

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Klinik für Nephrologie

(Direktor: Prof. Dr. Uwe Heemann)

Einfluss von Statinen auf die Gefäßfunktion bei diätinduzierter Adipositas

Jeanne-Natalie Klingberg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Marcus Baumann

2. Prof. Dr. Dr. h.c. Uwe Heemann

Die Dissertation wurde am 20.02.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 03.01.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.	4
1. Einleitung.	5
1.1 Adipositas und arterieller Hypertonus	6
1.2 Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur.	8
1.3 RhoA und Rho-assoziierte Kinasen (ROCK)	9
1.4 Rho-Kinase Inhibitoren.	12
1.5 Fragestellung	14
2. Material.	15
2.1 Chemikalien und Geräte.	15
2.2 Medikamente.	15
2.3 Stammlösungen und Puffer	16
2.4 Medien für die Zellkultur	16
2.5 Puffer für die Messungen	16
2.6 Stammlösungen für die Messung der Gefäßfunktion.	17
2.7 Verdünnungsreihen.	17
2.8 Versuchstiere	17
2.9 Spezielle Software	18
3. Methoden.	18
3.1 Behandlung der Versuchstiere.	18
3.2 Das Aortenringmodel	18
3.2.1 Myograph.	18
3.2.2 Präparation der Aortenringe	18
3.2.3 Kurzzeitinkubation von Gefäßringen	19
3.2.4 Langzeitinkubation von Gefäßringen	19
3.2.5 Methode	20
3.2.6 Versuchsprotokoll	21
3.3 Zellbiologische Methoden	22
3.3.1 Isolation glatter Muskelzellen.	22
3.3.2 Zellkultur	22
3.3.3 Behandlung mit Pravastatin	23

3.4	Biochemische Methoden.....	24
3.4.1	Proteinisolation aus Zellgewebe.....	24
3.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	24
3.4.3	ROCK-Assay.....	24
3.5	Statistik.....	25
4.	Ergebnisse.....	26
4.1	Gewichtszunahme.....	26
4.2	Veränderung des Blutdrucks.....	27
4.3	Gefäßkontraktilität der Aorta.....	28
4.4	ROCK-Aktivität.....	36
5.	Diskussion.....	37
5.1	Diskussion der Methodik.....	38
5.2	Gewichtszunahme.....	38
5.3	Veränderung des Blutdrucks.....	39
5.4	Gefäßkontraktion und ROCK.....	41
6.	Zusammenfassung.....	46
7.	Anhang.....	48
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	48
7.2	Tabellenverzeichnis.....	48
8.	Literaturverzeichnis.....	49
9.	Veröffentlichung auf Tagungen und Kongressen.....	53
10.	Danksagung.....	54

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
dd	doppelt destiliert
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	Fetal bovine serum
FPP	Farnesylpyrophosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GTP	Guanosintri-phosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
KPSS	K+ in physiologischer Kochsalzlösung
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MBS	Myosinbinding Subunit
MLCK	Myosinleichtketten Kinase
MLCP	Myosinleichtketten Phosphatase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NA	Noradrenalin
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
PBS	Phosphate buffered saline
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
WOSCOP	West of Scotland Coronary Prevention Study
4S	Scandinavian Simvastatin Survival Study

1. Einleitung

Übergewicht (Präadipositas) und Adipositas (ab einem BMI von 30kg/m^2) sind ein großes Problem der heutigen Gesellschaft und werden auch zukünftig eine wichtige Rolle in der gesundheitlichen Entwicklung unserer Gesellschaft spielen. Die WHO spricht bereits von einer Übergewichtskrise. 2010 waren laut WHO in Deutschland 44% der Frauen und 62% der Männer übergewichtig ($\text{BMI} > 25\text{kg/m}^2$), über 15% der Menschen sogar fettleibig ($\text{BMI} > 30\text{kg/m}^2$). In den USA sind laut einer Studie der American Heart Association (2009) zwei Drittel aller Menschen übergewichtig, ein Drittel ist fettleibig.

Übergewicht entsteht durch eine erhöhte Energiezufuhr bei einem verringerten Energiebedarf. Überschüssige Energie wird dann als Fett im Körper eingelagert. Ein Zusammenspiel aus genetischen Faktoren, körperlicher Aktivität, Essgewohnheit, psychischen Faktoren und Umweltbedingungen beeinflusst das Körpergewicht eines jeden Einzelnen. Auch Folgen einer Erkrankung oder Medikamente können Einfluss nehmen. In der heutigen Gesellschaft spielen vor allem die modernen Umweltfaktoren Stress, Zeitmangel und Bürojob, sowie der Trend des Fastfoods eine entscheidende Rolle. Studien der letzten Jahrzehnte beobachteten einen Zuwachs der kardiovaskulären, metabolischen und muskuloskeletalen Erkrankungen, sowie eine steigende Inzidenz von Tumorerkrankungen. Vor allem Tumorerkrankungen und kardiovaskuläre Erkrankungen führen zu einer erhöhten Mortalität der Betroffenen. Neben den gesundheitlichen Folgen für die Betroffenen spielt auch die volkswirtschaftliche Bedeutung eine große Rolle. In Deutschland entfallen mindestens 10% der Behandlungskosten auf die Folgekrankheiten von Übergewicht. In den USA lagen die Behandlungskosten für Übergewicht und damit assoziierte Erkrankungen allein 2008 bei 148 Milliarden Dollar.

Nach neuesten Studien sind allein 75% der Inzidenz für Bluthochdruck auch direkt auf Übergewicht zurückzuführen.

Deshalb sind Konzepte zur Prävention des Adipositas assoziiertem Bluthochdruck notwendig.

Firstline Therapie des arteriellen Hypertonus sind Lifestyleänderungen mit Gewichtsreduktion und Umstellung von Ernährungsgewohnheiten und Lebensstil. Dies führt bei Übergewicht meist schon zur Blutdrucksenkung. Ein Körpergewicht mit einem $\text{BMI} < 25\text{kg/m}^2$ gilt als effektiv in der Primärprävention. Zusätzlich wäre die medikamentöse Unterstützung eine weitere Maßnahme.

Hier setzt auch die Forschung zu Statinen und ihrem Nutzen in der Adipositas Therapie und Prävention an und konzentriert sich dabei vornehmlich auf den Cholesterin unabhängigen

Effekt von Statinen auf die glatte Gefäßmuskulatur. Denn es gibt noch kein konkretes Medikament zur Senkung des Blutdrucks bei Adipositas.

In dieser Arbeit sollen die Zusammenhänge von Übergewicht, arteriellem Hypertonus und Gefäßkontraktilität erläutert werden. Lässt sich innerhalb eines kurzen Zeitraums bereits die Gefäßkontraktilität durch Pravastatin beeinflussen?

1.1 Adipositas und arterieller Hypertonus

Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung von arteriellem Hypertonus ist Adipositas, wie sich erstmalig klar in der Framingham- Heart Studie (Gordon et al.) 1960 zeigte. Internationale epidemiologische Studien stimmen darin überein, dass die altersbezogene Prävalenz von arterieller Hypertonie eng mit dem BMI korreliert. Schon bei Jugendlichen ist ein enger Zusammenhang von Adipositas und Bluthochdruck erkennbar. Eine Bauchumfangszunahme von 4,5 cm bei Männern und 2,5 cm bei Frauen geht mit einem systolischen Blutdruckanstieg von 1 mmHg einher (NHANES- Studie, Guo 2016). Dabei eignet sich vor allem das viszerale oder retroperitoneale Fett besser als Prädiktor, als der BMI (subkutanes Fett, Tchernof 2013). Als weiterer kardiovaskulärer Risikofaktor kommt es im weiteren Verlauf oft zur Entwicklung eines metabolischen Syndroms, ab einem BMI > 30kg/m² beträgt das Risiko 60% (Slany 2008). Durch die steigende Inzidenz von Übergewicht bereits bei Kindern im Vorschulalter wird eine Zunahme von Herzkreislauferkrankungen und auch Malignomen befürchtet (Calle 2013).

Die zugrunde liegenden Pathomechanismen des Adipositas assoziierten Hypertonus sind komplex und noch nicht komplett geklärt. In einem Punkt stimmen die meisten Studien überein: eine Schlüsselrolle nimmt die Aktivierung des Sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron- Systems ein. Eine hohe Zufuhr fettreicher und kohlenhydratreicher Nährstoffe steigert den Umsatz von Noradrenalin im peripheren Gewebe und geht einher mit einer erhöhten Noradrenalin-Plasmakonzentration und einer überschießenden Noradrenalin-Ausschüttung durch einfache Stimulation, wie zum Beispiel der Wechsel in eine aufrechte Körperposition. Bei Hypercholesterinämie lässt sich eine Überexpression von Angiotensin 1-Rezeptoren nachweisen.

Zusätzlich dazu erhöht eine Hypercholesterinämie die kontraktile Antwort und Sensitivität gegenüber Vasokonstriktoren an isolierten großen Arterien, wie experimentelle Studien zeigen (Fronhoffs 1999, O'Rourke 1998, Merkel 1990). Eine abnorme Verteilung von freien

Fettsäuren verstärkt die vaskuläre Sensibilität der α 1-Adrenorezeptoren (Stepniakowski 1995) und hemmt die Funktion der Natrium/Kalium-ATPase (Oishi 1990) was zu einer Erhöhung des Vasotonus führt. Die pharmakologische Blockierung von α 1- und β -Adrenorezeptoren senkt den durch hochkalorische Diät (High fat diet HFD) hervorgerufenen erhöhten Blutdruck im Tiermodell (Hall et al. 2001, Antic 2000). Zudem kommt es zu einer direkten Interaktion von Freien Fettsäuren an Ionenkanälen der Zellmembran von glatten Gefäßmuskelzellen (Ordway 1991). Arterielle Barorezeptoren der großen Gefäße reagieren auf den erhöhten Blutdruck und inhibieren unter physiologischen Umständen die Sympathikusaktivität. Mit Zunahme der Gefäßsteifigkeit oder bei abdominaler Adipositas reduziert sich ihre Sensitivität bis zur Dysfunktion, was eine mangelnde Inhibition des Sympathischen Nervensystems zur Folge hat (Grassi 2004).

Mechanische Faktoren wie die zunehmende Kompression der Organe und Gefäße durch viszerales Fettgewebe bedingen die zunehmende Gefäßspannung durch Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur, um den systemischen Blutfluss entgegen des extravasalen Widerstandes aufrecht zu erhalten.

Eine zunehmende Sekretion von Leptin, welches auch von Adipozyten vermehrt synthetisiert wird (Wynne 1998, Hall 2001), wirkt ebenfalls aktivierend auf das Sympathische Nervensystem und bietet einen weiteren Anknüpfungspunkt zwischen Adipositas und arteriellem Hypertonus.

Mit zunehmender Dauer entstehen Endorganschäden und die Adipositas assoziierte arterielle Hypertonie ist nur noch schwer kontrollierbar. Die Folge sind der Bedarf von mehreren Antihypertonika in Kombination plus eine Behandlung der Risikofaktoren wie Dyslipidämie, Insulin Resistenz, Diabetes sowie systemische und vaskuläre Entzündung.

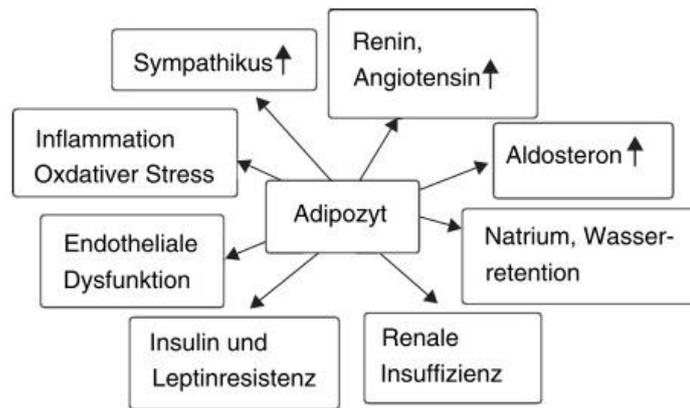


Abb. 1 Pathomechanismen der Hochdruckentstehung bei Übergewicht (Slany 2008)

1.2 Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur

Der arterielle Blutdruck gewährleistet die Versorgung des Körpers mit lebenswichtigen Nährstoffen und Sauerstoff. Entsprechend des Bedarfs der einzelnen Organe wird über den arteriellen Gefäßdurchmesser der lokale Blutfluss reguliert. Entscheidend ist dabei der Tonus der glatten Muskelzellen in der Media der Gefäßwand. Durch Kontraktion oder Relaxation der glatten Muskelzellen passt sich der arterielle Gefäßdurchmesser an. Herzminutenvolumen und Nierenfunktion spielen zudem eine wichtige Rolle. Neuronale (Noradrenalin) und endotheliale Mediatoren (Nitritoxid, Endothelin-1, Thromboxan A₂), neurohumorale Mechanismen (Angiotensin II, Adrenalin) und der Depolarisationsgrad der glatten Muskelzellen (Membrandepolarisation durch Dehnung aktiviert spannungsabhängige L-Typ Kalzium-Ionkanäle) beeinflussen lokal den Gefäßtonus. Tonuserhöhend sind diese Einflüsse, wenn sie direkt oder indirekt zu einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration $>10^{-6}$ mol/l führen. Das Kalzium strömt vor allem von extrazellulär in die Zelle ein, ein kleiner Teil stammt aus den intrazellulären Speichern. Das Kalzium bindet an Calmodulin und aktiviert die Myosinleichtkettenkinase (MLCK). Diese phosphoryliert die 20kDa Myosinleichtkette, die glatte Muskelzelle kontrahiert. Eine Dephosphorylierung durch eine Kalzium-unabhängige Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP) relaxiert die glatte Muskelzelle. Unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration gibt es einen zweiten Regulationsmechanismus des Muskeltonus. Dieser wird über die GTPase RhoA und die nachgeschaltete Kinase gesteuert.

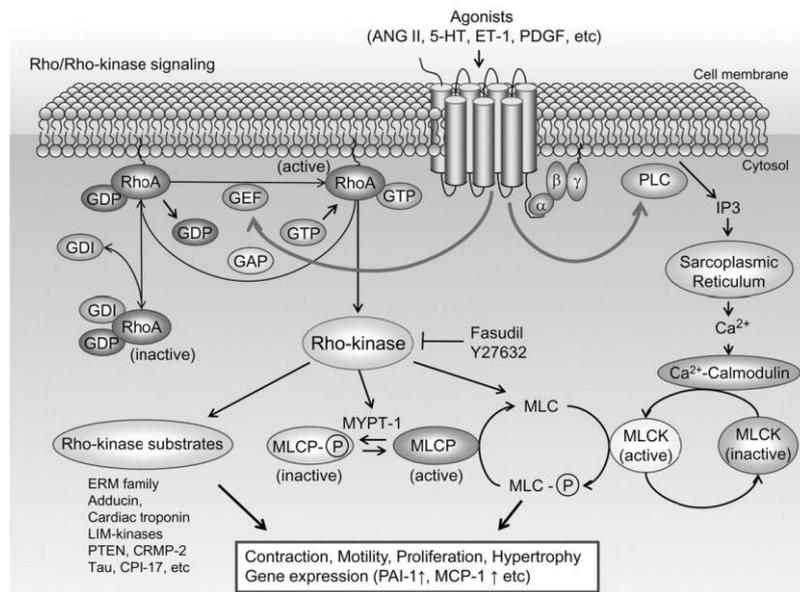


Abb. 2 Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur, direkt über die Depolarisation der Zellmembran oder RhoA vermittelt und unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration (Sato 2011).

1.3 RhoA und Rho-assoziierte Kinasen (ROCK)

RhoA gehört zur Familie der Ras homologen Genfamilie, eine Gruppe kleiner GTP-bindender Proteine, zu der auch Ras und Cdc42 gehören. Als molekularer Schalter steuern sie den Aufbau und die Organisation des Zytoskeletts und die Genexpression. Wachstumsfaktoren, Integrine, Zytokine und Hormone wie Bradykinin aktivieren Rho. Essentiell für die Aktivierung von Rho ist eine posttranslationale Modifikation mit Geranylgeraniol, ein Zwischenprodukt der Cholesterin Biosynthese, welches die Translokation und Bindung des inaktiven Rho an die Zellmembran ermöglicht. In glatten Gefäßmuskelzellen reguliert RhoA (Member A) direkt oder über die Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK) eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie die Kontraktion glatter Muskelzellen, Organisation des Aktin-Zytoskeletts, Zell-Zell-Interaktion und Zellmigration, Proliferation, Apoptose und Genexpression. ROCK wird eine Schlüsselrolle in der Pathogenese vieler kardiovaskulärer Krankheiten zugeschrieben. Studien beweisen eine erhöhte ROCK Aktivität bei Endothelialer Dysfunktion, vaskulären Entzündungsprozessen und in der Regulation des Gefäßtonus.

Die Rho-assoziierte Proteinkinase bildet eine eigene Gruppe in der Familie der AGC-Kinasen. Bekannt sind zwei Isoformen: ROCK 1 (ROK β / p160ROK) mRNA wird hauptsächlich in Lunge, Leber, Milz, Niere und Testis exprimiert, ROCK 2 (ROK α) mRNA besonders reichlich im Gehirn und Herz (Morgan-Fisher et al 2013, Nakagawa 1996). Beide Isoformen gleichen sich zu 65% in ihrer Aminosäuresequenz und besitzen zu 92% die gleiche Kinasedomäne. ROCK1 und ROCK2 werden ab der Embryonalperiode bis ins Erwachsenenalter ubiquitär exprimiert (Nakagawa 1996). Die Kinaseaktivität beider Isoformen wird über RhoA reguliert, ROCK1 wird zusätzlich noch über RhoE gesteuert. Es gibt funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Isoformen. Beide Kinasen beteiligen sich an gleichen wie auch unterschiedlichen Signalkaskaden. Mit Hilfe von ROCK1 und ROCK2 defizienten Mäusen werden die funktionellen Unterschiede der beiden Isoformen untersucht. So stellte sich an ROCK 1 defizienten Mäusen heraus, dass die regulatorische Untereinheit der Myosin Phosphatase nur an ROCK 2 bindet und diese somit hauptsächlich an der Kontraktion der glatten Muskelzellen beteiligt ist (Wang et al. 2009).

Mittels Immunolokalisation und Zellfraktionierung lässt sich eine Verteilung von ROCK 2 in inaktiver GDP gebundener Form im Zytoplasma nachweisen (Leung T. 1995, Matsui 1996). Durch die Bindung von GTP wird die aktivierte Form an die Zellmembran gebunden. Im Gegensatz dazu ist über die Verteilung von ROCK 1 wenig bekannt, berichtet wird von einer zytoplasmatischen Lokalisation verknüpft mit Zell-Zell Kontakten, Zentromeren, der Zellmembran oder Vesikeln (Chevrier 2002).

ROCK steuert die Kontraktion der glatten Muskelzellen über einen dualen Regulationsmechanismus. Ersterer aktiviert die Myosinleichtkette direkt über eine Phosphorylierung (Kureishi et al., 1997). Zweiterer hemmt die Deaktivierung der Myosinleichtkette durch eine inaktivierende Phosphatgruppe am Myosin-binding Subunit (MBS) der Myosinleichtketten Phosphatase. Der Phosphorylierung des MBS kommt aktuell das größte wissenschaftliche Interesse aller ROCK Funktion zuteil (Kimura 1996; Somlyo and Somlyo, 2003; Loirand 2006). Über Alpha1-Adrenorezeptoren wird ROCK aktiviert und löst eine Kontraktion der glatten Muskelzellen unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration aus. Dieser Vorgang wird als Kalzium Sensibilisierung beschrieben und resultiert in einem erhöhten vasopressorischen Effekt von Noradrenalin und Angiotensin II (Dong 2009). Bei normotensiven Zuständen wird der basale Gefäßtonus über den Rho/ROCK-Signalweg durch eine erhöhte Sensibilität gegenüber Kalzium aufrechterhalten (Uehata et al. 1997, Jarajapu 2004). Die Studie von Kureishi et al. (1997) beschrieb erstmals

den direkten Einfluss der Rho-Kinase auf die Gefäßkontraktilität der glatten Muskulatur unabhängig vom Kalzium-Calmodulin abhängigen Signalweg.

Eine erhöhte ROCK Aktivität verstärkt die Phosphorylierung der Myosinphosphatase und Myosinleichtketten und resultiert in einer dauerhaften Vasokonstriktion der glatten Gefäßmuskelzellen ohne erhöhtes intrazelluläres Kalzium (Somlyo et al. 2003). Dies ist eines der Kennzeichen von arteriellem Hypertonus und anderer Kardiovaskulärer Erkrankungen.

Der Prozess der Gefäßdilatation ist zum größten Teil endothelial gesteuert. Hier sei nur am Rande ein weiterer Rho/ROCK-gekoppelter Signalweg erwähnt, bei dem die Rho-Kinase die endotheliale Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) auf molekularer Ebene inhibiert und so die NO-vermittelte Vasodilatation hemmt.

Eine Störung der Aktivität der glatten Muskelzellen wird als ursächlich für kardiovaskuläre Erkrankungen wie arterielle und pulmonale Hypertonie, Angina Pectoris, Herzinsuffizienz und ischämischen Apoplex angesehen und bietet vielen Studien einen Ansatzpunkt für die pharmakologische Behandlung. Uehata et al brachten 1997 erstmalig die RhoA-assoziierte Kinase in Zusammenhang mit arteriellem Hypertonus, Mukai et al. (2001) bestätigten die Schlüsselrolle des Rho/ROCK-Signalwegs und eine Hochregulation von ROCK bei arteriellem Hypertonus.

Mittlerweile wird eine Hyperkonstriktion der glatten Gefäßmuskelzellen, ausgelöst durch eine Überaktivität der Rho-Kinase, als Auslöser für die essentielle Hypertonie verantwortlich gemacht.

Studien gehen soweit, dass sie den prognostischen Wert der ROCK-Aktivität bezüglich kardiovaskulärer Ereignisse untersuchen (Kajikawa 2014). Daten zeigen exemplarisch, dass eine Korrelation zwischen leukozytärer und vaskulärer ROCK-Aktivität besteht. Die ROCK-Aktivität aus Leukozyten korreliert mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonus, Dyslipidämie, Diabetes, Alter, Nikotinabusus und Übergewicht.

Patienten mit einer höheren Aktivität zeigten dabei eine verstärkte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.

Die ROCK-Aktivität aus Leukozyten könnte also ein neuer Biomarker für kardiovaskuläre Ereignisse sein. Somit wäre eine Inhibition der Rho-assoziierten Kinase ein therapeutischer Ansatz zur Prävention. Leider lässt sich anhand der Aktivität noch keine Aussage bezüglich der Prognose machen.

1.4 Rho-Kinase Inhibitoren

Es gibt direkte Rho-Kinase Inhibitoren wie Fasudil und Y-27632 und indirekte Inhibitoren wie die Gruppe der Statine.

Die Wirkung von Statinen beruht auf der kompetitiven Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, welche die hepatische Biosynthese von Cholesterin und dessen Zwischenprodukten vermindert. Durch einen relativen Cholesterinmangel steigt die LDL-Rezeptor Dichte im Organismus und durch intrazelluläre Aufnahme mittels Endozytose wird zirkulierendes LDL aus dem Blut beseitigt.

Als Primär- und Sekundärprävention hat sich der klinische Nutzen von Statinen zur Lipidsenkung etabliert. Internationale große Studien wie West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOP, 1995), Scandinavian Simvastatin Survival Study (SSSS, 1990) oder Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPIDS, 1998) dokumentieren einen positiven Effekt auf kardiovaskuläre Ereignisse bei Risikopatienten, mit einer durchschnittlichen Risikoreduktion von 30% für Herzinfarkte und kardiovaskulär bedingte Todesfälle im Vergleich zur Placebogruppe. Auch zehn bis zwanzig Jahre nach Studienende profitieren die Patienten weiterhin von der Statinbehandlung (Hague et al. 2016).

Neben der Cholesterin senkenden Wirkung finden sich lipidunabhängige Effekte wie die Stabilisation arteriosklerotischer Plaques, die Verbesserung der endothelialen Funktion, Senkung von pulmonalem und arteriellem Hypertonus und die Hemmung der Intimaproliferation, die zu Restenosen nach arteriellem Bypass führt (Kassan 2013). Ein großer Teil der pleiotropen Wirkung entsteht durch die Hemmung von RhoA (Igel 2004). Durch eine verminderte Synthese der Cholesterinzwischenprodukte fehlen die Isoprenylderivate Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP) (Goldstein 1990). Eine fehlende Isoprenylation von RhoA verhindert die Zellmembranbindung und hemmt dadurch die Aktivierung von RhoA durch GTP.

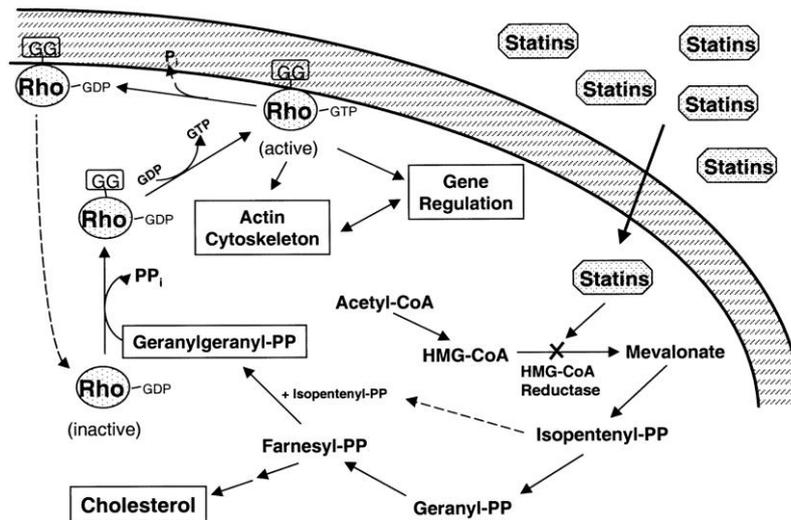


Abb. 3 Inhibition von Rho durch Statine (Laufs et al 2000)

Über mehrere Mechanismen greifen Statine in die Regulation des arteriellen Blutdrucks ein. In experimentellen Studien verbessern Statine die Endothelfunktion durch eine Reduktion von oxidativem Stress (Wassmann 2001) und einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von endotheliale Stickstoffmonoxid durch eine Hochregulation der Stickstoffmonoxid-Synthese (eNOS) Aktivität und Expression von eNOS-mRNA (Laufs 2000), reduzieren die Freisetzung von Endothelin-1 (Hernandez et al. 1998) und verringern die Expression von AngiotensinII-Rezeptoren (Nickenig 1999). Zusätzlich reduzieren Statine signifikant die arterielle Gefäßsteifigkeit (Shige 2001) und verbessern die arterielle Elastizität (Saliashvili 2004).

Statine unterscheiden sich untereinander in ihrer Lipophilie, Halbwertszeit und Potenz der LDL-Senkung. Lipophile Statine wie Simvastatin und Fluvastatin diffundieren in die Zellen, während hydrophile Statine wie Pravastatin oder Rosuvastatin über spezielle Transporter in die Zelle gelangen. Der Vorteil von Pravastatin ist, dass es im Gegenteil zu den lipophilen Statinen nicht ins Fettgewebe aufgenommen und dort gespeichert wird. Außerdem erhöht Pravastatin im Vergleich zu Rosuvastatin die Insulin Sensitivität und den Adiponectinspiegel, welcher wiederum das Risiko für Diabete mellitus senkt und gefäßprotektiv wirkt (Koh et al. 2013).

Mehrere klinischen Studien (Shepherd et al. 1995, Yamagashi 2006, Güçlü 2004, Araki et al. 2008) kommen zu dem Ergebnis, dass Pravastatin einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung von Adipositas und den damit assoziierten Erkrankungen hat. Im Mausmodell

verbesserte Pravastatin die Insulinsensitivität im Rahmen eines metabolischen Syndroms (Araki et al. 2008).

Fasudil (HA-1077), der einzige zugelassene Rho-Kinase Inhibitor, wird in Japan (seit 1997) und China zur Prävention und Behandlung von zerebralen Vasospasmen insbesondere nach Subarachnoidalblutungen eingesetzt. Fasudil inhibiert die ATP-abhängige Kinase Domäne von ROCK. Nach neuesten Erkenntnissen ist Fasudil auch in der Alzheimertherapie wirkungsvoll (Song et al. 2013) und bei pulmonalem Hypertonus (Fukumoto et al. 2005). Ein neuer Rho-Kinase Inhibitor, 2013 von Oh et al. publiziert, DW 1865, inhibiert die Kinase Aktivität von ROCK 1 und ROCK 2 in vitro mit einer 10 fach stärkeren Potenz als Fasudil. In vivo zeigte sich im Rattenmodel sogar eine antihypertensive Wirkung. Uehata et al. demonstrierten als erste die Rolle der Rho Kinase in der Pathophysiologie des arteriellen Hypertonus. Y-27623 senkt den Blutdruck spontan in hypertonen, nicht aber in normotonen Ratten.

Der Rho/ROCK-Signalweg erfreut sich großen Interesses, da seine abnormale Aktivierung in vielen verschiedenen Erkrankungen eine scheinbar wichtige Rolle spielt. Angefangen von kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertonie, koronaren Vasospasmen, Arteriosklerose, bis zur Tumorinvasion und Metastasierung ermöglicht die Inhibition des Rho/ROCK-Signalweges neue therapeutischer Angriffspunkte.

1.5 Fragestellung

Nach dem positive Effekte von Pravastatin auf die Entwicklung von Übergewicht und Diabetes im Adipositasmodel beobachtet wurden, stellt sich die Frage, ob sich diese positiven Effekte von Pravastatin auch in Bezug auf die Gefäßfunktion beobachten lassen.

1. Beeinflusst Pravastatin die Gefäßfunktion bei diätinduzierter Adipositas?
2. Nach welcher Behandlungsdauer ist Pravastatin effektiv wirkungsvoll?
3. Gibt es einen Unterschied in der Reaktion auf verschiedene Vasokonstriktoren wie Noradrenalin oder Kaliumchlorid (KPSS)?
4. Lassen sich andere positive Effekt beobachten?

2. Material

2.1 Chemikalien und Geräte

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Chemikalien stammten von folgenden Herstellern: Biochromchrom (Berlin), Sigma-Aldrich (Steinheim), Gibco (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Apotheke Klinikum rechts der Isar (München), Carl Roth (Karlsruhe), Baxter (Unterschleißheim), Braun (Melsungen), Pierce (Thermo Fisher Scientific) (Schwerte), Ssniff (Soest).

Für die durchgeführten Laborarbeiten fanden folgende Geräte Anwendung:

Brutschrank	Heraeus, Osterode
Mikroskop, Leica MZ 16; Olympus BX 20	Leica, Wetzlar, Olympus Hamburg
pH-Meter	Sartorius, Göttingen
Photometer, Multiscan FC	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Tissuelyser, TissueLyser	Quiagen, Hilden
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad mit Thermostat, SW 21	Julabo, Seelbach
Wire-Myograph, Model 410 A	Danish Myograph Technology, Aarhus Dänemark
Zentrifugen, Biofuge/Multifuge 3 L-R	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.2 Medikamente

Für die Statinbehandlung der Tiere wurden Pravastatin Tabletten 200 mg der Firma Hexal zermörsert und in Trinkwasser gelöst. Die ex vivo Inkubation erfolgte mit Pravastatin Natriumhydrat von Sigma Aldrich.

2.3 Stammlösungen und Puffer

10 x PBS: 80g NaCl
(pH 7,4) 2g KCl
14,4g Na₂HPO₄ 2 H₂O, dd H₂O ad 1l

RIPA-Puffer 50 mM Tris
(pH 7,4) 150 mM NaCl
1 mM EDTA
1% (w/v) NP-40
0.25 % (w/v) Na-Deoxycholat

2.4 Medien für die Zellkultur

Medium für die Kultivierung RPMI 1640 mit Glucose und Glutamin
glatter Muskelzellen 10% FBS
50 U/ml Penicillin-Streptomycin
1 mM Natriumpyruvat
0.1 mM nichtessentielle Aminosäuren

2.5 Puffer für die Messungen

Konzentrationsangaben in [mM]

Standard PSS: NaCl 3250, KCl 117.5, KH₂PO₄ 29.5, MgSO₄ 7H₂O 29.25, NaHCO₃ 14.9,
Glucose 5.5, EDTA 0.65

Standard KPSS: NaCl 74.7, KCl 60, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 7H₂O 1.17, NaHCO₃ 14.9,
Glucose 5.5, EDTA 0.026, CaCl₂ 1.6

Die entsprechend eingewogenen Substanzmengen wurden mit dem vorgesehenen Volumen dd H₂O gelöst. Die Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

2.6 Stammlösung für die Messung der Gefäßfunktion

Noradrenalin 10mM 0,041g Noradrenalin
20 ml H₂O dd
Aliquots: -30°C

Acetylcholin 10mM 0,0364g Acetylcholin
20 ml H₂O dd
Aliquots: -30°C

2.7 Verdünnungsreihen

Zur Bestimmung der Gefäßkontraktilität und –relaxation wurde eine Verdünnungsreihe für Noradrenalin und Acetylcholin vorbereitet.

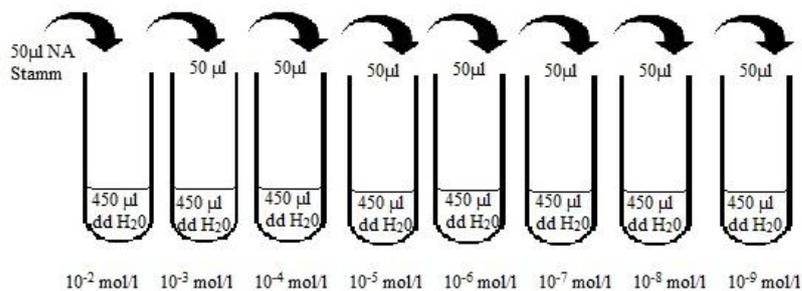


Abb. 4 Verdünnungsreihen für die Noradrenalin- Dosis-Antwort-Kurve zur Bestimmung der Gefäßkontraktilität.

2.8 Versuchstiere

Bei allen Versuchen wurden die geltenden Tierschutzrichtlinien beachtet. Es lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor.

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden männliche Mäuse vom Wildtyp (C57/BL6) von Charles River (Sulzfeld) im Alter von 10-12 Wochen verwendet. Wasser und Futter standen unbegrenzt zur Verfügung. Die Haltung der Tiere entsprach Standardlaborbedingungen mit einer Raumtemperatur von 20°C, relativer Luftfeuchtigkeit von 40-50% und einem 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus.

Zweimal wöchentlich wurde der Blutdruck über die Schwanzgefäße gemessen. Das Gewicht wurde vor Diätbeginn und am Operationstag bestimmt.

2.9 Spezielle Software

LabChart

GraphPad Prism ® 5.0

3. Methoden

3.1 Behandlung der Versuchstiere

Alle Tiere wurden mit einer hochkalorischen Diät gefüttert (E15126-34 Ssniff, Soest) mit 20.1 MJ/kg und einem Fettgehalt von 51%.

Eine Gruppe von acht Tieren bekam Pravastatin (50mg/kg/d) in Trinkwasser gelöst, die anderen Tiere bekamen normales Trinkwasser.

3.2 Das Aortenringmodell

3.2.1 Myograph

Mit dem Mulvany-Myographen kann man isometrisch die Vasodilatation und Vasokonstriktion von Gefäßen mit einem Durchmesser von 60-3000 µm messen.

3.2.2 Präparation der Aortenringe

Vor der OP wurde das ganze Tier gewogen. Die Euthanasie der Maus erfolgte unter tiefer Isofluran-Anästhesie. Nach Fixierung auf dem Operationstisch wurde die Bauchhaut vorsichtig mit Pinzette und Schere durchtrennt. Darm, Nieren, Milz, Fatpads und Leber wurden entnommen. Die Organe wurden gewogen, geteilt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80°C wurden sie gelagert bzw. 48 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert und danach in 70 % Ethanol umgebettet

Danach wurde die Aorta frei präpariert. Die Excision erfolgte durch vorsichtiges Schneiden entlang der Wirbelkörper mit einer feinen Präparationsschere von cranial nach caudal. Dabei

wurde die gesamte Aorta vom Aortenbogen bis zur Bifurcatio entnommen und unnötige Quetschungen und Dehnung vermieden, um das Endothel nicht zu verletzen. Anschließend wurde die Aorta in eine Kulturschale mit PSS überführt und sofort mit der weiteren Organpräparation fortgeföhren.

Die Präparation erfolgte unter dem Binokularen Präparationsmikroskop in Silikon beschichteten Petrischalen. Die beiden Enden der Aorta wurden spannungsfrei mit feinen Nadeln fixiert. Mit Mikrofederschere und feiner Pinzette wurde das umgebende Bindegewebe und Fett entfernt. Aus der thorakalen Aorta wurden Ringe mit 2-3 mm Länge geschnitten. Somit wurden vier Ringe aus einer Aorta gewonnen.

Danach folgte entweder die sofortige Einspannung in den Myographen oder die Inkubation mit Pravastatin.

3.2.3 Kurzzeitinkubation von Gefäßringen

Nach Einspannung in den Myographen und Normalisierung wurden die Aortenringe für eine Stunde mit 5 µl Pravastatin im Gefäßbad inkubiert. Während des Experiments wurde nach jedem Austausch des Puffers Pravastatin hinzugefügt, da durch die wiederholten Auswaschungen das Pravastatin aus den Zellen gewaschen wird.

3.2.4 Langzeitinkubation von Gefäßringen

Eine Gruppe von Gefäßringen wurde 24 Stunden im Brutschrank bei 36°C inkubiert. Dazu wurden 1,5 ml Eppendorftubes mit 1ml Dulbecos Modified Medium (versetzt mit Penicillin/Streptomycin und 10 % FPS) verwendet. Ein Ring wurde als Negativkontrolle nur in Medium inkubiert, zwei Ringe einer Aorta wurden zusätzlich mit 1µl Pravastatin behandelt.

3.2.5 Methode

Die Mulvany-Myographie wurde erstmals 1977 von Mulvany und Halpern zu wissenschaftlichen Untersuchungen vorgestellt.

Auf zwei kleine Metallstifte wird der Aortenring aufgespannt. Ein Stift ist mit einer Mikrometerschraube verbunden, der andere mit einem mechanoelektrischem Signalwandler.

Die Mikrometerschraube ermöglicht die Annäherung/Entfernung beider Träger in μm Schritten. Der Gefäßinnendurchmesser lässt sich durch den Abstand der beiden Stifte bestimmen.

Der Kraftmesser besteht aus einem Piezo gesteuerten Widerstandssensor, der mit dem Computer verbunden ist. Alle Messungen erfolgten unter isometrischen Bedingungen, d.h. es wurden Kraftänderungen bei konstantem Gefäßdurchmesser registriert.

Das Organbad wurde mit 5 ml PSS Puffer befüllt und langsam auf 37°C aufgeheizt.

Während des Versuches wurde die Temperatur konstant gehalten. Es wurden jeweils vier Gefäßringe gleichzeitig untersucht. Um alle Gefäße später miteinander vergleichen zu können, wurden die Ringe zu Beginn normalisiert.

Durch stückweise Drehung der Mikrometerschraube wurde die Aorta auf eine Vorspannung von 90 % ihres maximalen Durchmessers gebracht.

Der PSS-Puffer wurde anschließend ausgetauscht, um durch die Dehnung freigesetzten vasoaktive Substanzen auszuwaschen. Nach einer kurzen Ruhepause wurde die Vorspannung auf 90 % nachjustiert.

Durch kontinuierliche Begasung des Puffers mit Carbogen (Gasgemisch aus 95 % O_2 und 5 % CO_2) wurde ein physiologischer PH-Wert von 7,4 gewährleistet.

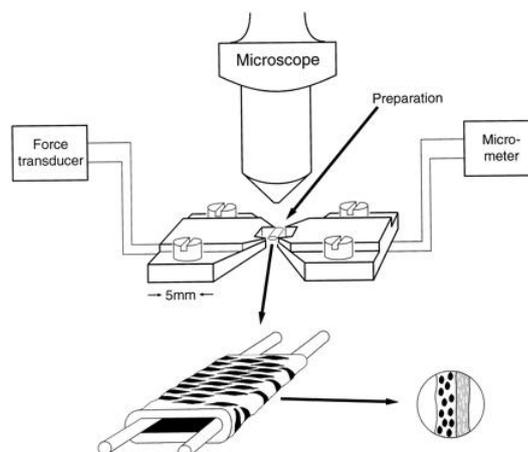


Abb. 5 Aufbau des Mulvany Myographen (Grahame 1997)

3.2.6 Versuchsprotokoll

Zu Beginn des Experiments wurde die Vitalität der Gefäße überprüft. Dies lässt sich rezeptorabhängig und –unabhängig durchführen. Mit KPSS (high potassium saline solution) lässt sich die Kontraktionsfähigkeit rezeptorunabhängig überprüfen. KPSS führt zu einer Depolarisation der glatten Muskelzellen und einer Öffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle, es kommt zu einer Kontraktion. Anschließend erfolgte eine vollständige Relaxation durch zweimaliges Auswaschen mit PSS Puffer und einer Ruhephase von 15 Minuten. Daraufhin folgte die rezeptorabhängige Kontraktion mit einer Noradrenalin-Dosis von $5 \mu\text{l } 10^{-3} \text{ mol/l}$. Eine anschließende Acetylcholin Dosis von $5 \mu\text{l } 10^{-2} \text{ mol/l}$ überprüfte die endothelabhängige Dilatation. Es wurden nur Gefäße verwendet, die mit einer Dilatation von 50 % reagierten. Es erfolgte eine erneute Auswaschung mit PSS über einen Zeitraum von 30-45 Minuten, bis das Gefäß wieder vollständig relaxiert war.

Nun folgte die Messung der Gefäßfunktion und Kontraktilität mit Hilfe einer Noradrenalin-Dosis-Wirkungskurve sowie einer Acetylcholin-Dosis-Wirkungskurve. Dabei wurden die Gefäße durch eine aufsteigende Noradrenalin-Dosis kontrahiert und gleich danach mit einer aufsteigenden Acetylcholin-Dosis dilatiert. Hierfür wurde nach unten stehendem Schema vorgegangen (s. Abb.6). Die Zugabe der nächst höheren Dosis erfolgte erst, wenn die vom Gefäß erzeugte Spannung konstant war.

10^{-9} mol/l	10^{-8} mol/l		10^{-7} mol/l		10^{-6} mol/l		10^{-5} mol/l	
N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9
5 μl	1 μl	5 μl	1 μl	5 μl	1 μl	5 μl	1 μl	5 μl

10^{-10} mol/l	10^{-9} mol/l		10^{-8} mol/l		10^{-7} mol/l		10^{-6} mol/l		10^{-5} mol/l	
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
5 μl	1 μl	5 μl	1 μl	5 μl	1 μl	5 μl	1 μl	5 μl	1 μl	5 μl

Abb. 6 Überblick der applizierten Dosen für die Noradrenalin- und Acetylcholin-Dosis-Wirkungskurve.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Isolation glatter Muskelzellen

Glatte Muskelzellen wurden aus der Mäuseaorta isoliert (Kobayashi et al. 2005). Dazu wurde die freipräparierte Aorta mit einer Kollagenase II behandelt, um die aortalen Endothelzellen zu entfernen. Anschließend wurde die Aorta in 2 mm lange Ringe geschnitten und in eine mit Gelatine ausgekleidete Petrischale zur Kultivierung der glatten Muskelzellen überführt. Die Kultivierung dauerte drei bis vier Wochen und erfolgte in DMEM Medium mit 10 % BSA. War eine ausreichende Zelldichte erreicht, wurden die glatten Muskelzellen mit 0.25 % Trypsin/EDTA abgelöst und auf ihr Homogenität untersucht (Spindelmorphologie, Expression von α -Smooth Muscle Actin, Smoothelin und Calponin).

3.3.2 Zellkultur

Die Haltung der Zellkulturen erfolgte in einem offenen System im CO₂-auto-zero-Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit.

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden in einer mit Gelatine beschichteten Zellkulturflasche (Flask) in 12 ml DME Medium mit 10% FPS und 5% Penicillin und Streptomycin kultiviert. Zweimal wöchentlich wurde das Medium unter sterilen Bedingungen gewechselt. Nach 5-7 Tagen hatten sich die Zellen vermehrt und eine spindelförmige Gestalt angenommen. Nun wurde die Zellkultur geteilt (Splittung).

Dazu wurden die abzulösenden Zellen zuerst mit 5 ml Dulbecco abgewaschen, dann mit 3 ml Trypsin (einminütige Inkubation bei 37°C) vom Nährboden gelöst. Mit 9 ml Medium wurde die Wirkung von Trypsin aufgehoben. Anschließend wurden die Zellen auf neue Flask aufgeteilt.

Nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte wurden die glatten Gefäßmuskelzellen in Gelatine beschichtete Petrischalen überführt. Vier bis fünf Tagen später waren die Zellen spindelförmig (konfluent) und reif für die Behandlung.

3.3.3 Behandlung mit Pravastatin

Ziel der Behandlung war es, auf zellulärer Ebene die Inhibition der Rho-assoziierten Proteinkinase (ROCK) durch Pravastatin zu quantifizieren.

Zur Aktivierung von ROCK wurde LPS eingesetzt, ein Lipopolysaccharid, das Bestandteil der äußeren Membran von Bakterien ist. Es wird auch als Endotoxin bezeichnet und aktiviert die Rho-Kinase abhängige Stickstoffmonoxid-Synthase.

Als Rock-Inhibitor wurde Y-27632 verwendet.

Für die Behandlung wurden die Zellen vier Stunden vorher mit 2 % Medium versetzt. Es wurden 16 ml Petrischalen mit 10 ml Medium und 100 000 bis 150 000 Zellen/ml verwendet. Während der Behandlungsdauer von 24 Stunden wurden die Zellen im Brutschrank gelagert.

Die Gruppen waren folgende:

1. Blindkontrolle
2. LPS
3. LPS + Y-27632
4. LPS + Pravastatin 24 Stunden
5. LPS + Pravastatin 1 Stunde

Die erste Gruppe diente unbehandelt als Kontrolle, Gruppe 4 wurde 24 Stunden, Gruppe 5 nur eine Stunde lang mit Pravastatin (10 µl, 10 µM) behandelt. Gruppe 2-5 wurden vier Stunden vor Behandlungsende mit 10 µl LPS behandelt. Gruppe 3 wurde zusätzlich mit 10 µl Y-27632 in den letzten 30 Minuten behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen unverzüglich mit 5 ml Dulbecco gewaschen und mit jeweils 300 µl RIPA-Puffer, dem Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt waren, bedeckt. Die Zellen wurden vom Schalenboden abgekratzt und sofort mit dem Puffer in Eppendorf Tubes auf Eis pipettiert. Anschließend wurde bei 4°C und 13 000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Das Pellet wurde verworfen.

3.4 Biochemische Methoden

Für die biochemischen Analysen wurden sowohl isolierte glatten Gefäßmuskelzellen als auch frische Zellen aus den Aorten der Mäuse verwendet. Die Aorten wurden wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben entnommen und inkubiert. Es gab drei Gruppen. Die erste Gruppe wurde eine Stunde, die Zweite 24 Stunden mit Pravastatin inkubiert. Eine dritte Gruppe diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Die Aorten wurden nach Inkubation bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.1 Proteinisolation aus Zellgewebe

Zur Proteinisolation aus Gewebe wurden die gefrorenen Aorten mit der zehnfachen Menge RIPA-Puffer (mit Protease- und Phosphataseinhibitoren) versetzt und im Tissuelyser homogenisiert ($f=30/s$, 3 min). Anschließend wurde bei 4°C und 13 000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Das Pellet wurde verworfen.

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Messung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit von Pierce durchgeführt. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe (2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 und 0 µg/ml). Auf eine 96-Well-Platte wurden in Doppelbestimmung jeweils 10 µl Standardlösung oder Proteinlösung aufgetragen und mit 200 µl Substratlösung (Reagenz A: Reagenz B= 50:1) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten (37°C) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 565 nm gemessen.

3.4.3 ROCK-Assay

Die Messung der Rho-assoziierten Kinase Aktivität wurde mittels eines Enzym Immunoassays bestimmt. Nach erfolgter Proteinkonzentrationsbestimmung wurde weiter nach dem Versuchsprotokoll des Assaykits vorgegangen. Die Messung erfolgte mit 10 µg Proteinlysate.

3.5 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm der Standardabweichung (SEM) angegeben. Für die Ergebnisse der Experimente am Myographen wurde der logEC50 Wert berechnet. Um statistische Signifikanzen zu ermitteln, wurde die nicht-lineare Regressionsanalyse eingesetzt. Zum Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde der Students-t-Test verwendet. Ein $P \leq 0.05$ wurde als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Veränderung der Gefäßeigenschaften der adipösen Tiere bezüglich der Reaktion auf die Vasokonstriktoren Kaliumchlorid und Noradrenalin sowie den Vasodilatator Acetylcholin untersucht werden.

Im zweiten Teil wurde die RhoA-Kinase Aktivität in glatten Muskelzellen bestimmt und der Einfluss von Pravastatin auf die Kinase Aktivität.

4.1 Gewichtszunahme

Für das ideale Mausmodell zur Untersuchung von Übergewicht ist eine leichte Zunahme des Körpergewichts und der kardiovaskulären Risikofaktoren nötig. Die zweiwöchige Diät mit hochkalorischer Nahrung erfüllte diese Kriterien.

Durch die Ernährung mit hochkalorischer Diät der Mäuse kam es innerhalb von zwei Wochen zu einem erhöhten Körpergewicht.

Bereits hier zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen: das Körpergewicht der Kontrolltiere erhöhte sich um $10\% \pm 1.1$, während die mit Pravastatin behandelten Mäuse $4\% \pm 2.2$ ihres Körpergewichtes zunahmen.

Die Mäuse, die zusätzlich mit Pravastatin behandelt wurden, nahmen im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich weniger an Gewicht zu. Im Vergleich nahm die Kontrollgruppe durchschnittlich 2.7g zu, wohingegen Mäuse mit einer Kombination von hochkalorischer Diät und Pravastatin im Trinkwasser durchschnittlich 1.1g zunahmen.

Die Behandlung mit Pravastatin verringert signifikant die Gewichtszunahme bei gleicher Diät.

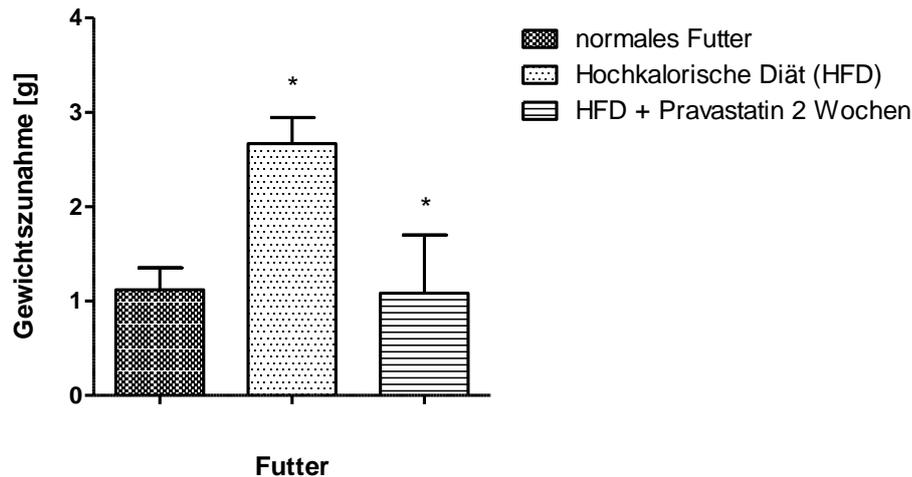


Abb. 7 Gewichtszunahme nach 2 Wochen, Vergleich von normalem Futter, hochkalorischem Futter und zusätzlicher Behandlung mit Pravastatin für zwei Wochen, Darstellung des Mittelwerts \pm SEM, n=8, *P \leq 0.05

4.2 Veränderung des Blutdrucks

In Erwartung, dass eine starke Gewichtszunahme zu erhöhtem Blutdruck führt, wurden im Verlauf regelmäßig die Blutdruckwerte bestimmt.

Hier ließ sich ein deutlicher Unterschied zwischen den systolischen und diastolischen Blutdruckwerten der Pravastatinmäuse im Vergleich zur unbehandelten Gruppe feststellen. Die mit Pravastatin behandelten Tiere hatten tendenziell einen geringeren Blutdruck als Tiere aus der Vergleichsgruppe. Dabei war die Variabilität der systolischen Blutdrücke in der behandelten Gruppe relativ groß.

Die mit Pravastatin behandelte Gruppe zeigte nach zwei Wochen Behandlung ein signifikant niedrigeren Blutdruck als die Kontrollgruppe (systolischer Blutdruck der Kontrollgruppe: 142.2 ± 1.9 mmHg, 2 Wochen Pravastatin: 118.7 ± 8.1 mmHg).

	Kontrollgruppe	Pravastatin 2Wochen
Gewichtszunahme (g)	2,7 ± 0,3	1,1 ± 0,6
Systolischer Blutdruck (mmHG)	142,7 ± 3,3	124,4 ± 4,8
Diastolischer Blutdruck (mmHG)	75,4 ± 4,9	58,3 ± 5,2
Mittlerer art. Blutdruck (mmHG)	97,8 ± 3,9	78,0 ± 4,8

Tabelle 1 Gewichtszunahme und Blutdruck, jeweils n=8, Signifikant (P < 0.05)

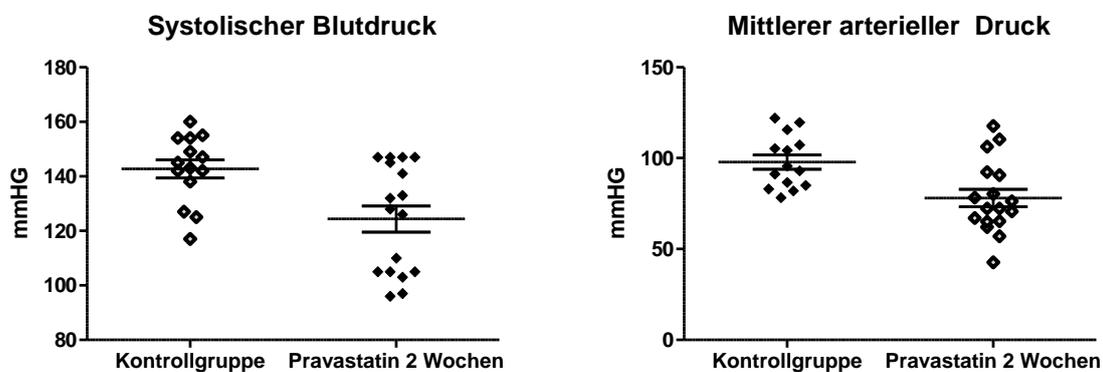


Abb. 8 Darstellung Systolischer Blutdruck und mittlerer arterieller Blutdruck der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe.

4.3 Gefäßkontraktilität der Aorta

Die Untersuchung der Gefäßkontraktilität wurde mittels eines Mulvany Myographen untersucht. Die Vasokonstriktion wurde mit Noradrenalin und Kaliumchlorid (KPSS) untersucht, die Vasodilatation mit Acetylcholin.

Bereits bei der Vitalitätsprüfung zu Beginn der Untersuchung zeigte sich ein Unterschied in den behandelten Gruppen.

Die durch KPSS ausgelöste Vasokonstriktion erzielte sowohl in der unbehandelten als auch in der mit Pravastatin behandelten Gruppe eine gleich hohe Gefäßspannung.

Die Vasokonstriktion ausgelöst durch eine hohe Dosis Noradrenalin ($1\mu\text{M}$) ließ bereits Unterschiede in den behandelten Gruppen erkennen.

Während eine Pravastatinbehandlung für eine Stunde die kontraktile Antwort auf Noradrenalin nur wenig beeinflusste, war die Vasokonstriktion nach 24 Stunden bereits leicht abgeschwächt. Nach zweiwöchiger Behandlung war eine deutliche Tendenz erkennbar: im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe war die kontraktile Antwort auf eine hohe Dosis Noradrenalin deutlich abgeschwächt (Abb. 8 und 9).

Im nächsten Untersuchungsschritt wurde mit Noradrenalin und Acetylcholin in aufsteigender Dosierung die Reagibilität der glatten Muskelzellen untersucht.

Die Untersuchung der Gefäßfunktion an isolierten Aortenringen zeigte eine zunehmende Reduktion der Kontraktilität in Abhängigkeit von der Dauer der Statinbehandlung.

Nach einstündiger Behandlung mit Pravastatin ließ sich kaum ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich des Verlaufs der Dosis-Wirkungs-Kurve feststellen.

Nach 24 Stunden Pravastatin Behandlung zeigten sich bereits erste Unterschiede.

Nach dieser kurzen Inkubation reagierten die Gefäße signifikant schwächer auf eine bestimmte Konzentration von Noradrenalin.

Die Sensitivität gegenüber dem Vasokonstriktor Noradrenalin war für die mittleren Konzentrationen (N5- N8) signifikant ($P\leq 0.05$) herabgesetzt. Es zeigt sich eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve.

Besonders deutlich zeigte sich eine abgeschwächte Vasokonstriktion nach der zweiwöchigen Pravastatin Behandlung.

Nach Gabe der Maximalkonzentration von Noradrenalin kam es zu einer maximalen Gefäßkontraktion. Diese wurde zum Ende des Experimentes von allen Gruppen erreicht und ließ sich auch nicht durch die Zugabe von geringen Dosen des Vasodilatators Acetylcholin antagonisieren.

Die mit Acetylcholin überprüfte Dilatationsfähigkeit des Endothels war stets intakt. Eine endotheliale Dysfunktion entwickelte sich während der zweiwöchigen hochkalorischen Diät nicht. Auch hatte die unterschiedliche Pravastatinbehandlung keinen Einfluss auf das Dilatationsverhalten der vorkontrahierten Gefäßringe. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Acetylcholin Dosis-Wirkungskurve der verschiedenen Gruppen (Exemplarisch dargestellt in Abb. 8 für die 24 Stunden Pravastatinbehandlung).

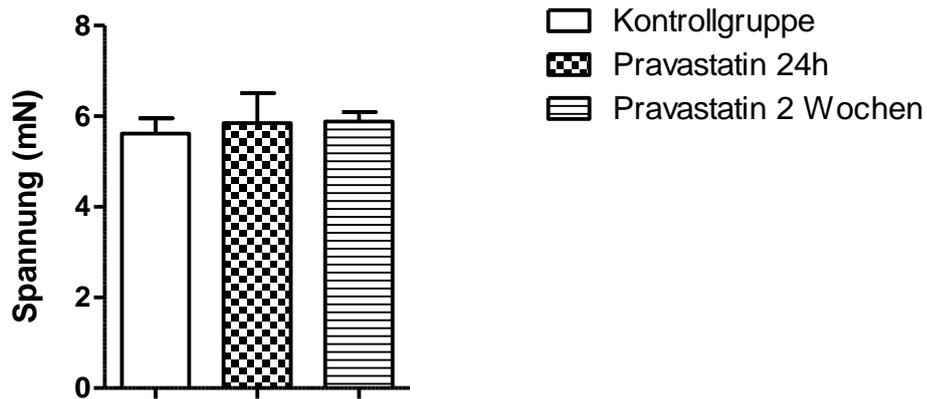


Abb. 9 KPSS induzierte Vasokonstriktion zu Beginn als erster Schritt der Vitalitätsprüfung der Gefäßringe nach einer Pravastatin Inkubation von 24 Stunden und nach einer in vivo Behandlung für 2Wochen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM, n=7

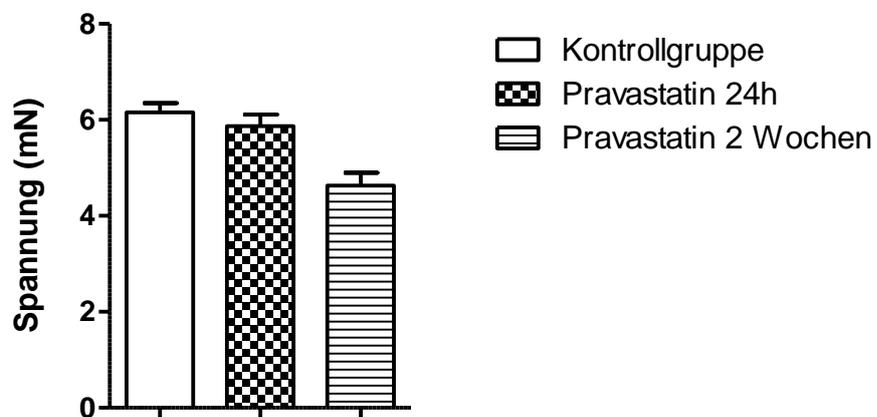


Abb. 10 Noradrenalin (1 μ M) induzierte Vasokontraktion als zweiter Schritt der Vitalitätsprüfung der Gefäßringe nach einer Pravastatin Inkubation von 24 Stunden und nach einer in vivo Behandlung für 2Wochen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM, n=7

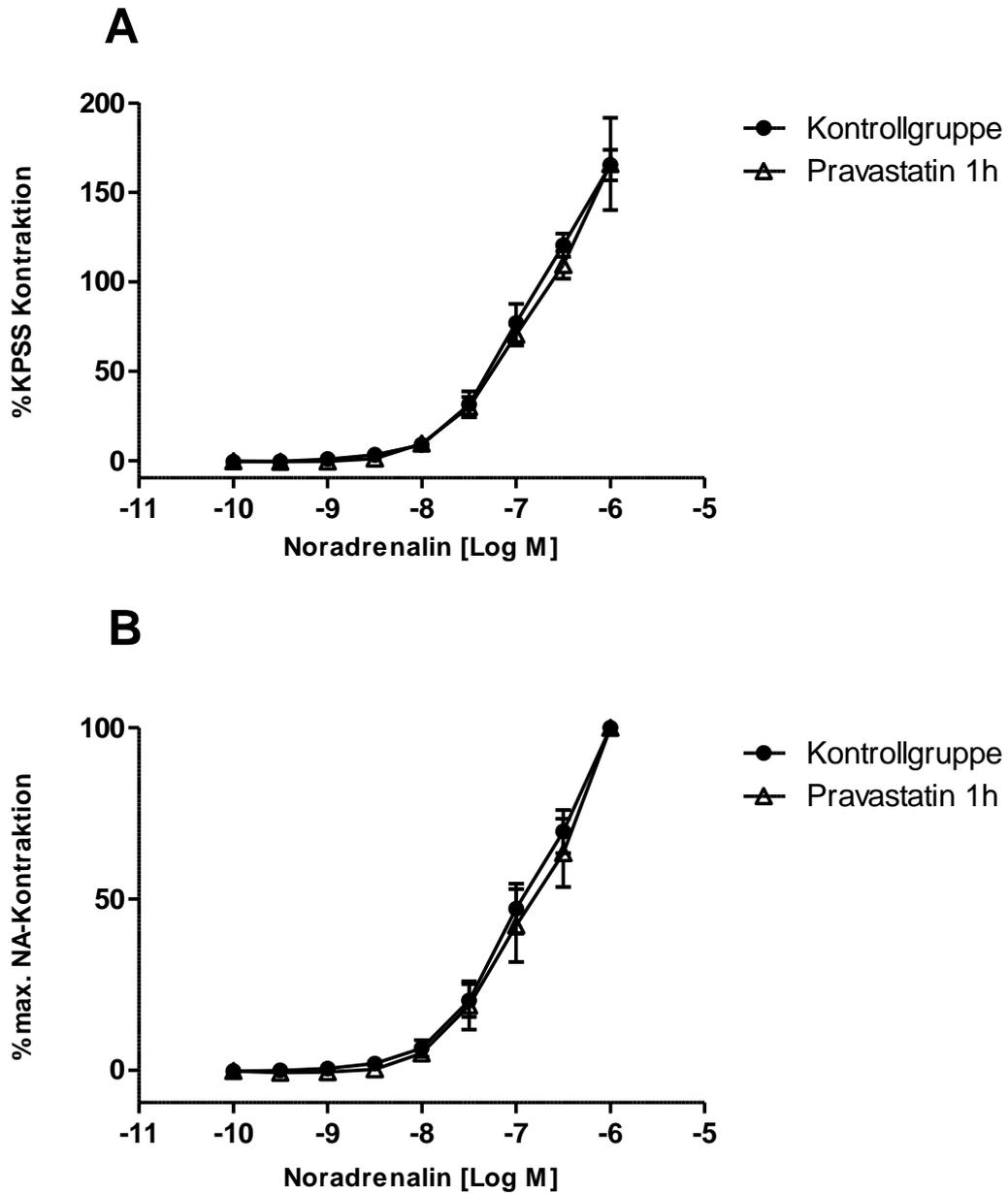


Abb. 11 Dosis-Antwortkurve für Noradrenalin induzierte Vasokonstriktion nach einstündiger in vitro Inkubation mit Pravastatin (10 μ M), Kontraktilität bezogen auf die maximale Vasokonstriktion mit (A) KPSS und (B) Noradrenalin 1 μ M, Darstellung des Mittelwerts \pm SEM, n=7, *signifikant, $P \leq 0.05$

Nach einstündiger Inkubation mit Pravastatin zeigte sich kein Unterschied in der durch Noradrenalin induzierten Kontraktion der Aortenringe in beiden Gruppen (n=7).

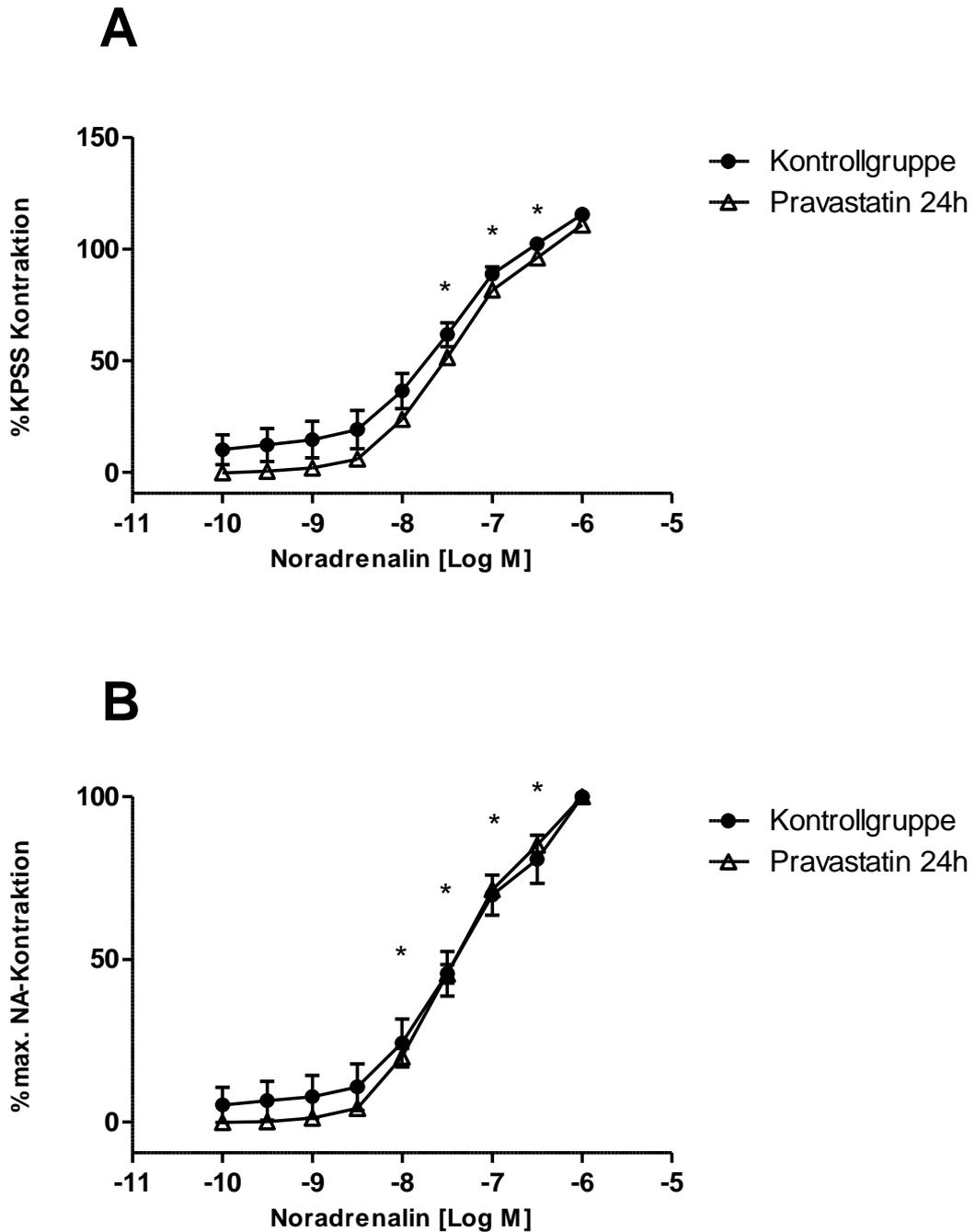


Abb. 12 Dosis-Antwortkurve für Noradrenalin induzierte Vasokontraktion nach 24 Stunden *in vitro* Inkubation mit Pravastatin (10 μ M), Kontraktilität bezogen auf die maximale Vasokonstriktion mit (A) KPSS und (B) Noradrenalin 1 μ M, Kontrollgruppe logEC₅₀: -7.7 vs. Pravastatin 24h logEC₅₀: -7.3, Darstellung des Mittelwerts \pm SEM, n=7, *P \leq 0.05

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei einer mittleren bis hohen Konzentration Noradrenalin (N5-N8)

Noradrenalin-Konzentration	Vasokonstriktion in %	
	Kontrollgruppe	Pravastatin 24 Stunden
N5	34,8 ± 8,2	15,3 ± 2,3
N6	56,0 ± 5,8	40,6 ± 2,7
N7	79,2 ± 3,5	68,0 ± 1,7
N8	90,7 ± 1,2	83,9 ± 1,3

Tabelle 2 Vasokonstriktion in % der signifikanten Noradrenalin-Konzentration N5-N8, bezogen auf die maximale Vasokonstriktion mit Noradrenalin 1µM im Vergleich von Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe mit Pravastatin für 24 Stunden. Darstellung des Mittelwerts ± SEM, n=7.

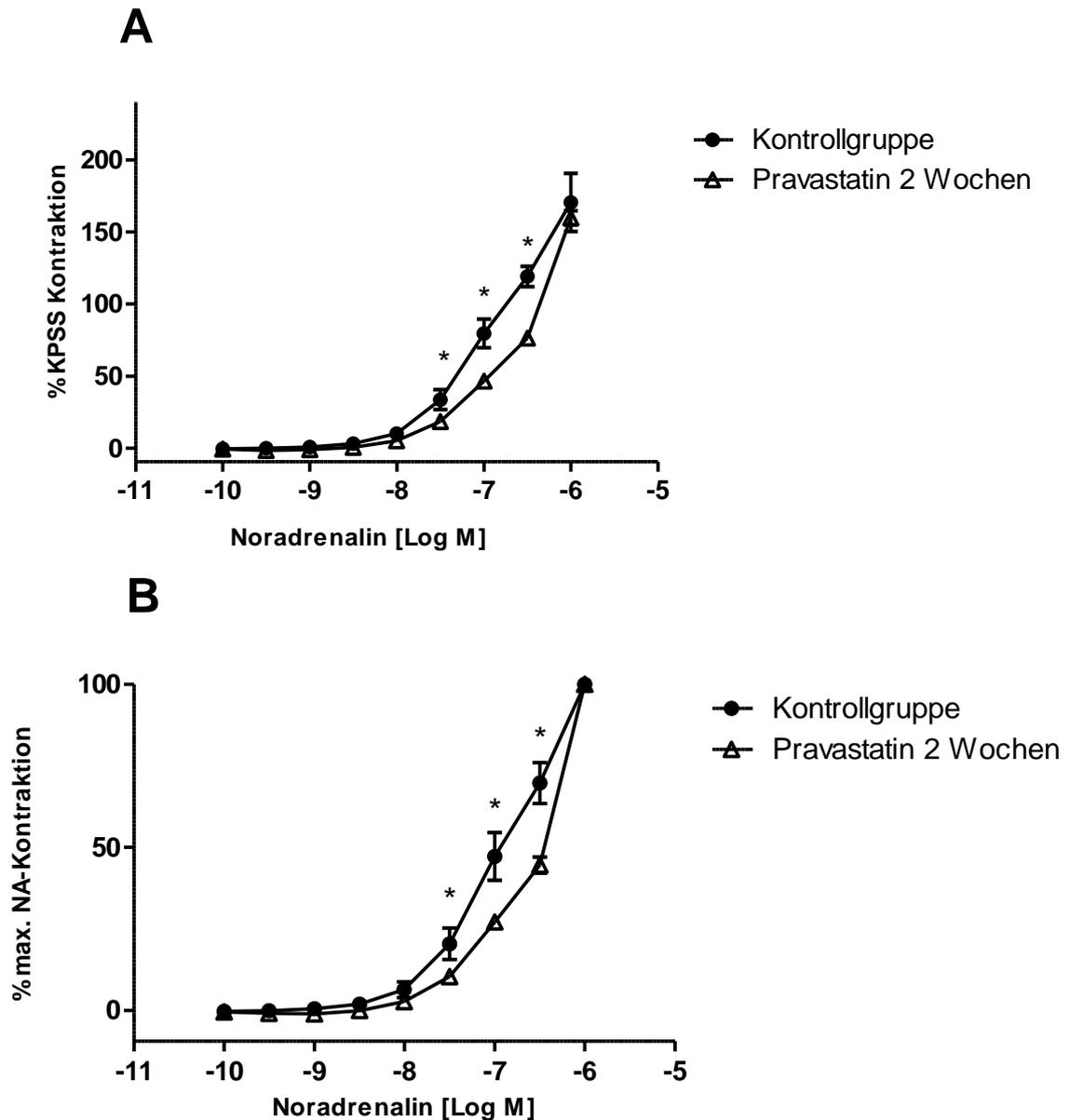


Abb. 13 Dosis-Antwortkurve für Noradrenalin induzierte Vasokontraktion nach 2 Wochen in vivo Behandlung mit Pravastatin (50mg/kg/d), Kontraktilität bezogen auf die maximale Vasokonstriktion mit (A) KPSS und (B) Noradrenalin 1 μ M, Kontrollgruppe logEC₅₀: -6.9 vs. Pravastatin 2 Wochen logEC₅₀: -6.6, Darstellung des Mittelwerts \pm SEM, n=7, *P \leq 0.05

Wurden die Mäuse zwei Wochen mit Pravastatin (p.o.) behandelt, zeigte sich eine deutlich abgeschwächte kontraktile Reaktion auf Noradrenalin (B) im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe (n=7). * P \leq 0.05

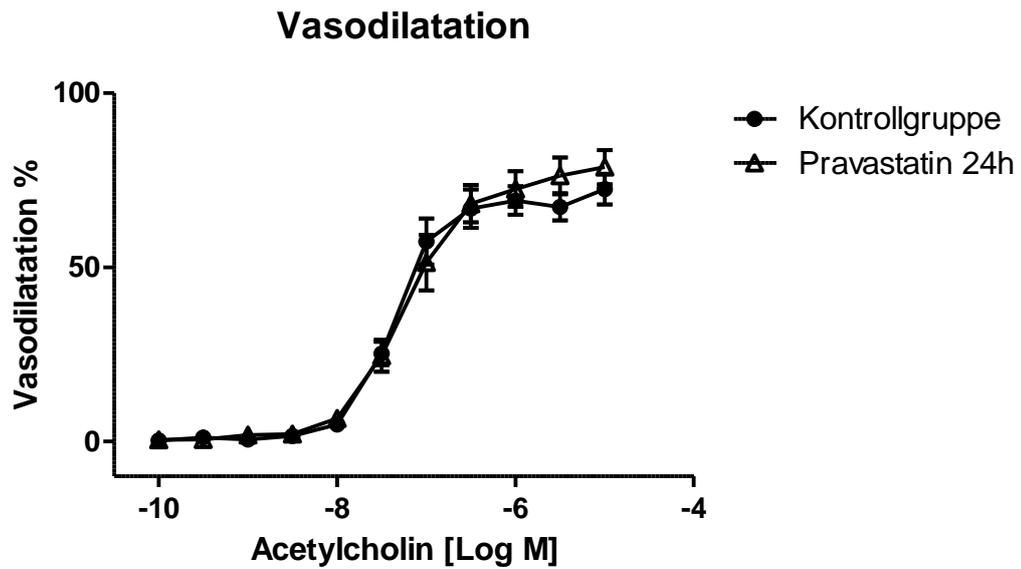


Abb. 14 Acetylcholin induzierte Vasodilatation von Aortenringen aus Mäusen der Kontrollgruppe im Vergleich zu Gefäßringen nach Pravastatin Inkubation für 24 Stunden. Darstellung der Relaxation in %, Darstellung des Mittelwerts \pm SEM, n=7

Es zeigten sich kein Unterschied in der Acetylcholin Dosis-Wirkungskurve der beiden Gruppen, (n=7).

4.4 ROCK- Aktivität

Im zweiten Teil sollte der Zusammenhang zwischen der verminderten Kontraktilität der Aorta und der Rho-A Protein assoziierten Kinase Aktivität dargestellt werden.

Glatte Muskelzellen aus der Aorta wurden für 4 Stunden mit LPS behandelt plus zusätzlich entweder eine Stunde oder 24 Stunden lang mit Pravastatin. Dazu kam eine Gruppe, die mit dem spezifischen Rho-A Kinase Inhibitor Y-27632 für 30 Minuten behandelt wurde.

Im Anschluss wurde die Rho-A Kinase Aktivität gemessen.

Die LPS Behandlung der Zellen zeigte eine gesteigerte Aktivität der Rho-A Kinase.

Y-27632 dämpfte die Aktivität. Mit zunehmender Dauer der Pravastatininkubation zeigte sich eine Tendenz zur verringerten Aktivität der Rho-A Kinase, die initial durch LPS gesteigert worden war. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Abhängig von der Zeitdauer der Pravastatininkubation zeigte sich eine tendenzielle Verringerung der Aktivität mit zunehmender Behandlungsdauer.

Eine Isolierung beziehungsweise ein Nachweis der Rock-Aktivität aus den Gefäßen der behandelten Gruppe gelang nicht.

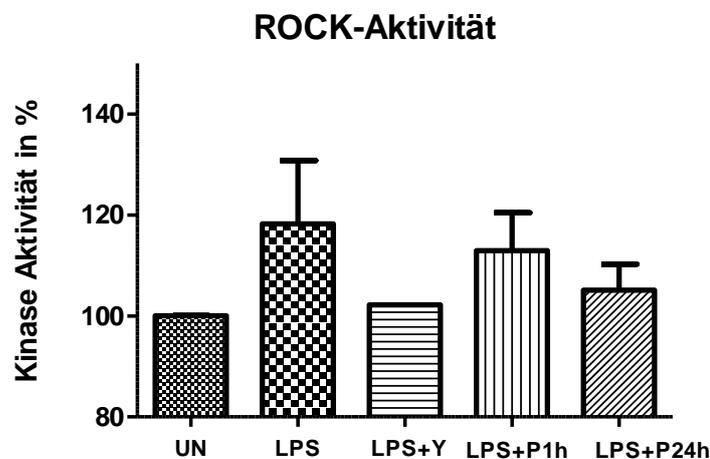


Abb. 15 ROCK-Aktivität in % bezogen auf die ROCK- Aktivität der unbehandelten Gruppe (UN), nach Behandlung mit LPS und zusätzlich Y-27632, Pravastatin für eine Stunde oder 24 Stunden. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM, n=4

5. Diskussion

Eine Vielzahl von Studien konnte den positiven Effekt von Statinen auf die Gefäßfunktion beweisen, sowohl im physiologisch gesunden Modell als auch im Bezug auf arteriellen Hypertonus und Diabetes. Das Augenmerk dieser Arbeit richtet sich auf die Wirkung von Pravastatin im Adipositasmodell.

Die durchgeführte experimentelle Studie stellt anhand eines Mausmodells den Mechanismus dar, der durch eine hohe Zufuhr von Kalorien innerhalb kurzer Zeit Veränderungen der Gefäße hervorruft. Es kommt zur Entwicklung von Übergewicht mit einer Steigerung des arteriellen Blutdrucks und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko.

Untersucht wurde, wie Pravastatin die durch Übergewicht verursachte vaskuläre Veränderung beeinflusst.

Die Arbeit kommt zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Pravastatin beeinflusst die Kontraktilität der Gefäßringe nach hochkalorischer Diät in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Eine abgeschwächte Reaktion wird vor allem bei der durch Noradrenalin-ausgelösten Vasokonstriktion beobachtet, wohingegen die Depolarisation mit Kaliumchlorid (KPSS) in allen Gruppen zu einer ähnlich starken Vasokonstriktion führt. Die Vasokonstriktion durch Noradrenalin unterscheidet sich besonders für die mittleren Konzentrationen von Noradrenalin.
- 2) Pravastatin beeinflusst in vivo die Entwicklung des Körpergewichts unter hochkalorischer Diät.
- 3) Pravastatin beeinflusst die Veränderung des Blutdrucks unter hochkalorischer Diät.
- 4) Auf zellulärer Ebene hemmt Pravastatin die ROCK-Aktivität mit zunehmender Inkubationszeit.

Ausführlich wird dazu im Weiteren diskutiert.

5.1 Diskussion der Methodik

Es existieren viele Studien, die die Beeinflussung der Gefäßkontraktilität und die Entstehung von Bluthochdruck im Zusammenhang mit Statinen untersuchen. Es gibt aber nur wenige Studien die den Faktor Übergewicht mit einbeziehen.

Es ist bekannt, dass Übergewicht ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen ist. Zahlreiche Studien befassen sich mit der Analyse von Adipositas und Übergewicht als bedeutsamer Faktor in der Ätiologie kardiovaskulärer Erkrankungen.

Auch zu Statinen existieren vielfältige Studien. Als Inhibitoren der Rho-Kinase spielen sie eine bedeutende Rolle und können verschiedenste biologische Prozesse beeinflussen.

Für diese Arbeit wurden die Mäuse mit einer Pravastatin Tagesdosis von 50 mg/kg/d über 14 Tage lang behandelt. Diese Dosierung wurde bereits in vorangegangenen Experimenten des Instituts verwendet.

In vorherigen klinischen Langzeitstudien wie der West of Scotland Coronary Prevention Study von Shepherd et al. (1995) wurden Patienten mit einer Tagesdosierungen von 40 mg/Tag Simvastatin behandelt. Im Mausmodell dosierten Araki et al. (2008) Pravastatin mit 100 mg/kg/Tag, um den Zusammenhang von Übergewicht, Diabetes und Adiponectin zu untersuchen.

Basierend auf der Studie von Kassan et al. (2013) wurde zur Behandlung der Aortenringe für die myographische Untersuchung eine Pravastatin Dosierung von 10 µM/l verwendet. Dies gilt auch für die Zelleexperimente.

5.2 Gewichtszunahme

Interessanterweise zeigte sich nach der zweiwöchigen Behandlung mit Pravastatin ein Unterschied in der Gewichtszunahme der beiden Gruppen. Die Tiere wurden unter den gleichen Lebensbedingungen gehalten und bekamen exakt das gleiche Futter. Pravastatin wurde nur dem Trinkwasser der einen Gruppe zugesetzt. Mäuse, die nur mit hochkalorischer Diät ernährt wurden, nahmen im Vergleich zu der mit Pravastatin behandelten Gruppe im Durchschnitt das Doppelte an Körpergewicht zu (Gewichtszunahme: Kontrollgruppe mit hochkalorischer Diät 2,7 g vs. zweiwöchige Pravastatinbehandlung 1,1 g).

Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen von Araki et al. (2008). Nach achtwöchiger hochkalorischer Diät plus einer Pravastatin Behandlung in den letzten vier

Wochen (100 mg/kg/d) zeigte sich bei gleicher Menge an Nahrungsaufnahme eine deutlich geringere Gewichtszunahme in der behandelten Gruppe.

Die Konzentration von Serum Glukose, Triglyceriden und freien Fettsäuren war in beiden Gruppen gleich. Dafür wies die behandelte Gruppe niedrigere Werte im Glukosetoleranztest auf, sowie ein reduziertes Volumen der Adipozyten und einen erhöhten Serum Adiponectinspiegel. Erklärt wird dieser Unterschied von Araki et al. damit, dass der Energiebedarf vermehrt durch die konsumierten Fette statt der Kohlenhydrate gedeckt wird. Dies führt zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und dadurch zu einem erniedrigten Respiratorischen Quotienten ($RQ = \text{CO}_2 \text{ Produktion} / \text{O}_2 \text{ Verbrauch}$). Die Ergebnisse einer japanischen Studie (Yu et al., 2004) zeigen, dass Ratten mit Diabetes unter Pravastatinbehandlung (100 mg/kg/d für 30 Wochen) weniger Körpergewicht zunehmen, als Ratten mit Diabetes ohne Pravastatinbehandlung. Eine Vergleichsgruppe von Tieren ohne Diabetes mit oder ohne Pravastatinbehandlung unterschied sich bezüglich der Gewichtszunahme nicht voneinander. Tatsächlich beobachtete die Gruppe um Yu, dass die Ratten der Diabetesgruppe sogar mehr Futter zu sich nahmen.

Wie genau Pravastatin das Körpergewicht reguliert, bleibt zunächst noch unklar.

5.3 Veränderung des Blutdrucks

Während der zweiwöchigen Behandlungszeit wurde regelmäßig der Blutdruck mittels einer Blutdruckmanschette am Schwanz gemessen. Im Verlauf stieg der Blutdruck der unbehandelten Gruppe an. Im Vergleich dazu zeigten die Mäuse unter Pravastatintherapie eine starke Varianz des Blutdrucks mit einem Trend zu niedrigeren Blutdruckwerten.

Klinisch konnte bereits in mehreren Studien eine signifikante Senkung des Blutdrucks unter Statintherapie beobachtet werden.

Die klinische Studie von Glorioso et al. (1999) berichtet von einer signifikanten Blutdrucksenkung nach 16 Wochen Behandlung mit 20 mg/d Pravastatin. Interessanterweise wird ein signifikanter Unterschied des diastolischen Blutdrucks bereits nach 4 Wochen Behandlung erreicht, hingegen verringerte sich der systolische Druck erst nach 12 Wochen signifikant. Eine Beeinflussung des Blutdrucks durch Körpergewicht (BMI), Natrium-Ausscheidung oder Plasma Renin Aktivität ließ sich ausschließen, regelmäßige Kontrollen ergaben keine wesentliche Veränderung während der Behandlungsdauer. Eine Senkung der Serum Lipide wurde dagegen beobachtet.

In vorangegangenen Studien zeigt sich immer wieder, dass Statine erhöhten Blutdruck senken können, aber einen normotensiven Blutdruck nicht beeinflussen (WOSCOP, 4S). Eine Beteiligung der Rho-Kinase an der Pathogenese des essentiellen Hypertonus wurde erstmals von Masumoto et al. (2001) nachgewiesen. Masumoto et al. verglichen in ihrer Studie zwei Patientengruppen, eine normotensiv, die andere mit arteriellem Hypertonus, die sie mit Fasudil (ein ROCK-Inhibitor) in verschiedenen Konzentrationen behandelten. Blutdruck, Puls und Unterarm-Blutfluss wurden vor und nach jeder Fasudil-Aplikation gemessen. Hierbei zeigte sich ein vasodilatatorischer Effekt in der Gruppe der Hypertoniker. Der Grad der Vasodilatation nahm mit steigender Fasudil Dosis zu. Der vaskuläre Widerstand war signifikant verringert in der Gruppe der Hypertoniker. In der normotensiven Gruppe zeigte sich keine Änderung des Vasotonus. Eine Veränderung des systemischen Blutdrucks und Puls wurden während der Infusion nicht beobachtet. Nitroprussidnatrium löste in beiden Gruppen eine ähnlich starke Vasodilatation aus, die Fasudilwirkung kam also nicht durch eine strukturelle Änderung der Gefäße zustande.

Eine Metaanalyse (Strazzullo et al. 2007) von 20 randomisierten placebokontrollierten klinischen Studien mit 828 Patienten kommt zu dem Ergebnis, dass eine Langzeittherapie mit Statinen signifikant den systolischen Blutdruck senkt, mit einem Trend zu verminderten diastolischen Blutdruckwerten. Die Statintherapie zeigte eine deutlich effektivere Wirkung bei Patienten mit höheren Blutdruck Ausgangswerten (Systolisch ≥ 130 mmHg, diastolisch ≥ 80 mmHg).

Die blutdrucksenkenden Effekte durch Statine, wirklich signifikant nur für die systolischen Werte, sind im Vergleich zu Antihypertonika zwar gering, jedoch als Teil einer Kombinationstherapie nicht zu verachten.

Erwähnenswert ist, dass die meisten Patienten der verschiedenen Statin Studien zu Beginn meist niedrigere Blutdruckwerte hatten als Patientenkollektive von Studien zu klassischen Antihypertensiva.

Patienten der San Diego Statin Study (Golomb 2004), die mit Simvastatin oder Pravastatin behandelt wurden, zeigten eine signifikante Blutdrucksenkung mit einer maximalen Differenz von 2,8/2,7 mmHg. Bereits eine Senkung von 2 mmHg des systolischen Blutdrucks ist mit einer 15 % verringerten Rate an Schlaganfällen und einer 19 % verringerten Rate an Herzinsuffizienz assoziiert.

Interessant wäre, wie sich der Blutdruck der Mäuse ändert, wenn man sie erst für einige Wochen mit hochkalorischer Diät füttert und dann im Anschluss eine Behandlung mit

Pravastatin beginnt. Steigt der Blutdruck unter hochkalorischer Diät und ist eine signifikante Senkung unter Pravastatin messbar? Lässt sich die Statinkonzentration im Blut messen? Wie hoch ist die ROCK Aktivität? Dies sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

5.4 Gefäßkontraktion und ROCK-Aktivität

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass im Adipositasmodell die Kontraktilität und Sensibilität auf Vasokonstriktoren in Abhängigkeit von der Behandlungszeit durch Pravastatin abgeschwächt werden. Eine signifikante Verringerung der durch Noradrenalin induzierten Kontraktilität wird bereits nach 24 Stunden Pravastatinbehandlung erreicht. Nach zwei Wochen in vivo Behandlung sind die Ergebnisse noch deutlicher. Signifikante Unterschiede zeigen sich vor allem für die mittelhohen Noradrenalin-Konzentrationen von N5-N8. Die KPSS-induzierte Kontraktilität war in allen Gruppen identisch. Ebenso zeigte sich bei der endothelabhängigen Vasodilatation auf Acetylcholin kein Unterschied.

Ergebnisse von vorangegangenen Studien (Ghaffari et al. 2011) belegen, dass Pravastatin (112 nmol/l) bereits nach 60 Minuten in vitro Inkubation die Vasokonstriktion in kleinen Mesenterialarterien von gesunden Kaninchen hemmt. Eine kürzere Inkubation von 15 Minuten ist nicht effektiv. Inkubation mit Atorvastatin zeigt bereits nach 30 Minuten an Gefäßringen der Aorta einen sofortigen Effekt (Alp et al. 2015) und auch in vivo beeinflusst eine Einzeldosis Atorvastatin- wenn auch an einer relativ niedrigen Patientenzahl (13 Männer mit Hypertension)- den Vasotonus (Saluveer et al.2013).

Um in großen Gefäßen wie der Aorta einen Effekt mit Pravastatin erzielen zu können, ist wahrscheinlich eine längere Inkubationszeit nötig, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen. Zudem führt die hochkalorische Diät zu einer erhöhten Rho-Kinase Aktivität (Liu 2007, Ross 2013), die in einer erhöhten Vasokonstriktion gegenüber Noradrenalin resultiert. Fraglich ist, ob die Unterschiede im Wirkungseintritt der verschiedenen Statine im Zusammenhang mit ihrer unterschiedlich starken Potenz oder Lipophilie stehen. Sönmez et al. (2005) untersuchten im Gegensatz dazu die unmittelbare relaxierende Wirkung von Statinen. Nach ähnlichem Versuchprotokoll wurden Gefäßringe der Aorta maximal mittels Noradrenalin vorkontrahiert und dann in aufsteigenden Dosierungen mit Ceriva-, Atorva- oder Pravastatin inkubiert. Alle drei Statine haben einen positiven Effekt, am stärksten vasorelaxierend wirkt Cerivastatin.

Tesfamariam (1999), Bergdahl (2003) und Mraiche (2005) kommen zu dem Ergebnis, dass Pravastatin im Vergleich zu Simvastatin und Atorvastatin in vitro keinen Effekt auf die mit Noradrenalin induzierte Vasokonstriktion hat. Einschränkend sei die hydrophile Eigenschaft von Pravastatin, die eine intrazelluläre Aufnahme außerhalb der Leber erschwere.

Ergebnisse der Zellkultur aus der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass Pravastatin auch in vitro in glatten Gefäßmuskelzellen wirkt. Eine durch LPS gesteigerte ROCK-Aktivität konnte durch die Inkubation mit Pravastatin vermindert werden. Diese Studie kann daher als Hinweis für eine intrazelluläre extrahepatische Wirkung von Pravastatin dienen.

Im Bezug auf die Wirkung von Pravastatin im lebenden Organismus zeigen die Ergebnisse der zweiwöchigen Behandlung mit Pravastatin exemplarisch, dass Pravastatin einen klinischen Nutzen in der Behandlung von Adipositas und damit assoziiertem arteriellen Hypertonus haben könnte. Der Effekt der abgeschwächten Vasokonstriktion kann auf einem Mangel an Isopreniden beruhen, der durch eine Störung der hepatischen Cholesterinbiosynthese durch Pravastatin entsteht und eine verminderte Aktivität von Rho zur Folge hat. Bereits eine niedrige Statindosis von 10 mg/kg/Tag (Atorvastatin, Simvastatin und Pravastatin) verbessert im Diabetes induzierten Rattenmodell effektiv und lipid-unabhängig die Herz-Kreislauffunktion (Crespo et al. 2015) und vermindert die Media-Dicke der Aorta sowie eine perivaskuläre Fibrosierung.

Ghaffari et al. (2011) und Sönmez et al. (2005) kommen zu dem Ergebnis, dass der positive Effekt von Pravastatin Endothel-abhängig ist. Ghaffari schließt eine Endothel-unabhängige Wirkung von Pravastatin auf Noradrenalin -induzierte Vasokonstriktion komplett aus.

Hingegen führt eine Entfernung des Endothels nach Beobachtung von Sönmez et al zu einer signifikanten Abschwächung der Vasorelaxation durch Statine, hebt sie aber nicht komplett auf. Simvastatin, Atorvastatin, Cerivastatin und Fluvastatin wirken direkt vasorelaxierend und Endothel-unabhängig über die Hyperpolarisation der Zellmembran (Mukai et al. 2003, Alvarez de Sotomayor 2001). Der Kalzium-Einstrom über spannungsabhängige Kalzium-Kanäle sowie die Freisetzung aus intrazellulären Speichern wird gehemmt, die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert.

In Abwesenheit des Endothels wird eine höhere Statindosis benötigt, um einen positiven Effekt zu erzielen, wie Shiga et al. (2005) für Simvastatin (1×10^{-4} mol/l) und Mukai für Cerivastatin zeigen. Auch Saluveer und Alp bestätigten die Endothel-unabhängige Wirkung von Atorvastatin.

Ob die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf einen endothelabhängigen oder unabhängigen Effekt zurückzuführen sind bleibt offen und bedarf weiterer Untersuchungen. Bestimmung der ROCK Aktivität aus den Gefäßringen der adipösen Mäusen waren nicht auswertbar.

In der vorliegenden Arbeit war die KPSS-induzierte Kontraktilität in allen Gruppen identisch und nicht wesentlich beeinflussbar durch Pravastatin. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Tesfamariam (1999) und lässt darauf schließen, dass ROCK nicht in diesen durch Depolarisation ausgelösten Kontraktionsmechanismus involviert ist. Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von Urban et al. (2003), die eine Kalzium-Sensibilisierung und ROCK Aktivierung auch durch die Depolarisation mittels Kaliumchlorid nachweisen konnten. Mittels ROCK- Inhibitor Y-27632 oder Fasudil lässt sich die mit Kalium (60mM) induzierte Kontraktion der glatten Muskelzellen aufheben (Mita et al. 2002).

Auffällig waren in der vorliegenden Arbeit, dass sich das Ausmaß der Kontraktilität auf KPSS und Noradrenalin in den Kontrollgruppen unterschied, abhängig davon ob die Gefäßringe sofort nach der Entnahme untersucht wurden oder erst am nächsten Tag. Man würde eine identische Reaktion auf die maximale Konzentration von Noradrenalin bei allen Gefäßringen der Kontrollgruppen erwarten. Interessanterweise scheint die Inkubation der Gefäße die Kontraktilität doch zu beeinflussen. Ein direkter Vergleich der behandelten Gruppen untereinander ist dadurch nicht sinnvoll.

Eine vasokonstriktorische Hyperreaktivität der glatten Gefäßmuskelzellen bei Diabetes ist bekannt, Xie et al. (2006) stellen eine erhöhte ROCK-Aktivität in direkten Zusammenhang mit einer erhöhten Blutglukosekonzentration. Eine Inkubation von glatten Gefäßmuskelzellen in einer Nährlösung mit erhöhter Glukose führte zeitabhängig zu einer zunehmenden durch ROCK induzierten Phosphorylierung der Myosinphosphatase, reversibel durch Y-26732. Ein erhöhter Glukosespiegel führt demnach zu einer zunehmenden Aktivierung von RhoA und ROCK.

Mehrere klinische Studien kommen zu der Erkenntnis, dass das Ansprechen von ROCK-Inhibitoren von der Aktivität der Rho-Kinase abhängig ist. Erst eine vermehrte Aktivität von ROCK ermöglicht das Ansprechen auf den Inhibitor (Masumoto et al. 2001, Nohria et al. 2006). In einer japanischen Studie reduzierte Pravastatin (Therapie über 3 Monate) signifikant den arteriellen Blutdruck von Hypertonikern, wohingegen die Behandlung der

Kontrollgruppe mit normotensiven Blutdruckwerten keine Veränderung erfuhr (Kawano et al. 2006).

Wie bei allen Medikamenten gilt es, Nutzen und Risiko abzuwägen. Auf die Myotoxizität von Statinen richtet sich das Hauptaugenmerk der Untersuchung von Kang et al. (2014). Bereits eine niedrige Dosierung von Simvastatin mit 1 μM hat einen signifikanten Effekt auf die Vasokonstriktion, 10 μM verringern die durch Noradrenalin induzierte Vasokonstriktion um mehr als 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine erhöhte Apoptoserate von glatten Muskelzellen wurde bereits nach 24 Stunden Simvastatin Inkubation (10 μM) registriert. Kang et al. liefern damit einen weiteren Beweis für eine der wichtigsten Nebenwirkungen der Statintherapie, die nicht nur Skelett- und Herzmuskulatur, sondern auch glatte Gefäßmuskelzellen betrifft.

Es fällt der Begriff der Simvastatin induzierten glatten Gefäßmuskel Dysfunktion. Zusätzlich beobachteten sie strukturelle Veränderungen der Aorta bei Ratten, die 80 mg/kg/d Simvastatin für sieben Tage erhalten hatten. Sowohl das Gefäßlumen als auch die Media Dicke waren im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert. Eine kombinierte Behandlung mit Geranylgeraniol konnte die Wirkung von Simvastatin abschwächen. Auch Endothelzellen reagieren mit einer erhöhten Apoptoserate nach längerer Lovastatin Inkubation (Li et al. 2002).

Als molekulare Schalter spielt Rho eine wichtige Rolle im Zellzyklus und greift dementsprechend auch in die Regulation der Apoptose ein (Shi et al. 2007). Diese Eigenschaft lässt sich klinisch ausnutzen, zum Beispiel in der Therapie maligner Tumorerkrankungen (Kato et al. 2010) oder auch postinterventionell zur Prophylaxe von Restenosen nach Angioplastien (Erl et al. 2005).

Für Pravastatin spricht die hydrophile Eigenschaft, welche die systemische Wirkung positiv beeinflusst und im Vergleich zu Atorvastatin ein geringeres Auftreten von Nebenwirkungen aufweist (Pfeffer et al. 2002). Eine japanische Kohortenstudie über sechs Jahre (Chang et al. 2013) zur Untersuchung der muskulären Nebenwirkungen von Statinen wertete Patientendaten von 18 036 Patienten aus. Pravastatin wies, im Vergleich mit anderen Statinen (Atorvastatin, Rosuvastatin, Pitavastatin, Simvastatin und Fluvastatin), die geringste Inzidenz (0,45 pro 1000 Personen-Jahre) für muskuläre Nebenwirkungen auf. Auch scheint eine geringe Tagesdosis von 10-20 mg Pravastatin plus eine lipidarme Diät ausreichend zu sein, um das kardiovaskuläre Risiko zu senken (Sirtori et al. 2006).

Es stellt sich die Frage, welche Auswirkungen eine Langzeittherapie mit Pravastatin auf die Muskulatur hat. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Wichtig ist die Dosierung, wie sich in vielen Studien zeigt. Bereits eine geringe Dosierung reicht aus, um den wünschenswerten Effekt auf die Gefäßmuskulatur zu erzielen. Besonders in Kombination wurden bereits Empfehlungen für eine kombinierte Statintherapie ausgesprochen. So empfehlen Lee et al. (2012) eine Kombinationstherapie von Statinen und Renin-Angiotensin- Inhibitoren (Simvastatin-Losartan), um eine steigende Insulinresistenz zu verhindern. Eine Kombinationstherapie wäre eine gute Lösung für Patienten mit arteriellem Hypertonus, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, metabolischem Syndrom oder Übergewicht zum Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen.

Die Suche nach dem optimalen Mittel zur Blutdruckkontrolle bei Übergewichtigen läuft weiter und die Rolle der Rho-Kinase gewinnt an Bedeutung, da sich die Therapie deutlich adressieren lässt. Derzeit fehlt es noch an Langzeitstudien zu ROCK-Inhibitoren und deren längerfristigen Einfluss auf Mortalität und Morbidität.

Auch besteht weiterhin die Frage nach der Differenzierung und genaueren Identifizierung der beiden Subtypen ROCK 1 und ROCK 2. In welchem Signalweg spielt welche Subklasse eine Rolle?

Auch stellt sich die Frage des Nutzen/Nebenwirkungs Profils. Welche Dosierung ist nötig um einen positiven Einfluss auf die Vasokonstriktion zu erreichen ohne Nebenwirkungen wie Myopathie und Creatinkinase Erhöhung herbei zu führen?

Ab welchem Lebensalter empfiehlt sich eine Behandlung beziehungsweise welche Risikofaktoren sind ausschlaggebend?

Und wäre ein ROCK selektiver Inhibitor wie beispielsweise Fasudil oder Y-27632 eine gute Alternative zu Statinen?

Deshalb sollte die ROCK-Inhibition in klinischen Studien weiter evaluiert werden.

6. Zusammenfassung

Weltweit steigt die Zahl der übergewichtigen Menschen, in den entwickelten Industrienationen ist Übergewicht bereits im Kindesalter schon stark ausgeprägt. Damit einher geht eine zunehmende Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren, unter denen die arterielle Hypertonie mit 45% in Europa vertreten ist. Früherkennung und Prävention bekommen daher eine immer größere Bedeutung.

Im Fokus internationaler Studien stehen Statine und die lipidunabhängigen Effekte, die bereits nach kurzer Therapie einen positiven Einfluss auf das Herz-Kreislaufsystem haben. Die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase vermindert auch die Synthese von Cholesterinzwischenprodukten (Isoprenylderivaten), die eine wichtige Rolle in der Regulation zahlreicher Zellfunktionen spielen. Sie sind essentiell für die Aktivierung GTP-bindender Proteine wie RhoA, welches unter anderem den Muskeltonus glatter Gefäßmuskulatur reguliert.

Eine Störung der Aktivität der glatten Muskelzellen, ausgelöst durch eine Überaktivität der Rho-Kinase bei Adipositas, wird als Auslöser für die essentielle Hypertonie verantwortlich gemacht. Studien zeigen, dass Statine die Gefäßfunktion beeinflussen und dass Pravastatin zudem einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung von Adipositas und den damit assoziierten Erkrankungen hat. So ergibt sich für diese Arbeit die Fragestellung, ob Pravastatin bei diätinduzierter Adipositas die Gefäßfunktion beeinflusst.

Der Einfluss von Pravastatin auf die Gefäßfunktion wurde an Aortenringen von Mäusen untersucht, die für zwei Wochen eine hochkalorische Diät erhalten hatten. Eine Gruppe wurde zusätzlich mit Pravastatin (50 mg/kg/d) im Trinkwasser behandelt. Zusätzlich zu der in vivo Behandlung gab es zwei weitere Behandlungsgruppen, für die Aortenringe ex vivo jeweils eine Stunde oder 24 Stunden mit Pravastatin inkubiert wurden. Mit einem Myographen wurde die Gefäßkontraktilität nach einem standardisierten Protokoll untersucht. Auf molekularer Ebene wurde die Rho-Kinase Aktivität von glatten Gefäßmuskelzellen nach Inkubation mit Pravastatin bestimmt.

Interessanterweise zeigte sich, dass Pravastatin in vivo die Entwicklung des Körpergewichts unter hochkalorischer Diät beeinflusst und auch positiv auf den Blutdruck wirkt. Die Kontrolltiere nahmen im Vergleich zu der mit Pravastatin behandelten Gruppe im Durchschnitt das Doppelte an Körpergewicht zu. Zudem hatten die mit Pravastatin behandelten Tiere tendenziell einen geringeren Blutdruck als die Tiere der Vergleichsgruppe, wobei die Variabilität der systolischen Blutdrücke in der behandelten Gruppe relativ groß war.

Im Hinblick auf die Gefäßfunktion zeigte sich, dass Pravastatin die Kontraktilität der Gefäßringe in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer beeinflusst. Eine abgeschwächte Reaktion wird vor allem bei der durch Noradrenalin-ausgelösten Vasokonstriktion beobachtet, hier besonders für die mittleren Konzentrationen, wohingegen die Depolarisation mit Kaliumchlorid in allen Gruppen zu einer ähnlich starken Vasokonstriktion führt. Auf zellulärer Ebene bestätigte sich, dass Pravastatin die ROCK-Aktivität mit zunehmender Inkubationszeit stärker hemmt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Pravastatin die Gefäßfunktion bei diätinduzierter Adipositas positiv beeinflusst.

Weitere Untersuchungen bezüglich der Dosierung und der Auswirkung einer Langzeittherapie sind notwendig und Gegenstand aktueller Forschung.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Pathomechanismen der Hochdruckentstehung bei Übergewicht

Abb. 2 Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur

Abb. 3 Inhibition von Rho durch Statine

Abb. 4 Verdünnungsreihen für die Noradrenalin- Dosis-Antwort-Kurve zur Bestimmung der Gefäßkontraktilität.

Abb. 5 Aufbau des Mulvany Myographen

Abb. 6 Überblick der applizierten Dosen für die Noradrenalin- und Acetylcholin-Dosis-Wirkungskurve.

Abb. 7 Gewichtszunahme nach 2 Wochen

Abb. 8 Darstellung des Systolischen Blutdrucks und des mittleren arteriellen Blutdrucks

Abb. 9 KPSS induzierte Vasokonstriktion zu Beginn der Untersuchung

Abb. 10 Noradrenalin induzierte Vasokonstriktion als zweiter Schritt der Vitalitätsprüfung

Abb. 11 Dosis-Antwortkurve für Noradrenalin induzierte Vasokonstriktion nach einstündiger in vitro Inkubation mit Pravastatin

Abb. 12 Dosis-Antwortkurve für Noradrenalin induzierte Vasokontraktion nach 24 Stunden in vitro Inkubation mit Pravastatin

Abb. 13 Dosis-Antwortkurve für Noradrenalin induzierte Vasokontraktion nach 2 Wochen in vivo Behandlung mit Pravastatin

Abb. 14 Acetylcholin induzierte

Abb. 15 ROCK-Aktivität in

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Gewichtszunahme und Blutdruck

Tabelle 2 Vasokonstriktion in %

8. Literaturverzeichnis

1. A coronary primary prevention study of Scottish men aged 45-64 years: trial design. The West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *J Clin Epidemiol.* 1992;45(8):849-860.
2. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med.* 1998;339(19):1349-1357.
3. Akhtar R, Sherratt MJ, Cruickshank JK, Derby B. Characterizing the elastic properties of tissues. *Mater Today (Kidlington).* 2011;14(3):96-105.
4. Alp Yildirim Fİ, Kaleli Durman D, Aypar E, Ark M, Özdemir O, Uydeş Doğan BS. Atorvastatin acutely reduces the reactivity to spasmogens in rat aorta: implication of the inhibition of geranylgeranylation and MYPT-1 phosphorylation. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 2016;30(2):96-106.
5. Alvarez de Sotomayor M, Perez-Guerrero C, Herrera MD, Marhuenda E. Effect of simvastatin on vascular smooth muscle responsiveness: involvement of Ca(2+) homeostasis. *Eur J Pharmacol.* 2001;415(2-3):217-224.
6. Antic V, Kiener-Belforti F, Tempini A, Van Vliet BN, Montani JP. Role of the sympathetic nervous system during the development of obesity-induced hypertension in rabbits. *Am J Hypertens.* 2000;13(5 Pt 1):556-559.
7. Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Kakuma T, Yoshimatsu H. Effects of pravastatin on obesity, diabetes, and adiponectin in diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(9):2068-2073.
8. Bergdahl A, Persson E, Hellstrand P, Sward K. Lovastatin induces relaxation and inhibits L-type Ca(2+) current in the rat basilar artery. *Pharmacol Toxicol.* 2003;93(3):128-134.
9. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *New England Journal of Medicine.* 2003;348(17):1625-1638.
10. Chang CH, Kusama M, Ono S, Sugiyama Y, Orii T, Akazawa M. Assessment of statin-associated muscle toxicity in Japan: a cohort study conducted using claims database and laboratory information. *BMJ Open.* 2013;3(4).
11. Chevrier V, Piel M, Collomb N, Saoudi Y, Frank R, Paintrand M, Narumiya S, Bornens M, Job D. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *J Cell Biol.* 2002;157(5):807-817.
12. Crespo MJ, Quidgley J. Simvastatin, atorvastatin, and pravastatin equally improve the hemodynamic status of diabetic rats. *World J Diabetes.* 2015;6(10):1168-1178.
13. Dong M, Yan BP, Liao JK, Lam YY, Yip GW, Yu CM. Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Discov Today.* 2010;15(15-16):622-629.
14. Erl W. Statin-induced vascular smooth muscle cell apoptosis: a possible role in the prevention of restenosis? *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2005;5(2):135-144.
15. Fronhoffs S, Mengden T, Oliveira J, Sachinidis A, Vetter H. Cholesterol enhances contractile responses in isolated small mesenteric arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension.* 1999;17(12):1941-1947.
16. Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, Abe K, Takeshita A, Shimokawa H. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart.* 2005;91(3):391-392.
17. Ghaffari N, Ball C, Kennedy JA, Stafford I, Beltrame JF. Acute modulation of vasoconstrictor responses by pravastatin in small vessels. *Circ J.* 2011;75(6):1506-1514.
18. Glorioso N, Troffa C, Filigheddu F, Dettori F, Soro A, Parpaglia PP, Collatina S, Pahor M. Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. *Hypertension.* 1999;34(6):1281-1286.
19. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343(6257):425-430.
20. Golomb BA, Criqui MH, White HL, Dimsdale JE. The UCSD Statin Study: a randomized controlled trial assessing the impact of statins on selected noncardiac outcomes. *Control Clin Trials.* 2004;25(2):178-202.
21. Goode GK, Garcia S, Heagerty AM. Dietary Supplementation With Marine Fish Oil Improves In Vitro Small Artery Endothelial Function in Hypercholesterolemic Patients. *A Double-Blind Placebo-Controlled Study.* 1997;96(9):2802-2807.
22. Gordon T, Kannel WB. Obesity and cardiovascular diseases: the Framingham study. *Clin Endocrinol Metab.* 1976;5(2):367-375.
23. Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti Trevano F, Bolla GB, Mancia G. Effect of central and peripheral

- body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens*. 2004;22(12):2363-2369.
24. Guclu F, Ozmen B, Hekimsoy Z, Kirmaz C. Effects of a statin group drug, pravastatin, on the insulin resistance in patients with metabolic syndrome. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(10):614-618.
 25. Guo F, Garvey WT. Trends in Cardiovascular Health Metrics in Obese Adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1988-2014. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(7).
 26. Hague WE, Simes J, Kirby A, Keech AC, White HD, Hunt D, Nestel PJ, Colquhoun DM, Pater H, Stewart RA, Sullivan DR, Thompson PL, West M, Glasziou PP, Tonkin AM. Long-Term Effectiveness and Safety of Pravastatin in Patients With Coronary Heart Disease. *Sixteen Years of Follow-Up of the LIPID Study*. 2016;133(19):1851-1860.
 27. Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypertens*. 2001;14(6 Pt 2):103s-115s.
 28. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1998;101(12):2711-2719.
 29. Igel M, Sudhop T, Bergmann Kv. Nichtlipidsenkende: Effekte von Statinen. *Dtsch Arztebl International*. 2004;101(6):352-.
 30. Jarajapu YP, Knot HJ. Relative contribution of Rho kinase and protein kinase C to myogenic tone in rat cerebral arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(5):H1917-1922.
 31. Kajikawa M, Noma K, Maruhashi T, Mikami S, Iwamoto Y, Iwamoto A, Matsumoto T, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Nakashima A, Goto C, Liao JK, Higashi Y. Rho-associated kinase activity is a predictor of cardiovascular outcomes. *Hypertension*. 2014;63(4):856-864.
 32. Kang S, Woo HH, Kim K, Lim KM, Noh JY, Lee MY, Bae YM, Bae ON, Chung JH. Dysfunction of vascular smooth muscle and vascular remodeling by simvastatin. *Toxicol Sci*. 2014;138(2):446-556.
 33. Kassan M, Sevilla MA, Gonzalez-Santos JM, Lopez-Rodriguez J, Sorli MJ, Codoner MB, Montero MJ. Pravastatin improves endothelial function in arteries used in coronary bypass grafting. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;61(6):513-519.
 34. Kato S, Smalley S, Sadarangani A, Chen-Lin K, Oliva B, Branes J, Carvajal J, Gejman R, Owen GI, Cuello M. Lipophilic but not hydrophilic statins selectively induce cell death in gynaecological cancers expressing high levels of HMGCoA reductase. *J Cell Mol Med*. 2010;14(5):1180-1193.
 35. Kawano H, Yano K. Pravastatin decreases blood pressure in hypertensive and hypercholesterolemic patients receiving antihypertensive treatment. *Circ J*. 2006;70(9):1116-1121.
 36. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273(5272):245-248.
 37. Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(3):138-142.
 38. Koh KK, Quon MJ, Sakuma I, Han SH, Choi H, Lee K, Shin EK. Differential metabolic effects of rosuvastatin and pravastatin in hypercholesterolemic patients. *Int J Cardiol*. 2013;166(2):509-515.
 39. Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997;272(19):12257-12260.
 40. Laufs U, Liao JK. Targeting Rho in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*. 2000;87(7):526-528.
 41. Lee BS, Choi JY, Kim JY, Han SH, Park JE. Simvastatin and losartan differentially and synergistically inhibit atherosclerosis in apolipoprotein e(-/-) mice. *Korean Circ J*. 2012;42(8):543-550.
 42. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*. 1995;270(49):29051-29054.
 43. Li X, Liu L, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Sebt SM, Hamilton AD, Harlan JM. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(18):15309-15316.
 44. Liu P-Y, Chen J-H, Lin L-J, Liao JK. Increased Rho Kinase Activity in a Taiwanese Population With Metabolic Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(15):1619-1624.
 45. Loirand G, Guérin P, Pacaud P. Rho Kinases in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. *Circulation Research*. 2006;98(3):322-334.
 46. Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A. *Hypertension*. 2001;38(6):1307-1310.
 47. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP

- binding protein Rho. *Embo j.* 1996;15(9):2208-2216.
48. Merkel LA, Rivera LM, Bilder GE, Perrone MH. Differential alteration of vascular reactivity in rabbit aorta with modest elevation of serum cholesterol. *Circulation Research.* 1990;67(3):550-555.
 49. Mita M, Yanagihara H, Hishinuma S, Saito M, Walsh MP. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem J.* 2002;364(Pt 2):431-440.
 50. Mraiche F, Cena J, Das D, Vollrath B. Effects of statins on vascular function of endothelin-1. *Br J Pharmacol.* 2005;144(5):715-726.
 51. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Hiroki J, Kunihiro I, Fujiki T, Takeshita A. Acute vasodilator effects of HMG-CoA reductase inhibitors: involvement of PI3-kinase/Akt pathway and Kv channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42(1):118-124.
 52. MUKAI Y, SHIMOKAWA H, MATOBA T, KANDABASHI T, SATOH S, HIROKI J, KAIBUCHI K, TAKESHITA A. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *The FASEB Journal.* 2001;15(6):1062-1064.
 53. Nickenig G, Baumer AT, Temur Y, Kebben D, Jockenhovel F, Bohm M. Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation.* 1999;100(21):2131-2134.
 54. Nohria A, Grunert ME, Rikitake Y, Noma K, Prsic A, Ganz P, Liao JK, Creager MA. Rho Kinase Inhibition Improves Endothelial Function in Human Subjects With Coronary Artery Disease. *Circulation Research.* 2006;99(12):1426-1432.
 55. Oh KS, Oh BK, Park CH, Seo HW, Kang NS, Lee JH, Lee JS, Ho Lee B. Cardiovascular effects of a novel selective Rho kinase inhibitor, 2-(1H-indazole-5-yl)amino-4-methoxy-6-piperazino triazine (DW1865). *Eur J Pharmacol.* 2013;702(1-3):218-226.
 56. Oishi K, Zheng B, Kuo JF. Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J Biol Chem.* 1990;265(1):70-75.
 57. Ordway RW, Singer JJ, Walsh JV, Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.* 1991;14(3):96-100.
 58. O'Rourke M, Docherty JR. Effects of a high-cholesterol diet on vascular and endothelial function in rat aorta. *Pharmacology.* 1998;56(1):1-6.
 59. Pfeffer MA, Keech A, Sacks FM, Cobbe SM, Tonkin A, Byington RP, Davis BR, Friedman CP, Braunwald E. Safety and tolerability of pravastatin in long-term clinical trials: prospective Pravastatin Pooling (PPP) Project. *Circulation.* 2002;105(20):2341-2346.
 60. Ross KR, Darrah RJ, Hodges CA, Lang L, Kelley TJ. Increased Expression of RhoA in Epithelium and Smooth Muscle of Obese Mouse Models: Implications for Isoprenoid Control of Airway Smooth Muscle and Fibroblasts. *Journal of Allergy.* 2013;2013:740973.
 61. Saliashvili G, Davis WW, Harris MT, Le NA, Brown WV. Simvastatin improved arterial compliance in high-risk patients. *Vasc Endovascular Surg.* 2004;38(6):519-523.
 62. Saluveer O, Bergh N, Grote L, Andersson O, Hrafnkelsdottir TJ, Widgren BR. Acute vascular effects of atorvastatin in hypertensive men: a pilot study. *Scand Cardiovasc J.* 2013;47(5):275-280.
 63. Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 2011;301(2):H287-H296.
 64. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 1995;333(20):1301-1307.
 65. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55(2):61-75.
 66. Shiga N, Hirano K, Hirano M, Nishimura J, Nawata H, Kanaide H. Long-Term Inhibition of RhoA Attenuates Vascular Contractility by Enhancing Endothelial NO Production in an Intact Rabbit Mesenteric Artery. *Circulation Research.* 2005;96(9):1014-1021.
 67. Shige H, Dart A, Nestel P. Simvastatin improves arterial compliance in the lower limb but not in the aorta. *Atherosclerosis.* 2001;155(1):245-250.
 68. Sirtori CR, Calabresi L. Japan: are statins still good for everybody? *Lancet.* 2006;368(9542):1135-1136.
 69. Slany J. Hochdruck und Adipositas. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 2008;158(13-14):370-372.
 70. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1325-1358.
 71. Song Y, Chen X, Wang LY, Gao W, Zhu MJ. Rho kinase inhibitor fasudil protects against beta-amyloid-induced hippocampal neurodegeneration in rats. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19(8):603-610.
 72. Sönmez Uydeş-Doğan B, Topal G, Takır S, İlkay Alp F, Kaleli D, Özdemir O. Relaxant effects of pravastatin, atorvastatin and cerivastatin on isolated rat aortic rings. *Life Sciences.* 2005;76(15):1771-1786.
 73. Stepniakowski KT, Goodfriend TL, Egan BM. Fatty acids enhance vascular alpha-adrenergic sensitivity.

- Hypertension*. 1995;25(4 Pt 2):774-778.
74. Strandberg TE, Pyörälä K, Cook TJ, Wilhelmsen L, Faergeman O, Thorgeirsson G, Pedersen TR, Kjekshus J. Mortality and incidence of cancer during 10-year follow-up of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *The Lancet*. 364(9436):771-777.
 75. Strazzullo P, Kerry SM, Barbato A, Versiero M, D'Elia L, Cappuccio FP. Do statins reduce blood pressure?: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*. 2007;49(4):792-798.
 76. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*. 2013;93(1):359-404.
 77. Tesfamariam B, Frohlich BH, Gregg RE. Differential effects of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin on Ca²⁺ release and vascular reactivity. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34(1):95-101.
 78. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389(6654):990-994.
 79. Urban NH, Berg KM, Ratz PH. K⁺ depolarization induces RhoA kinase translocation to caveolae and Ca²⁺ sensitization of arterial muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(6):C1377-1385.
 80. Wang Y, Zheng XR, Riddick N, Bryden M, Baur W, Zhang X, Surks HK. ROCK Isoform Regulation of Myosin Phosphatase and Contractility in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*. 2009;104(4):531-540.
 81. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rosen R, Bohm M, Nickenig G. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension*. 2001;37(6):1450-1457.
 82. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol*. 2005;184(2):291-318.
 83. Xie Z, Su W, Guo Z, Pang H, Post SR, Gong MC. Up-regulation of CPI-17 phosphorylation in diabetic vasculature and high glucose cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2006;69(2):491-501.
 84. Yamagishi S, Matsui T, Sato T, Takeuchi M. Protective role of pravastatin in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Med Hypotheses*. 2006;66(3):609-611.
 85. Yu Y, Ohmori K, Chen Y, Sato C, Kiyomoto H, Shinomiya K, Takeuchi H, Mizushige K, Kohno M. Effects of pravastatin on progression of glucose intolerance and cardiovascular remodeling in a type II diabetes model. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(4):904-913.

9. Veröffentlichung auf Tagungen und Kongressen

N. Klingberg, M. Baumann, C. Aoqui, U. Heemann, Pravastatin attenuates vasoconstriction in diet induced obesity, 25. European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, Milano, 2015

10. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Marcus Baumann für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die Betreuung meiner Arbeit und die Hilfe beim Korrekturlesen.

Herrn Prof. Dr. med. U. Heemann danke ich für die Aufnahme in seiner Abteilung und seinem Forschungslabor.

Ich danke meinem Mentor Herrn Dr. Stephan Kemmner.

Für die Einweisung im Labor und die Unterstützung bei den Experimenten danke ich Alina Schmidt, Claudia Guggenmoos, Martha Maria Lassak und Dr. med. Christiane Aochi.