

Aus dem Bereich Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Professor Dr. med. Michael Böhm

**Telmisartan inhibiert proinflammatorische Zytokine
und die Expression von α M/ β 2-Integrin
auf humanen T-Lymphozyten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2006

Vorgelegt von: Dominik Legner
Geb. am : 29.11.1964 in Zweibrücken

1. Tag der Promotion:
2. Dekan: Prof. Dr. med. Mathias Montenarh
3. Berichterstatter:

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben der Quellen gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und der Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, den 22.06.2006

Widmung:

Die Arbeit widme ich in erster Linie meinem Sohn Jakob, der mir mit seiner Geburt während der Erstellung der Arbeit so manche Stunde geraubt, aber auch viel Energie geschenkt hat.

Verzeichnis der häufig verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACE-H	Angiotensin-Konversions Enzym Hemmer
a. e.	am ehesten
AMI	akuter Myokardinfarkt
ARB	Angiotensin II Rezeptor Blocker
AT II	Angiotensin II
ca.	circa
CBA	cytometric beat array
CD	cluster of differentiation
dl	Deziliter
FACS	fluorescence activated cell sorter
HDL	high density Lipoprotein
hsCRP	hochsensitives C-reaktives Protein
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
KHK	koronare Herzerkrankung
LFA-1	leukozytenassoziiertes Funktionsantigen-1
LDL	low density Lipoprotein
Mac-1	Integrin $\alpha M/\beta 2$
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	matrix metallo-proteinase
NAD(P)H	Nikotinamidadeninnucleotid(phosphat)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
n. s.	nicht signifikant
O ₂ ⁻	Superoxidradikal
oxLDL	oxidiertes LDL
Pat.	Patient
pg	Picogramm
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SEM	Standartfehler der Mittelwerte
(s)ICAM-1	(soluble) intercellular adhesion molecule-1
(s)L-Selektin	(soluble) L-Selektin
(s)PECAM-1	(soluble) platelet endothelial cell adhesion molecule-1
(s)VCAM-1	(soluble) vascular cell adhesion molecule-1
SMC	smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)
s. o.	siehe oben
μ l	Mikroliter
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis:

1. Zusammenfassung

2. Einleitung

2.1 Atherosklerose und Inflammation

2.1.1 Allgemeiner Hintergrund

2.1.2 Adhäsionsmoleküle

2.1.3 Zytokine

2.1.4 Chemokine

2.1.5 andere

2.2 Angiotensin II

2.2.1 Das Renin-Angiotensin-System

2.2.2 Subtypen von Angiotensin II Rezeptoren

2.2.3 Proinflammatorische Wirkung von Angiotensin II

2.2.4 in vitro und in vivo Daten

2.3 AT₁-Rezeptorantagonisten

2.3.1 Allgemeine pharmakologische Aspekte

2.3.2 Pharmakologische Besonderheiten von Telmisartan

2.3.3 Antiinflammatorische Wirkung von AT₁-Rezeptorantagonisten

2.3.3.1 Wirkung auf Adhäsionsmoleküle

2.3.3.2 Wirkung auf Zytokine

2.3.3.3 Wirkung auf Chemokine

2.3.3.4 Wirkung auf proinflammatorische Proteine

2.4 Fragestellung

3. Klinische Studie, Methoden, Materialien

3.1 Klinische Studie

3.1.1 Studiendesign, Patienten

3.1.2 Einschlusskriterien

3.1.3 Ausschlusskriterien

3.1.4 Zwischenausschlusskriterien

3.1.5 Abbruchkriterien

3.1.6 Begleitmedikation

3.1.7 Prüfplan

3.2 Methoden

3.2.1 Blutdruckmessung

3.2.2 Blutentnahme

3.2.3 Probenaufbereitung

3.2.4 Bestimmung von leukozytären Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Chemokinen, proinflammatorischen Proteinen und NK-Zellen

3.2.5 Human-FACS-Färbung für Oberflächenmarker auf periphere blutmononukleäre Zellen (PBMNC) aus EDTA Vollblut

3.2.6 Cytometric Bead Array (CBA) zur Bestimmung löslicher Zytokine

3.2.7 FACS-Analyse

3.2.8 ELISA zur Bestimmung von MCP-1, s-ICAM-1 und sL-Selektin

3.2.9 Bestimmung der Konzentration des hs-CRP

3.3 Materialien

3.3.1 Medikamente

3.3.2 Angiotensin II

3.3.3 Reagenzien

3.3.4 Geräte

3.4 Statistik

4. Ergebnisse

5. Diskussion

6. Literaturverzeichnis

7. Dank

8. Lebenslauf

1. Zusammenfassung

Inflammatorische Prozesse spielen bei der Atherosklerose eine wichtige Rolle. Das Renin-Angiotensin-System mit seinen AT1- und AT2-Rezeptoren ist für die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und Plaqueinstabilität von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden prospektiven doppelblind plazebokontrollierten Studie sollte durch die exemplarische Bestimmung potentieller löslicher Biomarker und zusätzlich zellulär exprimierter Adhäsionsmoleküle die Angiotensin II vermittelte Inflammation anhand der Wirkung des AT₁-Rezeptorblockers Telmisartan (40 mg) im Vergleich zu Placebo auf Patienten mit gesicherter stabiler KHK und milder Hypertonie geprüft werden. Das Kollektiv umfasste 21 Patienten in der Placebo- und 21 Patienten in der Telmisartangruppe. Der Behandlungszeitraum belief sich auf 12 Wochen.

Bei der zellulären Expression der Adhäsionsmoleküle (CD11a, CD11b, CD31 und CD54) auf den untersuchten Monozyten und Lymphozyten konnte bei dem α M/ β 2-Integrin (Mac-1, CD11b) auf Lymphozyten eine statistisch signifikante Änderung zur Baseline nachgewiesen werden. Bei den löslichen Parametern (Adhäsionsmoleküle: sL-Selektin, s-ICAM-1; Zytokine: IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ ; Chemokine: MCP-1; inflammatorische Proteine: hsCRP) zeigte sich in der Telmisartangruppe eine Abnahme der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und INF- γ , wobei IFN- γ mit einer signifikanten Änderung zur Baseline vorlag ($p < 0,05$; $n = 21$).

Zusammenfassend kann nach der vorliegenden Studie postuliert werden, dass der AT1-Rezeptorantagonist Telmisartan einen immunmodulatorischen Effekt durch Down-Regulation proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IFN- γ als auch durch verminderte Expression von α M/ β 2-Integrin auf T-Lymphozyten hat. Durch zu erwartende verminderte Einwanderung in atherosklerotische Plaques könnte es somit zu einer Plaquesstabilisierung kommen. Die verminderte Expression des α M/ β 2-Integrin könnte auf einen Angiotensin II unabhängigen Mechanismus und damit auf einen möglichen pleiotropen Effekt von Telmisartan zurückgeführt werden.

Telmisartan inhibits proinflammatory cytokine and the expression of α M/ β 2 integrin in human T-lymphocytes

Inflammation plays a major role in atherosclerosis. The renin-angiotensin system with the AT(1)- and AT(2)-receptors is important for the development of the endothelial dysfunction and plaque instability.

This prospective double-blind placebo-controlled study should demonstrate the influence of angiotensin II depended inflammation by measuring special soluble biomarkers and cell adhesion molecules. This effect is proved by the angiotensin receptor blocker telmisartan versus placebo on patients with stable coronary heart disease and mild hypertension. There were 21 patients with placebo and 21 patients with telmisartan in the study group. The treatment was limited for 12 weeks.

For the cellular expression of adhesion molecules (CD11a, CD11b, CD31, CD54) in human monocytes and lymphocytes there was documented a significant change of baseline for the α M/ β 2-integrin (Mac-1, CD11b) in lymphocytes. The soluble markers (adhesion molecules: sL-selectin, s-ICAM-1; cytokines: IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ ; chemokines: MCP-1; inflammatory proteins: hsCRP) has shown a decrease of the proinflammatory cytokines IL-6, TNF- α and IFN- γ by treatment with telmisartan, IFN- γ with a significant change of baseline ($p < 0,05$; $n = 21$).

The conclusion of this study can be, that the angiotensin receptor blocker telmisartan could have an immunomodulatory effect by downregulation of proinflammatory cytokines like TNF- α and IFN- γ and a decrease of expression of α M/ β 2-integrin in human T-lymphocytes. You can expect a reduction of migration in atherosclerotic plaques with the possibility of plaquestabilisation. The decreased expression of α M/ β 2-integrin could have an angiotensin II independent mechanism and could be a pleiotropic effect of telmisartan.

2. Einleitung

2.1 Atherosklerose und Inflammation

2.1.1 Allgemeiner Hintergrund

Bei der Atherosklerose spielen vaskulär entzündliche Veränderungen und Autoimmunreaktionen eine zentrale Rolle. Für die Entwicklung einer Atherosklerose ist die endotheliale Dysfunktion von entscheidender Bedeutung. Für diese können außer einer mechanischen Endothelschädigung nicht nur erhöhte LDL-Plasma-Spiegel als Ursache angeführt werden, sondern auch andere Mechanismen, wie z. B. durch Rauchen verursachte freie Radikale, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperhomocysteinämie, genetische Veränderungen oder auch bakterielle oder virale Entzündungen (ROSS, 1999).

Entzündliche Veränderungen setzen das Vorhandensein von Entzündungsmediatoren in der Zelle voraus. Normales Endothel bindet in der Regel keine Leukozyten (LIBBY, 2002). Im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion kommt es jedoch zu einer erhöhten Adhäsivität und Permeabilität des Endothels für Leukozyten. Dies ermöglicht die Migration von Monozyten und T-Zellen aus der Blutbahn in die Zelle. Nach Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen nehmen diese oxidiertes LDL auf und entwickeln sich zu Schaumzellen (ROSS, 1999).

Durch den intrazellulären Entzündungsprozess werden Intimaproliferation, das Wachstum glatter Muskelzellen, Atherombildung und thrombotische Komplikationen begünstigt. Entscheidend für diese Vorgänge sind auf der einen Seite die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Chemokinen, Metalloproteinasen und Wachstumsfaktoren, auf der anderen Seite u.a. das Zusammenspiel mit Angiotensin II, Endothelin, Prostaglandin (PGI₂), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO).

2.1.2 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle sind Moleküle auf der Zelloberfläche, die die Adhäsion mit anderen Zellen ermöglichen (BLANKENBERG, 2003). Sie werden grundsätzlich auf fast allen Zellen exprimiert. Für die Entwicklung einer Atherosklerose sind die Adhäsionsmoleküle der vaskulären Endothelzellen und der zirkulierenden Leukozyten entscheidend. Besonders im Bereich von Arterienaufzweigungen kommt es im Rahmen von zunehmenden Turbulenzen und Scherstress zu einer vermehrten Expression. Die erhöhten Scherkräfte verringern u. a. die Bildung von endotheliale Stickoxid (NO), das wiederum gefäßerweiternd und antiinflammatorisch wirkt (LIBBY, 2002). Es wird die physiologische Hemmung der Expression von VCAM-1 unterdrückt und die Produktion von ICAM-1 induziert (NAGEL, 1994), was eine erhöhte Adhäsion, Migration und Akkumulation von Monozyten und T-Lymphozyten zur Folge hat.

Die Migration von Monozyten wird vor allem durch das Chemokin MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (HANSSON, 2001) beeinflusst, die der T-Lymphozyten durch die Interferon- γ -induzierbaren Chemokine IP 10 (IFN-inducible protein), Mig (monokine induced by IFN- γ) und I-TAC (IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant) (MACH, 1999).

Die Adhäsionsmoleküle sind in drei große Gruppen zu unterscheiden:
(siehe Abbildung 1)

- Selektine
(P-Selektin, E-Selektin, L-Selektin)
- Immunglobulin ähnliche Moleküle
(ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1, u.a.)
- Integrine
(LFA-1, Mac-1, VLA4, u.a.)

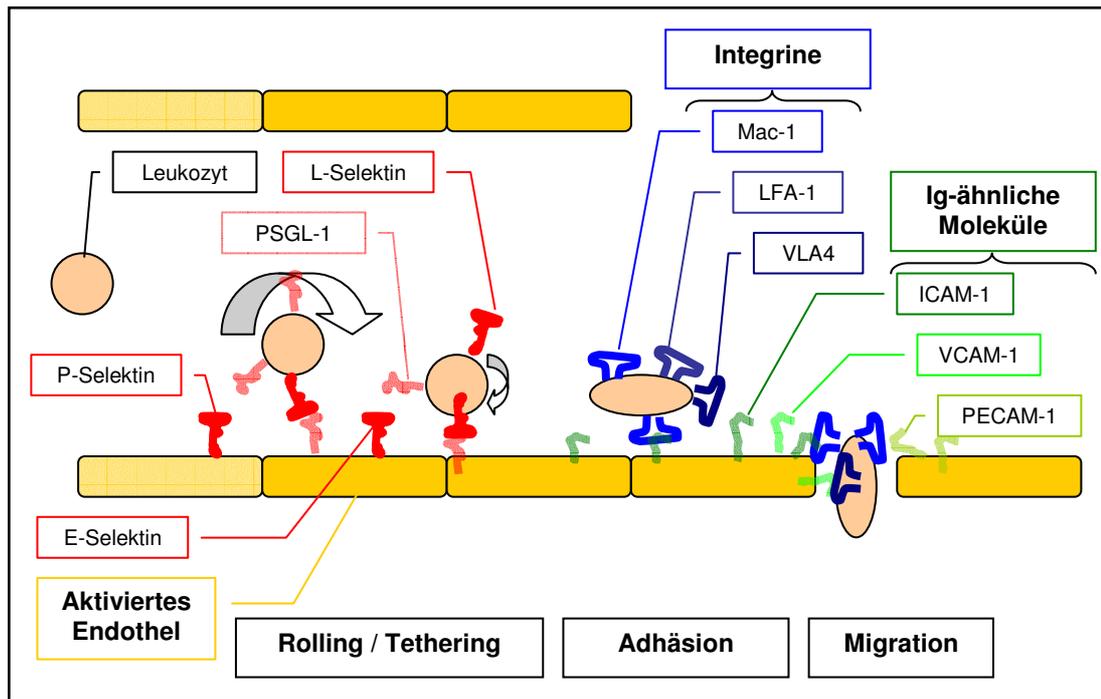


Abb. 1: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel mit Bezug auf die Adhäsionsmoleküle

Selektine werden nach dem Ort ihrer Expression differenziert. So werden auf Leukozyten L-Selektine, auf Endothelzellen E-Selektine und auf Thrombozyten P-Selektine exprimiert. Sie binden an spezifische Liganden, wie z.B. PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand). PSGL-1 ist für P-Selektin der stärkste Ligand, aber in schwächerer Form auch für E- und L-Selektin.

Die Expression der Selektine ist nicht konstant, sondern hängt z. B. bei den L-Selektinen von der Aktivierung von Leukozyten, T- und B-Zellen sowie NK-Zellen ab. Beim ruhenden Endothel liegen keine E-Selektine vor. Erst durch eine Entzündungsreaktion kommt es durch Zytokine zur Genaktivierung und damit zur Selektinexpression.

Über rolling (Rollen) und tethering (Anbindung) entsteht aufgrund der Liganden eine schwache Verbindung zwischen Leukozyten und Endothelzellen (MOORE, 1995). Durch diese Bindung kommt es wiederum zur Aktivierung der Leukozyten, zur Mobilisation von Integrinen und damit zur Beeinflussung von Entzündungsprozessen und thrombotischen Ereignissen.

Integrine liegen in inaktiven Zellen in einer nicht adhäsiven Form vor. Sie bestehen aus verschiedenen α - und β -Ketten. Integrine haben in der Regel mehrere Liganden. Erst durch eine Zellaktivierung kommt es zu einer Strukturänderung der Integrine und damit zu einer erhöhten Adhäsivität (HUGHES, 1998).

Entscheidend für die vaskulären Prozesse sind die Integrine α L/ β 2 (CD11a/CD18, leucocyte function associated antigen-1, LFA-1), α M/ β 2 (CD11b/CD18, Mac-1) und α 4/ β 1 (VLA4, CD49d/CD29), die mit ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1 binden.

Bei den immunglobulinähnlichen Molekülen handelt es sich um Membran-Glykoprotein-Rezeptoren, wie z. B. ICAM 1-3 (intercellular adhesion molecule), VCAM -1 (vacular cell adhesion molecule) und PECAM-1 (platelet endothelial cellular adhesion molecule).

ICAM-1 bindet u. a. an leukozytenspezifisches β 2 Integrin (α L/ β 2, LFA-1, CD11a/CD18) und an α M/ β 2 (Mac-1, CD11b/CD18). Wahrscheinlich ist die Bindung an Mac-1 entscheidend für rolling und tethering (DUNNE, 2003).

VCAM-1 wird auf Endothelzellen, Makrophagen, Myoblasten und dendritischen Zellen exprimiert. Es bindet mit α 4/ β 1 Integrin (VLA4, CD49d/CD29) und erlaubt dadurch eine Leukozyteneinwanderung aus dem Gefäß in die Zelle (MATHENY, 2000).

Das auf Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen exprimierte PECAM-1 kommt vor allem zwischen den einzelnen Zellen vor und ist verantwortlich für die interzelluläre Verbindung (Endothelzelle-Endothelzelle oder Endothelzelle-Leukozyten) (NEWTON, 1997). Damit spielt es ebenfalls eine Rolle bei der Leukozyteneinwanderung und hat eine Bedeutung bei Thrombose, Entzündung, Wundheilung und Angiogenese (DE LISSER, 1997).

Lösliche Formen der Adhäsionsmoleküle stehen als potentielle Biomarker zur Risikostratifizierung einer KHK seit Jahren im Blickpunkt der Forschung. Eine genaue Erklärung für die nachweisbaren Blutspiegel von löslichen Adhäsionsmolekülen liegt derzeit noch nicht vor. Diskutiert werden ansteigende Gentranskription, mRNA-Änderungen, Translationsänderungen,

vermehrte Unterformen und vermehrte proteolytische Abscherung (BLANKENBERG 2003).

U. a. durch Abscheren der Zellen entstehen somit lösliche (soluble) Isoformen, wie sICAM-1 oder sVCAM-1. sICAM-1 korreliert mit dem CRP und gilt generell als proinflammatorischer Marker. In mehreren prospektiven Studien (siehe Tabelle 1), wie z. B. in der HOPE-Studie, wurde gezeigt, dass sICAM-1, wie auch Fibrinogen, bei gesunden Menschen als möglicher positiver Prädiktor für die Entwicklung einer KHK angesehen werden kann (SMIEJA, 2001). In der PRIME Study zeigten sich erhöhte sICAM-Werte prädiktiv für akute Koronarsyndrome wie Angina pectoris, Myokardinfarkt und koronarischämischer Tod, sVCAM zeigte keine Korrelation zur KHK. sICAM war bei KHK unabhängig von weiteren Risikofaktoren. In Kombination mit hs-CRP erhöht sich für sICAM der prädiktive Wert (LUC, 2003).

Studie	Parameter	
	spezifisch	unspezifisch
WHS, Ridker (1998, 2000)	sP-Selektin, sICAM-1, SAA, IL-6, CRP	
PHS, Ridker (1997, 1998, 2000)	sICAM-1, IL-6, CRP	sVCAM-1
ARIC, Hwang (1997)	sICAM-1	sVCAM-1
HOPE, Smieja (2001)	sICAM-1, Fibrinogen	hsCRP, IL-6
PRIME, Luc (2003)	sICAM-1	sVCAM-1

Tabelle 1: Prospektive klinische Studien über Inflammationsmarker und das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse in der Zukunft (WHS: Women's Health Study; PHS: Physician's Health Study; ARIC: Atherosclerosis Risk in Communities (Study); HOPE: Heart Outcomes Prevention Evaluation; PRIME: The prospective epidemiological study of myocardial infarction)

Da sVCAM im „ruhenden Endothel“ nicht exprimiert wird, steigt der Plasmaspiegel erst nach Endothelaktivierung an. Somit werden erhöhte Werte besonders bei bekannter KHK und insbesondere auch beim akuten Koronarsyndrom (ACS) gesehen.

Der sL-Selektin Wert fällt bei Gesunden mit zunehmendem Lebensalter, korreliert aber mit der Leukozytenzahl (PONTHEUX, 2004). sL-Selektin war in einer kleinen Studie bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit im Vergleich zu Gesunden nicht signifikant erhöht

(BLANN, 1996). Bei stabiler und instabiler AP, sowie bei akutem Myokardinfarkt wurden erniedrigte Werte von L-Selektin und sL-Selektin im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet. Eine Stimulation der Leukozyten der Kontrollgruppe führte ebenfalls zu einer deutlichen Down-Regulation. Somit spiegeln erniedrigte Spiegel von L-Selektin und sL-Selektin einen chronisch entzündlichen Prozess wider (HAUGHT, 1996). Ähnliche Ergebnisse zeigen auch Modelle bei Sepsis/SIRS, bei denen erniedrigte sL-Selektin-Werte eine schlechte Prognose zeigten (SEIDELIN, 2002). Im Gegensatz dazu wurde im Blut aus dem Koronarsinus nach Angioplastie ein erhöhter Level von sL-Selektin festgestellt (INOUE, 1999). Entsprechend wurden erhöhte sL-Selektin Spiegel auch bei verzögert interveniertem oder nur mit PTCA versorgtem akutem Myokardinfarkt gesehen, wobei eine rasche Intervention oder eine gleichzeitige Stentversorgung zu keiner Erhöhung von sL-Selektin führte (LINK, 2004).

2.1.3 Zytokine

Bei den Zytokinen handelt es sich um Signalmoleküle, die überwiegend von Makrophagen und Lymphozyten produziert und exprimiert werden. Die Aufgabe der Zytokine besteht in der Regulation von Immunreaktionen in Verbindung mit anderen Zellen. Im Rahmen atherosklerotischer Läsionen spielen insbesondere Interleukine (IL-1, IL-6, IL-10), der Tumornekrosefaktor (TNF- α) und Interferone (z. B. IFN- γ) eine wichtige Rolle. Die Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen führt zu einer "Zytokinkaskade" (HANSSON, 2001).

Die Lymphozyten lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen: T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen. Für die Zytokinausschüttung in atheromatösen Läsionen sind die CD4⁺ T-Helferzellen von besonderer Bedeutung. Diese können nach Differenzierung aus naiven T-Helferzellen in Th1- und Th2-Zellen unterteilt werden (MOSMANN, 1986).

Th1-Zellen exprimieren IFN- γ , IL-2 und TNF- α , Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Zusammenfassend können Th1-Zellen als pro- und Th2-Zellen als antiinflammatorisch angesehen werden.

Die durch IFN- γ stimulierten Makrophagen sezernieren das Zytokin IL-1, das glatte Muskelzellen (SMC) zur IL-6 Produktion anregt (LOPPNOW, 1990). IL-6 gilt ebenfalls als proinflammatorisches Zytokin und hat biologische Funktionen, wie z.B. die Stimulation von Hepatozyten zur CRP-Produktion, als hämatopoetischer Wachstumsfaktor oder auch als Aktivator der Expression von Membranmolekülen. Im Tierversuch steigert IL-6 die Expression von AT1-Rezeptoren, was zu einer erhöhten AT-II-vermittelten Vasokonstriktion führt (WASSMANN, 2004). Eine große Zahl von Studien konnte zeigen, dass erhöhte Plasmaspiegel von IL-6 und CRP einen positiven Prädiktor für eine koronare Herzerkrankung darstellen (RATTAZZI, 2003).

TNF- α ist eines der am längsten bekannten Zytokine und wird vor allem von Makrophagen und TH1-Zellen produziert. Es induziert außer den Wirkungen wie Fieber, Kachexie oder Produktion von Akutphaseproteinen insbesondere auch proinflammatorische Veränderungen in den Endothelzellen. Hierzu gehören u. a. die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Produktion und Freisetzung von Zytokinen und prokoagulatorischen Substanzen und die Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Diese produziert zum einen das vasodilatierende, aggregationshemmende und antiproliferative NO, zum anderen aber auch Peroxynitrit (ONOO⁻), das Gefäßspasmen und Aggregation bewirkt (DEPRE, 1999).

Von den Th2-Zytokinen spielt das IL-10 eine wichtige Rolle in Bezug auf die Atherosklerose. In atherosklerotischen Plaques liegt eine erhöhte Expression von IL-10 vor. IL-10 kann sowohl die Aktivität von Makrophagen als auch von Lymphozyten supprimieren. Es inhibiert zelluläre Prozesse, die nicht nur die Entstehung, sondern auch die Zusammensetzung und damit verbundene Rupturgefahr von Plaques beeinflussen (MALLAT, 1999).

Eine weitere Population sind die Th3-Zellen, die IL-4, IL-10 und den stark antiinflammatorisch wirkenden transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) produzieren. Bei atheromatösen Läsionen bewirkt er die Stimulation der Kollagensynthese, Entzündungshemmung und Plaquestabilisation (MC CAFFREY, 1997). Im Tierversuch starben Mäuse mit einem Mangel an TGF- β (TGF- β KO mice) in wenigen Wochen an einer fulminanten Sepsis (KULKAMI, 1993).

2.1.4 Chemokine:

Das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gilt als Prototyp der Chemokine und bewirkt über seinen Rezeptor CCR2 die Einwanderung von Monozyten und Macrophagen in frühe atherosklerotische Läsionen. Erhöhte Spiegel von MCP-1 im Blut werden bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, instabiler Angina pectoris und nach Koronarintervention beobachtet (MATSUMORI, 1997; deLEMONS, 2003; SHEIKINE, 2004).

2.1.5 Andere:

HLA-DR (human leucocyte antigen) gehört zu den Klasse-II-Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) und wird von B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. In Verbindung mit HLA-DR erkennen die Zellen phagozytierte Antigene. Dadurch wird die Entzündungsreaktion z. B. durch die Sekretion von INF- γ und IL-2 durch Th1-Zellen begünstigt. HLA-DR positive T-Zellen werden fast konstant in Plaques von Patienten mit Myokardinfarkt gefunden (DE BOER, 2003; VAN DER WAL 1994). Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris wurden deutlich erhöhte HLA-DR Werte gefunden, bei stabiler Angina pectoris gering und bei Gesunden nicht erhöhte Werte (LINDMARK 2001; SERNERI, 2004). Zur Erkennung von aktivierten Entzündungszellen können somit Antikörper für HLA-DR herangezogen werden.

NK-Zellen sind wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems, insbesondere bei viralen Infektionen. Sie erkennen ihre Zielzellen auf zwei Arten. Zum einen über den Fc-Rezeptor, der das an die Zielzelle gebundene IgG bindet und damit die zytotoxische Aktivität auslöst. Zum anderen über den "killer-activating receptor", der die Zytotoxizität einleitet, oder den "killer-inhibitory receptor", der mit MHC Klasse-I-Molekülen die Zytolyse verhindert (DELVES, 2000). NK-Zellen werden in atherosklerotischen Plaques

gefunden, regulieren aber auch die Produktion einiger Zytokine, so dass eine direkte Wirkung auf die Atherogenese bisher nicht sicher belegt werden konnte (GETZ, 2002). Tiermodelle mit LDLr^{-/-} Mäusen haben die direkte proatherogene Wirkung nahe legen lassen (SCHILLER, 2002; STEWART C. WHITMAN, 2004). Bis heute ist die genaue Bedeutung der NK-Zellen bei der Atherosklerose aber noch unbekannt.

Die Bedeutung des C-reaktiven Proteins als prognostischer Faktor für kardiovaskuläre Komplikationen konnte in den letzten Jahren durch mehrere Studien belegt werden (RATAZZI, 2003; RIDKER, 2004; LINK 2002). Die CRP-Produktion in der Leber wird durch die Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 beeinflusst (s. o.). Es bleibt jedoch weiter zu untersuchen, ob das CRP nur als Marker oder auch als direkter Auslöser einer Atherosklerose anzusehen ist (HANSSON, 2005).

2.2 Angiotensin II

2.2.1 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) gehört zu den endokrinen Peptidsystemen. Das Haupteffektorpeptid stellt das Angiotensin II dar. Ausgangsprodukt ist das Angiotensinogen, das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird. Das in den Nieren zur Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes und damit auch des Blutdruckverhaltens produzierte Renin spaltet von Angiotensinogen das inaktive Dekapeptid Angiotensin I ab. Das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), vor allem aus der Lunge und den Hoden entstammend, spaltet wiederum ein Dipeptid von Angiotensin I ab, so dass das aktive Angiotensin II entsteht. ACE ist jedoch ein unspezifisches Enzym und kann z. B. auch Bradykinin, Substanz P, Enkephaline und die β -Kette von Insulin abbauen. Über die Hemmung des Bradykininabbaus durch ACE-Hemmer erklärt sich z. B. der unter ACE-Hemmer-Therapie häufig auftretende Reizhusten. Angiotensin II bindet an zwei verschiedene Rezeptoren, den AT₁- und AT₂-Rezeptor (s.u.).

Alle Proteine des RAS konnten in verschiedenen Organen wie Gehirn, Herz, Gefäßwand, Niere, Nebenniere, Eierstöcken und Hoden gefunden werden. Somit muss aktuell zusätzlich von einem lokalen RAS ausgegangen werden. Eine pharmakologische Beeinflussung des RAS erfolgt über die ACE-Hemmer und die Angiotensin-Rezeptorantagonisten.

2.2.2 Subtypen von Angiotensin II Rezeptoren

Die Angiotensin II Rezeptoren werden nach ihrer Affinität für Losartan und CPG 42112A, PD 123177 und PD 123319 in AT₁- und AT₂-Rezeptoren differenziert. Die Sartane stellen die Hauptliganden für die AT₁-Rezeptoren dar. Beide Rezeptortypen sind im Gewebe unterschiedlich verteilt.

Der AT₁-Rezeptor kommt bei adultem Gewebe vor allem in Blutgefäßen, Herz, Leber, Nebennieren und Nieren vor. Er aktiviert die hauptsächlich durch AT II vermittelten Wirkungen wie Vasokonstriktion, vaskuläre und kardiale Hypertrophie, Mediahypertrophie, erhöht Kontraktilität des Herzens, Arrhythmien, Sympatikusmodulation, renal tubuläre NaCl-Rückresorption, Nephrosklerose, Osmoregulation, Baroreflexhemmung, Zellproliferation, Entzündungsantwort und oxidativen Stress (UNGER, 2003; LEVY, 2004).

In adultem Gewebe ist der AT₂-Rezeptor überwiegend in Gehirn und Nebennieren, geringer in Gefäßendothel, Myokard, Ovarien und Uterus exprimiert. In fetalem Gewebe ist der AT₂-Rezeptor weiter verbreitet, was auf eine Bedeutung im Entwicklungs- und Differenzierungsprozess hinweist. Insgesamt werden dem AT₂-Rezeptor die Möglichkeit der Vasodilatation, Antiproliferation, Antiangiogenese, Hemmung der Neointimabildung, Zelldifferenzierung, Geweberegeneration und Apoptose zugeschrieben (UNGER, 1999; LEVY, 2004). Der Effekt auf den Blutdruck ist aktuell noch nicht eindeutig geklärt. Bei einem Defekt des AT₂-Rezeptors konnte eine Blutdruckerhöhung gezeigt werden.

Bei der Blockade von AT₁-Rezeptoren kommt es zu einer Erhöhung von Angiotensin II, welches mit den AT₂-Rezeptoren interagiert und somit eine Blutdrucksenkung begünstigen kann (DE GASPARO, 2000). In Tierversuchen wurden bezüglich Hypertrophie, Remodeling und Apoptose

sowohl begünstigende, als auch inhibierende Effekte aufgezeigt, so dass hierzu eine eindeutige Beurteilung noch nicht möglich ist. Zusammenfassend scheint sich aber eine indirekte Langzeitstimulation von AT₂-Rezeptoren durch AT₁-Rezeptorantagonisten begünstigend auf Myokardhypertrophie, vaskuläre Fibrose und Zunahme von Neovaskularisation in ischämischem Gewebe auszuwirken (LEVY, 2004).

2.2.3 Proinflammatorische Wirkung von Angiotensin II

Bei kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz und Atherosklerose, spielen die inflammatorischen Wirkungen des Angiotensin II eine wichtige Rolle. In der HOPE-Studie war dieser Effekt deutlich zu belegen (HOPE STUDY INVESTIGATORS, 2000). Dies beruht vor allem auf dem AT₁-Rezeptor vermittelten oxidativen Stress, welcher wiederum eng mit der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Interaktion mit NAD(P)H-Oxidase und der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zusammenhängt. ROS inaktivieren NO und führen zu einer Erhöhung von Peroxy-Nitrit. Über Monozyten (MCP-1-Expression, CD11b/18-Expression), Endothelzellen (ICAM-1- und VCAM-1-Expression, Zytokine, Wachstumsfaktoren), vaskuläre glatte Muskelzellen (Kontraktion, Migration, Proliferation, Apoptose, Zytokine, Wachstumsfaktoren und MMP), Lipide (Oxidation, oxidiertes LDL, Lox-1-Expression) und das Gerinnungssystem (PAI-1, tPA) werden endotheliale Dysfunktion, Plaqueformation und Plaqueruptur verursacht (NICKENIG, 2002).

2.2.4 in vitro und in vivo Daten

Eine Vielzahl von Studien haben verschiedene Effekte von Angiotensin II auf unterschiedliche Zellkomponenten gezeigt. Im Mausmodell werden klassischer Weise ApoE^{-/-} Mäuse verwendet, bei denen das Genprodukt zur Produktion von Apolipoprotein E fehlt, wodurch es zur Ausbildung einer Atherosklerose kommt. Die Abhängigkeit der Reaktion von Angiotensin II auf die gewählten Parameter wurde meist durch eine selektive Blockade von

AT₁-, oder AT₂-Rezeptoren zurückgeführt. Verschiedene Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgezeigt.

Autor	Studiendesign	Parameter	Ergebnisse
Lakó-Futó Circ 2003	Ratten AT II + AT ₂ -Rez- Antagonist (PD123319)	Genexpression von c-fos, ET-1, IGF-1, FGF-1, VEGF und ANP, LV- Hypertrophie	Durch AT ₂ -Rezeptorblockade über wachstumshemmenden und -fördernden Faktoren Aggravierung von LV- Hypertrophie, Herzinsuffizienz und Arrhythmieneigung
Hayek Cardiovasc Res. 1999	ApoE ^{-/-} Mäuse, ACE-Hemmer	Aortenläsion, RR, oxLDL	Reduktion der Aortenläsion-Größe um 70%; antiatherogener Effekt über AT II- abhängige Effekte (z.B. Inhibition LDL- Oxidation)
Chen Biochem Biophys Res Commun. 2001	hypercholester. Kaninchen AT ₁ -Blockade (Losartan)	Expression von AT ₁ Rez.; P-Selektin, MCP-1	Durch ARB Reduktion der Intima- proliferation, der Expression von P-Selektin und MCP-1 (unabhängig vom Serum-Lipid- Spiegel oder AT ₁ -Rez.-Expression), Steigerung der AT II-Spiegel
Daugherty J Clin Invest. 2000	ApoE ^{-/-} Mäuse AT II-Infusion für 1 Monat	Aortensklerose, Makrophagen, Lymphozyten	Durch AT II Progress der Atherosklerose (bei bestehender Hyperlipidämie und Atherosklerose unabhängig vom RR) Entwicklung von Aortenaneurysmata Erhöhung der Zahl lipidbeladener Makrophagen und Lymphozyten
Tummala Circ 1999	Ratten Norepinephrin- und AT II Infusion	RR, VCAM-1 Expression, NF-κB	Durch AT II Induktion der Aktivierung von VCAM-1 in SMC, a. e. über Aktivierung von NF-κB (RR-unabhängig)
Pueyo Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000	Endothelzellen aus Rattenaorta AT II Stimulation	VCAM-1, Superoxid (O ₂ ⁻), NF-κB, I-κB	Durch AT II Stimulation der intrazellulären H ₂ O ₂ -Produktion, Oxidativer Stress mit Reduktion von I-κB und Erhöhung von NF- κB, mit Erhöhung der Expression von VCAM-1
Rajagopalan J Clin Invest. 1996	Ratten Norepinephrin- und AT II Infusion (Losartan)	Superoxid (O ₂ ⁻), RR	Durch AT II Verdoppelung der vaskulären Produktion von Superoxid (O ₂ ⁻) über NAD(P)H; Durch AT ₁ -Rezeptorblockade Normalisierung der Superoxidproduktion
Kranzhofer Arterioscl Thromb Vasc Biol. 1999	humanen VSMC Stimulation mit AT II; (Losartan; Pyrrolidine dithiocarbamat)	IL-6, IL-6mRNA, NF-κB	Durch AT II in SMC über AT ₁ -Rez Stimulation der Zytokinproduktion (IL-6) und Aktivierung von NF-κB.
Schieffer Circ 2000	Humane ischämische oder dilatativen Kardiomyopathien AT II-Stimulation in vitro Expression von RAS-Faktoren	AT II, ACE, AT ₁ -Rezeptor, IL-6	Expression von AT II, ACE und AT ₁ -Rez in atherosklerotischen Koronararterien; vermutliche Bildung von AT II durch ACE im Plaques ; Induktion in vitro von IL-6 durch AT II, in vivo enger räumlicher Zusammenhang von AT II und IL-6
Kalra Circ 2002	ex vivo Herzen, Katze Stimulation mit AT II (Losartan)	NF-κB, TNF mRNA, AP-1, PKC	Durch AT II TNF-Synthese über Aktivierung von NF-κB, Aktivator-Protein-1 (AP-1) und einen Proteinkinase C (PKC) abhängigen Mechanismus
Sun J Lab Clin Med 2004	geschädigten Herzen, Ratten Suppression von plasmatischem AT II	NF-κB, ICAM-1, MCP-1, TNF-α, TGF-β, PAI-1 Kollagen Typ I	über Gewebe-AT II AT ₁ -Rez.-abhängige vermittelte Entzündungsreaktion erst nach 30 Tagen (bei unterdrücktem Plasma AT II- Spiegel)

	und Renin (Valsartan)		
--	--------------------------	--	--

Tabelle 2: experimentelle Studien zur Wirkung von Angiotensin II auf Atherosklerose

2.3 **AT₁-Rezeptorantagonisten**

2.3.1 **Allgemeine pharmakologische Aspekte**

AT₁-Rezeptorantagonisten besetzen in therapeutisch eingesetzter Dosierung mit hoher Selektivität die AT₁-Rezeptoren und verhindern damit die Wirkung von Angiotensin II an diesen, nicht aber an den AT₂-Rezeptoren. Bei AT₁-Rezeptor vermittelter negativer Rückkopplung zur Reninproduktion kommt es durch Blockade der Rezeptoren zu einer gesteigerten Renin- und damit auch Angiotensin II Produktion. ACE-Hemmer verringern dagegen die Gesamtmenge von Angiotensin II, so dass es hierbei zu einer verminderten Aktivierung von AT₁- und AT₂-Rezeptoren kommt. Der möglichen Aktivierung der AT₂-Rezeptoren wird aber insbesondere der organprotektive Effekt der AT₁-Rezeptorantagonisten zugeschrieben.

Angiotensin II kann nicht nur über den Weg des Angiotensin-Konversionsenzym, sondern auch über ACE-unabhängige Enzyme wie Kathepsin G, Elastase oder Chymase gebildet werden. Lokale, ACE-unabhängige Angiotensin II Bildung wurde in letzter Zeit insbesondere im Herzmuskel gefunden (SUN, 2004).

Durch die spezifische Blockade der AT₁-Rezeptoren ist die Nebenwirkungsrate, insbesondere in Bezug auf den Reizhusten, der am ehesten durch die Hemmung des Bradykininabbaus durch ACE-Hemmer hervorgerufen wird, deutlich geringer als unter ACE-Hemmern. In zahlreichen Studien bestätigte sich dieses günstige Nebenwirkungsprofil (ELITE II: Therapieabbruch unter ACE-Hemmer vs. ARB: 14,5% vs. 9,4%; ValHeFT und CHARM-Alternative : Nebenwirkungen gleich denen von Placebo).

Die Indikation der AT₁-Rezeptorantagonisten reicht von der arteriellen Hypertonie (Studien: LIFE, VALUE, SCOPE), der Herzinsuffizienz (ELITE II, HEALL, Val-HeFT, CHARM, I-PRESERVE), dem Herzinfarkt (OPTIMAAL, VALIANT), der diabetischen Nephropathie (RENAAL, IRMA 2, IDNT, ABCD-

2V), dem Schlaganfall (ACCESS, LIFE) bis hin zur Sekundärprävention mit antiproliferativer und antiinflammatorischer Wirkung (ONTARGET).

Die Substanzklasse der AT₁-Rezeptorantagonisten, sogenannte Sartane, haben zum einen Klasseneffekte, zum anderen unterscheiden sie sich in einzelnen Details. Ein Teil der Substanzen liegt in der aktiven Wirkform vor (Irbsartan, Valsartan, Eprosartan und Telmisartan), andere werden erst in vivo zu den aktiven Metaboliten umgewandelt (Candesartan, Olmesartan, Losartan). Die Halbwertszeiten unterscheiden sich ebenfalls deutlich und betragen zwischen 5-7 Stunden (Eprosartan) bis zu 24 Stunden (Telmisartan).

2.3.2 Pharmakologische Besonderheiten von Telmisartan

Telmisartan zeigt eine rasche Resorption mit Spitzenkonzentrationen im Plasma nach 0,5-2 Stunden. Bei hohem Verteilungsvolumen und starker Plasmaproteinbindung hat es mit 24 Stunden die längste Halbwertszeit aller AT₁-Rezeptorantagonisten (KAKUTA, 2005). Die Elimination erfolgt fast ausschließlich über die Leber, die renale Ausscheidung ist unbedeutend. Eine Interaktion mit dem Cytochrom P-450 liegt nicht vor.

Im PROTECTION Programm (WEBER, 2003) zeigt sich die effektive Blutdrucksenkung durch Telmisartan insbesondere in der 24-Stunden Messung. Die Zusammenfassung von insgesamt 9 verschiedenen Studien mit Telmisartan soll bezüglich Endorganprotektion weitere Ergebnisse bringen. Bezüglich der zerebralen Effekte bei der Genesung nach Schlaganfall spielt die Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Rolle. Hier scheint Telmisartan ein gutes Penetrationsvermögen zu besitzen (UNGER, 2003). Eine weitere Studie, TELMAR, soll die Wirkung von Telmisartan auf die Reduktion linksventrikulärer Hypertrophie unabhängig vom Blutdruckverhalten aufzeigen (FRIEDRICH, 2003). Außerdem wird Telmisartan über die Aktivierung von peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR_γ) eine zentrale Rolle in der Prävention und Behandlung des metabolischen Syndroms, Diabetes mellitus und der Atherosklerose zugesprochen (KURTZ, 2005).

2.3.3 Antiinflammatorische Wirkung von AT₁-Rezeptorantagonisten

Wie bereits oben erwähnt, wurden viele experimentelle und bisher relativ wenige klinische Studien zur Wirkung von Angiotensin II mit selektiver AT₁- und AT₂-Rezeptorblockade durchgeführt. Es konnte der Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Effekten, Angiotensin und damit auch der Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten aufgezeigt werden. Die AT₁-Rezeptor vermittelte Wirkung mit Induktion eines oxidativen Stresses spielt dabei die zentrale Rolle (s. o.). Ein Zusammenfassung wichtiger Studien erfolgt in Tabelle 3.

2.3.3.1. Wirkung auf Adhäsionsmoleküle

Außer den experimentellen Wirkungen von AT₁-Rezeptorantagonisten auf die Expression von Adhäsionsmolekülen kann aus den bisherigen klinischen Studien bei Hypertonie, KHK und Hypercholesterinämie eine Wirkung auf manche Adhäsionsmoleküle abgeleitet werden. Für die Gruppe der Selektine zeigte sich für sE-Selektin keine Änderung (PRASAD 2001; GRANINGER, 2004), für sL-Selektin eine Erhöhung der Spiegel (PRASAD, 2001). Bei den Integrinen war nur eine geringe Reduktion von LFA-1 aufgefallen (PRASAD, 2001). Von den immunglobulinähnlichen Molekülen war sVCAM-1 (NAVALKAR, 2001; PRASAD, 2001; GRANINGER, 2004) und sICAM-1 normal (PRASAD, 2001) bis vermindert (GRANINGER, 2004).

2.3.3.2 Wirkung auf Zytokine

Bei den Zytokinen waren unter AT₁-Rezeptorantagonisten die Spiegel von TNF- α , IL-1 und IL-6 signifikant reduziert (NAVALKAR, 2001; KOH, 2003; FLISER, 2004; SCHIEFFER, 2004; TREVELYAN, 2004). Der IL-10-Spiegel stieg unter Therapie an (SCHIEFFER, 2004).

Autor	Studiendesign	Parameter	Ergebnisse
Kahn JACC 2001	47 Pat. mit KHK Irbesartan vs. Placebo	LDL-Oxidations-Zeit O ₂ ⁻ Monozytenbindung, CD 11b Thiobarbiturat reaktive Substanzen	Verzögerungszeit für die LDL-Oxidation um 32% steigend; Thiobarbiturat reaktive Substanzen- Aktivität reduziert sich um 36%; Monozytenbindungskapazität und O ₂ ⁻ Spiegel reduziert
Navalkar JACC 2001	33 Pat. mit KHK vs. Kontroll- gruppe ohne KHK Irbesartan	sTNF-αRII VCAM-1 O ₂ ⁻	höhere Spiegel bei KHK- als bei Kontroll- Gruppe; Irbesartan reduziert Level von VCAM-1 um 36%, sTNF-α um 54% und O ₂ ⁻ um 52% mit Maximum nach 12 Wochen
Prasad Am Heart J 2001	31 Pat. mit KHK Losartan	sICAM-1 sVCAM-1 PECAM-1 sE-Selektin L-Selektin LFA-1, Mac-1 VLA-4, CD11c CD18, CRP	Keine Änderung der löslichen Adhäsionsmoleküle (sICAM-, sVCAM-1, sE-Selektin); Expression von L-Selektin unter Losartan auf Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten erhöht; andere Adhäsionsmoleküle und CRP nicht signifikant verändert
Dohi Hypertens Res. 2003	132 Pat. mit Hypertonie Candesartan vs. Antihypertensiva	CRP 8-Epi-Prostaglandin F2α 8-Hydroxydeoxy- Guanosin	Unter Candesartan reduzierte Spiegel von CRP, 8-Epi-Prostaglandin F2α und 8- Hydroxydeoxy-Guanosin im Ggs. zu anderen Antihypertensiva als Zeichen antiinflammatorischer Wirkung und oxidativem Stress
Koh JACC 2003	45 Pat. mit Hypertonie Candesartan vs. Placebo	CRP, MCP-1 TNF-α, PAI-1 MMP Fibrinogen Malondialdehyd	Candesartan reduziert signifikant Spiegel von MAD, MCP-1, TNF-α und PAI-1; Keine Reduktion von CRP, MMP und Fibrinogen
Murakami Cardiovasc Drug Ther. 2003	36 Pat. mit AMI vs. Gesunde Perindopril vs. Candesartan vs. Placebo	MCP-1 Vascular endothelial growth factor (VEGF) (im Serum und auf PBMC)	Bei gleichem Ausgangswert Anstieg von MCP-1 und VEGF bei AMI-Gruppe; Anstieg von MCP-1 und VEGF im Serum und durch Produktion von PBMC sowohl in Kontroll-, als auch in Behandlungsgruppe
Takeda Atheroscler. 2003	1231 Pat. mit stabiler vs. 226 Pat. ohne KHK ASS / ACE-H/ ARB / Statine	hs-CRP	hs-CRP bei KHK-Pat. deutlich höher; Reduktion des hs-CRP in beiden Gruppen durch Statine; Reduktion des hs-CRP in der KHK-Gruppe durch ACE-Hemmer, ARB; nicht durch ASS
Graninger J Cardiovasc Pharmacol. 2004	27 Pat. mit Hyper- cholesterinämie; Losartan vs. Enalapril vs. Placebo	sICAM-1 sVCAM-1 sE-Selektin ICAM-1	Bei Hypercholesterinämie sICAM-1 und sVCAM-1 bei Losartan und Enalapril leicht erniedrigt; sE-Selektin und ICAM-1 auf Leukozyten unverändert
Schieffer JACC 2004	48 Patienten mit KHK und Hypertonie Irbesartan vs. Enalapril	IL-6 IL-10 hsCRP MMP-9	Enalapril und Irbesartan reduzieren die Serum-MMP-9 Aktivität; erhöhen die IL-10 Konzentration vergleichbar; Irbesartan reduziert hsCRP, IL-6 und Plättchenaggregation
Trevelyan Am J Cardiol. 2004	Männliche Patienten vor Bypass-Op Enalapril, Losartan oder Kontrolle	IL-1, IL-6 IL-8, IL-10 -174 G/C und -572 G/C IL-6 Gen- Polymorphismus	Freigabe von IL-1 Rezeptoragonist reduziert sich unter Enalapril (E) um 29%, unter Losartan (L) um 31%; IL-6 unter E um 17%, unter L um 20%; -174 G/C Genotyp produziert 20% mehr IL-6, davon reduzierte E die Freigabe um 51%, L geringer

Tabelle 3: Klinische Studien zur Wirkung von AT₁-Rezeptorantagonisten auf Parameter von Inflammation bei Atherosklerose

2.3.3.3 Wirkung auf Chemokine

Als Hauptrepräsentant der Chemokine wurde überwiegend das MCP-1 untersucht. Erhöhte MCP-1 Werte bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt konnten weder durch ACE-Hemmer, noch durch AT₁-Rezeptorantagonisten beeinflusst werden (MURAKAMI, 2003). Ähnliche Beobachtung wurden auch bei hypertensiv diastolischer Herzinsuffizienz unter Therapie mit AT₁-Rezeptorantagonisten gefunden (YOSHIDA, 2004). Bei rein arterieller Hypertonie konnte in der EUTOPIA Studie eine Senkung der MCP-1 Werte unter Olmesartan beobachtet werden (FLISER, 2004).

2.3.3.4 Wirkung auf proinflammatorische Proteine

Eine Senkung des CRP, bzw. hs-CRP Spiegels durch die Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten ist in einigen Untersuchungen bei KHK, Hypertonie und Herzinsuffizienz belegt (TAKEDA, 2003; UEHARA, 2003; FLISER, 2004; SCHIEFFER, 2004; YASUNARI, 2004).

2.4 Fragestellung

Auswirkungen des AT₁-Rezeptorantagonisten Telmisartan in vivo auf die Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Chemokinen und proinflammatorischen Proteinen ?

Es sollten anhand einer prospektiv, placebokontrollierten, doppelblind randomisierten Studie Erkenntnisse über die im peripheren Blut nachweisbare Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Chemokinen und proinflammatorischen Proteinen erbracht werden. Die Therapie mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten in der Studienmedikationsgruppe sollte mögliche Veränderungen der gemessenen Parameter im Vergleich zur Placebo-Gruppe aufzeigen. Dadurch könnten sich ggf. weitere

Therapieoptionen von AT₁-Rezeptorantagonisten, bzw. neue Erkenntnisse über pathomechanistische Vorgänge ergeben.

Die vorliegende Arbeit untersuchte Patienten mit gesicherter KHK und milder arterieller Hypertonie. Eine zugelassene Begleitmedikation sicherte die Blutdruckeinstellung beider Gruppen auf gleichem Niveau, so dass eine blutdruckunabhängige Beurteilung der Wirkung der AT₁-Rezeptorantagonisten möglich war.

3. Klinische Studie, Methoden, Materialien

3.1 Klinische Studie

3.1.1 Studiendesign, Patienten

Die vorliegende Studie war als doppelblinde, randomisierte, placebokontrollierte Studie geplant. Die ethischen Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen beziehen sich auf die Deklaration des Weltärztesbundes von Helsinki (1964, Revision 2000). Nach Vorlage bei der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz erging am 20.06.2001 ein positives Votum.

Es wurden Patienten mit gesicherter koronarer Herzerkrankung und milder bis mäßiger arterieller Hypertonie eingeschlossen. Eine Untersuchung an gesunden Probanden erfolgte in diesem Rahmen nicht. Jeder Teilnehmer musste eine Einverständniserklärung zur Studienteilnahme unterschreiben.

3.1.2 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten über 18 Jahre mit einer koronarangiographisch gesicherten koronaren Herzerkrankung. Zusätzlich musste eine behandelte arterielle Hypertonie mit systolischen Blutdruckwerten von kleiner/gleich 160 mmHg und diastolischen Blutdruckwerten von kleiner/gleich 95 mmHg vorliegen. Ferner musste es nach klinischen Kriterien verantwortbar gewesen sein, eine etwaige

vorbestehende antihypertensive Therapie mit einem ACE-Hemmer oder AT₁-Rezeptorantagonisten sowie eine lipidsenkende Therapie mit Statinen für die Dauer der Studie zu unterbrechen.

3.1.3 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Patienten mit folgenden Erkrankungen / Zuständen: akutes Koronarsyndrom; akute oder chronische Herzinsuffizienz mit einer Ejektionsfraktion des linken Ventrikels von weniger als 45%; symptomatische Herzklappenerkrankung; Infektionserkrankungen; prämenopausale Frauen ohne sichere Empfängnisverhütung; stillende Mütter; sekundäre Hypertonie; Blutdruckwerte über 160/95 mmHg bei einem der Besuche; Nieren- und Leberfunktionsstörungen; bilaterale Nierenarterienstenosen oder funktionelle Einzelnieren; Z.n. Nierentransplantation; Hypo- oder Hyperkaliämie; Hyponatriämie; Volumenmangel; primärer Hyperaldosteronismus; hereditäre Fructoseintoleranz; Gallenwegsobstruktion; Entwicklung eines Angioödems während vorangegangener Therapie mit einem ACE-Hemmer oder AT₁-Rezeptorantagonisten; Medikamenten- oder Alkoholabusus; Teilnahme an anderen Studien während des letzten Monats; bekannte Allergie gegen die Studienmedikation; jegliche andere Gründe, die die Gabe der Studienmedikation nicht zulassen.

3.1.4 Zwischenausschlusskriterien

Zwischenausschlusskriterien waren das Auftreten von Erkrankungen oder Zuständen während der Studienteilnahme, die primäre Ausschlusskriterien darstellen (s. o.). Insbesondere stellten Blutdruckerhöhungen von mehr als 160/95 mmHg bei einem der Besuche ein Zwischenausschlusskriterium dar.

3.1.5 Abbruchkriterien

Die Studie konnte jederzeit vom Patient ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteil für seine weitere Behandlung abgebrochen werden. Vom

Studienarzt wurde die Studie abgebrochen, sobald eine relevante Nebenwirkung auf die Studienmedikation oder Erkrankungen / Zustände der Zwischenausschlusskriterien auftraten

3.1.6 Begleitmedikation

Außer ACE-Hemmern, AT₁-Rezeptorantagonisten und Statinen waren alle antihypertensiven, kardiovaskulären und sonstigen Begleitmedikamente zulässig. Soweit ohne Gefahr für den Patient möglich, war in der Randomisierungsphase das Absetzen der ACE-Hemmer, AT₁-Rezeptorantagonisten und Statinen möglich.

3.1.7 Prüfplan

Während des ersten Besuches wurden eine eingehende Anamnese und körperliche Untersuchung erhoben. Dadurch wurden Ein- und Ausschlusskriterien auf Eignung zur Studienteilnahme geprüft. Nach Feststellung der Eignung und eingehender Aufklärung konnte vom Patient die Einverständniserklärung unterschrieben werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde ergänzend ein 12-Kanal-EKG und eine Basis-Laboruntersuchung (Blutbild, klinische Chemie) durchgeführt.

Nach weiteren zwei bis vier Wochen wurde im Rahmen des zweiten Besuches nochmals eine eingehende Anamnese und körperliche Untersuchung vorgenommen. Ferner wurde Blut für die geplanten Laboruntersuchungen abgenommen.

Nach dieser Screeningphase wurde die Randomisierung (40 mg Telmisartan, oder Placebo) vorgenommen. Die Therapiephase betrug 84 Tage. Während dieser Zeit fanden die Besuche 3,4 und 5 statt. Bei Besuch 3 und 4 wurde eine eingehende Anamnese, insbesondere im Hinblick auf die Verträglichkeit der Studienmedikation oder etwaiger Nebenwirkungen und eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Bei abschließendem Besuch 5 erfolgte zusätzlich ein EKG und eine Blutentnahme.

Zur Begutachtung der sekundären Endpunkte Blutdruckverhalten und klinischer Verlauf wurden bei jedem Besuch der Blutdruck gemessen und

eine klinische Erhebung der Parameter Angina pectoris, Herzinsuffizienz, akute Koronarereignisse durchgeführt, sowie Krankenhausaufenthalte aufgrund kardialer Ereignisse festgehalten.

3.2 Methoden

3.2.1 Blutdruckmessung:

Die Blutdruckmessung erfolgte am sitzenden Patient nach 3-minütiger Ruhephase mit einer an den Oberarmumfang angepassten Blutdruck-Manschette (in der Regel 12 x 24 cm). Nach der Methode nach Riva-Rocci wurde die Manschette 30 mmHg bis über den Punkt des Verschwindens des palperten Radialispulses aufgepumpt und dann entsprechend bei langsamem Ablassen auskultatorisch der systolische und diastolische Wert bestimmt. Bei der Erstuntersuchung erfolgte eine Messung an beiden Oberarmen zum Ausschluss einer Seitendifferenz.

3.2.2 Blutabnahme

Die Blutentnahme erfolgte bei freiwilligen Probanden und bei den Studienpatienten nach schriftlicher Einverständniserklärung aus der Kubitalvene mit Hilfe von zwei 9 ml Serum-Monovetten , zwei 9 ml EDTA K-Plasmamonovetten, einer 2,7 ml EDTA K-Plasmamonovette und einer 2,7 ml Lithium-Heparin Monovette.

3.2.3 Probenaufbereitung

Für die Untersuchungen wurden die Blutproben der Studienpatienten gekühlt direkt in das Labor gebracht und dort entsprechend weiter bearbeitet (s.u.).

Das Blut von zwei 9 ml EDTA-Monovetten wurde mit 2500 x g für 10 Minuten zentrifugiert und danach das Serum in sechs 1,5 ml Eppendorf Röhrchen abgefüllt und bei –80 °C eingefroren.

Für die Human-FACS-Färbung der Oberflächenmarker ist es erforderlich, Lymphozyten zu isolieren und störende andere Zellen, z. B. Erythrozyten zu

eliminieren. Hierfür stehen verschiedene Methoden, wie Lyse von Vollblut oder Dichtegradiententrennung mittels Ficoll-Paque. Beide Methoden sind gleich effektiv, die Trennung durch Lyse jedoch deutlich weniger aufwendig und schonender (RENZI, 1987; ASHMORE, 1989). Die Summe der Bindung monoklonaler Antikörper differiert je nach Methode. Am höchsten liegt sie bei gefrorenen peripheren Blut-Lymphozyten, gefolgt von lysiertem Vollblut und am geringsten bei Ficoll-Trennung (ISLAM, 1995). Durch die Bearbeitung des Blutes ex vivo treten Veränderungen der Expression von Oberflächenmarkern auf. Die geringste Änderung scheint bei lysiertem EDTA-Vollblut bei einer Verarbeitungstemperatur von 4 °C vorzuliegen (LUNDAHL, 1995).

3.2.4 Bestimmung von leukozytären Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Chemokinen, proinflammatorischen Proteinen und NK-Zellen

Der Nachweis vaskulär entzündlicher Prozesse kann auf verschiedene Art erfolgen. So können z.B. funktionelle (Blutfluss) und morphologische (Kollateralisierung) Parameter, Modelle mit ApoE^{-/-} Mäusen, histologische, immunhistochemische (Immunfluoreszenzmikroskopie) oder andere Verfahren Aussagen treffen.

Um die Effekte von Telmisartan in vivo auf die leukozytäre / endotheliale Interaktion erkennen zu können, wurden in dieser Untersuchung von den aus der Literatur bekannten proinflammatorischen serologisch bestimmbaren Markern exemplarisch Vertreter der jeweiligen Gruppen ausgewählt. Diese sind in der Tabelle 4 mit dem Vorkommen, den charakteristischen Merkmalen und der jeweiligen Bestimmungsmethode aufgeführt.

<i>Parameter</i>	<i>Vorkommen</i>	<i>Funktion / Eigenschaft</i>	<i>Bestimmungsmethode</i>
Selektine			
sL-Selektin	Plasma (löslich) (Leukozyten)	Tethering Rolling	ELISA
Integrine			
LFA-1 (CD11a; αL/β2-Integrin)	Leukozyten	Adhäsion	FACS
MAC-1 (CD11b; αM/β2-Integrin)	Leukozyten	Adhäsion	FACS
Ig-ähnliche Moleküle			
s-ICAM-1	Plasma (löslich) (Leukozyten, Endothel)	Adhäsion	ELISA
ICAM-1	Leukozyten Endothelzellen	Adhäsion	FACS
PECAM-1	Leukozyten, Thrombozyten, Endothelzellen	Migration	FACS
Zytokine			
IL-4	Plasma, Th2-Zellen	antiinflammatorisch	CBA
IL-6	Plasma, Leukozyten glatte Muskelzellen, u.a.	proinflammatorisch	CBA
IL-10	Plasma, Th2-Zellen Makrophagen	antiinflammatorisch	CBA
TNF-α	Plasma, Th1-Zellen Makrophagen	proinflammatorisch	CBA
IFN-γ	Serum, Th1-Zellen	proinflammatorisch	CBA
Chemokine			
MCP-1	Plasma, Endothel, Monozyten / Makrophagen	Migration proinflammatorisch	ELISA
Inflammatorische Proteine			
hs-C-Reaktives Protein	Plasma	postiver Prädiktor für kardiovask. Ereignisse	Immunkomplex- Nephelometrie
andere			
FCγRIII	Plasma	zytotoxische Aktivität	FACS

Tabelle 4: Charakterisierung der verwendeten leukozytären Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Chemokine, proinflammatorischen Proteine und anderer

3.2.5 Human-FACS-Färbung für Oberflächenmarker auf periphere blutmononukleäre Zellen (PBMNC) aus EDTA Vollblut

Bei der Aufbereitung der Patientenproben wurde die Human-FACS-Färbung aus EDTA-Vollblut angewandt. Zur Differenzierung der Monozyten und Lymphozyten wurden je 10 µl CD14-Antikörper und CD3-Antikörper in die FACS-Röhrchen vorgelegt. Danach kamen jeweils 10 µl der zweiten Antikörper zur weiteren Differenzierung hinzu. Zu jeder Antikörpermischung wurden 100 µl EDTA-Vollblut hinzu pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunklen erfolgte eine Zerstörung der Erythrozyten durch je 2 ml

hypotoner FACS-Lysing-Solution (1:10 verdünnt). Nach erneuter Inkubation für 10 min und Zentrifugieren für 10 min wurde der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgesaugt. Nach zweimaliger Reinigung mit Cell-Wash und entsprechendem Zentrifugieren und Absaugen wurde zur Herstellung der Messlösung letztmalig 1 ml Cell-Wash hinzugefügt.

3.2.6 Cytometric Bead Array (CBA) zur Bestimmung löslicher Zytokine

Unter dem Cytometric Bead Array (CBA) versteht man eine Methode zur Bestimmung von löslichen Substanzen, wie z. B. Zytokine aus Zellüberstand oder Serum. Für jedes Zytokin gibt es eine Population von Capture-Beads (Polymerkügelchen) mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität. Der Zytokin – Capture Bead – Komplex bindet wiederum einen spezifischen Detektions-Antikörper mit einer anderen Fluoreszenzintensität. Vom Prinzip handelt es sich um einen "Sandwich-ELISA", wobei der Capture-Antikörper aber nicht an einer Mikrotiterplatte bindet. Die Messung erfolgt über die Durchflusszytometrie. Über eine Eichgerade können außer qualitativen auch quantitative Ergebnisse erzielt werden.

Für die Zytokinbestimmung in der vorliegenden Studie wurde der CBA-KIT der Firma BD verwendet. Hierzu wurde nach Produkthanleitung zuerst das Cytometer Setup erstellt, indem je 50 µl Cytometer Setup Beads in die Röhrrchen A, B und C pipettiert wurden. In Röhrrchen B kamen 50µl FITC-positiv Kontrolle, in Röhrrchen C PE-positiv Kontrolle hinzu. Nach Inkubation erfolgte die Zugabe von 450 µl Waschpuffer in Röhrrchen A und 400 µl in B und C. Mit diesen Mischungen war die Cytometer-Einstellung möglich.

Zur Quantifizierung war es zusätzlich erforderlich, eine Verdünnungsreihe der Zytokinstandards zu erstellen. Hierfür wurde lyophilisiertes human Th1/Th2 Zytokin Standard mit 200 µl Assay Diluent rekonstituiert und nach Inkubation von 15 Minuten ein Top Standard mit Assay Diluent mit einer Konzentration von 5 ng/ml hergestellt. Es folgte das Anlegen einer Verdünnungsreihe bis 1:256 und einer Negativ-Kontrolle.

Für die Präparation der Studienproben wurden zuerst 50 µl des Mastermix aus je 10 µl der einzelnen Capture Beads hergestellt. Danach wurden je 50 µl der Proben hinzupipettiert und für 1,5 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach

Hinzugabe von je 50 µl PE-Detektionsreagenz erfolgte eine erneute Inkubation für 1,5 Stunden. Die Proben wurden dann mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und abzentrifugiert. Zum Messen wurden nochmals 300 µl Waschpuffer hinzugegeben.

3.2.7 FACS-Analyse

Eine FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) – Analyse entspricht in der Funktionsweise einer Durchflusszytometrie. Hierbei werden suspendierte Einzelzellen durch einen Lichtstrahl (Laser) geführt und geben in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenmarkierung charakteristische Signale ab, die mittels Detektoren nachgewiesen werden können. Durch die Partikelgröße entsteht ein Vorwärtsstreulicht (FSC), durch die Granularität bzw. Komplexität ein Seitwärtsstreulicht (SSC) und die spezifische Fluoreszenz eine entsprechende Fluoreszenzintensität. Anhand dieser Phänomene sind charakteristische Verteilungen der Zellen reproduzierbar (siehe Abb. 2).

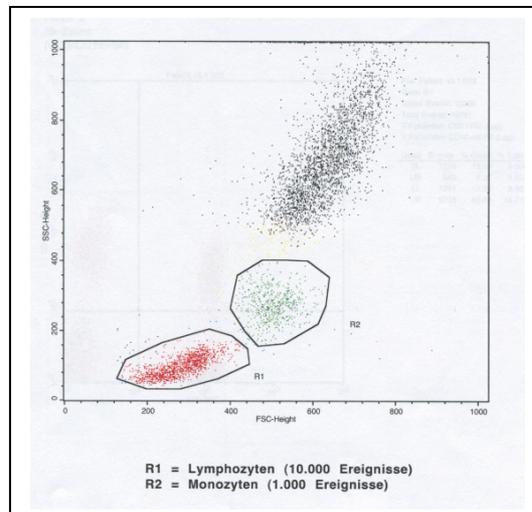


Abb. 2: Beispiel für FSC / SSC - Auftrennung in der Punktwolken-Darstellung

Die Wellenlänge der Fluoreszenzen ist von den jeweils eingesetzten Fluorochromen abhängig. Diese adsorbieren die Energie des Laserstrahles und geben sie wieder in Form bestimmter Wellenlängen frei. In der vorliegenden Studie wurden die Fluorochrome Fluoreszinoisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet, die beide von blauem Laser zur Fluoreszenz angeregt werden, aber ein unterschiedliches

Emissionsspektrum haben. Das Streu- und Fluoreszenzlicht wird in getrennten Systemen jeweils zu Photodetektoren geleitet, dort in elektronische Spannungsimpulse umgewandelt und digitalisiert an den Computer übermittelt.

Für die semiquantitative Beurteilung eines spezifischen Antikörpers muss eine ausreichend starke Fluoreszenzintensität vorliegen. Dies wird mit der dimensionslosen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bezeichnet. Sie trifft jedoch nur eine Aussage für die Güte der Messung, nicht aber über die prozentuale Verteilung des Adhäsionsmoleküls auf der Zelle. Für die statistische Auswertung wird die prozentuale Angabe herangezogen.

3.2.8 ELISA zur Bestimmung von MCP-1, s-ICAM-1 und sL-Selektin

Für die Bestimmung von MCP-1 und der löslichen Parameter s-ICAM-1 und sL-Selektin wurde ein enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) angewandt. Hierbei bildet der zu untersuchende Stoff einen Komplex mit spezifischen Antikörpern, die auf einer Mikrotiterplatte aufgebracht sind. Durch Hinzugabe eines zweiten monoklonalen Antikörpers und der Entfernung überschüssiger Antikörper und weiterer Zellen bildet sich ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich-Prinzip). An diesen Komplex wiederum bindet ein Enzym, das durch die Farbreaktion des zuletzt zugegebenen Substrates sichtbar gemacht wird. Die Farbreaktion wird in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge zwischen 405 und 492 nm bestimmt. Sie ist direkt proportional zur Konzentration des nachgewiesenen Stoffes.

Auf spezifisch beschichtete Mikrotiterplatten (je mit MCP-1-Antikörper, sICAM-1 Antikörper und sL-Selektin Antikörper) wurden zuerst je 100 µl Standard Verdünnungspuffer, danach 100 µl Standard, bzw. 100 µl Probe (1:10 verdünnt) gegeben. Nach Zugabe von 50 µl anti-sICAM-1, bzw. anti-sL-Selektin wurden die Platten für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels viermaligem Waschen wurden ungebundene Proben entfernt. Nach Hinzufügen von 100 µl Streptavidin-HRP Arbeitslösung wurde die Platte erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem

Waschvorgang wurden 100 µl Stabilized Chromogen als Farbsubstrat hinzugegeben. Nach erneuten 30 Minuten Inkubation wurde die Reaktion durch Hinzugabe von 100 µl Stopplösung beendet.

Durch eine Absorptionsanalyse von 100 µl Stabilized Chromogen und 100 µl Stopplösung wurde der Leerwert ermittelt.

Die Mikrotiterplatten wurden dann innerhalb von zwei Stunden im ELISA-Reader bei einer Absorption von 450 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden in pg/ml MCP-1, pg/ml s-ICAM-1 und pg/ml sL-Selektin angegeben.

3.2.9 Bestimmung der Konzentration des hs-CRP

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie der Universität des Saarlandes erfolgte die Bestimmung des hs-CRP mittels immunologischem Trübungstest (Immunkomplexnephelometrie), womit eine untere Nachweisgrenze 0,1-0,2 mg/l möglich war.

3.3. Materialien

3.3.1. Medikamente

Telmisartan (Micardis®), Boehringer Ingelheim, Deutschland

Die in der Studie verwendeten Medikamente wurden freundlicherweise von der Firma Böhringer Ingelheim als doppelt verblindete Medikation Verum vs. Placebo zu Verfügung gestellt.

3.3.2 Angiotensin II

3.3.3 Reagenzien

FACS Lysing Solution (BD, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

FACS-Flow (BD)

FACS-Clean (BD)

FACS-RINSE (BD)

CellWASH (BD)
PBS
CD14-FITC (BD)
CD3-PE (BD)
CD3-FITC (BD)
CD11a-PE (Beckmann / Coulter, Krefeld, Deutschland)
CD11a-FITC (Beckmann / Coulter)
CD11b-PE (Beckmann / Coulter)
CD11b-FITC (Beckmann / Coulter)
CD16-PE (BD)
CD31-PE (BD)
CD54-PE (BD)
CD62L-PE (BD)
CD86-PE (BD)
Anti-Mouse-IgG-PE (Sigma Aldrich)
Simul-Test CD45-FITC / CD14-PE (BD / Pharmingen)
Simul-Test CD3-FITC / CD16 + CD56 (BD / Pharmingen)

Assay Diluent (BD)
Lyophilisiertes human Th1/Th2 Zytokin Standard (BD)
Capture-Bead-Reagenzien (BD)
(IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10)
Wasch Puffer (modifiziertes PBS) (BD)
PE-Detektionsreagenz (BD)

MCP-1 ELISA-Kid, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
SICAM-1 ELISA-Kid, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
SL-Selectin ELISA-Kid, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

3.3.4 Geräte

EDTA-Monovetten
VACUTAINER® Blutröhrchen (BD)
Eppendorf Röhrchen 1,5 ml (Eppendorf, Wesselin-Berzdorf, Deutschland)

Zentrifugen: Labofuge 400R, Heraeus, Osterode, Deutschland
Vakuum concentrator 5301, Eppendorf, Deutschland
Megafuge 2.0 R, Heraeus, Osterode, Deutschland

Vortex Mixer

FACSCalibur Flow Cytometry System (BD)

Cellquest software system (BD)

ELISA-Reader (Bio-Rad, München, Deutschland)

3.4 Statistik

Bei der Analyse eines Varianz-Modells können Änderungen der Höhe von Parametern für die Therapie- und Placebo-Gruppe statistisch signifikant dann erfolgen, wenn für jede Gruppe mindestens je 20 prä- und posttherapeutische Werte vorliegen. Die Daten der primären Endpunkte werden als Mittelwert und Standardfehler \pm angegeben. Die Gruppenvergleiche zwischen der Telmisartan- und Placebo-Gruppe erfolgten mittels des Mann-Whitney U-Tests (Wilcoxon Rangsummentest) für die unpaaren Proben und des Wilcoxon Vorzeichenrangtests für die gepaarten Proben. Unterschiede wurden bei einem p-Wert von $< 0,05$ als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

Insgesamt wurden 42 Patienten (21 Patienten Telmisartan, 21 Patienten Placebo) in einem Zeitraum von 27 Monaten (01/02 – 03/04) eingeschlossen. Es bestanden zu Studienbeginn zwischen den zwei Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Alter, Geschlechtsverteilung, BMI kardiovaskulärem Risikoprofil, Bluthochdruck, Herzfrequenz und antihypertensiver Begleitmedikation (siehe Tabelle 5). Alle Patienten konnten bis zum Studienende behandelt werden. Abbrüche wegen schwerwiegender Ereignisse, administrativer Probleme oder Non-Compliance traten nicht auf.

	Placebo- gruppe	Telmisartan -gruppe	p
n	21	21	n.s.
Alter (Jahre)	58.5 ± 11.6	56.4 ± 7.1	n.s.
Mann / Frau (n / n)	17 / 4	17 / 4	n.s.
Body mass index (kg/m ²)	26.9 ± 2.9	27.3 ± 3.6	
Kardiovaskuläre Vorerkrankung			
Hyperlipidämie (n)	18	17	n.s.
Diabetes mellitus (IDDM / NIDDM) (n)	0 / 2	1 / 3	n.s.
Nikotinkonsum (Nie-/ Ex-/ Raucher) (n)	6 / 12 / 3	6 / 13 / 2	n.s.
Koronare Herzerkrankung (Jahre)	2.1 ± 3.1	2.5 ± 3.9	n.s.
Arterielle Hypertonie – Dauer (Jahre)	6.9 ± 5.8	8.4 ± 5.3	n.s.
Hämodynamische Parameter			
Herzfrequenz (bpm) – Ausgangswert	65.1 ± 7.5	66.5 ± 9.5	n.s.
Herzfrequenz (bpm) – 12 Wochen	65.8 ± 6.3	64.8 ± 9.5	n.s.
Systolischer Blutdruck (mmHg) - Ausgangswert	136.5 ± 14.1	140.0 ± 13.2	n.s.
Systolischer Blutdruck (mmHg) – 12 Wochen	133.5 ± 12.3	134.5 ± 15.4	n.s.
Diastolischer Blutdruck (mmHg) - Ausgangswert	81.5 ± 5.3	82.2 ± 4.5	n.s.
Diastolischer Blutdruck (mmHg) – 12 Wochen	79.9 ± 7.7	79.6 ± 7.5	n.s.
Antihypertensive Begleittherapie			
Betablocker	13	13	n.s.
Ca-Antagonisten	3	1	n.s.
Diuretika	5	3	n.s.
Nitrate	1	1	n.s.

Tabelle 5: Patientencharakteristik: Alter, Geschlecht, BMI, kardiovaskuläre Vorerkrankungen, hämodynamische Parameter und antihypertensive Begleittherapie. Die Daten zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Placebo- und der Telmisartan-Gruppe

Die laborchemischen Parameter, absolute Zellzahl und prozentuale zelluläre Expression von Leukozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen, sowie Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Chemokinen und inflammatorischen Proteinen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde zum Teil von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.KG durchgeführt und in die Beurteilung mit einbezogen. In Tabelle 6 werden die einzelnen Parameter bezüglich der Änderung zur Baseline mittels ihres p-Wertes beurteilt. Signifikanz lag bei einem p-Wert < 0,05 vor. Es zeigte sich, dass nur für die

Mac1-Expression auf Lymphozyten und die Plasmakonzentration von IFN- γ Signifikanzniveau erreicht wurde.

Zeitpunkt (Tag)	Placebo-Gruppe		Telmisartan-Gruppe	
	Baseline	12 Wochen	Baseline	12 Wochen
Zellzahl				
NK-Zellen ▶ Prozent der Lymphozyten (%)	12,9 ± 1,5	13,2 ± 2,3	13,7 ± 2,0	16,6 ± 2,2
Adhäsionsmoleküle				
LFA-1-Expression auf Lymphozyten ▶ zelluläre Expression (%)	96,0 ±	96,3 ±	95,1 ±	91,1 ±
LFA-1-Expression auf Monozyten ▶ zelluläre Expression (%)	99,9 ±	100 ±	99,3 ±	100,0 ±
MAC-1-Expression auf Lymphozyten ▶ zelluläre Expression (%)	21,7 ± 2,9	27,4 ± 4,5	28,6 ± 5,5	19,1 ± 2,7
MAC-1-Expression auf Monozyten ▶ zelluläre Expression (%)	100,0 ±	100,0 ±	100,0 ±	100,0 ±
PECAM-1-Expression auf Lymphozyten ▶ zelluläre Expression (%)	40,3 ±	42,1 ±	41,9 ±	40,6 ±
PECAM-1-Expression auf Monozyten ▶ zelluläre Expression (%)	99,8 ±	99,8 ±	99,7 ±	99,9 ±
ICAM-1-Expression auf Lymphozyten ▶ zelluläre Expression (%)	27,2 ±	34,6 ±	31,9 ±	32,2 ±
ICAM-1-Expression auf Monozyten ▶ zelluläre Expression (%)	99,1 ±	99,8 ±	99,1 ±	99,5 ±
s-ICAM-1-Plasmakonzentration ▶ absolute Menge (pg/ml)	14,5 ± 0,2	13,1 ± 0,2	15,5 ± 0,3	13,3 ± 0,2
sL-selectin- Plasmakonzentration ▶ absolute Menge (pg/ml)	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Zytokine, Chemokine, inflammatorische Proteine				
TNF-α-Plasmakonzentration ▶ absolute Menge (pg/ml)	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,4
IFN-γ-Plasmakonzentration ▶ absolute Menge (pg/ml)	27,2 ± 3,4	31,2 ± 3,6	32,0 ± 3,7	24,8 ± 3,3
IL-4-Plasmakonzentration ▶ absolute Menge (pg/ml)	3,5 ± 1,0	5,9 ± 1,6	1,5 ± 0,5	2,7 ± 1,0
IL-6-Plasmakonzentration ▶ absolute Menge (pg/ml)	3,0 ± 0,6	5,1 ± 1,2	3,1 ± 0,5	3,0 ± 0,5
IL-10-Plasmakonzentration ▶ absolute Menge (pg/ml)	1,3 ± 0,4	1,9 ± 0,5	1,0 ± 0,3	1,5 ± 0,4
hs-C-Reactives Protein ▶ absolute Menge (mg/l)	5,0 ± 1,4	4,0 ± 0,7	2,5 ± 0,6	1,4 ± 0,3
MCP-1-Plasmakonzentration ▶ absolute Menge (pg/ml)	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,5	1,4 ± 0,1
Fc-γ-RIII-Expression auf Lymphozyten ▶ zelluläre Expression (%)	3,7 ±	5,1 ±	2,5 ±	4,8 ±

Tabelle 6: Absolute Werte und Standardabweichung der Serummarker zum Ausgangszeitpunkt und nach 12 Wochen

Parameter	P-Wert	
LFA-1-Expression auf Lymphozyten	0,633	n. s.
LFA-1-Expression auf Monozyten	0,362	n. s.
MAC-1-Expression auf Lymphozyten	0,031	signifikant
MAC-1-Expression auf Monozyten	1,000	n. s.
PECAM-1-Expression auf Lymphozyten	0,191	n. s.
PECAM-1-Expression auf Monozyten	0,865	n. s.
ICAM-1-Expression auf Lymphozyten	0,466	n. s.
ICAM-1-Expression auf Monozyten	0,311	n. s.
s-ICAM-1-Plasmakonzentration	0,057	n. s.
sL-selectin- Plasmakonzentration	0,620	n. s.
TNF- α -Plasmakonzentration	0,191	n. s.
IFN- γ -Plasmakonzentration		signifikant
IL-4-Plasmakonzentration		n. s.
IL-6-Plasmakonzentration	0,302	n. s.
IL-10-Plasmakonzentration	0,807	n. s.
hs-C-Reactives Protein	0,646	n. s.
MCP-1-Plasmakonzentration	0,093	n. s.
Fc- γ -RIII-Expression auf Lymphozyten	0,563	n. s.

Tabelle 7: Nichtparametrische Analyse der primären Endpunkte (immunologische Marker) nach dem Wilcoxon Rangsummentest (= Mann-Whitney U-Test) und Wilcoxon Vorzeichenrangtest; P-Wert < 0,05 entspricht Signifikanz

Adhäsionsmoleküle:

Aus der Gruppe der Integrine und Ig-ähnlichen Moleküle lag die Expression von LFA-1 (Placebo: 99,9/100; Telmisartan 99,3/100; $p=0,362$) Mac-1 (100/100; 100/100; $p=1,000$), PCAM-1 (99,8/99,8; 99,7/99,9; $p=0,865$) und ICAM-1 (99,1/99,8; 99,1/99,5; $p=0,311$) auf Monozyten jeweils bei fast hundert Prozent und zeigte in der Änderung zur Baseline keinen signifikanten Unterschied zur Placebo- und Telmisartan-Gruppe. Bei den Lymphozyten war die Expression von LFA-1 (96,0/96,3; 95,1/91,1; $p=0,633$) ebenfalls nahe hundert Prozent, bei Mac-1(21,7/27,4; 28,6/19,1; $p=0,031$), PCAM-1 (40,3/42,1; 41,9/40,6; $p=0,191$) und ICAM-1 (27,2/34,6; 31,9/32,2; $p=0,466$) deutlich niedriger. Nur für Mac-1 war eine signifikante Änderung

zur Baseline festzustellen. Die unterschiedliche Expression passt zu bereits erhobenen Daten (DIB, 2000)

CD11b Expression auf Lymphozyten und Änderung zur Baseline

% CD11b-Expression

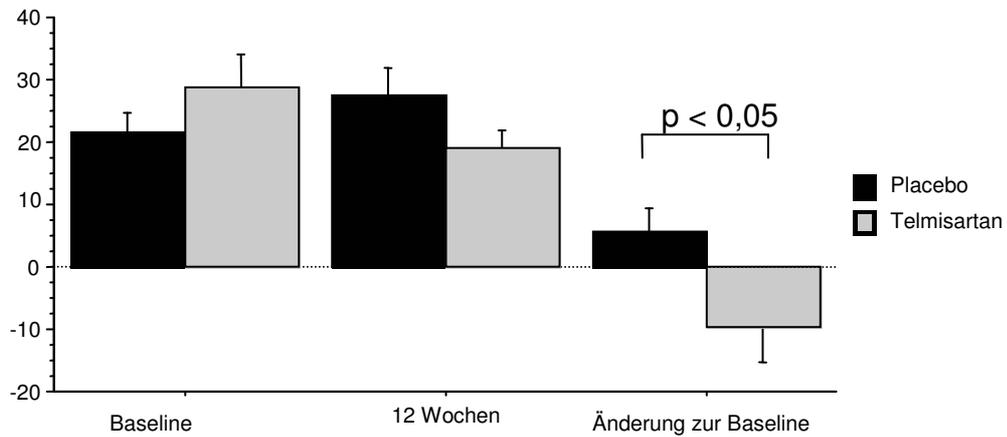


Abb. 3: Mac-1 (CD11b) Expression auf Lymphozyten und Änderung zur Baseline

Bei den löslichen Adhäsionsmolekülen lag aus der Gruppe der Selektine der sL-Selektin Wert (0,9/0,9 ng/ml; 0,8/0,9 ng/ml; $p=0,620$) nach früheren Untersuchungen (INOUE, 1999; PONTHEUX, 2004) im Erwartungsfenster, eine signifikante Änderung zur Baseline lag nicht vor.

sL-Selektin Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

sL-Selektin Plasmakonzentration (pg/ml)

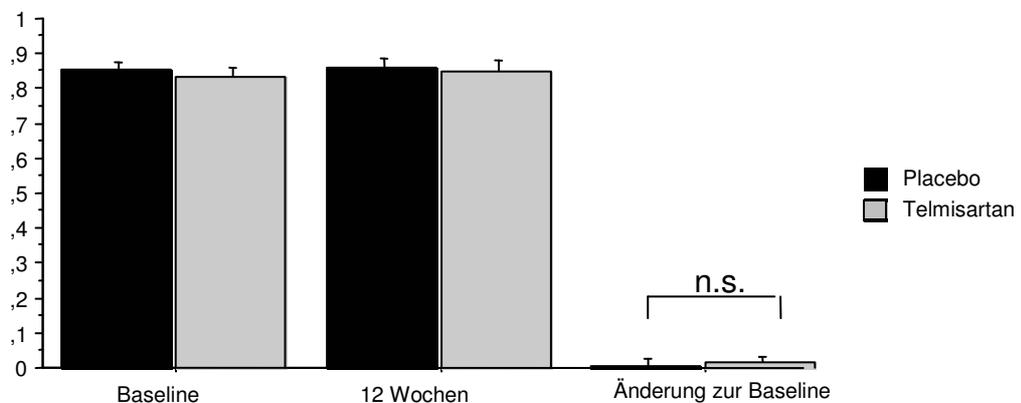


Abb. 4: sL-Selektin Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

Bei der Plasmakonzentration für sICAM (14,5/13,1 pg/ml; 15,5/13,3 pg/ml; $p=0,057$) konnte ein geringer Trend, jedoch noch keine Signifikanz in Bezug auf die Änderung zur Baseline beobachtet werden.

sICAM-1 Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

sICAM-1 Plasmakonzentration (pg/ml)

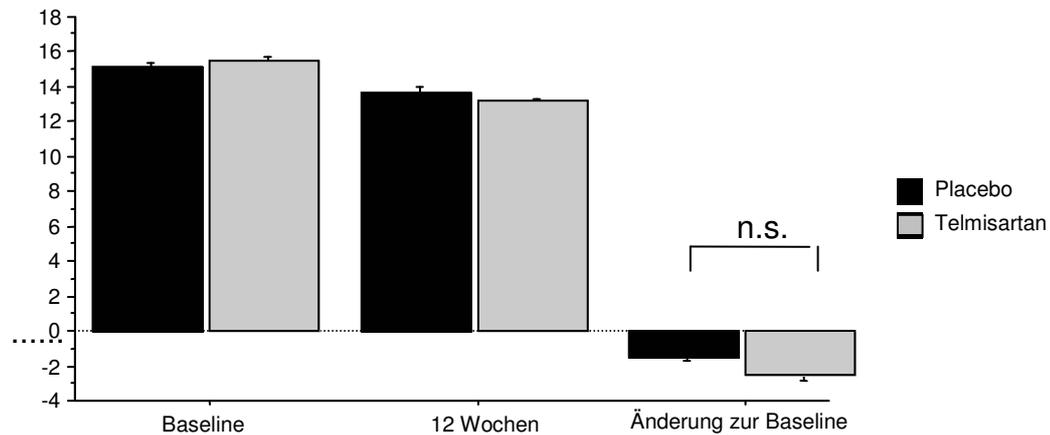


Abb. 5: sICAM-1 Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

Bei den Zytokinen waren die Änderung zur Baseline von TNF- α (1,2/1,7 pg/ml; 1,4/1,1 pg/ml; $p=0,191$), IL-4 (3,5/5,9 pg/ml; 1,5/2,7 pg/ml), IL-6 (3,0/5,1 pg/ml; 3,1/3,0 pg/ml; $p=0,302$) und IL-10 (1,3/1,9 pg/ml; 1,0/1,5 pg/ml; $p=0,807$) nicht signifikant.

TNF- α Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

TNF- α Plasmakonzentration (pg/ml)

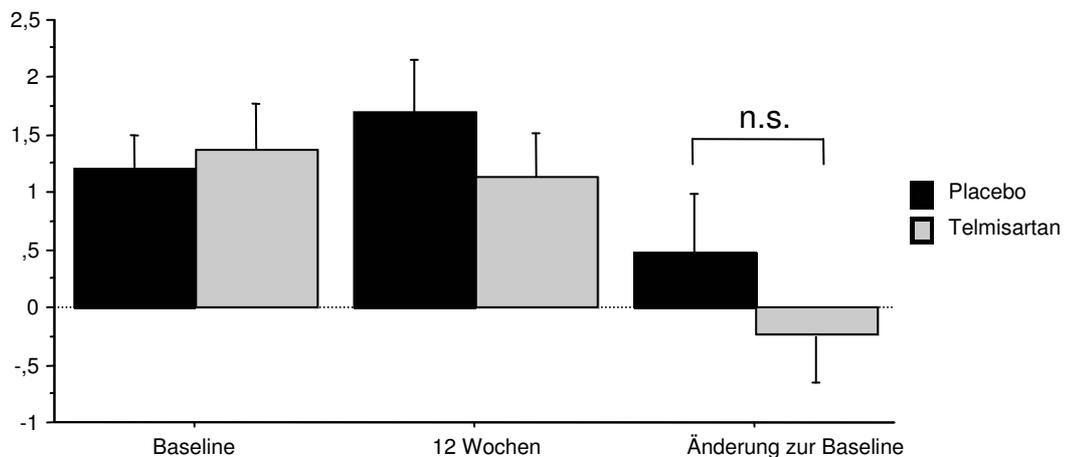


Abb. 6: TNF- α Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

IL-6 Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

IL-6 Plasmakonzentration (pg/ml)

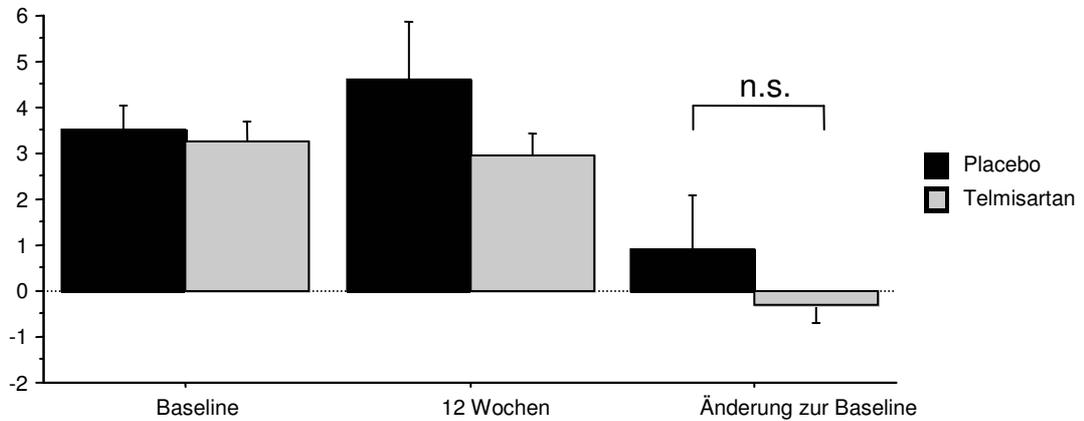


Abb. 7: IL-6 Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

Für IFN- γ (27,2/31,2 pg/ml; 32,0/24,8 pg/ml) zeigt sich eine deutliche Reduktion der Plasmaspiegel unter Therapie mit Telmisartan, entgegen der Placebogruppe mit leichtem Anstieg der Spiegel.

IFN- γ Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

IFN- γ Plasmakonzentration (pg/ml)

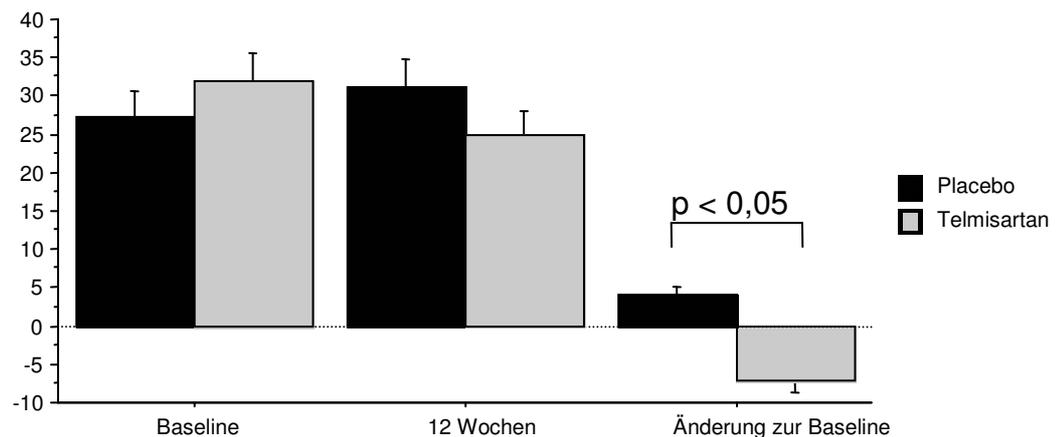


Abb. 8: IFN- γ Plasmakonzentration und Änderung zur Baseline

Bei dem exemplarischen Vertreter der Chemokine konnten bei den Plasmaspiegeln von MCP-1 (1,4/1,4 pg/ml; 1,5/1,4 pg/ml; $p=0,093$), bei den proinflammatorischen Proteinen wie hsCRP (5,0/4,0 mg/l; 2,5/1,4 mg/l;

p=0,646) und bei Fc- γ -RIII (3,7/5,1%; 2,5/4,8%; p=0,563) als Ausdruck zytotoxischer Aktivität keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

5. Diskussion

Wie aus vielfältigen Untersuchungen bereits bekannt, spielen inflammatorische Prozesse bei der Atherosklerose eine wichtige Rolle (LIBBY, 2002; ROSS, 1999). In Verbindung mit der Pathogenese kommt das Renin-Angiotensin-System mit seinen AT₁- und AT₂-Rezeptoren in allen Stadien der Atherosklerose vor. Dies ist für die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und Plaqueinstabilität von entscheidender Bedeutung (NICKENIG AND HARRISON, 2002; LEVY, 2004).

Im Serum lösliche Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Zytokine standen im Blickpunkt vieler Studien (siehe Tabelle 1). In der vorliegenden prospektiven doppelblind plazebokontrollierten Studie sollte durch die Bestimmung solcher löslicher Parameter und zusätzlich zellulär exprimierter Adhäsionsmoleküle die Angiotensin II vermittelte Inflammation anhand der Wirkung des AT₁-Rezeptorblockers Telmisartan (40 mg) im Vergleich zu Placebo auf Patienten mit gesicherter stabiler KHK und milder Hypertonie geprüft werden. Es ist dabei einzuschränken, dass es sich rein um die Bestimmung serologischer Marker handelt und keine funktionellen oder immunhistologischen Untersuchungen erfolgten. Da die inflammatorischen Prozesse sich auf verschiedenen Ebenen abspielen, konnten somit nur partielle Phänomene aufgezeigt werden.

Bei der zellulären Expression von Adhäsionsmolekülen (CD11a, CD11b, CD31 und CD54) auf den untersuchten Monozyten und Lymphozyten konnte bei dem α M/ β 2-Integrin (Mac-1, CD11b) auf Lymphozyten eine statistisch signifikante Änderung zur Baseline nachgewiesen werden. Bei den löslichen Parametern (Adhäsionsmoleküle: sL-Selektin, s-ICAM-1; Zytokine: IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ ; Chemokine: MCP-1; inflammatorische Proteine: hsCRP) zeigte sich in der Telmisartangruppe eine Abnahme der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und INF- γ , wobei IFN- γ mit einer signifikanten Änderung zur Baseline vorlag (p<0,05; n=21). Dies bestätigten

ähnliche in vitro (siehe Tabelle 2: KRANZHOFER, 1999; SUN 2004) und in vivo (siehe Tabelle 3: NAVALKAR, 2001; KOH, 2003; SCHIEFFER, 2004; TREVELYAN, 2004) Ergebnisse. Unterschiede können u. a. auf die Untersuchungsmethode, die Fallzahl, das Patientenkollektiv und die Therapie (Medikament, Dosis) zurückgeführt werden.

Im Rahmen der leukozytären-endothelialen Interaktion spielen Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle. In der Gruppe der Integrine liegen diese in inaktiven Zellen in einer nicht adhäsiven Form vor. Erst durch eine Zellaktivierung kommt es zu einer Strukturänderung der Integrine und damit zu einer erhöhten Adhäsivität (HUGHES, 1998).

Die Angiotensin II vermittelte T-Zell-Aktivierung ist bei bisher noch geringen Kenntnissen Gegenstand aktueller Untersuchungen. Man kann davon ausgehen, dass AT₁-Rezeptoren außer auf den bekannten Geweben auch auf den T-Zellen exprimiert werden (RODRIGUEZ-ITURBE 2001). Aktivierte T-Lymphozyten werden beim Menschen in atheromatösen Veränderungen gefunden und können im Rahmen entzündlicher Prozesse bis zur Ausbildung von Plaques und Plaqueruptur führen (HANSSON 2001; LIBBY 2002). In früheren in vitro Studien und Tiermodellen wurde eine Angiotensin II Stimulation mit vermehrtem Auftreten von Th1 Zellen im peripheren Blut in Verbindung gebracht (FERNANDEZ-CASTELLO, 1987; SHAO, 2003). Aktivierte zirkulierende T-Zellen wurden bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom gefunden (LIUZZO, 2000; CALIGIURI, 2000).

In einem weiteren Tiermodell (mesenteriale postkapilläre Venen von Ratten) konnte bei Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten unter Angiotensin II Stimulation ohne antihypertensiven Effekt eine deutliche Zunahme des Rolling/Tethering, der Adhäsion und der Migration beider Zellreihen festgestellt werden. Dieser Effekt konnte sowohl durch AT₁-, als auch durch AT₂-Rezeptorantagonisten und am effektivsten durch die Gabe beider unterdrückt werden. Es zeigte sich unter Angiotensin II Stimulation jedoch kein signifikanter Anstieg der CD11b/CD18 Expression auf Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten (PIQUERAS, 2000). In einer Folgearbeit lag unter Angiotensin II Stimulation ein ähnliches Ergebnis vor, mit der zusätzlichen Differenzierung, dass bei Arterien überwiegend Monozyten und

Lymphozyten, bei Venen vermehrt polymorphkernige Leukozyten adhären waren. Durch selektive Blockade der β 2-Integrine war aber eine Reduktion der Adhärenz um 83% zu beobachten (ALVAREZ, 2004). Hieraus war zu vermuten, dass Angiotensin II nicht über vermehrte Expression, sondern über die Aktivierung von β 2-Integrinen wirkt.

In der aktuellen Untersuchung stellte sich nun die Frage, ob zum einen die Änderung der Expression von α M/ β 2-Integrin und zum anderen die Aktivierung der Lymphozyten als antiinflammatorische Wirkung von Telmisartan angesehen werden kann.

Als zentraler Faktor für Rolling und Tethering ist bei verminderter Expression α M/ β 2-Integrins aufgrund dessen, unabhängig des Aktivierungszustandes, von einer verminderten Lymphozyteneinwanderung auszugehen. Wie oben erwähnt, muss die Expression jedoch nicht zwingend Angiotensin II abhängig sein (PIQUERAS, 2000; Alvarez, 2004), so dass hier auch ein pleiotroper Effekt des AT1-Rezeptorblockers Telmisartan möglich sein könnte.

Zur Frage der Aktivierung von Lymphozyten soll im weiteren auf die Zytokine eingegangen werden. Im Rahmen des durch vermehrte Expression und Aktivierung der AT1-Rezeptoren vermittelten oxidativen Stresses werden Veränderungen proinflammatorischer Zytokine beschrieben (NICKENIG AND HARISSON 2002). Vaskuläre glatte Muskelzellen und polymorphkernige Leukozyten sind wichtige Expressionsorte für diese Zytokine. Auch auf peripheren Angiotensin II-stimulierten Blut-Monozyten war dosisabhängig eine vermehrte Expression von IL-6, TNF- α und erhöhte Adhäsion an Endothelzellen festgestellt worden (HAHN, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II dosisabhängig über die Aktivierung der Transkription des Nuklearfaktors κ B die IL-6 Ausschüttung steigert (KRANZHÖFER, 1999).

Bei Angiotensin II stimulierten Ratten wurde ein Anstieg des Th1 Zytokin IFN- γ beobachtet, der unter Gabe eines AT1-Rezeptorantagonisten wieder abgefallen war (SHAO 2003). Wie bereits in verschiedenen Studien zu sehen (NAVALKAR, 2001; KOH, 2003; FLISER, 2004; SCHIEFFER, 2004; TREVELYAN, 2004), konnte auch in der vorliegenden Studie in vivo unter

Telmisartan eine Reduktion der proinflammatorischen Zytokine, insbesondere IFN- γ beobachtet werden. Dies kann als Ausdruck einer verminderten Aktivierung der Lymphozyten angesehen werden. Dass im Gegensatz zu anderen Untersuchungen für TNF- α und IL-6 unter Telmisartan nur ein Trend und keine Signifikanz bezüglich der Änderung zur Baseline nachgewiesen werden konnte, kann an der geringen entzündlichen Aktivität des Patientenkollektivs (stabile KHK, milde Hypertonie) liegen. Hierfür sprechen die geringen Ausgangswerte der proinflammatorischen Parameter (hs-CRP, IL-6, TNF- α , IFN- γ).

Da aktivierte T-Lymphozyten in atheromatösen Plaques gefunden werden und für die Unterhaltung der Entzündungsreaktion bis hin zur Plaqueruptur verantwortlich sind (CALIGIURI, 2000; HANSSON, 2001; LIBBY, 2002), kann zusammenfassend nach der vorliegenden Studie postuliert werden, dass der AT1-Rezeptorantagonist Telmisartan diesen Entzündungsprozess durch die Down-Regulation proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IFN- γ als auch durch die verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls α M/ β 2-Integrin (Mac-1, CD11b) reduzieren kann. Es ist zu erwarten, dass durch diesen immunmodulatorischen Effekt weniger T-Lymphozyten in atherosklerotische Plaques einwandern können und es damit zu einer Plaquesstabilisierung führen kann. Die verminderte Expression des α M/ β 2-Integrin könnte auf einen Angiotensin II unabhängigen Mechanismus und damit auf einen möglichen pleiotropen Effekt von Telmisartan zurückgeführt werden. Weitere Untersuchungen diesbezüglich sind geplant.

6. Literaturverzeichnis

1. Alvarez A, Cerda-Nicolas M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panes J, Lobb RR, Sanz Mj (2004) Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 104:402-408
2. Ashmore LM, Shopp GM, Edwards BS (1989) Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods*. 118:209-215
3. Blankenberg S, Barboux S, Tiret L (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170:191-203
4. Blann A, Morris J, McCollum C (1996) Soluble L-selectin in peripheral arterial disease: relationship with soluble E-selectin and soluble P-selectin. *Atherosclerosis* 126:227-231.
5. de Boer OJ, Teeling P, Idu MM, Becker AE, Wal AC (2005) T lymphocytes in atherogenesis-functional aspects and antigenic repertoire. *Cardiovasc Res* 60:78-86
6. McCaffrey TA, Du B, Consigli S, Szabo P, Bray PJ, Hartner L, Weksler BB, Sanborn TA, Bergman G, Bush HL Jr (1997) Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest*. 100:2182-2188
7. Caligiuri G, Paulsson G, Nicoletti A, Maseri A, Hansson GK (2000) Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. *Circulation*. 102:1114-1119
8. Cao C, Lawrence DA, Strickland DK, Zhang L (2005) A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics. *Blood*. 10.1182/blood-2005-03-1288
9. Delves PJ, Roitt IM (2000) The Immune System First of two parts. *N Engl J Med*. 343:37-49.
10. Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 343:108-117.

11. Depre C, Havaux X, Renkin J, Vanoverschelde JL, Wijns W (1999) Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res.* 41:465-472
12. Dib K, Andersson T (2000) β 2 Integrin signaling in leukocytes. *Front. Biosci.* v5: d438-451
13. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K (2003) Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol.* 171:6105-6111
14. Fliser D, Buchholz K, Haller H (2004) Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation. *Circulation.* 110:1103-1107
15. Friedrich MG, Dahlhof B, Sechtem U, Unger T, Knecht M, Dietz R (2003) Reduction (TELMAR) as assessed by magnetic resonance imaging in patients with mild-to-moderate hypertension--a prospective, randomised, double-blind comparison of telmisartan with metoprolol over a period of six months rationale and study design. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 4:234-243
16. de Gasparo M, Catt KJ, Wright JW, Unger T (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 52:415-472
17. Getz GS (2002) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 52:415-472
18. Graninger M, Reiter R, Drucker C, Minar E, Jilma B (2004) Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 44:335-339
19. Hahn AW, Jonas U, Buhler FR, Rensik TJ (1994) Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett.* 347:178-180
20. Hansson GK (2001) Immune Mechanism in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1876-1890
21. Hansson GK (2005) Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 352:1685-1695
22. Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB, Hendricks C, Metha JL (1996) Alterations in circulating intercellular

- adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J.* 132:1-8
23. Hughes PE, Pfaff M (1998) Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol.* 8:359-364
 24. Inoue T, Hoshi K, Yaguchi I, Iwasaki Y, Takayanagi K, Morooka S (1999) Serum levels of circulating adhesion molecules after coronary angioplasty. *Cardiology.* 91:236-242
 25. Islam D, Lindberg AA, Christensson B (1995) Peripheral blood cell preparation influences the level of expression of leukocyte cell surface markers as assessed with quantitative multicolor flow cytometry. *Cytometry.* 22:128-134
 26. Khan BV, Navalkar S, Khan QA, Rahman ST, Parthasasthy S (2001) Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates the vascular oxidative state in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 38:1662-1667
 27. Kakuta H, Sudoh K, Sasamata M, Yamagishi S (2005) Telmisartan has the strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor: comparison with other angiotensin II type 1 receptor blockers. *Int J Clin Pharmacol Res.* 25:41-46
 28. Koh KK, Ahn JY, Han SH, Kim DS, Jin DK, Kim HS, Shin MS., Ahn TH, Choi IS, Shin EK (2003) Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* 42:905-910
 29. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W (1999) Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:1623-1629
 30. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S (1993) Transforming growth factor-beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:770-774
 31. Kurtz TW (2005) Treating the metabolic syndrome: telmisartan as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator. *Acta Diabetol.* 42:S9-16

32. Laurat E, Poirier B, Tupin E, Caligiuri G, Hansson GK, Bariety J, Nicoletti A (2001) In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 104:197-202
33. de Lemos JA, Morrow DA, Sbatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E (2003) Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 107:690-695
34. Levy BI (2004) Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 109:8-13
35. Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 105:1135-1143
36. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 420:868-874
37. Lindmark E, Wallentin L, Siegbahn A (2001) Blood cell activation, coagulation, and inflammation in men and women with coronary artery disease. *Thromb Res*. 103:249-259
38. Link A, Schwerdt H, Hennen B, Bohm M (2004) Polymorphonuclear neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion injury. Influence of coronary intervention? *Z Kardiol*. 93:605-611
39. Link A, Bohm M, Nickenig G (2002) Acute coronary syndrome--better risk stratification by determination of inflammatory parameters? *Med Klin (Munich)*. 97:63-69
40. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM (1997) Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*. 151:671-677
41. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM (2000) Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*. 101:2883-2888
42. Loppnow H, Libby P (1990) Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J Clin Invest*. 85:731-738

43. Luc G, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, Ferrieres J, Bard JM, Elkhailil L, Fruchart JC, Ducimetiere P (2003) Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis*. 170:169-176
44. Lundahl J, Hallden G, Hallgren M, Skold CM, Hed J (1995) Altered expression of CD11b/CD18 and CD62L on human monocytes after cell preparation procedures. *J Immunol Methods*. 180:93-100
45. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD (1999) Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest*. 104:1041-1050
46. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A (1999) Protective Role of Interleukin-10 in Atherosclerosis. *Circ Res*. 85:e17-e24
47. Matheny HE, Deem TL, Cook-Mills JM (2000) Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol*. 164:6550-6559
48. Matsumori A, Furukawa Y, Hashimoto T, Yoshida A, Ono K, Shioi T, Okada M, Iwasaki A, Nishio R, Matsushima K, Sasayama S (1997) Plasma levels of the monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 are elevated in patients with acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 29:419-423
49. Moore KI, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichtenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP (1995) P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*. 128:661-671
50. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 136:2348-57
51. Murakami Y, Kurosaki K, Matsui K, Shimada K, Ikeda U (2003) Serum MCP-1 and VEGF levels are not affected by inhibition of the renin-angiotensin system in patients with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. 17:249-255

52. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr (1994) Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 94:885-891
53. Navalkar S, Parthasarathy S, Santanam N, Khan BV (2001) Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 37:440-4
54. Newton RA, Thiel M, Hogg N (1997) Signaling mechanisms and the activation of leukocyte integrins. *J Leukoc Biol.* 61:422-426
55. Nickenig G, Harrison DG (2002) The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation.* 105:393-396
56. Nickenig G, Harrison DG (2002) The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part II: AT(1) receptor regulation. *Circulation.* 105:530-536
57. Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ (2000) Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation.* 102:2118-2123
58. Ponthieux A, Herbeth B, Droesch S, Haddy N, Lambert D, Visvikis S (2004) Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study. *Atherosclerosis.* 172:299-308
59. Prasad A, Koh KK, Schenke WH, Mincemoyer R, Csako G, Fleischer TA, Brown M, Selvaggi TA, Quyyumi AA (2001) Role of angiotensin II type 1 receptor in the regulation of cellular adhesion molecules in atherosclerosis. *Am Heart J.* 142:248-253
60. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB (2000) Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:645-651
61. Rattazzi M, Puato M, Faggini E, Bertipaglia B, Zambon A, Pauletto P (2003) C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J Hypertens.* 21:1787-1803

62. Renzi P, Ginns LC (1987) Analysis of T cell subsets in normal adults. Comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 98:53-56
63. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MC, Allen J (1998) Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 351:88-92
64. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000) C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 342:836-843
65. Ridker PM, Buring JE, Rifai N (2001) Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*. 103:491-495
66. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL (2004) Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*. 109:6-19
67. Ridker PM (2004) High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. *Am Heart J*. 148:19-26
68. Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, Johnson RJ (2001) Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int*. 59:1626-1640
69. Ross R (1999) Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 340:115-126
70. Schieffer B, Bünte C, Witte J, Hoepfer K, Böger RH, Schwedhelm E, Drexler H (2004) Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 44:362-368
71. Schiller NK, Boisvert WA, Curtiss LK (2002) Inflammation in atherosclerosis: lesion formation in LDL receptor-deficient mice with perforin and Lyst(beige) mutations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22:1341-1346
72. survival in sepsis. *Intensive Care Med*. 28:1613-1618

73. Shao J, Nangaku M, Miyata T, Inagi R, Yamada k; Kurokawa K, Fujiuta T (2003) Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury. *Hypertension*. 42:31-38
74. Sheikine Y, Hansson GK (2004) Chemokines and atherosclerosis. *Ann Med*. 36:98-118
75. Smieja M, Yusuf S, Gnarpe J, Gnarpe H, Yi G, Olsson G, Dzavik V, McQueen M (2001) Inflammatory Markers and Risk of Subsequent Cardiovascular Events in the HOPE Trial. *Circulation (Scientific Session Abstracts)* Publishing ID: 3714
76. Sun Y, Zhang J, Lu L, Bedigian MP, Robinson AD, Weber KT (2004) Tissue angiotensin II in the regulation of inflammatory and fibrogenic components of repair in the rat heart. *J Lab Clin Med* 143:41-51
77. Takeda T, Hoshida S, Nishino M, Tanouchi J, Otsu K, Hori M (2003) Relationship between effects of statins, aspirin and angiotensin II modulators on high-sensitive C-reactive protein levels. *Atherosclerosis*. 169:155-158
78. Trevelyan J, Brull DJ, Needham EW, Montgomery HE, Morris A, Mattu RK (2004) Effect of enalapril and losartan on cytokines in patients with stable angina pectoris awaiting coronary artery bypass grafting and their interaction with polymorphisms in the interleukin-6 gene. *Am J Cardiol*. 94:564-569
79. Uehara K, Nomura M, Ozaki Y, Fujinaga H, Ikefuji H, Kimura M, Chikamori K, Nakaya Y, Ito, S (2003) High-sensitivity C-reactive protein and left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Heart Vessels*. 18:67-74
80. Unger T (1999) Significance of angiotensin type 1 receptor blockade: Why are angiotensin II receptor blockers different? (1999) *Am J Cardiol* 84:9-15
81. Unger T (2003) Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade. *J Hypertension* 21 (suppl 6):S3-S7
82. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK (1994) Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 89:36-44
83. Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Böhm M, Nickenig G (2004) Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial

- dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res.* 94:534-541
84. Weber M (2003) The telmisartan programme of research to show Telmisartan end-organ protection (PROTECTION) programme. *J Hypertens Suppl* 6:S37-46
 85. Whitman SC, Rateri DL, Szilvassy SJ, Yokoyama W, Daugherty A (2004) Depletion of natural killer cell function decreases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1049-1054
 86. Yasunari, K, Maeda K, Watanabe T, Nakamura M, Yoshikawa J, Asada A (2004) Comparative effects of valsartan versus amlodipine on left ventricular mass and reactive oxygen species formation by monocytes in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 43:2116-2123
 87. Yoshida J, Yamamoto K, Mano T, Sakata Y, Nishikawa N, Nishio M, Ohtani T, Miwa T, Hori M, Masuyama T (2004) AT1 receptor blocker added to ACE inhibitor provides benefits at advanced stage of hypertensive diastolic heart failure. *Hypertension.* 43:686-691

7. Dank

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. G. Nickenig und bei meinem Betreuer, Herrn Dr. med. A. Link. Ebenso bedanke ich mich bei meiner Frau und meiner Familie, die mich immer unterstützt und viel Verständnis für mich aufgebracht haben.

8. Lebenslauf

- 1964 Am 29.11.1964 in Zweibrücken geboren
- 1984 Abschluss des Abiturs am Herzog Wolfgang Gymnasium in Zweibrücken
- 1984-86 Zivildienst in einem Altenheim in Zweibrücken
- 1986 Beginn des Medizinstudiums an der Ruprecht-Karl-Universität in Heidelberg (Physikum 1988, 1. Staatsexamen 1989, 2. Staatsexamen 1991, 3. Staatsexamen 1992)
- 1992-95 Tätigkeit als Arzt im Praktikum und anschließend als Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Krankenhaus Bruchsal, Chefarzt Prof. Dr. med. Heinrich
- 1994 10.06.1994 Approbation als Arzt (Regierungspräsidium Stuttgart)
- 1994 Erlangungen des Fachkundenachweises Rettungsdienst
- 1995-2002 Tätigkeit als Assistenzarzt mit regelmäßigen Notarztdiensten in der Inneren Abteilung, Chefarzt Dr. med. Kampschulte, im Sankt Elisabeth Krankenhaus Zweibrücken
- 2002 Am 03.04.2002 Anerkennung der Gebietsbezeichnung "Arzt für Innere Medizin"
- 2002 Zum 01.07.02 Wechsel an die Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik der Universität des Saarlandes, Innere Medizin III; Tätigkeit auf der internistischen Intensivstation, danach einjährige Tätigkeit auf der kardiologischen Station
- 2003 Beginn einer Dissertationsarbeit bei Prof. Nickenig unter Betreuung von OA Dr. Link
- 2005 Am 01.01.2005 Wechsel in die Pneumologie der Universitätsklinik Homburg zu Prof. G. W. Sybrecht, Tätigkeit dort bis zum 30.04.2006
- 2006 Seit 01.05.2006 Weiterbildungsstelle zur Gebietsbezeichnung Pneumologie bei PD Dr. med. Schäfer im Klinikum Saarbrücken