese war über eine KCl/Agarbrücke mit der Lösung in der Meßkammer verbunden. Die Darstellung des Potentialwertes erfolgte nach 10-facher Verstärkung auf einem Großbildschirmoszilloskop (SGM 43 BN 901 S7N293, Knott, München). Der Elektrodenbereich wurde zusammen mit der Meßkammer durch einen Faraday-Käfig abgeschirmt. Die Messung selbst erfolgte jeweils circa 5 Minuten nach Beginn einer neuen Flußgeschwindigkeit. Damit hatte das Präparat Zeit, auf die Flußgröße zu reagieren und sich zu stabilisieren. Von der Endothelseite her wurde in die Myozyten eingestochen. Dabei konnte das Gelingen dieses Vorganges auf dem Großbildschirmoszilloskop verfolgt werden. Beim Eintauchen in die fließende Lösung wurde das Elektrodenpotential auf Null gestellt. Das Eindringen in den Intrazellulärraum der Myozyten wurde durch einen steilen Potentialabfall auf Werte zwischen -50 und -80 mV kenntlich. Während einer Meßserie wurde der Elektrodenkopf vor der Ableitung minimal in horizontaler Richtung bewegt und somit verschiedene Einstichstellen ausgewählt. Die gemessenen Werte spiegeln den Potentialzustand mehrerer Muskelzellen wider. Membranpotentiale positiver als -50 mV mußten aus der Auswertung genommen werden, da sie vermutlich Endothelzellen entstammten. Die Werte wurden protokolliert und in jedem Versuch wurde für die

einzelnen Flußgeschwindigkeiten ein Mittelwert errechnet.

### *3.3. Datenaufnahme*

Die gemessenen Werte wurden über einen Analog/Digital-Digital/Analog Wandler (DT 2821, Data Translation, Marlboro, Massachusetts, USA) an den PC (80486, DX-2-66, Highscreen, Vobis, Aachen) weitergeleitet. Hier wurden sie mittels der Software WinADDA (V 1.31, Mikrotaurus Software, Berlin) aufgezeichnet. Zudem fand eine schriftliche Protokollierung der Potential- und Tonuswerte im Abstand von je 5 Minuten statt.

### *3.4. cAMP- und cGMP-Bestimmung*

Sämtliche Versuchspräparate wurden unmittelbar nach Versuchsende aus der Meßvorrichtung ausgespannt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hieraus erfolgte die Bestimmung der cGMP- und cAMP-Konzentration mittels kompetitiver ELISAs (Biotrak, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany).

#### *3.4.1. Homogenisieren des Gewebes*

Zunächst erfolgte die Einwaage der in flüssigem Stickstoff gelagerten Gewebeproben auf ca. -80°C vorgekühlte 2 mL Polypropylengefäße. Im Anschluß wurden die Präparate durch dreimaliges manuelles Homogenisieren in 2 mL Glas-Potter-Homogenisatoren in jeweils 0,2 mL 6%iger Trichloressigsäure aufgeschlossen. Nachdem sich das Homogenisat in den Polypropylengefäßen gesammelt hatte, wurden präzipitierte Anteile des Homogenisats durch 15-minütige Zentrifugation bei  $23000 \times g$  sedimentiert. Die Trichloressigsäure konnte mit dem abgetrennten Überstand entfernt werden. Dies erfolgte durch viermaliges Abschütteln mit je 1 mL wassergesättigtem Diäthyläther. Danach wurde die verbleibende wässrige Phase gefriergetrocknet. Die löslichen Sedimente wurden in 0,2 mL Testpuffer (50 mmol/L Na-Acetat, pH = 5,8, BSA = 0,02%) inkubiert. Bis zur Bestimmung der cAMP-Konzentration lagerte der Aufschluß erneut bei -80°C.

#### *3.4.2. Bestimmung der cAMP-Konzentration mittels ELISA*

Die cAMP-Konzentration wurde mit den BIOTRAK-ELISA-Reagenzien von Amersham

Pharmacia Biotech ohne Acetylierung bestimmt. Der Biotrak ELISA beruht auf der Konkurrenz der Bindung des freien cAMP der Probe mit einem cAMP-Peroxidase-Konjugat an immobilisiertes cAMP-spezifisches Antiserum. Vor der Verwendung wurde das Antiserum 1:2 mit dem Testpuffer verdünnt. Anschließend wurden Antiserum und cAMP-Peroxidase-Konjugat in jeweils 11 mL Testpuffer gelöst. Mit Hilfe einer Stammlösung (32 nmoL/L) wurde eine Verdünnungsreihe der Standards hergestellt, welche 0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 und 3200 fmol in jeweils 100 µL Volumen beinhaltete. Die Ansätze enthielten entweder 100 µL Standard oder 80 µL Testpuffer sowie 20 µL Probe und wurden auf einer mit Anti-Kaninchen-IgG beschichteten 96-well ELISA-Platte hergestellt. Hohe cAMP-Konzentrationen in der Probe hatten eine entsprechende Reduktion der Probenmenge zur Folge. 200 µL Testpuffer zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Konjugats "NSB" wurden 120 min im Kühlschrank bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Duplikate der Standards und Proben wurden vor der Inkubation zusätzlich mit 100 µL Antiserum versetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde zu allen Ansätzen 50 µL cAMP-Peroxidase-Konjugat hinzugegeben, woran sich nochmals 60 min Inkubation anschlossen. Danach wurden die Ansätze 5-mal mit Waschpuffer (Testpuffer plus 0,05% Tween 20) gewaschen und anschließend sorgfältig getrocknet.

Die quantitative Bestimmung des gebundenen Peroxidase-Konjugats erfolgte photometrisch über die Umsetzung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Peroxidase. Da in alle Wells 150 µL der fertigen TMB-Substratlösung gegeben wurde, konnte bei Raumtemperatur die Blaufärbung des Standards beobachtet werden. Die Reaktionszeit wurde dabei, abweichend von den Angaben des Herstellers, so gewählt, daß ein Wert von 1,5 bis 1,7 Absorptionseinheiten nicht überschritten wurde. Der dafür benötigte Zeitraum variierte zwischen 10 und 120 Minuten. Sobald die optimale Blaufärbung der Nullwerte erreicht wurde, konnten 100 µL 1 molarer Schwefelsäure zugegeben werden, was einen Farbumschlag nach Gelb zur Folge hatte. Dieser blieb bis zu einer Stunde lang stabil. Die anschließende Absorptionsmessung wurde mit einem ELISA Reader bzw. einem Perkin-Elmer Victor ELISA Platten Photometer bei 450 nm durchgeführt.

### 3.4.3. Bestimmung der cGMP-Konzentration mittels ELISA

cGMP wurde mittels einer analogen Methode bestimmt. Hier fand jedoch eine Acetylierung von Standards und Samples statt. Die Sensitivität des Tests konnte etwa um den Faktor 10

gesteigert werden, da das Antiserum zu acetylierten Zyklonukleotiden eine höhere Affinität besitzt. Das Acetylierungsreagenz enthielt zu zwei Teilen Triäthylamin und zu einem Teil Essigsäureanhydrid. Die Proben und Standards wurden zu jeweils 1/10 ihres Volumens mit dem Acetylierungsreagenz versetzt. Innerhalb von etwa fünf Minuten war die Acetylierungsreaktion abgeschlossen. Die Standards enthielten 0; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 und 512 fmol pro Ansatz in einem Volumen von 50 µL. Für die Acetylierung der Proben wurden 100 µL Probe mit 10 µL Testpuffer und 11 µL Acetylierungsreagenz versetzt. Der NSB-Ansatz enthielt 150 µL Testpuffer. Es wurden für die Meßansätze 100 µL Antiserum vorgelegt, zu dem jeweils 50 µL Standard oder Probe gegeben wurde. Alle Ansätze wurden zweifach hergestellt und 120 Minuten inkubiert. Auf die Zugabe von 100 µL cGMP-Peroxidase-Konjugat folgten erneut 60 Minuten Inkubation. Anschließend wurden die Ansätze gewaschen, mit 200 µL TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reagenz versetzt und wie bereits erläutert für einen variablen Zeitraum bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µL 1 molarer Schwefelsäure erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption.

#### 3.4.4. Auswertung mittels Kalibrierungskurve

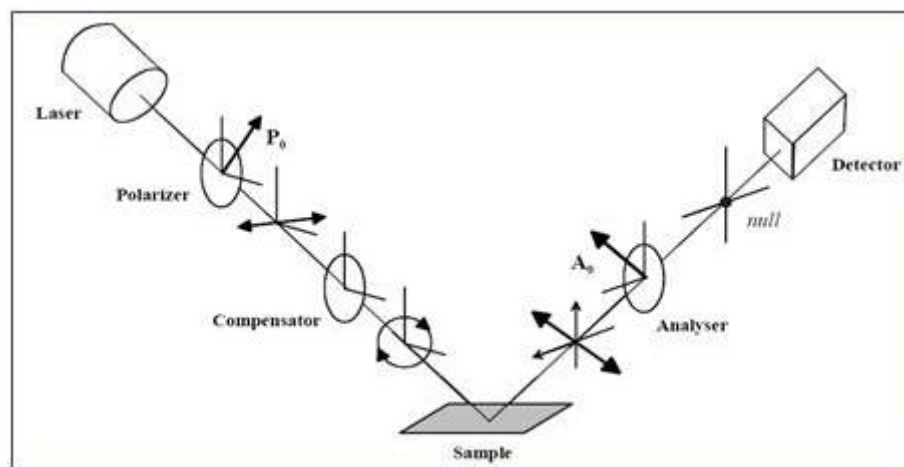
Eine parallel angelegte Kalibrierungskurve mit cAMP-Mengen zwischen 0 und 3200 fmol/L Ansatz ermöglichte die Auswertung mittels Fit der Absorption an die Standardkurven. In der dafür verwendeten Funktionsgleichung  $f = ((a \times b)/(b + X)) + c$  steht X für die Konzentration des Standards. Aus den Fitparametern a, b und c wurde die Menge (X)cAMP der Proben (in fmol) über  $X = ((a \times b)/(y - c)) - b$  berechnet. Die Variable y steht dabei für die Absorption bei 450 nm. Die Konzentration ergab sich anschließend aus dem Produkt von X und Faktor f (Gesamtvolumen/eingesetztes Probenvolumen) dividiert durch das Gewebsgewicht in mg. Die so ermittelte Konzentration trägt die Einheit nmol/kg.

### 3.5. Ellipsometrie

#### 3.5.1. Allgemeine Grundlagen der ellipsometrischen Messungen

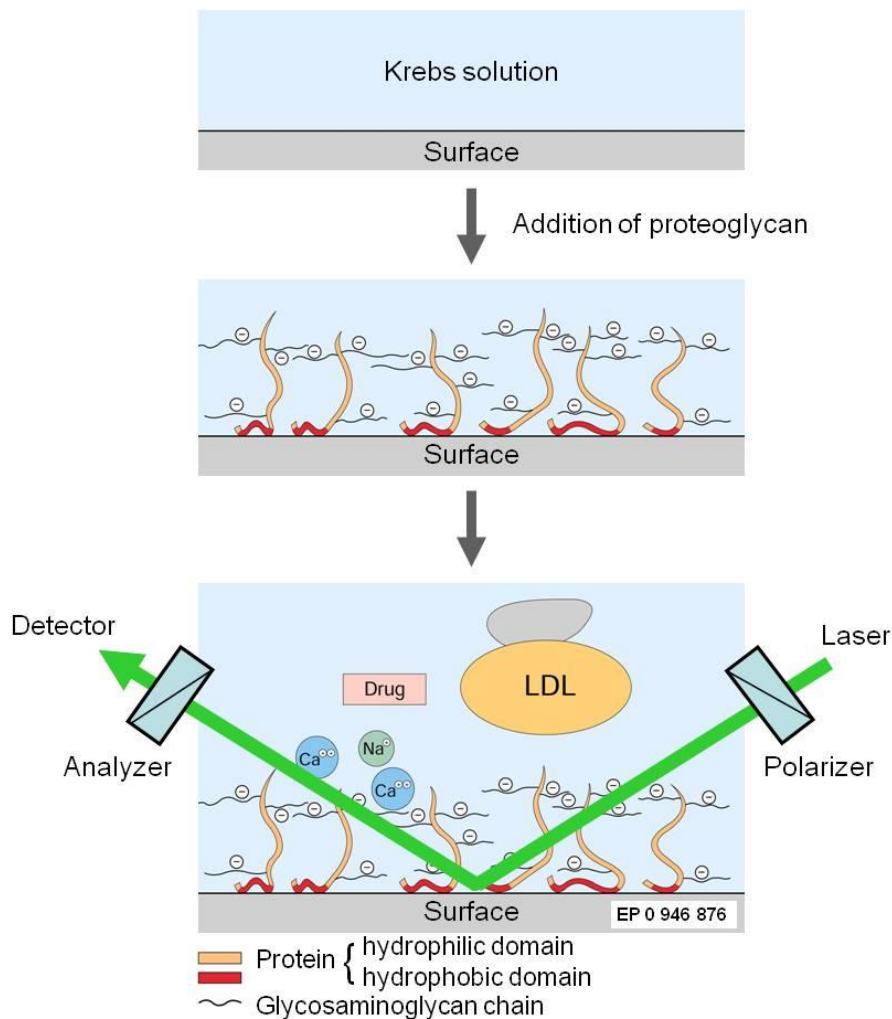
Unter Ellipsometrie versteht man eine optische Meßtechnik die darauf basiert, daß sich der Polarisationszustand eines Lichtstrahls bei Reflexion oder Brechung an einer Probe verändert (Abb. 2). Wie aus den Fresnel-Gleichungen hervorgeht, wird dieses Licht bei der gerichteten Reflexion an einer Grenzfläche im Allgemeinen elliptisch polarisiert, woraus sich

auch der Name Ellipsometrie ableitet. Handelt es sich bei der Probe um die Oberfläche eines reinen Dielektrikums, d.h. einer einfachen Grenzfläche, so läßt sich der Brechungsindex des Materials bestimmen. Für ein Medium mit Absorption ergibt sich ein komplexer Brechungsindex:  $\tilde{n} = n - ik$ . Befindet sich auf einer ebenen Grenzfläche ein dünner Film, so ergeben sich zusätzliche Reflexionen an den inneren Grenzflächen, was zu Interferenzeffekten führt. Diese Interferenzen verändern ebenfalls den Polarisationszustand des Lichts. Dies kann ausgenutzt werden, um die Dicken von Filmen bei bekanntem Brechungsindex zu bestimmen. Für Systeme, die aus mehreren Schichten unterschiedlicher Materialien bestehen, läßt sich dieses Prinzip verallgemeinern. Die Filmdicken können mit einer Auflösung von wenigen Ångström bestimmt werden.



**Abb. 2.** Allgemeiner Aufbau eines Ellipsometers (PCSA): P – Polarizer, C – compensator, S – sample, A – analyzer.

Ellipsometrie bestimmt die Änderung des Polarisationszustands von Licht bei Reflexion (oder Transmission) an einer Probe (Abb. 3). In der Regel wird linear oder zirkular polarisiertes Licht verwendet. Für die Messungen ist eine genaue Kenntnis des komplexen Brechungsindex des Substrates notwendig. Gemessen werden die beiden ellipsometrischen Winkel  $\Psi$  und  $\Delta$ .  $\Delta$  stellt dabei die Phasenverschiebung und  $\Psi$  die Dämpfung der Amplituden dar. Aus diesen Parametern lassen sich die adsorbierte Menge  $\Gamma$  und die adsorbierte Schichtdicke  $\delta_{el}$  berechnen. Dies erfolgt mit Hilfe der Formel nach de Feijter [13]. Voraussetzung ist eine vorhergehende Berechnung von Dicke  $d$  und Brechungsindex  $n$  [86]. Alle Messungen unserer Versuchsanordnung wurden bei 532 nm mit einem Optrel Multiskop (Optrel, Kleinmachnow, Germany) ausgeführt. Zunächst erfolgte eine Kalibrierung in Form der vier-Zonen Nullellipsometrie. Diese determiniert und korrigiert die unvermeidbaren Fehler der Nullposition von P, C, und A und der Winkelretardation des Kompensators.



**Abb. 3.** Monomolekulare Beschichtung einer methylierten Silikatoberfläche mit Proteoglykanmolekülen und ihre Wechselwirkung mit den Ionen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  sowie mit Lipoproteinpartikeln in Blutersatzlösung (nicht maßstabsgerecht). Weiterhin kann auch der Einfluß von Pharmaka in diesem laserbasierten Biosensormodell getestet werden (EP 0 946 876) (aus [76]).

Alle weiteren Messungen führten wir nach Kalibrierung in der ein-Zonen Nullellipsometrie durch. Im Falle von geschichteten Substraten, wie des Silikatoxides, muß zur korrekten Bestimmung der adsorbierten Schichtdicke und des mittleren Brechungsindex eine getrennte Messung für beide Schichten erfolgen. Hierzu werden die ellipsometrischen Parameter in zwei verschiedenen Medien, z.B. Luft und Puffer, bestimmt. Aus den zwei Parameterpaaren können dann die beiden Brechungsindices  $n_1$  (Oxidschicht) und  $n_2$  (Silikatschicht), die Schichtdicke  $d_1$  der Oxidschicht sowie die Absorption an der Silikatschicht  $k_2$  einzeln ausgerechnet werden [46]. Bei der von uns verwendeten methylierten Silikatoberfläche ist die Methylschicht aufgrund ihrer extremen Dünne von max. 0,5 nm vernachlässigbar [3]. Die zeitliche Auflösung zwischen 2 Messungen betrug jeweils 3-4 s. Die Adsorptionstemperatur wurde konstant bei  $25^\circ\text{C}$  gehalten. Gemischt wurde der Versuchsansatz durch einen magnetischen Rührer mit 300 rpm. Der pH-Wert von 7,3-7,4 wurde durch den Bikarbonat/Phosphat-

Puffer und die kontinuierliche Zufuhr eines definierten Gasgemisches (93% N<sub>2</sub>/7% CO<sub>2</sub>) (Aga, Schweden) zur Lösung in der Küvette, aufrechterhalten. Hierdurch beugten wir einem Proteoglykan- und Lipoproteinabbau sowie einer Calciumphosphat-Präzipitation vor.

### 3.5.2. Ellipsometrische Versuchsdurchführung

Sämtliche Experimente wurden in einer Blutersatzlösung durchgeführt. Diese sogenannte Krebslösung simuliert den Extrazellulärraum, in dem sich auch die Proteoglykane befinden. Sie setzt sich zusammen aus: Na<sup>+</sup> 151,16, K<sup>+</sup> 4,69, Ca<sup>2+</sup> 2,52, Mg<sup>2+</sup> 1,1, Cl<sup>-</sup> 145,4, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 16,31 und H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1,38 mmol/L (25°C, pH 7,3). Das HS-PG-Lyophilisat hatte ein Molekulargewicht von ca. 175 kDa, welches chromatographisch in Sephacryl S400 Säulen gegen Referenzproteoglykane bestimmt wurde. Die weitere Analyse ergab eine Heparansulfat-Proportion von 82g/100g Trockengewicht, entsprechend vier Heparansulfatketten (~4 × 36 kDa) mit einem durchschnittlichen Sulfatgehalt von 0,5 Sulfatgruppen pro Disaccharideinheit, die kovalent an den Proteincore gebunden sind [69].

Die methylierte Silikatoberfläche wurde folgendermaßen erzeugt. Die hydrophile und negativ geladene Silikatoberfläche wurde in der Reihenfolge Wasser, Ethanol und Trichlorethylen (pro analysi, Merck) gespült und anschließend mit einer 0,1 wt% Lösung von Cl<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si (Merck) in Trichlorethylen für 90 min behandelt. Die so präparierte Oberfläche hatte ein Oberflächenpotential von -40 mV und einen Kontaktwinkel von 90° [72]. Nach der optischen Analyse der reinen Substratschicht wurde HS-PG in einer Konzentration von 0,1 mg/mL in Ca<sup>2+</sup>-freier Krebslösung zur Küvette hinzugegeben und wiederum Psi und Delta bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Fluvastatin ebenfalls in Ca<sup>2+</sup>-freier Krebslösung. Auch hiernach wurden die ellipsometrischen Winkel gemessen. Aus den gemessenen ellipsometrischen Winkelpaaren wurden jeweils die Brechungsindices n und die durchschnittlichen Dicken δ<sub>e1</sub> bestimmt. Die adsorbierte Menge Γ der einzelnen Substrate konnte schließlich über die molare Refraktivität und das spezifische Volumen von 4,1 bestimmt werden [69].

### 3.6. Auswertung und Statistik

Zur Auswertung wurden jeweils Tonus und Membranpotentiale der Versuche bei identischen

Flußstärken summiert und durch die Zahl der Versuche dividiert. Entsprechende Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error mean) werden angegeben. Eingeschlossen wurden jeweils 6 Kontroll- und 6 Fluvastatinversuche. Die statistische Signifikanz des Fluvastatineffektes auf die flußabhängige Dilatation der Hirnarterien wurde mittels des gepaarten Student's *t*-test bestimmt. Prozentabweichungen in den Parametern wurden auf Signifikanz mit dem Wilcoxon signed-rank test, welcher bei kleinen Versuchszahlen sensibler ist, getestet. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

#### 4. Ergebnisse

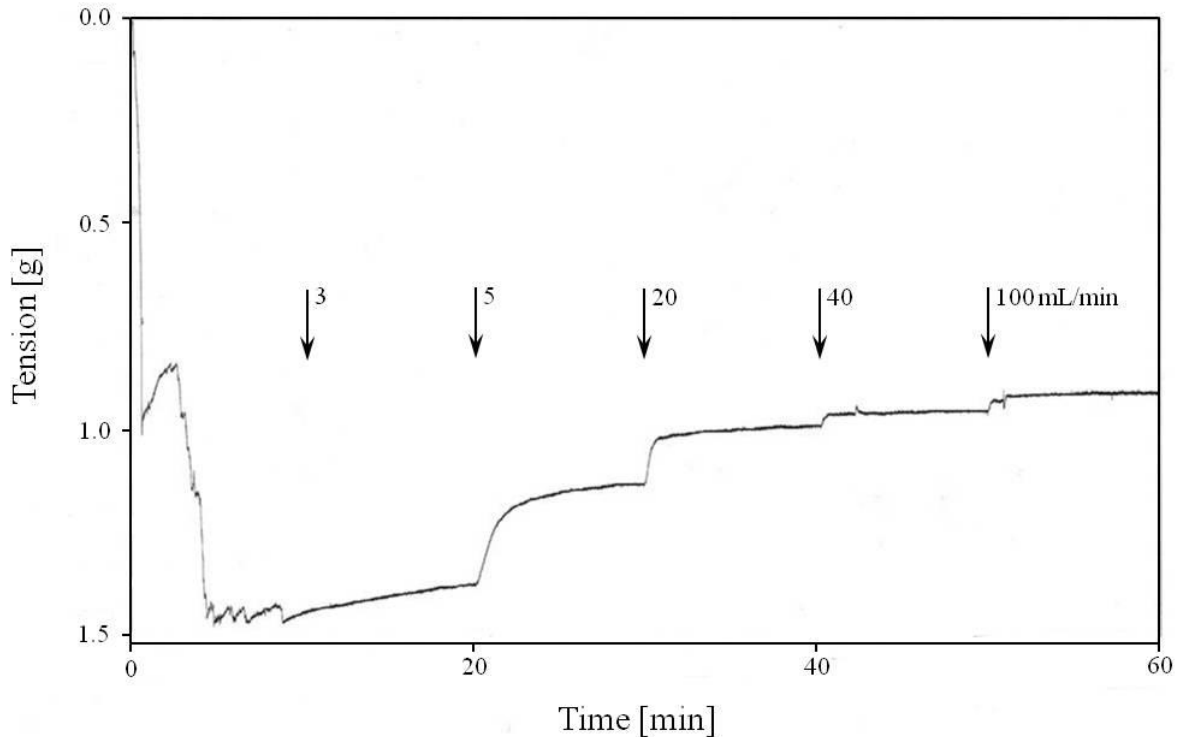
Aus jedem Gefäßresektat wurde, sofern möglich, ein Kontroll- und ein "Fluvastatinpräparat" gewonnen. Hierdurch erhielten wir aus den Mittelwerten der Kontrollversuche eine Vergleichskurve für die mit Fluvastatin behandelten Präparate.

##### 4.1. Die flußabhängige Dilatation der Kontrollpräparate

In Abb. 4 wird an einem Kontrollversuch beispielhaft die Reaktion eines Hirngefäßes auf ansteigende Flußgeschwindigkeiten dargestellt.

Die ersten 10 Minuten nach der Vorspannphase dienen der Anpassung des Gefäßstreifens auf den vorangegangenen Dehnungsvorgang. Es kommt zu einer von der Flußgeschwindigkeit unabhängigen Vasodilatation (*Stressrelaxation*), die mehrfach durch Nachspannen ausgeglichen wird. Der nach Beendigung der Anpassungsphase gemessene Wert dient als Ausgangspunkt für die weiteren Berechnungen. Die Flußgeschwindigkeit wurde nunmehr im Abstand von jeweils 10 Minuten erhöht. Es zeigt sich, daß nach jedem Umschalten eine reaktive Dilatation erfolgt. Bei Erhöhung einer Flußrate beobachtet man zunächst einen schnellen Tonusabfall. Nach circa fünf Minuten ist dann ein neuer, niedrigerer Tonuswert erreicht, welcher sich bis zum erneuten Umschalten relativ konstant hält. Aus dem Kurvenverlauf in Abb. 4 wird zudem ersichtlich, daß nicht bei jeder Zunahme der Flußgeschwindigkeit eine gleich starke Dilatation/Tonusänderung entsteht. Im Bereich von 5 mL/min bis 20 mL/min zeigt sich die stärkste Antwort auf die Flußratenerhöhung.





**Abb. 4.** Darstellung der flußabhängigen Relaxation eines Kontrollpräparates (Originalregistrierung). Auf die 10-minütige Vorspannphase folgt eine 10-minütige Anpassungsphase. Der am Ende dieser Phase gemessene Tonuswert dient als Ausgangswert für die weiteren Messungen.

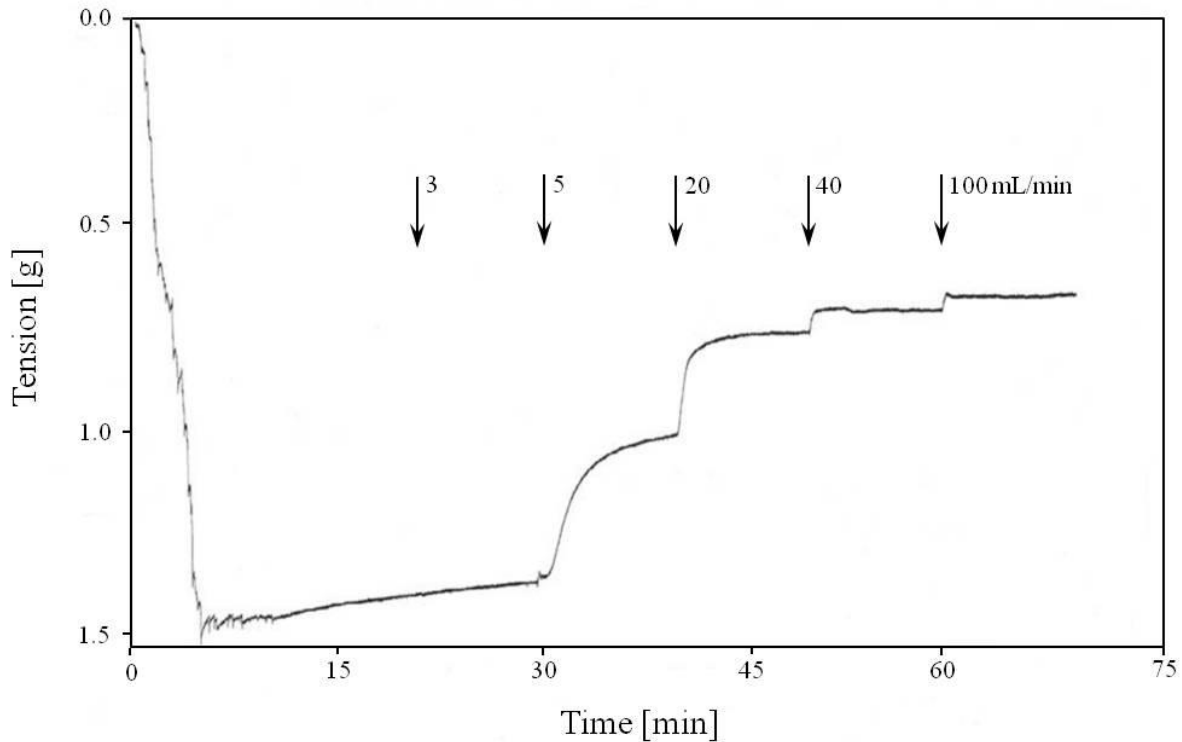
#### 4.2. Die flußabhängige Dilatation der mit Fluvastatin behandelten Präparate

Der grundsätzliche Kurvenverlauf unterscheidet sich nicht von dem der Kontrollpräparate. Nach Beendigung der Vorspannphase wurde die modifizierte Krebslösung durch Fluvastatinlösung ersetzt. In der sich anschließenden Anpassungsphase fand somit der erste Kontakt zwischen Versuchspräparat und Fluvastatin statt. In Abb. 5 wird der Kurvenverlauf eines mit Fluvastatinlösung durchgeführten Versuchs exemplarisch dargestellt.

#### 4.3. Gegenüberstellung der Potentialwerte aus Kontrollmessungen und Messungen mit Fluvastatin

In Abb. 6A werden die aus den jeweiligen Mittelwerten erzeugten Kurven gemeinsam dargestellt. Bereits das Potential bei einer Flußrate von 3 mL/min ist unter Fluvastatin deutlich negativer. Im Folgenden kommt es bei den mit Fluvastatin durchgeführten Versuchen zu einer wesentlich stärkeren Hyperpolarisation als Reaktion auf die Flußgeschwindigkeit. Insgesamt nimmt das Membranpotential in den Kontrollmessungen von  $-49,1 \pm 0,6$  mV auf  $-52,5 \pm 0,4$  mV und in den unter Fluvastatin durchgeführten Messungen von  $-50,7 \pm 0,3$  mV auf  $-56,6 \pm$

0,4 mV ab. Es zeigt sich also unter Fluvastatin bei jeder Flußrate eine signifikant stärkere Hyperpolarisation als Antwort auf ihre Erhöhung.



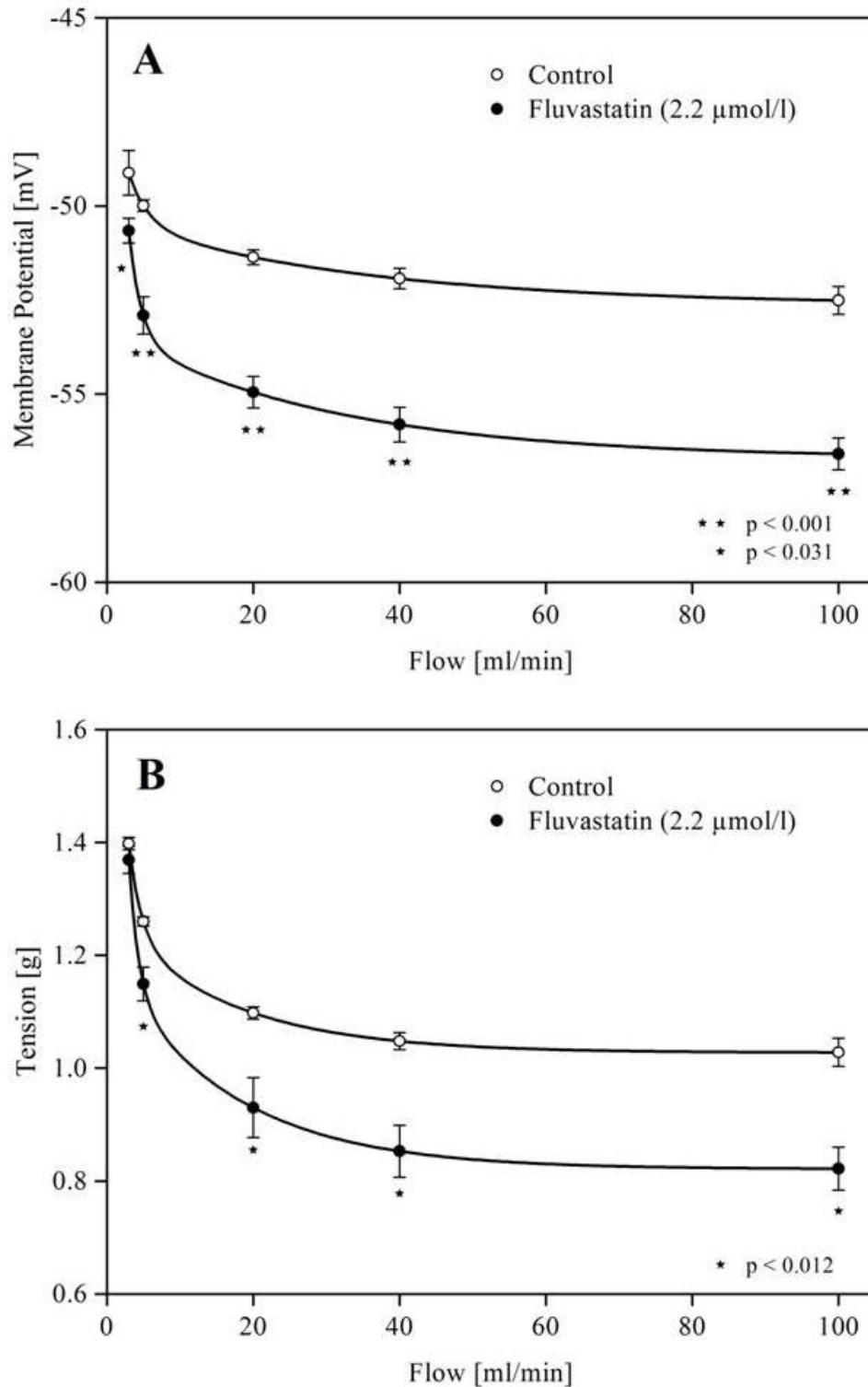
**Abb. 5.** Darstellung der flußabhängigen Dilatation eines mit Fluvastatinlösung behandelten Präparates (Originalregistrierung). Der zeitliche Ablauf entspricht dem der Kontrollversuche.

#### 4.4. Gegenüberstellung der Tonusergebnisse aus Kontroll- und Fluvastatinpräparaten

Entsprechend einer starken elektromechanischen Kopplung zeigen die in Abb. 6B dargestellten Kurvenverläufe eine dilatatorische Reaktion der mit Fluvastatin behandelten Gefäße und der Kontrollgefäße auf die jeweiligen Flußphasen. Sie sind aus den Mittelwerten der bei den jeweiligen Flußgeschwindigkeiten gemessenen Tonuswerte erstellt. Die Kontrollkurve dient dem Vergleich mit den bei Fluvastatingabe ermittelten Versuchsergebnissen. Eine Beurteilung des Fluvastatineffektes wäre ansonsten nicht möglich. Jedoch hat die Kontrollkurve noch eine weitere wichtige Bedeutung. Sie zeigt, daß an den intracerebralen Hirngefäßen überhaupt eine flußabhängige Vasodilatation stattfindet. Beide Kurven sind in der gleichen Skalierung dargestellt. Damit ist ein direkter Vergleich möglich (Abb. 6B).

Der Ausgangswert nach der 10-minütigen Anpassungsphase bei einer Flußgeschwindigkeit von 3 mL/min beträgt in der Kontrolle  $1,398 \pm 0,011$ g und im Fluvastatinversuch  $1,369 \pm 0,024$  g. Nach der ersten Erhöhung der Flußgeschwindigkeit auf 5 mL/min zeigt sich ein sig-

nifikanter Unterschied in der Stärke der Dilatationsreaktion. So liegt der Kontrollwert nach einer 10-minütigen Flußphase von 5 mL/min Geschwindigkeit bei  $1,260 \pm 0,008$  g, während der zum gleichen Zeitpunkt bei Fluvastatingabe gemessene Wert bereits auf  $1,149 \pm 0,003$  g



**Abb. 6.** A Darstellung der Potentialmittelwerte aus Kontrollmessungen und Messungen mit Fluvastatin in Abhängigkeit von der Flußgeschwindigkeit. B Darstellung der Tonusmittelwerte aus den Kontrollmessungen und den Messungen mit Fluvastatin in Abhängigkeit von der Flußgeschwindigkeit.

gesunken ist. Auch bei den folgenden Flußphasen ist stets eine stärkere dilatatorische Reaktion in den mit Fluvastatin durchgeführten Versuchen zu beobachten. Insgesamt dilatieren die Kontrollpräparate bis zu einem Tonuswert von  $1,028 \pm 0,025$  g, was einer Gesamtdilatation von 26,5% entspricht. Die mit Fluvastatin behandelten Gefäße reagieren auf die Flußraten-erhöhungen mit einer Tonussenkung auf  $0,822 \pm 0,039$  g. Ausgehend vom Ausgangswert ist dies eine 40%ige Reduktion des Tonus. Es kommt folglich bei den Fluvastatinpräparaten zu einer signifikant stärkeren flußabhängigen Tonusreduktion als bei den Kontrollpräparaten.

#### 4.5. cAMP und cGMP

Die Ergebnisse der cAMP- und cGMP-Bestimmung aus den eingefrorenen Präparaten stellen sich wie folgt dar.

**Tabelle 1.** cAMP- und cGMP-Konzentrationen in Kontrollversuchen und den mit Fluvastatin behandelten Präparaten. Unter Fluvastatineinwirkung zeigt sich eine signifikante Erhöhung des cGMP-Spiegels in den Hirngefäßen bei einem Fluß von 100 mL/min. Die cAMP-Konzentration unterscheidet sich jedoch in den beiden Gruppen nicht signifikant.

	Kontrollen	Fluvastatin (2,2 µmol/L)	Signifikanz
cAMP-Konzentration [nmol/kg]	$250,4 \pm 45,5$	$264,0 \pm 61,9$	n.s.
cGMP-Konzentration [nmol/kg]	$1,13 \pm 0,30$	$4,32 \pm 0,80$	$p < 0,0009$

#### 4.6. Ellipsometrie

Natives HS-PG wurde zunächst in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Krebslösung an eine methylierte hydrophobe Silikatoberfläche bis zur Sättigung adsorbiert. Die adsorbierte Menge wurde indirekt über die Änderung der ellipsometrischen Parameter  $\Psi$  und  $\Delta$  nach Zugabe des Substrates bestimmt. Im Folgenden wurde  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Krebslösung mit Fluvastatin (2,2 µmol/L) zur Küvette gegeben und weiterhin die Adsorptionsmenge bestimmt. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Adsorption und Schichtdicke (nicht dargestellt). Wir konnten somit von einer direkten Bindung von Fluvastatin an die HS-PG-Schicht ausgehen. In einem weiteren Arbeitsschritt wurde LDL (100 mg/dL) zum Versuchsansatz hinzugegeben und es kam zunächst zu einer

deutlichen Abnahme der adsorbierten Menge des binären Rezeptor-Lipid-Komplexes. Somit kann geschlossen werden, daß an HS-PG gebundenes Fluvastatin die LDL-Bindung an dasselbe Proteoglykan vermindert. Die Kinetik der LDL-Bindung mit ihrer dramatischen initialen Reduktion erinnert sehr stark an die HDL-Bindung (vgl. [71]). Erst unter  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe wurde die arteriosklerotische ternäre Nanoplaquebildung ausgelöst, die aber deutlich gegenüber Kontrollversuchen ohne Fluvastatin reduziert war [1].

## 5. Diskussion

### 5.1. Zielsetzungen

Mit dem in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsdesign sollen die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

- a) existiert an den Hirngefäßen eine flußabhängige Dilatation,
- b) läßt sich diese durch Fluvastatin beeinflussen und
- c) wie ist die Wirkungsweise des Fluvastatins.

Eine flußabhängige Vasodilatation ist bereits an einigen Gefäßabschnitten, wie den menschlichen Koronarien, den Armarterien und Lungengefäßen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen worden [31,33,44,66,73]. An Hirngefäßen ist dieser Effekt unseres Wissens nach in dieser Arbeit zum ersten Mal beobachtet worden.

Die von uns gewählten Meßparameter stehen an unterschiedlichen Stellen der Reaktionskette, die im Folgenden vereinfacht dargestellt wird. Diese beginnt mit dem Rezeptor, welcher das Signal aufnimmt, bzw. einen Liganden bindet. In unserem Falle ist dies das HS-PG. Dieser Rezeptor transduziert das Signal in das Zellinnere und aktiviert hier über unterschiedliche Wege (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig oder durch Akt) die eNOS. Letztere bildet NO, das in die darunterliegende glatte Muskelschicht diffundiert und über cGMP-Bildung zur Muskelrelaxation führt. Das Membranpotential und der Gefäßtonus sind somit eher am Ende der Signalkette zu sehen und zeigen den entstehenden Effekt am direktesten. Die ebenfalls bestimmten cAMP- und cGMP-Konzentrationen lassen sich in die beschriebene Wirkungskette einordnen, wobei sie sowohl Rückschlüsse auf die vorhergehenden als auch auf die nachfolgenden intrazellulä-

ren Mechanismen zulassen. Die Ellipsometrie zeigt die Bindung des Fluvastatins an den Proteoglykanrezeptor an der luminalen Gefäßoberfläche. Hier soll noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß der Proteoglykanrezeptor gleichzeitig Sensor für die flußabhängige Gefäßreaktivität ist.

Die Auswahl der Methodik orientiert sich vorrangig an zwei Bedingungen. Einerseits soll der Versuchsaufbau so weit wie möglich physiologischen Bedingungen entsprechen, andererseits sollen möglichst wenig einflußnehmende Faktoren vorhanden sein. Besonders in Bezug auf die Wirkung des Fluvastatins ist die Eliminierung aller an der Cholesterinbiosynthese beteiligten Gewebe wichtig. Nur so kann von einem pleiotropen Effekt ausgegangen werden. Zudem soll dargestellt werden, daß es sich um eine sehr schnelle Reaktion handelt, was für einen direkten rezeptorvermittelten Effekt spricht.

#### 5.1.1. Die flußabhängige Tonusbestimmung

In der von uns verwendeten Meßkammer ist ein kontinuierlicher Fluß bei gleich bleibenden äußeren Bedingungen gewährleistet. Die Flußrate kann schrittweise verändert werden, wobei wir Flußraten zwischen 3 und 100 mL/min einstellten. Neben dieser mit konstanten Flußraten arbeitenden Methode existieren auch Arbeiten mit pulsatilen Flußverhältnissen [58]. Unter beiden Bedingungen können Dilatationreaktionen nachgewiesen werden [61]. Jedoch kommt es bei den schrittweisen Erhöhungen der Flußgeschwindigkeit mit zwischenzeitlich konstanten Flußphasen zu einer stärkeren NO-Ausschüttung und somit zu einer deutlicheren und zeitlich besser zuordenbaren Reaktion [19]. Die gewählten Flußgeschwindigkeiten führen rechnerisch zu einer Schubspannung von 0,5 bis 17 dyn/cm<sup>2</sup> und liegen damit im physiologischen Bereich von mittleren Arterien [22]. Durch die Eröffnung des Gefäßzylinders quer zur Gefäßmuskulatur ist nach dem Einspannen in die Meßkammer eine direkte isometrische Messung des Muskeltonus möglich. Auch entfällt die in anderen Versuchsaufbauten notwendige Konstanthaltung des transmuralen Druckes. Zudem kann man von einem über den Versuchszeitraum konstant bleibenden shear stress ausgehen, da sich der Gefäßdurchmesser nicht ändern kann. Dies ist als Vorteil gegenüber der myographischen Messung an geschlossenen Gefäßzylindern zu sehen [9,16].

Da jeder Gefäßstreifen zu Beginn des Versuchs einen Ausgangstonus einnehmen muß, werden die Präparate nach dem Einspannprozeß vorgedehnt. Diese passive Dehnung führt zu

einer myogenic response, welche physiologischerweise zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden Gefäßtonus dient [18]. Generell läßt sich ein solcher Tonus auch pharmakologisch erzeugen. Dies hat allerdings den Nachteil, daß nachfolgende Signalkaskaden, welche den Tonus mitregulieren, aktiviert werden. Die physiologische Reaktion der Gefäßmuskulatur läßt sich dann nur noch mit Einschränkungen nachweisen und eine Interpretation bei Änderungen wird schwierig.

#### 5.1.2. Intrazelluläre Membranpotentialableitung

Auch hier stellt der eröffnete Gefäßstreifen ideale Untersuchungsbedingungen dar. Das Einstechen der Elektrodenspitze in die Gefäßmuskelzellen ist ein sehr sensibler Vorgang. Die Potentialmessung läßt sich dabei so in den Versuchsablauf integrieren, daß andere Parameter wie der Tonus nicht gestört werden und die durch den Fluß ausgelösten physiologischen Prozesse unter *in vivo*-nahen Bedingungen weiterlaufen können. Ein anderes mögliches Verfahren zur Bestimmung von Membranpotentialen ist zum Beispiel die patch clamp-Technik. Hierbei können die physiologischen Bedingungen meßtechnisch bedingt wesentlich weniger aufrechterhalten werden. Ein weiterer Vorteil ist die mögliche konsekutive Ableitung des intrazellulären Membranpotentials aus mehreren Muskelzellen. Es stellt sich damit ein Gesamtbild der untersuchten Gefäßmuskulatur dar.

#### 5.1.3. Ellipsometrie

Die Ellipsometrie stellt ein optisches Meßverfahren zur Bestimmung sehr dünner Schichtdicken dar. Vergleichende Messungen mittels MRI und Radiomarkierungsverfahren haben die Meßgenauigkeit dieses Verfahrens bestätigt. Als physiko-chemisches Biosensorverfahren ist statistisch von einem 3%-igen Meßfehler auszugehen, sodaß wir sehr verlässliche Meßdaten erwarten konnten.

### 5.2. Einordnung der Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse unserer Kontrollversuche zeigen, daß Hirngefäße auf eine Erhöhung der Flußgeschwindigkeit mit einer prompten Vasodilatation reagieren.

Bisher konnte diese Fähigkeit der Gefäße nur für andere Gefäßregionen dargestellt werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten eine flußabhängige Dilatation, welche zeitlich sehr eng an den auslösenden shear stress Stimulus gebunden war [28,30]. Dazu passend wiesen auch die in der Einleitung beschriebenen intrazellulären Signalwege vergleichbare zeitliche Dimensionen auf. So läßt sich auch der zweizeitige NO-Anstieg, welcher in Untersuchungen beobachtet wurde, in den Tonusmessungen wieder finden. Nach einer initial sehr starken Dilatation kommt es zu einem leichten Wiederansteigen des Tonus [16]. Diesen Prozeß konnten wir während des Versuchs sehr gut am Meßverstärker verfolgen. Auch die Flußgeschwindigkeiten, bei denen es zur stärksten Dilatationsreaktion kommt, stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein [52]. Hieraus läßt sich schlußfolgern, daß Hirngefäße im *in vitro*-Versuch gleichartig wie andere untersuchte Gefäße auf die shear stress-Stimulation reagieren.

In der Frage, inwieweit die Ergebnisse auf die *in vivo*-Verhältnisse übertragen werden können, müssen einige physiologische Einflußfaktoren, die in unserem Experiment ausgeschlossen waren, betrachtet werden. Bei einem intakten Gefäß kommt es bei einer flußbedingten Dilatation bei gleich bleibendem transmuralen Druck zu einer Gegenregulation. Diese so genannte "myogenic response" verhindert ein passives, flußangepaßtes Dilatieren der Gefäße und hält den für einen suffizienten Blutdruck notwendigen Grundtonus aufrecht. Bekannt ist auch, daß ein Sauerstoffüberangebot zu einer Konstriktion der Hirngefäße führt.

So spielt die Hyperventilation in der Akuttherapie des erhöhten intrakraniellen Druckes eine Rolle. Die Gefäße verengen sich hierunter und nehmen somit weniger Volumen ein. Im Gehirn existiert eine sehr ausgeprägte Autoregulation der Gefäßweite und damit auch der Durchblutung. Es ist davon auszugehen, daß eine Vielzahl von Faktoren für diese feine Anpassungsregulation notwendig ist. Die genaue Einordnung des Stellenwertes der beobachteten flußbedingten Dilatation fällt damit sehr schwer. Wichtig ist aber, daß eine gestörte FDD der Hirngefäße, z.B. aufgrund von arteriosklerotischen Endothelveränderungen, durchaus für eine verminderte Hirndurchblutung verantwortlich sein kann.

#### 5.2.1. Der funktionelle Einfluß des Fluvastatins

Unter dem Einfluß von Fluvastatin kommt es bereits in der Anpassungsphase bei einer Flußgeschwindigkeit von 3 mL/min zu einem gegenüber den Kontrollen niedrigeren Tonus und Potential. Zwar ist der Unterschied in dieser Flußphase nicht signifikant, jedoch ist bei einem



längeren Zeitintervall oder bei größeren Fallzahlen mit einer Signifikanz zu rechnen. Bei allen weiteren Flußraten kommt es zu einer signifikant stärkeren Dilatationsreaktion als in den Kontrollversuchen. Zum Versuchsende ergibt sich damit ein signifikant größerer Gesamteffekt.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch unter *in vivo*-Bedingungen gemacht werden. In einer Studie von Westphal et al. nahm ein Teil der Probanden Fluvastatin oral über einen Zeitraum von 5 Wochen ein, der andere Teil erhielt ein Placebo. In festgelegten Zeitabständen wurden sowohl die Lipidwerte als auch die flußabhängige Dilatation gemessen. Es zeigte sich, daß vor allem bei Patienten, die eingangs eine sehr niedrige FDD aufwiesen, eine deutliche Verbesserung dieser Funktion unter Fluvastatin eintrat [90].

#### 5.2.1.1. Diskussion der intrazellulären Wirkungsmechanismen des Fluvastatins

Die vorab für die Kontrollen beschriebenen Eigenheiten des Kurvenverlaufs sind bei Fluvastatingabe in gleicher Weise, jedoch ausgeprägter vorhanden. Dies läßt annehmen, daß Fluvastatin vorhandene Mechanismen und Abläufe, welche für die Übermittlung des shear stress Stimulus verantwortlich sind, positiv beeinflusst.

Wir haben in unserer Versuchsanordnung folgende Parameter bestimmt: den Tonus, das Membranpotential und die Konzentration von cGMP und cAMP. Anhand des unter Fluvastatin erniedrigten Tonus und der Hyperpolarisation läßt sich auf eine Beeinflussung von Ionenkanälen und Ionenkonzentrationen schließen. Second messenger wie das cGMP können wie in der Einleitung beschrieben, derartige Veränderungen bedingen. In unseren Untersuchungen zeigte sich, daß die Konzentration von cGMP unter Fluvastatin signifikant erhöht ist.

Das weitere Zurückverfolgen der Signalkette zu seinem Ursprung, dem Rezeptor, ist mit den von uns gemessenen Parametern nur hypothetisch möglich. So ist nach dem derzeitigen Wissensstand davon auszugehen, daß cGMP durch NO, welches aufgrund des shear stresses vermehrt gebildet wird, ansteigt [26]. Kureishi et al. [40] zufolge führen Statine zu einer schnellen Aktivierung der Proteinkinase Akt in den Endothelzellen, welche wiederum die eNOS phosphoryliert.

In der Frage, über welchen intrazellulären Signalweg Fluvastatin seine Wirkungen vermittelt,

bestehen jedoch noch viele Unklarheiten. So wird von Mukai et al. [51] die Existenz von mindestens zwei unterschiedlichen Mechanismen postuliert. Ihre Versuche an isolierten Rattenaorten zeigen, daß Fluvastatin unabhängig vom Endothel zu einer Gefäßrelaxation führt. Gehemmt werden konnte die Dilatationsreaktion unter Fluvastatin durch NOS-Inhibitoren und PI3-Kinase-Inhibitoren, durch KCl und  $K_v$ -Kanal-Inhibitoren. Die Autoren gehen sowohl von einem endothelabhängigen Weg über die PI3-Kinase/Akt-abhängige Aktivierung der eNOS als auch von einem endothelunabhängigen Weg über eine  $K_v$ -Kanal-vermittelte Hyperpolarisation der glatten Muskulatur aus.

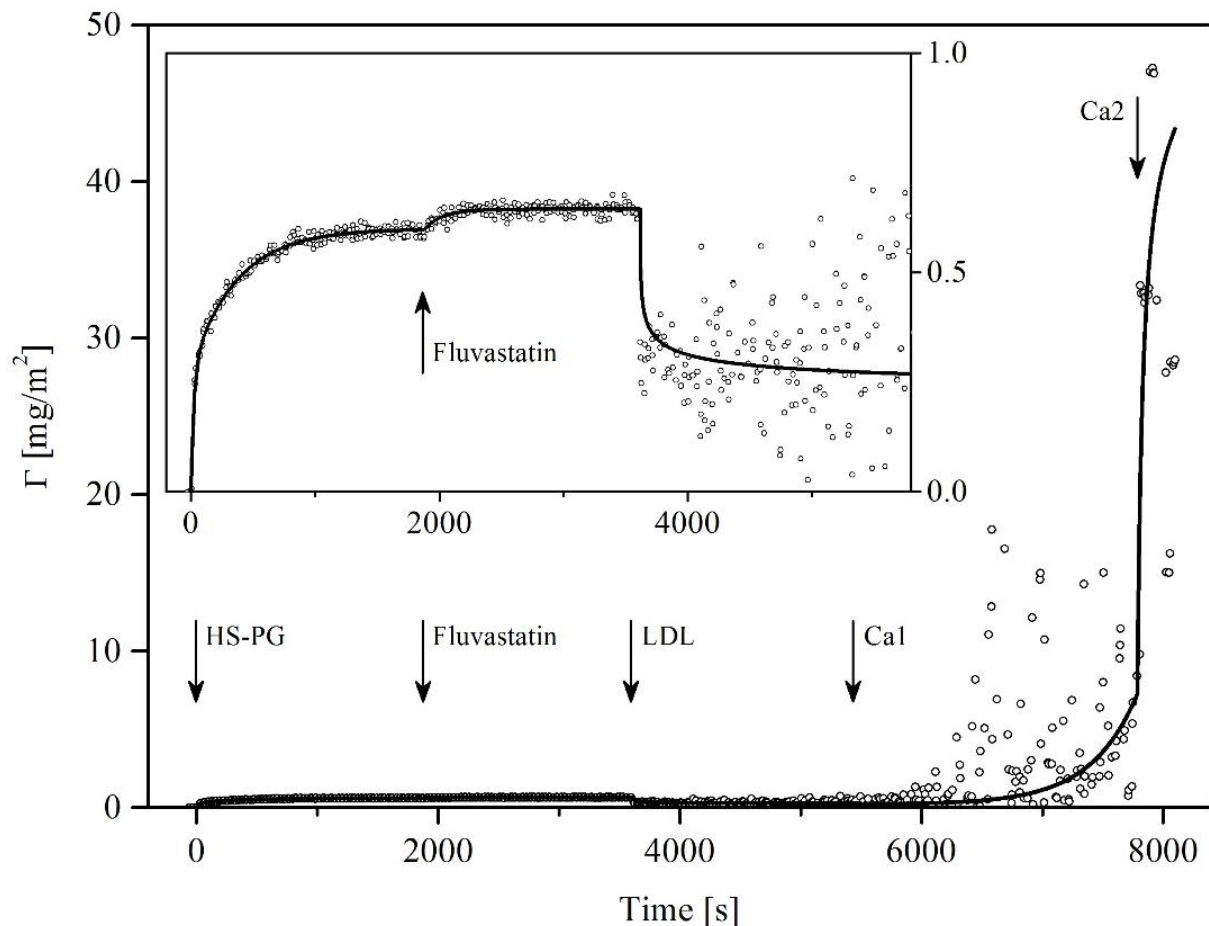
#### 5.2.1.2. Das Rezeptormodell und die Einordnung der ellipsometrischen Ergebnisse

Angesichts der unter Fluvastatin beobachteten intrazellulären Veränderungen stellt sich die Frage, an welchem Molekül das Pharmakon seine Wirkung initiiert. Die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Fluvastatin ist hinlänglich bekannt und erklärt den cholesterinsenkenden Effekt. Jedoch handelt es sich bei der flußabhängigen Dilatation um einen pleiotropen, cholesterinunabhängigen Effekt. Diese Wirkung läßt sich auch in Anbetracht der zeitlichen Dimensionen nicht über den genannten Angriffspunkt erklären. Es muß vielmehr einen Rezeptor geben, der am Gefäßlumen lokalisiert ist und sowohl auf den shear stress-Stimulus als auch auf die Bindung von Fluvastatin reagieren kann. Diese Assoziation scheint insofern sinnvoll, da der Effekt des Fluvastatins an die Flußstärke gebunden ist. Die Dilatationsreaktion auf den Stimulus wird verstärkt.

Daß die Heparansulfat-Proteoglykane als Flußsensoren dienen können, wurde in der Einleitung bereits erklärt. In unseren ellipsometrischen Versuchen konnten wir zeigen, daß Fluvastatin an Proteoglykane bindet [68,75]. Hierzu wurde Proteoheparansulfat an eine methylierte Silicatoberfläche adsorbiert. Die transmembranäre hydrophobe Proteincore-domäne bindet durch hydrophobe Wechselwirkung an die Oberfläche, die anionischen Gykosaminoglykan-Seitenketten sind zur umgebenden Blutersatzlösung ausgestreckt. Sie dienen damit als Rezeptoren für Lipoproteine und weitere Substanzen. Es zeigte sich in vorhergehenden Versuchen, daß LDL eine hohe Bindungsaffinität zu diesen ausgestreckten Seitenketten besitzt. Besonders unter hohen Calcium-Konzentrationen bildete sich ein so genannter “ternary complex” aus Proteoglykan, low-density lipoprotein und Calcium, welcher als arteriosklerotische Nanoplaqueformation angesehen wird [1,48,71]. Diese Komplexierung konnte durch die Anlagerung von HDL, welches eine circa vierfach höhere Affinität zu HS-PG besitzt,

komplett verhindert werden.

Mit dem gleichen Versuchsaufbau konnten wir zudem nachweisen, daß zur Blutersatzlösung appliziertes Fluvastatin an HS-PG bindet und ebenfalls die Bildung des “ternary complex” teilweise verhindert (Abb. 7). In einem weiteren Experiment wurden die VLDL/IDL/LDL- und die VLDL/IDL/LDL/HDL-Plasmafraktionen in Blutersatzlösung von kardiovaskulären



**Abb. 7.** Totale adsorbierte Schichtmenge *versus* Zeit. Zum Zeitpunkt Null wurde HS-PG (0,1 mg/mL) an eine hydrophobe Silicatoberfläche in Ca<sup>2+</sup>-freier Krebslösung adsorbiert. Der zweite Pfeil markiert die Zugabe von Fluvastatin (2,2 µmol/L), der dritte die Inkubation mit LDL (100 mg/dL). Die weiteren Pfeile indizieren Ca<sup>2+</sup>-Zugaben (Ca1: 2,52 mmol/L; Ca2: 10,08 mmol/L). Der pH-Wert der Lösung war auf 7,38 eingestellt. In dem Bildeinsatz ist die Fluvastatinanlagerung an HS-PG besonders deutlich zu sehen.

Hochrisikopatienten mit Dyslipoproteinämie und Typ 2-Diabetes mellitus auf den genannten Versuchsaufbau angewendet [70,77]. Es ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Bei Gabe der VLDL/IDL/LDL-Plasmafraktion auf die HS-PG-beschichtete Oberfläche bildeten sich auch schon bei normalen Calciumkonzentrationen arteriosklerotische Nanoplaques. Die HDL-hal-

tige Fraktion entwickelte dagegen wesentlich weniger oder gar keine Nanoplaques [29,45]. In einem anderen Patientenkollektiv wurde eine Einzeldosis von 80 mg Fluvastatin gegeben. Aus den am nächsten Morgen abgenommenen Blutproben wurden einerseits die Lipide bestimmt und andererseits die VLDL/IDL/LDL- und die VLDL/IDL/LDL/HDL-Plasmafraktionen abgetrennt. Während die Lipide unverändert waren, entsprach die Reduktion der arteriosklerotischen Nanoplaquebildung zu 95% derjenigen nach einer 2-monatigen Behandlung der Patienten. Das bedeutet, daß diese Sofortwirkung des Statins nichts mit einer Lipidsenkung zu tun hat und als weiterer pleiotroper Effekt anzusehen ist. In weiteren ellipsometrischen Untersuchungen ergab sich aus dem Vergleich zwischen den apoB100- und den HDL-haltigen Lipidfraktionen, daß das körpereigene HDL die Nanoplaquebildung genauso gut reduziert wie Fluvastatin [68].

Aus diesem Versuchsaufbau ergibt sich die Frage, wie das Fluvastatin, welches der Patient zuvor eingenommen hatte an den Wirkort gelangte. Da ausschließlich die Lipoproteinfraktionen vom Patienten isoliert wurden, ist ein Transport hierüber anzunehmen. Hussein et al. [34] konnten zeigen, daß Fluvastatin an die LDL-Phospholipide und teilweise an die unesterterten Cholesterole des LDL bindet. Sie gehen davon aus, daß diese Fluvastatinbindung zu einer Konformationsänderung im LDL-Partikel führt, welches hierdurch nicht mehr an den HS-PG-Rezeptor andocken kann. Dieser Mechanismus ist unter *in vivo*-Bedingungen durchaus vorstellbar und kann sogar eine Verbesserung der FDD erklären. Erhöhte LDL-Konzentrationen stören die endothelabhängige Vasodilatation [15]. Eine verminderte Bindungsfähigkeit der LDL-Fluvastatin-Partikel könnte diesen negativen Effekt verhindern.

Da in unseren Versuchen jedoch eine modifizierte Krebslösung verwendet wurde, die weder HDL noch LDL enthält, kann das Fluvastatin nicht über eine Bindungshemmung von LDL an HS-PG gewirkt haben. Es muß vielmehr direkt seine Wirkungen initiiert haben. Wie in den ellipsometrischen Messungen nachgewiesen, ist Fluvastatin zu einer Bindung an HS-PG befähigt. Da dieses membranintegrale Makromolekül gleichzeitig als Flußsensor fungiert, ist von einer durch die Fluvastatinbindung ausgelösten, verstärkten „Aktivität“ auszugehen. Möglicherweise führt die Fluvastatinbindung zu einer Konformationsänderung, wie sie auch durch höhere Flußraten erfolgt, oder Fluvastatin bindet an eine bestimmte Seitenkette, was den Funktionszustand des Flußsensors verändert. Die Folge könnte in jedem Falle eine erhöhte NO-Freisetzung sein.

Die Seitenketten des HS-PG scheinen einen sehr entscheidenden Einfluß auf die Funktionsweise des Sensors zu haben [77]. Durch enzymatische Abbaungen von bestimmten Seitenketten zeigte sich, daß heparansulfatreiche beziehungsweise chondroitinsulfatarme Proteoglykane zu einer verbesserten Dilatation führen [41]. Zur Klärung, an welcher Stelle Fluvastatin am HS-PG bindet und was dieses am Flußsensor bewirkt, bedarf es weiterführender Untersuchungen.

### 5.3. Die klinische Relevanz

Die Ergebnisse verschiedener Studien weisen darauf hin, daß Statine eine protektive Wirkung bezüglich der Alzheimer-Demenz und des ischämischen Schlaganfalls besitzen [21,60,80,81].

In der so genannten Rotterdam-Studie mit 6992 Teilnehmern, welche von 1990 bis 2005 hinsichtlich des Auftretens einer Alzheimer-Demenz beobachtet wurden, zeigte sich eine signifikant höhere AD-Inzidenz, wenn im genannten Zeitraum niemals Statine eingenommen wurden. Dabei erwiesen sich hinsichtlich des protektiven Effektes lipophile und hydrophile Statine als gleich gut [25]. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, lassen sich die positiven Fluvastatineffekte bezüglich der AD nicht durch einen einzigen Wirkmechanismus erklären. Die von uns nachgewiesene Verbesserung der flußabhängigen Dilatation und damit der Hirndurchblutung stellt einen wichtigen Teilaspekt dar, der mit der endothelialen Funktion in direktem Zusammenhang steht. Die endotheliale Dysfunktion wird als Mangel an endothelialer NO-Freisetzung definiert [80]. Unter Fluvastatin kommt es zu einer Hochregulation der NO-Synthetase, welche letztendlich die Vasodilatation ermöglicht. Von Zlokovic [91] werden der inadäquate zerebrale Fluß und die Störung des Endothels als Teil der Blut-Hirn-Schranke als wichtigste Risikofaktoren bei der Entstehung einer AD bezeichnet [38].

Daneben scheinen aber noch weitere pleiotrope Effekte an der protektiven Wirkung des Fluvastatins/der Statine beteiligt zu sein. So wurde von einigen Arbeitsgruppen eine Interaktion mit dem A $\beta$ -Precursorprotein-Stoffwechsel beschrieben. Statine sollen demnach den Metabolismus von A $\beta$ -Precursorprotein (APP) beeinflussen und damit den extrazellulären Gehalt des proteolytischen Produktes  $\beta$ -Amyloid reduzieren. Die Aggregation dieses A $\beta$  wirkt zytotoxisch, führt zur Formation von neurofibrillären tangles und zu neuronalen Verlusten im Ge-

hirn [49].

Ein weiterer Einfluß des Fluvastatins ist bei der Interaktion von HS-PG mit APP denkbar. Die Bindung von APP an HS-PG wird von Small [79] als wichtiger Schritt in der AD-Pathogenese angesehen. Da Fluvastatin ebenfalls zu einer Bindung an HS-PG befähigt ist, könnte es diese Interaktion im Sinne einer Inhibition beeinflussen. Diese Vorstellung ist jedoch rein hypothetisch und läßt sich derzeit noch nicht durch konkrete Versuchsergebnisse untermauern.

Bezüglich des ischämischen Schlaganfalls müssen sowohl die primär präventive Gabe als auch die Applikation in der frühen Postinfarktphase betrachtet werden. Bei der primär präventiven Gabe hat sich gezeigt, daß die Einnahme von Statinen die Schlaganfallinzidenz deutlich senkt. Als wirksame pleiotrope Effekte sind hier die Verbesserung der FDD und der endothelialen Funktion, die Thrombozytenaggregationshemmung und die antiinflammatorische Wirkung hervorzuheben [49]. In der Postinfarktphase konnte beobachtet werden, daß Patienten, die unabhängig von ihren LDL-Spiegeln mit Statinen therapiert wurden, ein funktionell besseres Outcome nach dem Stroke-Ereignis aufwiesen. Diese Beobachtung könnte auf einer verbesserten Hirndurchblutung beruhen. Auch das Reinfarkt-Risiko kann durch Statin-gabe gesenkt werden [82]. Diesen Vorteilen steht ein dosisabhängig erhöhtes Blutungsrisiko gegenüber.

Neben den genannten Vorteilen einer Statintherapie sollten aber auch eventuelle Risiken nicht unerwähnt bleiben. Statine können im schlimmsten Fall zu einer Rhabdomyolyse mit Nierenversagen und zu einer Verfettung der Skelettmuskulatur führen. Allerdings treten schwere Nebenwirkungen zunehmend bei hohen Dosierungen auf, wogegen sie im low dose-Bereich selten sind. Da manche pleiotropen Effekte auch schon durch geringe Dosen auftreten, die noch gar keine Beeinflussung des Fettstoffwechsels hervorrufen, kann man von einer sehr geringen Nebenwirkungsrate ausgehen.

## **6. Zusammenfassung**

Die flußabhängige Dilatation von Gefäßen stellt einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Durchblutung dar. Sie ist gleichzeitig an eine intakte endotheliale Funktion gebunden.

In unseren Experimenten konnten wir nachweisen, daß Hirngefäße die Fähigkeit zu einer solchen flußabhängigen Vasodilatation besitzen und sich diese durch Fluvastatin beeinflussen läßt.

Bereits eine kurze Kontaktzeit von einigen Minuten zwischen Gefäß und Fluvastatin reicht aus, um eine signifikante Verstärkung der FDD zu erhalten.

Weiterhin konnten wir mittels ellipsometrischer Meßverfahren die direkte Bindung von Fluvastatin an HS-PG nachweisen.

Der Rezeptor HS-PG, über welchen Fluvastatin diese pleiotrope Wirkung direkt vermitteln könnte, wurde beschrieben. Bei einer Bindung an HS-PG kommt es zur Aktivierung der eNOS und somit zu vermehrter Stickstoffmonoxidsynthese. NO stellt einen bekannten Mediator dar, welcher über cGMP zur Myozytenrelaxation führt.

Daneben ist die Erhöhung der eNOS-Aktivität auch gleichbedeutend mit einer Verbesserung der endothelialen Funktion.

In diesem Zusammenhang wurden zwei Krankheitsbilder aufgeführt, denen eine Verbesserung der Hirndurchblutung entgegenwirkt. Sowohl bei der AD als auch beim ischämischen Schlaganfall ist der Nutzen einer Statineinnahme in mehreren Studien beobachtet worden. Dies gilt ebenso für die prophylaktische Anwendung wie für die Progressionsverlangsamung beziehungsweise postinfarktuelle Rehabilitation.

## **7. Literaturverzeichnis**

- [1] Abletshauer C, Klüßendorf D, Schmidt A, Winkler K, März W, Buddecke E, Malmsten M, Siegel G. Biosensing of arteriosclerotic nanoplaque formation and interaction with an HMG-CoA reductase inhibitor. *Acta Physiol Scand* 2002;176:131-145.
- [2] Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7583-7587.

- [3] Azzam RMA, Bashara NM. *Ellipsometry and Polarized Light*, North-Holland, Amsterdam, 1989.
- [4] Berk BC, Corson MA, Peterson TE, Tseng H. Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulated signal transduction in endothelial cells: a hypothesis for calcium-dependent and calcium-independent events activated by flow. *J Biomech* 1995;28:1439-1450.
- [5] Bevan JA, Joyce EH, Wellman GC. Flow-dependent dilation in a resistance artery still occurs after endothelium removal. *Circ Res* 1988;63:980-985.
- [6] Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 2002;277:3388-3396.
- [7] Brown BG, Zhao XQ. Importance of endothelial function in mediating the benefits of lipid-lowering therapy. *Am J Cardiol* 1998;82(10B):49T-52T.
- [8] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
- [9] Butler PJ, Weinbaum S, Chien S, Lemons DE. Endothelium-dependent, shear-induced vasodilation is rate-sensitive. *Microcirculation* 2000;7:53-65.
- [10] Corsini A. Fluvastatin: effects beyond cholesterol lowering. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2000;5:161-175.
- [11] Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996;79:984-991.
- [12] Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995;75:519-560.
- [13] De Feijter JA, Benjamins J, Veer FA. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* 1978;17:1759-1772.
- [14] Essig M, Nguyen G, Prié D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res* 1998;83:683-690.
- [15] Fischer R. *Bedeutung endothelialer Proteoglyane für die flußabhängige Gefäßregulation von Koronararterien des Menschen*. Inaugural-Dissertation (2004), Berlin.
- [16] Fleming I, Bauersachs J, Busse R. Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res* 1997;34:165-174.
- [17] Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 1999;43:532-541.
- [18] Folkow B. Myogenic mechanisms in the control of systemic resistance. Introduction and historical background. *J Hypertens Suppl* 1989;7:S1-S4.
- [19] Frangos JA, Huang TY, Clark CB. Steady shear and step changes in shear stimulate endothelium via independent mechanisms—superposition of transient and sustained nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;224:660-665.



- [20] Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berk BC, Aebersold R, Corson MA. Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem* 1999;274:30101-30108.
- [21] Galus R, Zandecki Ł, Józwiak J, Włodarski K. [Statins and their pleiotropic effects]. [Article in Polish]. *Pol Merkur Lekarski* 2008;24:545-548.
- [22] Goldsmith HL, Turitto VT. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report – Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1986;55:415-435.
- [23] Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon JE, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;219:181-186.
- [24] Gudi SRP, Huver IV, Taliana AP, Boss GR, Frangos JA. Fluid flow-induced ras activation is mediated by Gαq in human vascular endothelial cells. *FASEB J* 1997;11:A223.
- [25] Haag MD, Hofman A, Koudstaal PJ, Stricker BH, Breteler MM. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:13-17.
- [26] Hampl V, Huang JM, Weir EK, Archer SL. Activation of the cGMP-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide and cGMP on calcium-gated potassium channels. *Physiol Res* 1995;44:39-44.
- [27] Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992;6:861-870.
- [28] Hintze TH, Vatner SF. Reactive dilation of large coronary arteries in conscious dogs. *Circ Res* 1984;54:50-57.
- [29] Hodoğlugil U, Williamson DW, Yu Y, Farrer LA, Mahley RW. Glucuronic acid epimerase is associated with plasma triglyceride and high density lipoprotein cholesterol levels in Turks. *Ann Hum Genet* 2011;75:398-417.
- [30] Holtz J, Busse R, Giesler M. Flow-dependent dilation of canine epicardial coronary arteries in vivo and in vitro: Mediated by endothelium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1983;322:R44-R57.
- [31] Holtz J, Förstermann U, Pohl U, Giesler M, Bassenge EJ. Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition. *Cardiovasc Pharmacol* 1984;6:1161-1169.
- [32] Huang A, Sun D, Koller A. Shear stress-induced release of prostaglandin H(2) in arterioles of hypertensive rats. *Hypertension* 2000;35:925-930.
- [33] Hull jr SS, Kaiser L, Jaffe MD, Sparks jr HV. Endothelium-dependent flow-induced dilation of canine femoral and saphenous arteries. *Blood Vessels* 1986;23:183-198.
- [34] Hussein O, Schlezinger S, Rosenblat M, Keidar S, Aviram M. Reduced susceptibility of low density lipoprotein (LDL) to lipid peroxidation after fluvastatin therapy is associated with the hypocholesterolemic effect of the drug and its binding to the LDL. *Atherosclerosis* 1997;128:11-18.

- [35] Igarashi M, Takeda Y, Mori S, Ishibashi N, Komatsu E, Takahashi K, Fuse T, Yamamura M, Kubo K, Sugiyama Y, Saito Y. Suppression of neointimal thickening by a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, BAYw6228, and its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol* 1997;120:1172-1178.
- [36] Ingber D. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3:841-848.
- [37] Iozzo RV. Series Introduction: Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest* 2001;108:165-167.
- [38] Isingrini E, Desmidt T, Belzung C, Camus V. Endothelial dysfunction: A potential therapeutic target for geriatric depression and brain amyloid deposition in Alzheimer's disease? *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10:46-55.
- [39] Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* 1980;239:H14-H21.
- [40] Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6:1004-1010.
- [41] Kurinami H, Sato N, Shinohara M, Takeuchi D, Takeda S, Shimamura M, Ogihara T, Morishita R. Prevention of amyloid beta-induced memory impairment by fluvastatin, associated with the decrease in amyloid beta accumulation and oxidative stress in amyloid beta injection mouse model. *Int J Mol Med* 2008;21:531-537.
- [42] Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97:1129-1135.
- [43] Little PJ, Ballinger ML, Osman N. Vascular wall proteoglycan synthesis and structure as a target for the prevention of atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3:117-24.
- [44] Liu QM, Zhou SH, Qi SS, Zhao SP, Minghui L. Significance of the lipid profile and endothelium-dependent vasodilatation in the pathogenesis of microvascular angina. *Cardiol J* 2008;15:324-328.
- [45] Mahley RW. Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. *Isr J Med Sci* 1996;32:414-429.
- [46] Malmsten M. Ellipsometry studies of protein layers adsorbed at hydrophobic surfaces. *J Colloid Interface Sci* 1994;166: 333-342.
- [47] Malmsten M, Siegel G. Ellipsometry studies of lipoprotein adsorption in atherosclerosis and Alzheimer's. *J Drug Del Sci Tech* 2007;17:245-251.
- [48] Malmsten M, Siegel G, Wood WG. Ellipsometry studies of lipoprotein adsorption. *J Colloid Interface Sci* 2000;224:338-346.
- [49] Miida T, Takahashi A, Ikeuchi T. Prevention of stroke and dementia by statin therapy: experimental and clinical evidence of their pleiotropic effects. *Pharmacol Ther* 2007;113:378-393.
- [50] Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:252-256.

- [51] Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Hiroki J, Kunihiro I, Fujiki T, Takeshita A. Acute vasodilator effects of HMG-CoA reductase inhibitors: involvement of PI3-kinase/Akt pathway and Kv channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42:118-124.
- [52] Muller JM, Chilian WM, Davis MJ. Integrin signaling transduces shear stress-dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circ Res* 1997;80:320-326.
- [53] Nelson MT. Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels and ATP-sensitive potassium channels as modulators of vascular tone. *Trends Cardiovasc Med* 1993;3:54-60.
- [54] Notarbartolo A, Davì G, Averna M, Barbagallo CM, Ganci A, Giammarresi C, La Placa FP, Patrono C. Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:247-251.
- [55] O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997;95:1126-1131.
- [56] Ohno M, Gibbons GH, Dzau VJ, Cooke JP. Shear stress elevates endothelial cGMP. Role of a potassium channel and G protein coupling. *Circulation* 1993;88:193-197.
- [57] Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986;8:37-44.
- [58] Recchia FA, Byrne BJ, Kass DA. Sustained vessel dilation induced by increased pulsatile perfusion of porcine carotid arteries in vitro. *Acta Physiol Scand* 1999;166:15-21.
- [59] Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, Flaker GC, Braunwald E. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1998;98:839-844.
- [60] Rosenberg PB, Mielke MM, Tschanz J, Cook L, Corcoran C, Hayden KM, Norton M, Rabins PV, Green RC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC, Munger R, Lyketsos CG. Effects of cardiovascular medications on rate of functional decline in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 2008;16:883-892.
- [61] Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250(6 Pt 2):H1145-H1149.
- [62] Rubanyi GM, Vanhoutte PM (eds). *Endothelium-Derived Relaxing Factors*. First International Symposium on Endothelium-Derived Vasoactive Factors, Philadelphia, PA, May 1-3, 1989. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney 1990.
- [63] Salonen R, Nyssönen K, Porkkala E, Rummukainen J, Belder R, Park JS, Salonen JT. Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS). A population-based primary preventive trial of the effect of LDL lowering on atherosclerotic progression in carotid and femoral arteries. *Circulation* 1995;92:1758-1764.
- [64] Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* 30. Aufl. 2007, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- [65] Schnitzer JE, Liu J, Oh P. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem* 1995;270:14399-14404.

- [66] Schretzenmayr A. Über kreislaufregulatorische Vorgänge an den großen Arterien bei der Muskelarbeit. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 1933;232:743-748.
- [67] Siegel G. Connective tissue: more than just a matrix for cells. In: Greger R, Windhorst U (eds), *Comprehensive Human Physiology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1996;1:173-224.
- [68] 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.
- [69] Siegel G, Ermilov E, Pries AR, Winkler K, Schmidt A, Ringstad L, Malmsten M, Lindman B. The significance of lipid peroxidation in cardiovascular disease. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2014;442:173-180.
- [70] Siegel G, Malmsten M. Molecular model for athero/arteriosclerosis, patent EP 0 946 876, 2005.
- [71] 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.
- [72] Siegel G, Malmsten M, Klüßendorf D, Michel F. A receptor-based biosensor for lipoprotein docking at the endothelial surface and vascular matrix. *Biosens Bioelectron* 2001;16:895-904.
- [73] Siegel G, Malmsten M, Schmidt A. Flow sensing at the endothelial cell membrane–blood interface. *J Membrane Sci* 1996;113:101-113.
- [74] Siegel G, Meyer-Rath G, Ermilov E, Rodríguez M, Malmsten M, Claesson P, Saunders R, Hetzer R, Lindman B. Flow sensing in the cardiovascular system. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2015;480:318-327.
- [75] Siegel G, Rodríguez M, Hammersen S, Feldmann C, Abletshauser C. The effect of fluvastatin on flow-dependent dilatation of human intracerebral arteries. *Stroke* 2007;38:456.
- [76] Siegel G, Rodríguez M, Sauer F, Abletshauser C, de Mey C, Schötz K, Ringstad L, Malmsten M, Schäfer P. Nanotechnologic biosensor ellipsometry and biomarker pattern analysis in the evaluation of atherosclerotic risk profile. *Biosens Bioelectron* 2009;24:1512-1517.
- [77] Siegel G, Rodríguez M, Schön T, Abletshauser C, Schmidt A, Hetzer R, Malmsten M. Blood flow sensor susceptibility to lipoproteins in early arteriosclerosis and its clinical improvement by statin therapy – a nanoplaque study. *Desalination* 2006;191:417-425.
- [78] Siegel G, Rückborn K, Schnalke F, Müller J. Endothelial dysfunction in human atherosclerotic coronary arteries. *Eur Heart J* 1993;14(Suppl I):99-103.
- [79] Small DH, Williamson T, Reed G, Clarris H, Beyreuther K, Masters CL, Nurcombe V. The role of heparan sulfate proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1996;777:316-321.
- [80] Smith AR, Hagen TM. Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (*R*)- $\alpha$ -lipoic acid. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 6):1447-1449.

- [81] Sparks DL, Kryscio RJ, Sabbagh MN, Connor DJ, Sparks LM, Liebsack C. Reduced risk of incident AD with elective statin use in a clinical trial cohort. *Curr Alzheimer Res* 2008;5:416-421.
- [82] Stead LG, Vaidyanathan L, Kumar G, Bellolio MF, Brown RD Jr, Suravaram S, Enduri S, Gilmore RM, Decker WW. Statins in ischemic stroke: just low-density lipoprotein lowering or more? *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2009;18:124-127.
- [83] Straznicky NE, Howes LG, Lam W, Louis WJ. Effects of pravastatin on cardiovascular reactivity to norepinephrine and angiotensin II in patients with hypercholesterolemia and systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1995;75:582-586.
- [84] Takahashi M, Ishida T, Traub O, Corson MA, Berk BC. Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J Vasc Res* 1997;34:212-219.
- [85] Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-1719.
- [86] Tompkins H, Irene EA. *Handbook of Ellipsometry*. William Andrew Publishing 2005.
- [87] Tsuboi H, Ando J, Korenaga R, Takada Y, Kamiya A. Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:988-996.
- [88] Ungvari Z, Koller A. Endothelin and Prostaglandin H<sub>2</sub>/Thromboxane A<sub>2</sub> Enhance Myogenic Constriction in Hypertension by Increasing Ca<sup>2+</sup> Sensitivity of Arteriolar Smooth Muscle. *Hypertension* 2000;36:856-861.
- [89] Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1212-1217.
- [90] Westphal S, Abletshauser C, Luley C. Fluvastatin treatment and withdrawal: effects on endothelial function. *Angiology* 2008;59:613-618.
- [91] Zlokovic BV. Vascular disorder in Alzheimer's disease: role in pathogenesis of dementia and therapeutic targets. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1553-1559.

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Entwicklung, Durchführung und Fertigstellung meiner Dissertationsarbeit unterstützt haben. An erster Stelle gilt dieser Dank Herrn Professor Dr. med. Günter Siegel, der mir das Thema vorschlug und mich hiermit begeisterte. Er war in jeder Phase der Durchführung mein wichtigster Ansprechpartner. Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau Angela Becker, die mir als MTA bei der praktischen Durchführung und dem Verständnis aller Versuchsaufbauten immer tatkräftige Unterstützung leistete.

Für die statistische Auswertung und graphischen Darstellungen bedanke ich mich zudem bei Dr. Miguel Rodríguez und Dr. Eugeny Ermilov.

Meiner Familie möchte ich vor allem für die mentale Unterstützung danken, sie ermunterte mich immer wieder, mich ausdauernd mit dem Schreiben und Verbessern der Arbeit zu befassen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Christiane Sokol, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, daß ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluß von Fluvastatin auf die flußabhängige Dilatation menschlicher Hirngefäße“ selbständig 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](http://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 un- wahren 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."



## **Publikation**

Siegel G, Rodríguez M, Hammersen S, Feldmann C, Abletshauser C. The effect of fluvastatin on flow-dependent dilatation of human intracerebral arteries. *Stroke* 2007;38:456.

## **Anteilerklärung**

Frau Christiane Sokol (geb. Feldmann) hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Siegel G, Rodríguez M, Hammersen S, **Feldmann C**, Abletshauser C. The effect of fluvastatin on flow-dependent dilatation of human intracerebral arteries. Stroke 2007;38:456.

Beitrag im Einzelnen: Feinpräparation der Gehirnarterien im Institutslabor mit Erfassung der klinischen Daten; Vorbereitung und Durchführung der Experimente zur flußabhängigen Mechanik und Nukleotidkonzentration; Auswertung und Datenanalyse; Mitwirkung an der Verfassung des Textes und Vorstellung der Ergebnisse.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin