

Endotheliale Dysfunktion bei inhalativem Rauchen :
Beeinflussbarkeit durch Nikotinkarenz und Gabe von Antioxidantien

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus – Liebig – Universität Gießen

vorgelegt von Sabrina Mehlhorn, geborene Ciesiolka
aus Duisburg

Gießen 2013

Aus der Medizinischen Klinik I

Abteilung für Kardiologie und Angiologie

Prof. Dr. C. Hamm

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

Gutachter : Prof. Dr. D. Sedding

Gutachter : Prof. Dr. J. Schneider

Tag der Disputation : 28.11.2013

Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body Mass Index
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C – natriuretisches Peptid
CRP	C – reaktives Protein
EDHF	Endothelial derived hyperpolarisation factor
EDNO	Endothelial derived Stickstoffmonoxid
EDRF	Endothelial derived relaxing -factor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid – Synthase
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen
FAD	Flavin – Adenosin – Dinukleotid
FGF	Fibroblast growth factor
FMD	Flussmodulierte Dilatation
FMN	Flavin – Mononukleotid
GSNO	S – Nitrosoglutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HDL	High – Density – Lipoprotein
ICAM1	Intercellular adhesion molecule – 1

IE	Internationale Einheiten
IGF	Insulin like growth factor
IL1b	Interleukin - 1 b
IL6	Interleukin - 6
i.v.	intravenös
LDL	Low – Density - Lipoprotein
Lp _a	Lipoprotein a
MetHb	Methämoglobin
MONICA	Monitoring Cardiovascular Disease – Studie der Weltgesundheitsorganisation über kardiovaskuläre Risikofaktoren
NaCl	Kochsalz
NADPH	Nicotinamiddinukleotidphosphat
NHANES III	Third National Health and Nutrition Examination Survey
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NOHb	Nitrosylhämoglobin
NOS	Stickstoffmonoxid – Synthase
O ₂ ⁻	Superoxidradikationen
OH [°]	Hydroxylradikale
ONOO ⁻	Peroxynitrit

PDGF	Platelet derived growth factor
PMN	Polymorphkernige neutrophile Leukocyten
py	Packyears (Anzahl gerauchter Jahre / 1 Schachtel / Tag / Jahr)
RNNO	Nitrosamine
RSNO	Nitrothiole
RXNO	Häm – Nitroverbindungen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VCAM – 1	Vascular cell adhesion molecule – 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Atherosklerose	1 – 5
1.2.	Metabolismus von Stickstoffmonoxid	5 – 8
1.3.	Endotheliale Dysfunktion	8 – 16
1.4.	Einfluss des Rauchens auf die NO – Bioverfügbarkeit / Rauchen als Risikofaktor	17 – 23
1.5.	Einfluss von Vitamin C auf die Endothelfunktion	23 – 24
1.6.	Fragestellung der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	25
2.1.	Studienprotokoll	25
2.2.	Studienkollektiv	25 – 26
2.3.	Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis	26 – 29
2.3.1.	Untersuchungsprotokoll	29 – 33
2.3.2.	Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers	33 – 34
2.4.	Laborbestimmungen	34
2.4.1.	Blutentnahme	34
	Bestimmungen der Laborparameter	34

2.4.2.	Bestimmung des Kotininspiegels	35
2.4.3.	Statistische Verfahren	35
2.5.		36 – 37
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Charakterisierung der Studienpopulation	37 – 38
3.2.	Flussmodulierte Vasodilatation (nativ)	38 – 39
3.3.	Flussmodulierte Vasodilatation mit Vitamin C	40 – 42
3.4.	Vasodilatation nach Nitroglyceringabe	42 – 43
4.	Diskussion	43
4.1.	Wesentliche Ergebnisse	43
4.2.	Methodenkritik	44
4.2.1	Messung der endothelialen Dysfunktion mit Hilfe der fluss- vermittelten Dilatation	44 – 47
4.3.		
4.4.	FMD und Nikotinkonsum	47 – 49
4.5.	FMD und Vitamin C	49 – 51
	Klinische Bedeutung und Ausblick	51 – 52
5.1.	Zusammenfassung	52 – 53
5.2.	Summary	54 – 55
6.	Tabellenanhang	56 – 66
7.	Literaturverzeichnis	67 – 81
8.	Danksagung	82

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen eine der Haupttodesursachen in der westlichen Welt dar. Allein 2004 starben 17 Millionen Menschen weltweit durch kardiovaskuläre Ursachen (1). Trotz eines neuen Gesundheitsbewußtseins, das eine Änderung des Lebensstils beinhaltet sowie pharmakologischen Hilfsmitteln zur Reduktion des Cholesterinspiegels nimmt die Mortalität weiter zu. Der überwiegende Teil kardiovaskulärer Todesfälle geht hierbei auf atherosklerotische oder atherothrombotische Erkrankungen zurück.

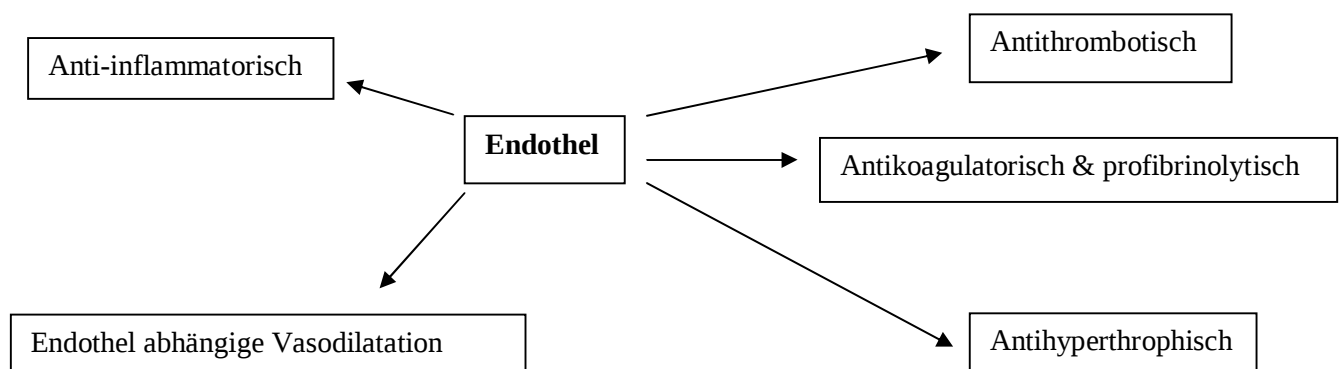
Nach heutigem Verständnis ist die Atherosklerose eine entzündliche Gefäßerkrankung (2-5), die vor allem mittlere und große Arterien betrifft (3). Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose sind u.a. erhöhte LDL – Spiegel (3-7), Diabetes mellitus (4-7), Nikotinabusus (5,6), arterielle Hypertonie (4-7) und genetische Veranlagung (5).

Als Initialzündung der Entstehung von Atherosklerose versteht man einen Funktionsverlust des Endothels, die sogenannte endotheliale Dysfunktion. Diese tritt bereits vor den ersten morphologisch fassbaren Veränderungen auf.

Die pathogenetisch initialen Veränderungen bei der Atheroskleroseentstehung betreffen die innerste Zellschicht der Gefäßwand, die Intima. Diese besteht aus einer einzigen Schicht von Endothelzellen, die neben einer reinen Barrierefunktion noch zahlreiche andere Funktionen ausübt (s. Abb. 1) (8). Neben parakrinen weist es auch endokrine Funktionen auf. Das Endothel ist in der Lage, je nach Abhängigkeit des Organs eine unterschiedliche Permeabilität aufzuweisen. Diese Permeabilitätsänderungen sind von den „tight junctions“, deren Moleküle, die Cadherinen, die die eigentliche Barrierefunktion übernehmen, abhängig (9). Das Endothel wird durch die Wirkung von Stickstoffmonoxid, Prostazyklin, Angiotensin II, Endothelin und PDGF u.a. für Lipoproteine durchlässiger (s. Abb. 2) (5). Zudem nimmt die prokoagulatorische Wirkung des Endothels zu (5). Unter physiologischen Bedingungen kommt es aufgrund der antithrombotischen Eigenschaften des Endothels zu keinem Anhaften der Zellen an der Oberfläche. Das intakte Endothel bildet fibrinolytisch wirksame und die Blutgerinnung hemmende Moleküle, wie z.B. den plasminogenaktivierenden Faktor und das Thrombomodulin, das Thrombin deaktiviert. Bei einer Schädigung der Zellen wird Thrombomodulin nicht mehr

gebildet und das Endothel wird thrombogen (9). Durch eine Inhibierung der Leukocytenadhäsion und –migration verfügt das Endothel über eine antiinflammatorische und durch die Hemmung der Zellproliferation und Migration der glatten Muskelzellen zugleich über eine antihypertrophische Wirkung (s. Abb. 1). Weiterhin reguliert das Endothel über die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO, vasodilatierend) und Endothelin (vasokonstringierend) Gefäßweite und –tonus.

Abbildung1 : Wirkungen des Endothels



Modifiziert nach : “Landmesser U, Hornig B, Drexler H; Endothelium Function : A Critical Determinant in Atherosclerosis ?; Circulation; 2004; 109”

Gleichzeitig werden Zytokine und Wachstumsfaktoren produziert. Falls der atheroskleroseauslösende Faktor nicht beseitigt wird, schreitet der Prozess der Atheroskleroseentstehung weiter voran, indem die Einwanderung und Proliferation von Muskelzellen gefördert wird. Daraus resultiert bei fortschreitender Anlagerung von Muskelzellen das sogenannte „Remodelling“ (5). Zur Verhinderung einer Lumeneinengung bei fortschreitender Verdickung der arteriellen Wand kompensiert das Endothel diese Einengung mit einer anpassenden allmählichen Erweiterung des Gefäßlumens. Durch die gesteigerte Chemotaxis von Monozyten, die nach ihrer Einwanderung ins Gewebe zu Makrophagen werden sowie der Einwanderung von T-Lymphocyten und deren Aktivierung mit Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren wird ein weiterer Schaden sowie eine lokale Nekrose induziert (3,4). Hieraus resultiert bei weiterer Einwanderung von Makrophagen und Muskelzellen ein Umbau der Läsion mit der Entstehung einer

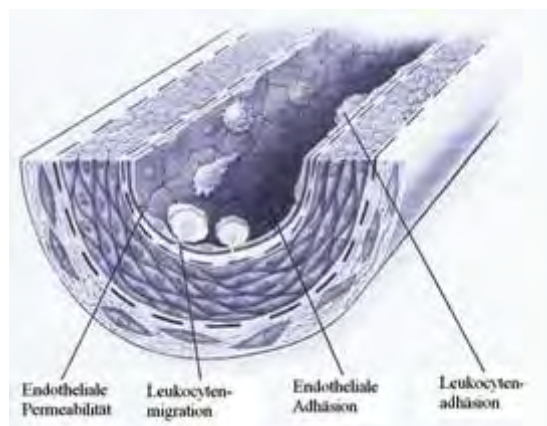
fibrotischen Kappe, die den lipidhaltigen Kern und das nekrotisierende Gewebe überdeckt (3) (s. Abb. 4). In diesem Stadium ist die Arterie nicht mehr in der Lage mit einer kompensatorischen Dilatation entgegenzuwirken (5).

Die ersten pathologisch bzw. anatomisch sichtbaren Veränderungen im Prozess der Atheroskleroseentstehung treten bereits im Kindesalter auf. Dabei handelt es sich um eine rein entzündliche Läsion, den sogenannten „Fatty streak“, der aus Makrophagen und T-Lymphocyten besteht (2, 3, 5) (s. Abb. 3).

Eine Hauptursache in der Entstehung der Atherosklerose stellen die durch oxidierte LDL verursachten Veränderungen von Phospholipiden und die Makrophagenaktivierung, die zur Gefäßschädigung führt, dar (10) (s. Abb. 5). Diese ist auch von der Menge des LDL – Cholesterins und somit der LDL – Cholesterinkonzentration im Blut abhängig. Wenn sich LDL in der Arterie anlagert, wird es oxidiert (2-5,11-13). Zudem wird durch oxidierte Phospholipide die Bindung von Monocyten ans Endothel sowie die Stimulation zur Bildung von Makrophagen colony stimulation factor gefördert.

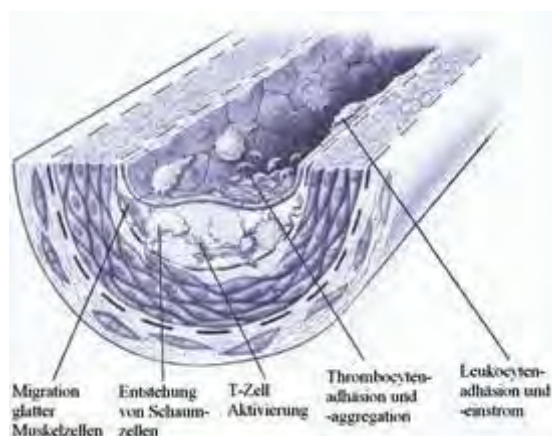
Die oxidierten Phospholipide werden im Endothel anschließend von Makrophagen aufgenommen. Diese werden durch die vereinfachte Anhäufung von Cholesterolestern zu aktivierten Schaumzellen (foam cells) (3,12). Durch oxidiertes LDL wird zudem die Einwanderung von Leukocyten in die Arterienwand sowie die Aktivierung von Thrombocyten induziert (3).

Abbildung 2 : Erste Endothelveränderungen



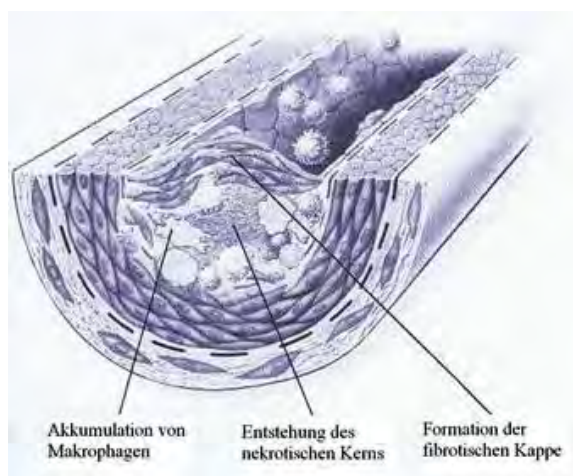
Erste atherosklerotische Veränderungen des Endothels. Erhöhte endotheliale Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile, was durch NO, Prostacyclin, PDGF, Angiotensin II und Endothelin vermittelt wird. Hochregulation der Leukozytenadhäsionsmoleküle (z.B. L-Selectin etc.) und endothelialen Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Selectin). Leukozytenmigration in die arterielle Wand, was z.B. durch oxidiertes LDL vermittelt wird.

Abbildung 3 : Entstehung von Schaumzellen



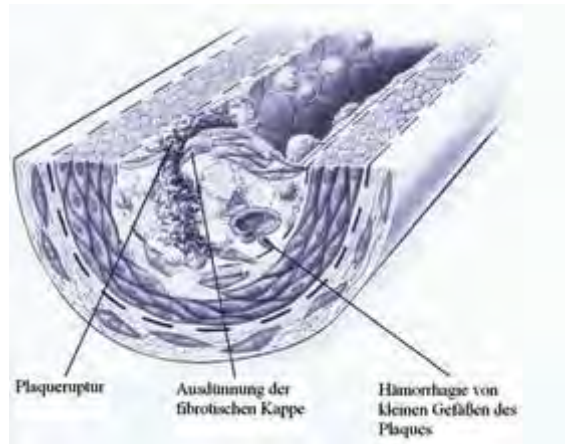
Formation des Fatty Streak (Monocyten, Schaumzellen (Makrophagen), T-Lymphocyten). Migration glatter Muskelzellen z.B. durch PDGF vermittelt, T-Zell-Aktivierung z.B. durch $\text{TNF } \alpha$ vermittelt. Entwicklung von Schaumzellen z.B. durch oxidiertes LDL verursacht, Thrombozytenaggregation z.B. durch Integrine verursacht.

Abbildung 4 : Entstehung der fibrotischen Kappe



Entstehung einer fibrotischen Kappe (Leukozyten, Lipide), die ins Gefäßlumen ragt. Kontinuierliche Leukozytenadhäsion an der Läsion. Entstehung der fibrotischen Kappe u.a. durch PDGF und $\text{TNF } \alpha$ vermittelt.

Abbildung 5 : Ruptur des Plaque



Ruptur der fibrotischen Kappe bzw. des fibrotischen Plaque. Dies geschieht durch Ausdünnung der fibrotischen Kappe, welche u.a. durch Aktivierung von Makrophagen verursacht wird. Diese setzen z.B. Metalloproteinasen frei, die zu Hämorrhagien der Vasa vasorum führen können.

Modifiziert nach : “Ross R., *Atherosclerosis – An Inflammatory Disease*; NEJM; 1999; 340;2”

1.2. Metabolismus von Stickstoffmonoxid

Ein wichtiger Aspekt bei der endothelialen Dysfunktion stellt die eingeschränkte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) dar (14,15). Aus diesem Grund soll zunächst auf den Metabolismus und die biochemischen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid eingegangen werden.

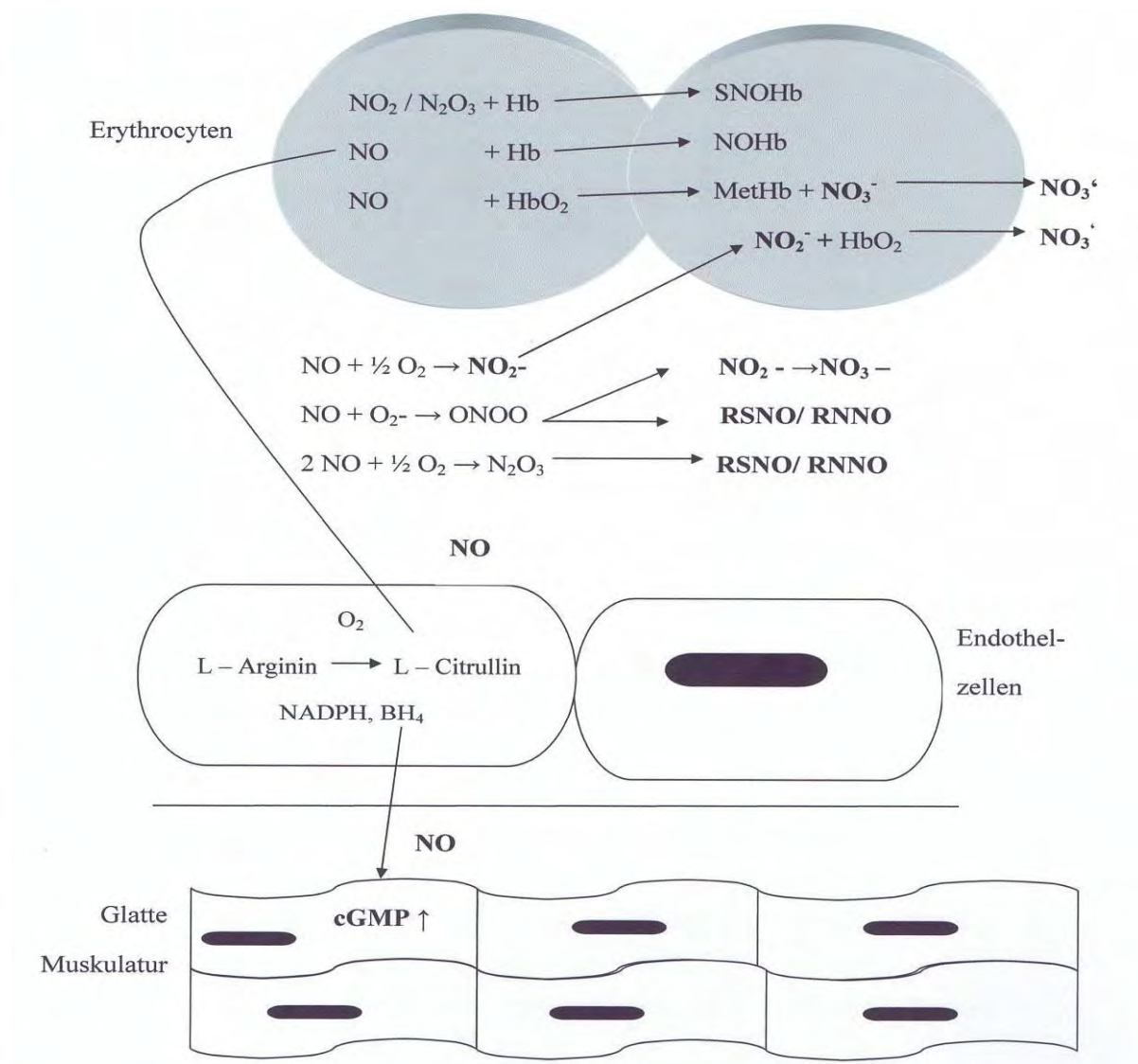
Furchgott und Zawadzki (16) entdeckten schon 1980, dass isolierte Gefäße nur bei einem intakten Gefäßendothel auf Acetylcholin und Bradykinin mit Vasodilatation reagieren, wohingegen nach der Entfernung des Endothels eine Vasokonstriktion erfolgte. In den darauffolgenden Jahren belegten immer mehr wissenschaftliche Arbeiten, dass Endothelzellen kontinuierlich und unter Stimulation mit vasoaktiven Mediatoren eine kurzlebige Substanz freisetzen. Diese bewirkte eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und eine Hemmung der Thrombocytenadhäsion. Zunächst war die chemische Struktur dieser neuen Substanz unbekannt, weshalb man sie zuerst als „Endothelium-derived-relaxing-factor“ (EDRF) bezeichnete (17). In den darauffolgenden Jahren konnten Palmer et al. (18), Ignarro et al. (19) sowie Kelm et al. (20) nachweisen, dass der von den Endothelzellen unter basalen und stimulierten Bedingungen freigesetzte EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist.

Die Bildung von NO geschieht im Endothel aus L-Arginin (20-22). In einer Redoxreaktion wird durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) NO und L – Citrullin (23,24) gebildet. Diese ist ein primär gebundenes Protein, welches in den Caveolae der Membran gespeichert wird (22). Die Oxidationszahl des Stickstoffatoms im L-Arginin beträgt -3 und steigt nach der Oxidation zum NO auf +2 auf. Somit findet ein Nettotransfer von 5 Elektronen statt. Weitere Cofaktoren bei dieser Reaktion stellen u.a. BH_4 , NADPH, FAD, FMN und molekularer Sauerstoff dar (25,26).

In biologischen Medien ist Stickstoffmonoxid sehr labil und hat im Vollblut lediglich eine kurze Halbwertszeit von 5,6 Sekunden bei 37°C Körpertemperatur (22,27). Das farblose Gas kann als freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron und neutraler Ladung frei über die Zellmembran hinweg aus der Gefäßendothelzelle in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand und ins Gefäßlumen diffundieren. In der glatten Muskelzelle der Gefäßwand bewirkt NO über eine Aktivierung der Guanylatzyklase und die Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels eine Vasodilatation (25,27) und eine Verringerung sowie Aggregation von Thrombocyten (21). Im Vollblut hingegen wird NO durch Oxidation zu Nitrit und Nitrat abgebaut (26). Durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff wird der Großteil des gebildeten NO zu Nitrit abgebaut (28,29). Mittels weiterer Oxidation mit oxygeniertem Hämoglobin innerhalb der Erythrocyten entsteht Nitrat unter Bildung von Methämoglobin (30). Eine weitere Abbaumöglichkeit stellt die direkte Oxidation mit HbO_2 zu Nitrat im Vollblut dar. Dies geschieht nach der Diffusion in einen Erythrocyten unter Methämoglobinbildung (31-33). Eine Übersicht über die Stoffwechselwege des NO gibt Abbildung 6 wieder.

Neben NO produziert die eNOS in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von L-Arginin und dem Redoxzustand der Kofaktoren auch Superoxidradikationen (O_2^-) (31). Diese Ionen sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (23) und Hydroxylradikale ($\text{OH}^\bullet$) können auch am oxidativen Abbau von NO beteiligt sein (34,35). Bei oxidativem Stress (36), der zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, gewinnt dieser Abbauprozess an Bedeutung. Bei der Reaktion von O_2^- mit NO entsteht Peroxynitrit (23,33), welches als starkes Oxidationsmittel über eine Veränderung von Biomolekülen zytotoxisch wirken kann (37). Als Katalysator der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Nitrit zu toxischen Sauerstoffspezies dient die Myeloperoxidase. Dieser Prozess führt vermutlich durch die vermehrte Oxidation von LDL zur Bildung von Atherosklerose.

Abbildung 6 : Schematische Darstellung einiger Stoffwechselwege des NO - Metabolismus



Nach Freisetzung von NO in das Gefäßlumen wird es mit molekularem Sauerstoff (O₂) zu Nitrit (NO₂⁻) abgebaut. Im Erythrocyten reagiert NO₂⁻ mit oxygeniertem Hämoglobin zu Nitrat (NO₃⁻). Im Plasma reagiert NO mit Superoxidanionen (O₂⁻) zu Peroxynitrit (ONOO⁻), das zu Nitrat (NO₃⁻) abgebaut wird. NO kann auch über Bildung von Distickstofftrioxid (N₂O₃) mit Thiolen oder Aminen zu Nitrothiolen (RSNO) und Nitrosaminen (RNNO) reagieren. Im Erythrocyten entsteht bei der Reaktion von NO mit oxygeniertem Hämoglobin NO₃⁻ und Methämoglobin (MetHb). Mit deoxygeniertem Hämoglobin entsteht Nitrosylhämoglobin (NOHb) oder S-nitrosohämoglobin (SNOHb).

Modifiziert nach : „Einfluss von Kakaoflavanolen auf die endotheliale Dysfunktion bei Rauchern, D. Finis“

Eine weitere Möglichkeit des Vorliegens von NO scheint die Zirkulation von NO als bioaktive, reversibel gebundene Form im Blut zu sein. Vor allem Thiolgruppen von Plasmaproteinen wurden als NO-Akzeptoren beschrieben (29). Der Transport des plasmatisch gebundenen NOs scheint zu einem Großteil an Albumin (38) zu geschehen. Zudem besteht die Möglichkeit der Bindung an niedermolekulare Verbindungen wie Cystein und Glutathion. Die plasmatischen S-Nitrothiole (32,39,40) werden in ihrer Gesamtheit als RSNOs (38,41) bezeichnet. Durch Temperatur, Licht, Ascorbat oder Übergangsmetalle kann die Freisetzung von NO aus S-Nitrosothiolen beeinflusst werden. Die Halbwertszeit von S-Nitrosoalbumin im Plasma beträgt im Gegensatz zur kurzen Halbwertszeit (1 – 2 s) von freiem NO 15-40 Minuten. Rassaf et al. (29) konnten nach der Infusion von S - Nitroglutathion (GSNO) ähnliche Effekte wie nach der Infusion einer NO-Lösung sowie einen Anstieg der RSNO-Konzentration im Plasma nachweisen. Somit scheinen S-Nitrosothiole als physiologische Speicherform von bioaktivem NO zu sein.

NO kann, außer an Thiolgruppen, noch an andere Gruppen gebunden werden, wie z.B. an Stickstoffatome von Proteinen. Diese werden dann als N-Nitrosamine oder RNNOs bezeichnet. Zudem existieren Eisen-Nitrosyle und Lipidverbindungen sowie die Möglichkeit der Bindung an die Häm-Gruppe im Hämoglobin analog zum Sauerstoff. NO kann zudem mit aromatischen Aminen, Verbindungen, Alkoholen, Thiolen und Metallen reagieren, um C-, N-, S-, O- und Metall-Nitrosoverbindungen zu formen. Von physiologischer Bedeutung scheinen im menschlichen Organismus RNNOs, RSNOs und Häm-Nitrosoverbindungen zu sein (33). Diese werden im Folgenden als RXNO bezeichnet. Bislang wurde eine vasodilatierende Wirkung nur für RSNOs belegt (34).

In mehreren Studien wurde zudem nachgewiesen, dass während körperlicher Betätigung, wie z.B. beim Sporttreiben, durch die Erhöhung der cardialen und skelettalen Durchblutung die Bereitstellung von O₂ sowie die Entstehung von Shear Stress gefördert wird. Daraus resultiert eine Erhöhung der NO – Produktion (22,33).

1.3. Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel ist ein großes autokrines, parokrines und endokrines Organ (42-45), welches die Vasoaktivität, die Thrombocytenaggregation, Monocytenadhäsion, Hämostasis, Thrombo-

lyse, Entzündungsprozess etc. beeinflusst (6,7,46-52). Es kleidet alle Gefäße des menschlichen Körpers von innen aus und stellt somit eine Grenzschrift zwischen dem Blut und dem perivaskulären Gewebe dar (52). Durch Strukturen wie die Oberflächenglykokalix, Zell – Zell-Verbindungen, aktive Transportmechanismen, transzelluläre Kanäle, Mikrovesikel und subendotheliale Matrix stellt es eine selektiv permeable Barriere dar. Durch die Expression von verschiedenen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Insulin, IGF („insulin growth factor“), VEGF („vascular endothelial growth factor“), FGF („fibroblast growth factor“) und Zytokinen können zelluläre Signale weitergeleitet werden (15,42,53,54).

Zudem produziert das Endothel vasoaktive Peptide und Hormone. Vasodilatoren wie Nitritoxid (NO), Prostacyclin, Bradykinin, EDHF („Endothel derived hyperpolarisation factor“), Adrenomedullin, C - natriuretisches Peptid (CNP) und Vaokonstriktoren wie Angiotensin II, Endothelin-1, Thromboxan A₂, Prostaglandine und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zählen dazu (17,42,53,55-59). Eine Übersicht über die wichtigsten im Endothel synthetisierten Substanzen gibt Abbildung 7 wieder. Mithilfe dieser Substanzen verfügt das Endothel über eine antiarteriosklerotische Wirkung. Darunter fallen die Modulation des Gefäßdurchmessers (27), die Hemmung der Einwanderung von Entzündungszellen, die antiproliferative Wirkung gegenüber glatten Muskelzellen und die Hemmung der Thrombocytenaggregation (6,60,61) (s. Abb. 8). Die Störung dieser Funktionen bezeichnet man als endotheliale Dysfunktion. Diese kann schon in früher Kindheit vor jeglicher Plaqueentstehung vorliegen (15,62,63).

Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose ist die Schädigung der Gefäßwand durch verschiedene Faktoren. Neuere Erkenntnisse belegen zudem noch die Auswirkung der endothelialen Dysfunktion, verbunden mit der eingeschränkten Verfügbarkeit von NO bei der Entstehung der Arteriosklerose (56,57,59,63-69). Die endotheliale Dysfunktion stellt den Ursprung der Arteriosklerose dar. Als Initialzündung der Atherosklerose ist sie diagnostisch fassbar, aber noch reversibel. Wenn das Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion, Inhibierung und Stimulation der Entstehung und Migration von glatten Muskelzellen etc. nicht mehr gewährleistet ist, resultiert daraus ein dysfunktionales Verhalten und das Endothel nimmt den ersten Schaden (49). Die daraus folgenden Auswirkungen eines Endothelschadens in Bezug auf die Entstehung von Atherosklerose sind im Teil über die Entstehung von Atherosklerose schon ausgeführt worden.

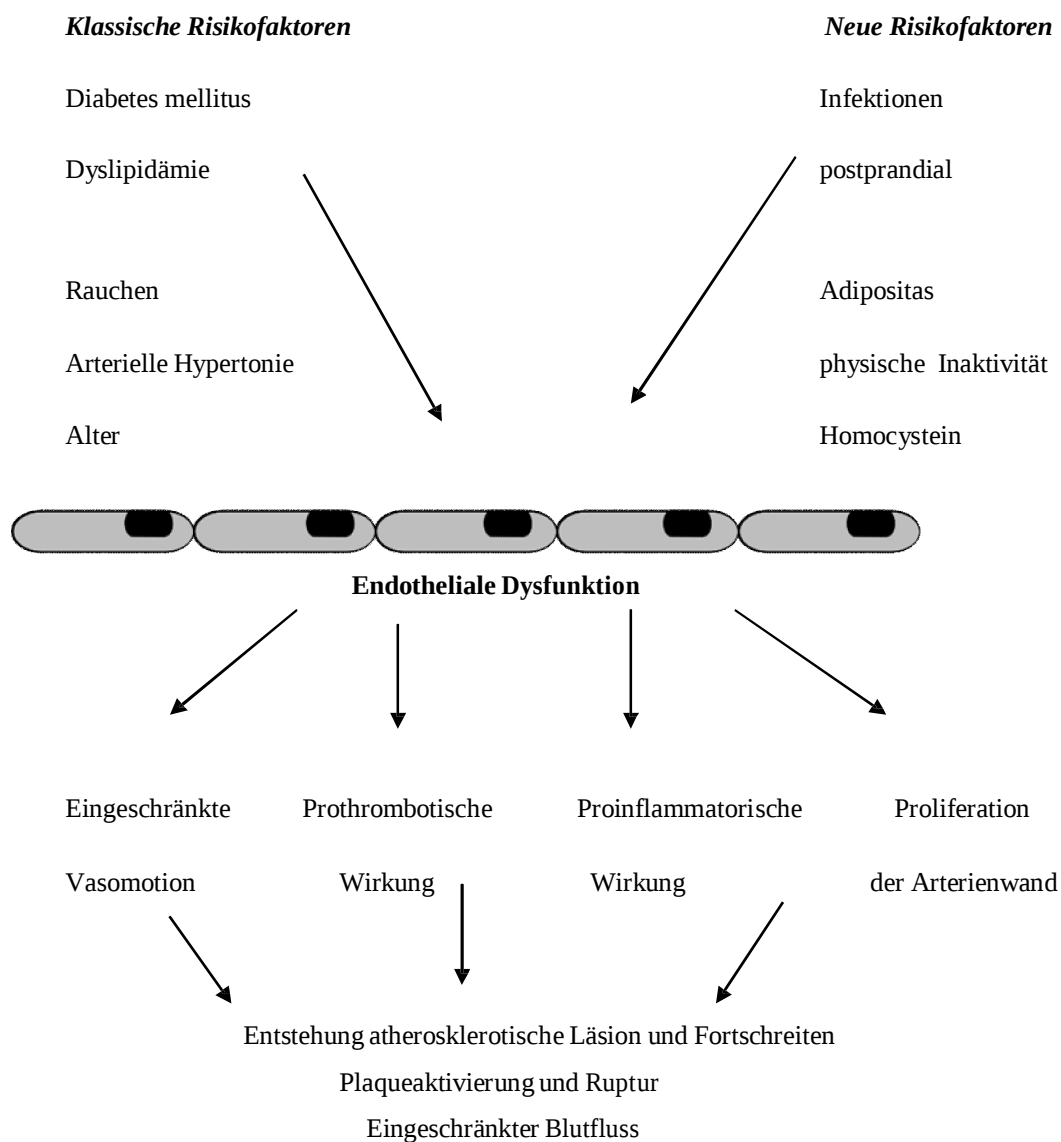
Abbildung 7 : Vom Endothel freigesetzte Substanzen

Vasodilatoren	Vasokonstriktoren
NO	Angiotensin II
Bradykinin	Endothelin
Prostacyclin	Thromboxan A ₂ , Serotonin, Arachidonsäure, Prostaglandin H ₂ , Thrombin, Nicotin
Endothelium derived relaxing factor	
Serotonin, Histamin, Substanz P	Inhibitoren des Wachstums glatter Muskelzellen
Aktivatoren des Wachstums glatter Muskelzellen	NO, Prostacyclin, Bradykinin
Platelet derived growth factor	Heparinsulfat
Basic fibroblast growth factor	Transforming growth factor
Insulin like growth factor	Thrombolytische Faktoren
Endothelin, Angiotensin II	Tissue-type Plasminogen Activator
	Plasminogen Activator Inhibitor -1
Adhäsionsmoleküle	Thrombomoduli
Endotheliales Leukocyten Adhäsionsmolekül	
Intercelluläres Adhäsionsmolekül	
Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül	

Modifiziert nach : „Drexler H, Factors involved in the Maintenance of Endothelial Function, American Journal of Cardiology. 1998; 82; 3S-4S & Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA, The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction, Journal of the American College of Cardiology. 2003; 42; 1149-1160”

Bereits 1961 wurden im Rahmen der Framinghamstudie (13,70,71) sowie 1978 in der PROCAM-Studie (72) verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren validiert. Darunter zählen das Rauchen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und die Hypercholesterinämie. Neuen Studien zufolge zählen auch erhöhte Homocysteinspiegel sowie CRP-Spiegel zu den Risikofaktoren (69,73-77).

Abbildung 8 : Risikofaktoren, Endotheliale Dysfunktion und ihre Auswirkungen



Modifiziert nach : "Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA; The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction; Jorنال of the American College of Cardiology; 2003; 42; 1149 – 1160"

Eine fettreiche Mahlzeit kann auch zu einer vorübergehenden endothelialen Dysfunktion führen (15,78).

Zur Beurteilung der endothelialen Funktionsfähigkeit können neben biochemischen Markern der endothelialen Integrität (Messung von Plasmaspiegeln, von Willebrand Faktor, Thrombomodulins o. ä.) auch bildgebende Methoden herangezogen werden.

Hierbei unterscheidet man invasive und nicht-invasive Verfahren. Für beide Verfahrensansätze verwendet man die endothelabhängige Vasodilatation (79,80). Der Fokus dieser Verfahren liegt dabei auf der Messbarkeit und Quantifizierbarkeit der NO – induzierten Vasodilatation. Andere Teilaspekte der Endothelfunktionen, wie z.B. Hämostase, werden hierbei außer Acht gelassen.

Zu den invasiven Verfahren zählt die intraarterielle Verabreichung von Acetylcholin, welche eine NO - vermittelte Gefäßdilatation induziert.

Acetylcholin wird im Körper von cholinergen Nerven ausgeschüttet. Im Körper hemmt es direkt die Ausschüttung von Norepinephrin aus dem sympathischen Nervensystem. Zudem stimuliert es in Gefäßen mit intaktem Endothel die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO). Dadurch kommt es zur Vasodilatation. Bei dem Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion hingegen resultiert es in einer Vasokonstriktion (7,21,81,82). Die hierdurch induzierten Veränderungen des Blutflusses und des Gefäßdiameters kann invasiv (mittels flow wire) oder nicht invasiv (mittels hochauflösendem Ultraschall) gemessen werden.

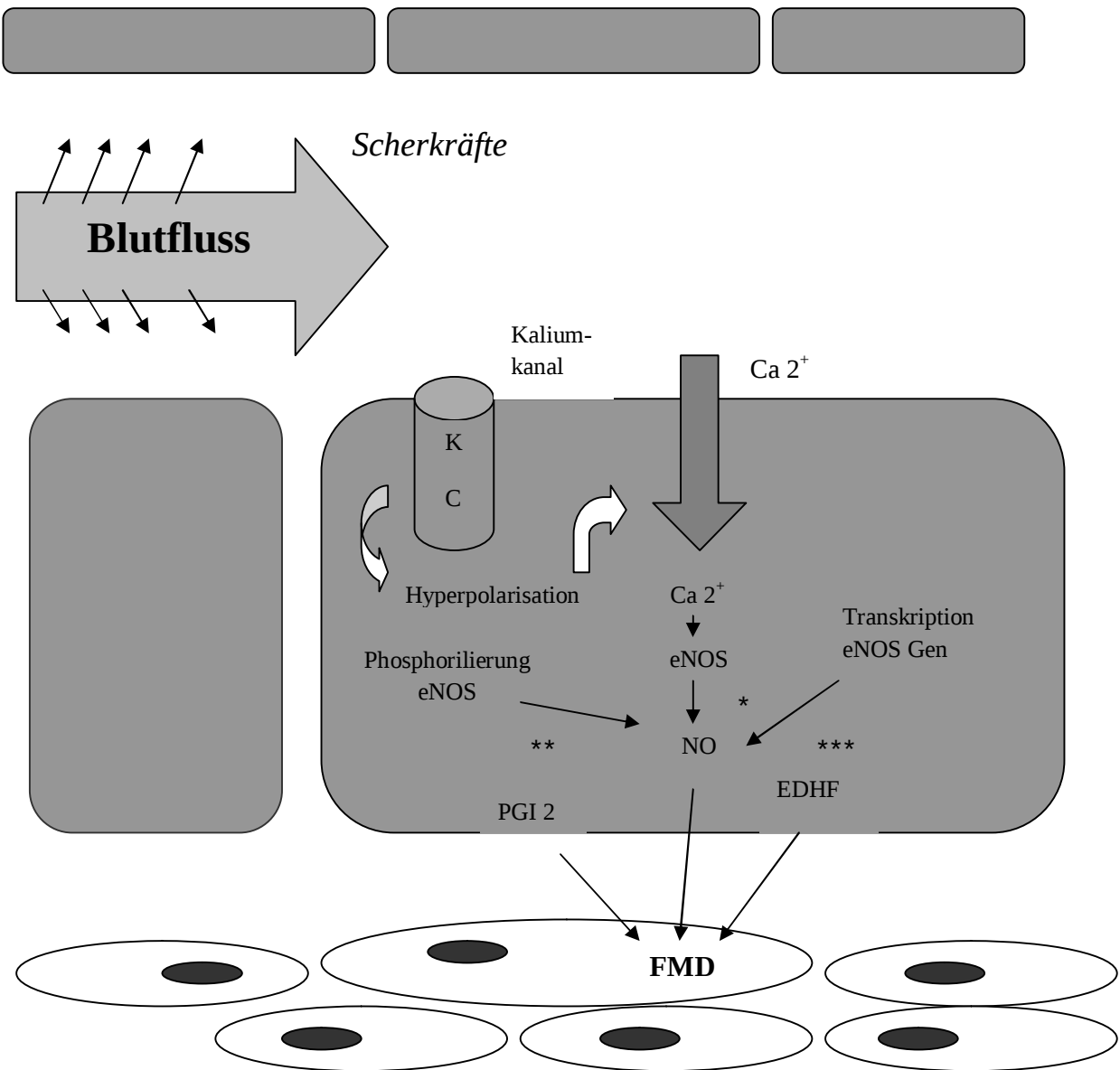
Als nichtinvasives Verfahren zählt die sogenannte Fluss-vermittelte-Dilatation. Dabei misst man mittels hochauflösendem Ultraschall die endothelabhängige Vasodilatation der Arteria brachialis nach einer vorausgegangen Ischämie des Unterarmes (49,59,62,64,71,79,83-85).

Durch die Änderung des Blutflusses und dem daraus resultierendem Shear-Stress reagiert das Endothel durch die Öffnung von calciumabhängigen Kaliumkanälen. Dadurch werden die Endothelzellen hyperpolarisiert und ermöglichen somit den verstärkten Einstrom von Calcium in die Zelle. Calcium aktiviert dann die endothelabhängige NO – Synthase (eNOS) (7,17,42,43,54,58,60,61,69,79). Somit entsteht daraus resultierend Stickstoffmonoxid und es kommt zu einer Vasodilatation (s.Abb. 8). Die Inhibition der eNOS bewirkt eine Reduktion der

brachialen FMD um 70 % (42). Durch eine kurzzeitige Erhöhung von Shear – Stress kommt es auch bei niedrigen Calciumkonzentrationen zu einer Phosphorylation von eNOS. Dies geschieht durch die Serin/Threonin Kinase und die Akt/Protein Kinase B. Durch andere posttranslationale Modifizierungen der eNOS oder Interaktionen mit Caveolin kann ebenfalls die Funktion beeinträchtigt werden. Längere Perioden von Shear – Stress aktivieren die genetische Transkription von eNOS, so dass eine kontinuierliche NO – Liberation gewährleistet ist (60).

Die flussmodulierte Vasodilatation ist ebenfalls von der NO – Inaktivierung sowie der Sensitivität der glatten Muskulatur für NO abhängig (84,86).

Abbildung 9 : Genese der FMD



Genese der FMD abhängig von verschiedenen Änderungen der Scherkräfte

* sehr kurz andauernde Veränderung

** Veränderung über Minuten

*** Veränderung über mehrere Minuten oder Stunden

Modifiziert nach : “Moens L, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ; Flow – Mediated Vasodilatation : A Diagnostic Instrument, or an Experimental Tool ?; Chest; 2005; 127; 2254 – 2263“

Beide Verfahren werden jedoch routinemäßig nicht im klinischen Alltag zur Diagnostik angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sonographie der A. brachialis zur Feststellung der endothelialen Dysfunktion angewendet.

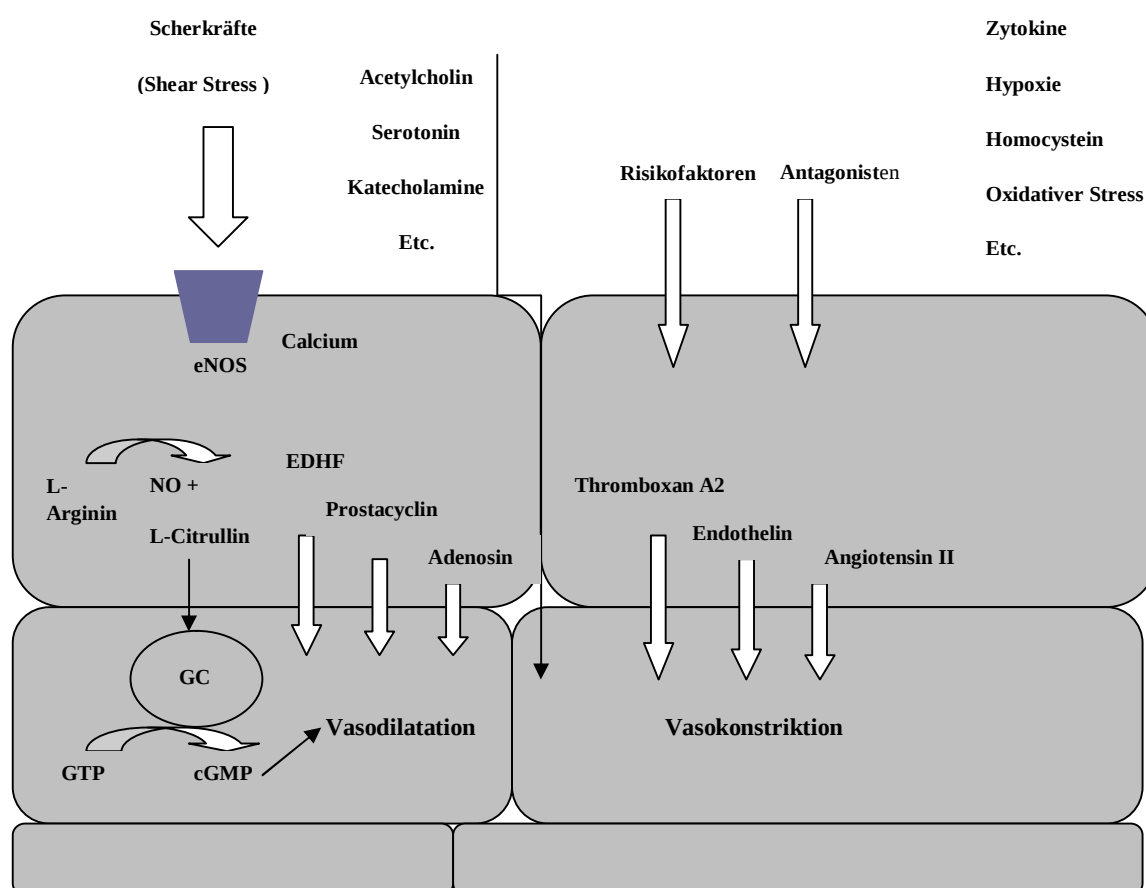
Durch zahlreiche Studien wurde belegt, dass ein Teil der endothelialen Dysfunktion durch oxidativen Stress bedingt wird (14,34,65,68,83,86,87), welcher mit fast allen traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert ist. Die Reaktion von NO mit O_2^- Ionen scheint dabei am Entscheidendsten zu sein, da O_2^- - Ionen sehr effektiv die Funktionen von NO inhibieren können. Das daraus resultierende Reaktionsprodukt Peroxynitrit selbst stellt ebenfalls ein starkes Oxidans dar.

Eine mögliche Quelle des oxidativen Stresses stellt das Rauchen dar. Mentaler Stress, sowohl chronisch als auch vorübergehend, verursacht ohne Vorhandensein weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren eine endotheliale Dysfunktion und begünstigt somit zudem die Entstehung der Arteriosklerose. In Tierversuchen zeigte sich, dass durch chronischen Stress vermehrt Zellen geschädigt werden und somit die NO – Verfügbarkeit reduziert ist. Daraus resultierend entsteht die endotheliale Dysfunktion. Die genaue Genese in humanen Personen ist bislang noch nicht genau geklärt (87). Bei Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung verursachte mentaler Stress durch eine sympathisch innervierte Vasokonstriktion eine Reduktion der NO – Produktion und daraus resultierend eine mögliche myocardiale Ischämie (44,87).

Unterschiedliche Studien zeigten, dass eine eingeschränkte Endothelfunktion als prognostischer Indikator für das Eintreten kardiovaskulärer Ereignisse sowie vaskulärer Veränderungen in der A. carotis (52,88,89) herangezogen werden kann (15,46,48,49,60,67-69,79,90-93). Fathi et al zeigten in einer Studie (6), dass Patienten mit einer FMD $< 2\%$ signifikant erhöhte kardiovaskuläre Ereignisse aufwiesen als Patienten mit einer normalen FMD ($> 6,3\%$). Die endotheliale Dysfunktion in einer Brachialarterie oder Poplitealarterie kann somit als Marker für eine generalisierte endotheliale Dysfunktion gewertet werden (54,61,62,69). Yeboah et al zeigten in einer Studie mit einem Follow Up von 5 Jahren, dass das Kollektiv mit einer unter dem Durchschnitt liegenden FMD ein erhöhtes Risiko für das Eintreten von kardiovaskulären Ereignissen aufwies (92). Suwaidi et al (68) zeigten ebenfalls in einer Studie mit einem Follow Up von 28 Monaten, dass Patienten mit einer bestehenden

schweren endothelialen Dysfunktion und einer koronaren Herzerkrankung ein erhöhtes Risiko für eine myokardiale Ischämie aufwiesen. Die Kollektive mit einer milden bzw. keiner Form der endothelialen Dysfunktion erlitten während des Follow Up keine Myokardinfarkte, wohingegen 14 % der Patienten mit einer schweren Form der endothelialen Dysfunktion einen Myokardinfarkt erlitten (68). In einer weiteren Studie von Perticone et al (45) wurde ebenfalls gezeigt, dass eine endotheliale Funktion prognostische Auswirkungen auf das Eintreten von kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit einem arteriellen Hypertonus hat. Man kann somit sagen, dass eine eingeschränkte Endothelfunktion im Bereich der Extremitätenarterien auf die Coronarien zu übertragen ist.

Abbildung 10 : Endotheliale Funktionen



Modifiziert nach : "Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadis; Evaluating endothelial function in humans : A guide to invasive and non-invasive techniques; Heart; 2005; 91; 553 – 558"

1.4. Einfluss des Rauchens auf die NO-Bioverfügbarkeit / Rauchen als Risikofaktor

Ein wichtiger Risikofaktor für die Arteriosklerose stellt das Rauchen dar (94-96).

Man unterscheidet beim Zigarettenrauch zwei Phasen : die Teer- und die Gasphase (97,98). Die Teerphase, die man auch als Partikelphase bezeichnet, ist der Anteil des Rauches, der z.T. durch den Filter der Zigarette gefiltert wird. Dabei werden ca. 99,9 % aller Partikel mit einer Größe von $>0,1 \mu\text{m}$ gefiltert. Die Gasphase ist definiert als der Anteil, der ungehindert den Filter passiert. Die Partikelphase enthält $>10^{17}$ freie Radikale / g (z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) (98), die Gasphase $> 10^{15}$ freie Radikale pro Zug. Die freien Radikale unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit. Die Radikale, die in der Partikelphase enthalten sind, sind Stunden oder Monate stabil, die Bestandteile der Gasphase hingegen nur Sekunden.

Zigarettenrauch enthält mehr als 4000 verschiedene bekannte und wohl mehr als 100.000 unbekannte Inhaltsstoffe (95,99,100). Neben toxischen (Nikotin und Kohlenmonoxid) sowie carcinogenen Substanzen wie Teer und Nitrosaminen (66) sind auch Substanzen enthalten, die die sensorischen Eigenschaften des Rauchers beeinflussen und somit die Attraktivität für die Raucher erhöhen. Dazu gehören neben Stoffen wie z.B. Vanillin auch Zusatzstoffgemische wie Pfefferminzöl oder Lakritz (101). Alleine vom Nikotin sind bislang acht tabakspezifische Derivate bekannt wie z.B. N'-Nitrosonornikotin, 4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1- butanon (NNK) und 4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1 butanol (NNAL). Vorgenannte gehören zu denen mit der höchsten carcinogenen Potenz (102).

Wenn der Zigarettenrauch die Alveolen der Lunge erreicht, wird das Nikotin schnell absorbiert. Dies liegt zum einen an der großen intrapulmonalen Resorptionsfläche, die durch die Verzweigung der Alveoli gewährleistet wird, zum anderen an der Auflösung des Nikotins bei einem pH-Wert von 7,4 in der Lunge. Pro Zigarette werden durchschnittlich etwa 1 mg Nikotin (0,3 – 2 mg) systemisch absorbiert. Abhängig ist die Absorption vom Volumen des Zuges, der Tiefe der Inhalation, der Anzahl der Züge sowie der Verteilung des Zigarettenrauches im Raum bzw. der Umgebung (102).

Eine weitere Einteilung des Zigarettenrauches erfolgt in Haupt- und Nebenrauch

(s.Abb. 11). Der Hauptrauch ist der Anteil, den der Raucher aktiv inhaliert (8 % Partikelphase, 92 % Gasphase) (103), der Nebenrauch ist der Anteil, der am Ende der Zigarette aufsteigt (97). Dieser enthält wesentlich mehr toxische Bestandteil als der aktiv inhalierte Teil.

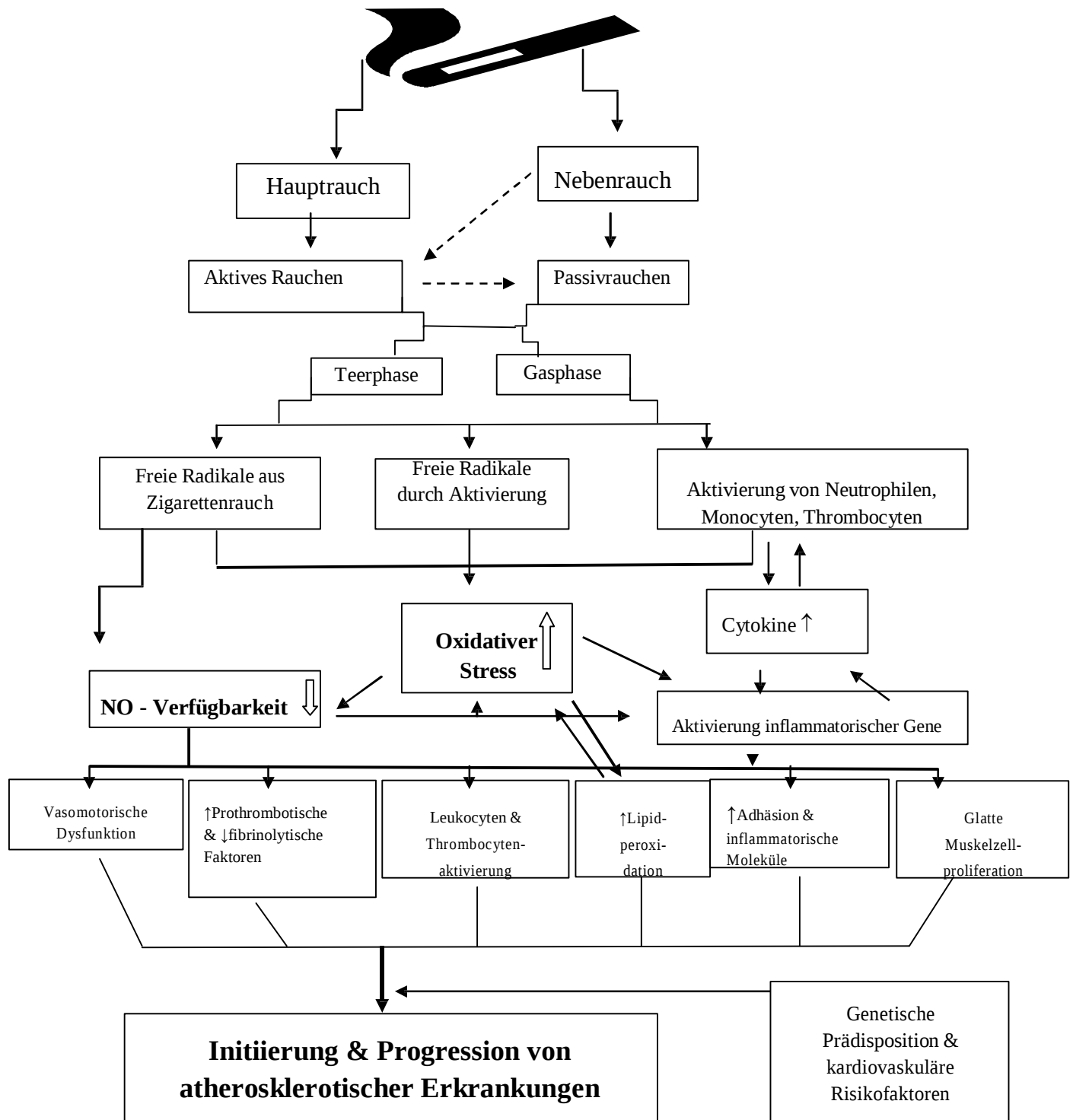
Selbst Passivrauchen mit nur einem Anteil von einem Prozent der Rauchexposition im Vergleich zu aktivem Rauchen erhöht das Risiko der koronaren Herzkrankheit um 30 %, wohingegen bei aktiven Rauchern das Risiko um 80 % ansteigt (104). Auch Jugendliche, die passiv dem Zigarettenrauch ausgesetzt sind, zeigen eine signifikant schlechtere Endothelfunktion (99).

Somit stellt Passivrauchen seit der frühen Kindheit einen zusätzlichen Risikofaktor in der Entstehung der Atherosklerose dar (104). Koronare Endothelzellen zeigten nach Inkubation mit Plasma von Rauchern niedrigere NO-Produktion als Zellen, die mit Nichtraucherplasma inkubiert wurden (104).

Somit scheint die eingeschränkte Bioverfügbarkeit von NO für diese Risikoerhöhung verantwortlich zu sein. Pathogenetisch wird oxidativer Stress (52,100,105,106,), der durch das Rauchen bedingt wird, als Hauptfaktor für die endotheliale Dysfunktion (97,100,107-109) vermutet. Über folgende Wege verursacht Rauchen oxidativen Stress :

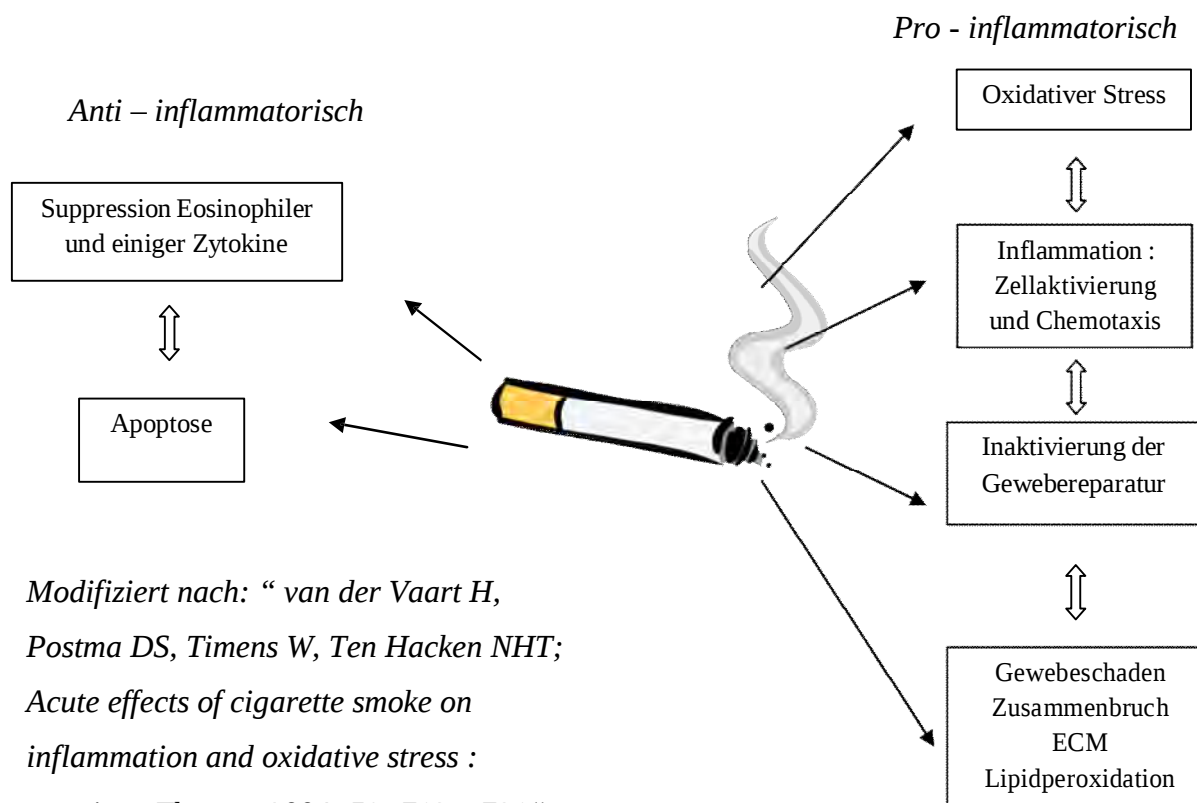
1. durch Aktivierung endogener Radikalquellen wie NOS, NADPH - Oxidase oder Xanthinoxidase (50,104)
2. durch die entzündungsfördernde Wirkung des Zigarettenrauchens (110)
3. durch reaktive Sauerstoffspezies und andere freie Radikale aus dem Zigarettenrauch (95)

Abbildung 11 : Rauchen und seine Wirkungen



Modifiziert nach : "Ambrose JA, Barua RS; The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease; Journal of the American College of Cardiology; 2004; Vol 43; 1731 – 1737"

Abbildung 12 : Effekte von Zigarettenrauch



Neben der direkten Reaktion von z.B. O_2^- Ionen resultiert auch die eingeschränkte Bioverfügbarkeit von Ko-Faktoren der eNOS (wie z.B. Tetrahydrobiopterin) in einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO (37,97-100,103,106,111).

Im Serum von Rauchern zeigten sich als Ausdruck der gesteigerten Inflammation in diversen Studien wie z.B. der NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey) Erhöhungen des CRP – Spiegels (37,98,99,103,110) durch eine Stimulation der Interleukin-6 Produktion. Zudem zeigte sich bei Rauchern eine Erhöhung des Fibrinogenspiegels (37,98,103,108,110,113).

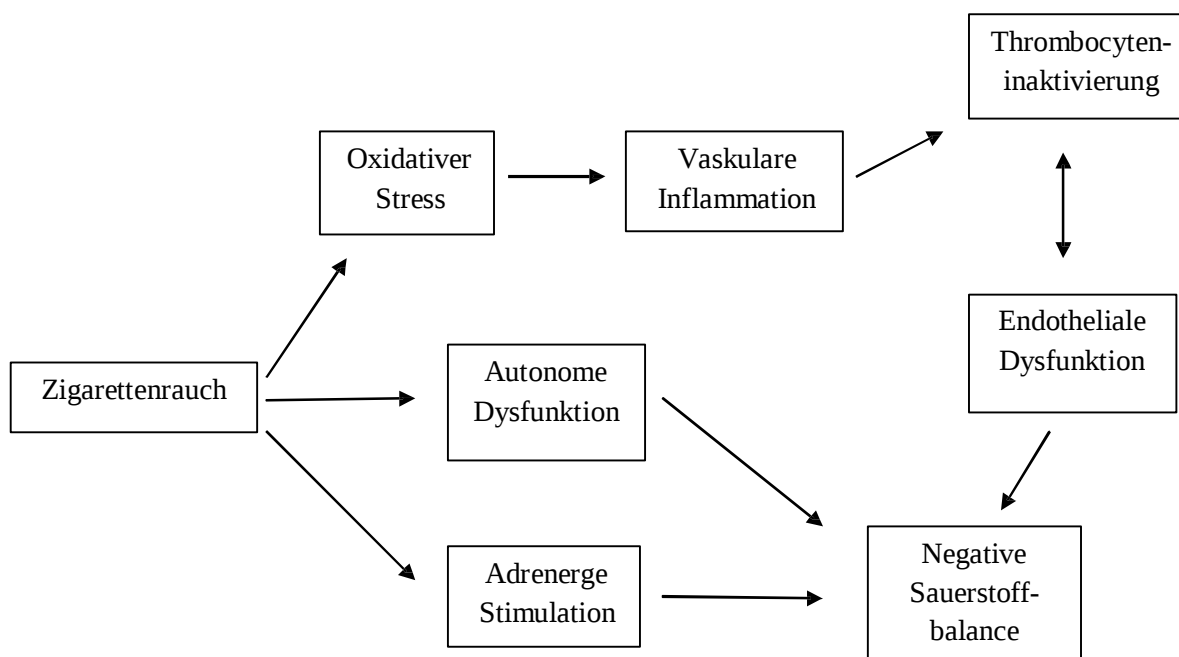
Fibrinogen selbst stellt wahrscheinlich einen Risikofaktor für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen dar (112), indem es u.a. die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen mit verursacht. Zudem ist es essentiell für die Thrombocytenaggregation und moduliert die Endothelfunktion (10,112,114). Durch den Tumornekrosefaktor α , der ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin im Körper darstellt,

wird die Produktion anderer Zytokine, wie z.B IL-6 angeregt. Dieses wiederum regt die Bildung von akute Phase Proteinen, wie dem CRP in der Leber an. Der Tumornekrosefaktor α ist im Serum von Rauchern vermindert (99,107,113). Durch eine Stimulation der Endothelin-1 Produktion erfolgt eine Zunahme der Adhäsionsmoleküle und begünstigt die Entstehung der Atherosklerose (98). In der MONICA III North Glasgow Studie (115) zeigte sich zudem eine signifikante Korrelation zwischen dem Interleukin-6-Spiegel sowie dem Fibrinogenspiegel und der Anzahl von weißen Blutkörperchen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Erhöhung des Fibrinogens durch eine Erhöhung bzw. Induktion von Interleukin-6 resultiert (98,110,115). Auch 10 Jahre nach der Beendigung des Rauchens zeigte sich u.a. in der MONICA Augsburg Studie eine Erhöhung des CRP – Spiegels (116). Erhöhungen des Fibrinogenspiegels äußern sich durch Auswirkungen auf die Viskosität des Blutes (Erhöhung des Hämatokritwertes), der Thrombocytenaggregation (93,105) und Fibrininformation (98). Langjährige Raucher zeigen zudem eine Erhöhung der weißen Blutkörperchen, v.a. der polymorphkernigen neutrophilen Leukocyten (PMN) (98).

Auch sind im Blut von Rauchern, verglichen mit Nichtrauchern, insgesamt die weißen Blutkörperchen (v.a. Lymphocyten und Monocyten) sowie deren Adhäsion an der Gefäßwand (103,106,108,110) erhöht. Dies spricht ebenfalls für die inflammatorische Wirkung des Rauchens bei der Entstehung der Atherosklerose.

Eine weitere systemische Wirkung des Rauchens auf den Organismus stellt die Erhöhung der Sympathikusaktivität dar (94,116-119). Dies liegt an der Wirkung des Nikotins auf die Nervenendigungen und der damit gesteigerten Freisetzung von Katecholaminen (94,120). Im Plasma von Rauchern ist der Spiegel von Norepinephrin erhöht (120). Schon nach dem Rauchen von nur zwei Zigaretten war in Untersuchungen von Narkiewicz et al sowie Groppe et al auch nach über 30 Minuten noch ein erhöhter Blutdruck sowie eine erhöhte Herzfrequenz zu verzeichnen (93,94,121). Starke Raucher zeigten zudem einen persistierend erhöhten Blutdruck sowie eine erhöhte Variabilität des Blutdruckes (121).

Abbildung 13 : Wirkungen von Zigarettenrauch auf das kardiovaskuläre System



Modifiziert nach : "Raupach T, Schäfer K, Konstantinides S, Andreas S; Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system : a change in paradigm; Eurheartj; 2006; 27; 386 – 392"

Ein weiterer Faktor, der bei Rauchern für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose mitverantwortlich zu sein scheint, sind die endothelialen Vorläuferzellen (EPC) (117,122). Dabei handelt es sich um Zellen, die aus dem Knochenmark ausgeschüttet werden, im Blut zirkulieren und sich bei Gefäßverletzungen u.a. in Endothelzellen oder andere Zelltypen differenzieren können (123,124). Nach Phasen einer Ischämie wie es z.B. nach einem Myokardinfarkt der Fall ist, unterstützen die endothelialen Vorläuferzellen durch ihre Differenzierung die Neovaskularisation oder Reendothelialisierung (123,125,126).

Hill et al (127) sowie Vasa et al (128) haben in Studien festgestellt, dass bei einer Zunahme der kardiovaskulären Risikofaktoren die Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen abnimmt.

Die endothelialen Vorläuferzellen sind zudem bei Rauchern reduziert (97,108,123) . Dies liegt u.a. an der verminderten Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) (95,123,127), die bei Rauchern reduziert ist. Dies stellt auch eine Begünstigung der Atherosklerose dar. Im Serum von Rauchern zeigten sich verminderte Vitamin C – Spiegel (98,106,110,129).

Eine Möglichkeit des Schutzes vor oxidativem Stress stellt die Applikation von Vitamin C dar. Darauf soll im folgenden Abschnitt weiter eingegangen werden.

1.5. Einfluss von Vitamin C auf die Endothelfunktion

Die Wirkung von Ascorbat (Vitamin C) und anderen Antioxidantien wie α -Tocopherol (aktive Form von Vitamin E) in Bezug auf die Entstehung und das Fortschreiten der Arteriosklerose wurde bislang in vielen Studien nachgewiesen (130). Einflüsse des Vitamin C beziehen sich zum einen auf die Oxidation von LDL (low density lipoprotein), auf die Adhäsion von Zellen sowie das vom Endothel produzierte NO (EDNO – Endothelium- derived NO) (131-134).

Vitamin C hemmt in physiologischen Dosen die LDL - Oxidation sowohl durch neutrophile Zellen als auch in zellfreiem Milieu. Dies geschieht durch die Fähigkeit des Vitamin C als Radikalfänger zu dienen (69,87,108,131,133,135-150). Durch das Wegfangen der freien Radikale im wässrigen Milieu können diese nicht mehr mit dem LDL interagieren und oxidieren (140,151). Die dabei entstandenen Ascorbylradikale werden durch chemische Reduktion, enzymatische Reduktion oder Dismutation wieder in Ascorbat verwandelt. Dadurch steht dem Organismus mehr NO zur Verfügung (151,152). Eine weitere Wirkung von Vitamin C liegt in der Hemmung der Zelladhäsion. In Studien wurde nachgewiesen, dass die von Rauchern isolierten Monocyten eine vermehrte Affinität zur Zelladhäsion mit Endothelzellen zeigten als isolierte Monocyten von Nichtrauchern. Raucher weisen damit einen geringeren Ascorbatspiegel im Blut auf (50,110,142).

Wenn ihnen exogen über mehrere Tage Vitamin C appliziert wird, zeigte sich eine Verminderung der Zelladhäsion (135,153). Man vermutet, dass durch Vitamin C die Expression von Liganden auf den Monocyten sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) (50), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)

(131,150) und E-Selectin supprimiert wird, so dass die Interaktion mit den Leukocyten über β_1 und β_2 Integrine verbunden wird. Diese vermitteln sonst das Leukocytenrolling, die Bindung an das Endothel und das Einwandern in den subendothelialen Raum.

Eine indirekte Wirkung von Vitamin C scheint die Einsparung von intrazellulären Thiolen zu sein. Diese dienen der Stabilisierung der Freisetzung von EDNO aus S-Nitrosothiolen (152).

Teilweise sind für diese Reaktionen im menschlichen Körper insbesondere für die Beeinflussung der NO-vermittelten Vasodilatation hohe Konzentrationen an Vitamin C ($\sim 10 \text{ mmol/l}$) notwendig (141,151), wie sie meist nur kurzzeitig durch eine intravenöse Applikation zu erreichen sind (137). Padayatty et al zeigten, dass durch eine intravenöse Gabe von Vitamin C 30- bis 70- fache Wirkspiegel im Gegensatz zu einer oralen Gabe erreicht werden können (154). Heller et al sowie Huang et al haben festgestellt, dass unter Zugabe von Tetrahydrobiopterin Vitamin C auch in physiologischen Konzentrationen die Synthese durch Stimulation der eNOS (132,133,136,139,143,152) sowie die biologische Bioverfügbarkeit von NO stimuliert. Dies geschieht u.a. durch die Umwandlung von Tetrahydrobiopterin aus dem Trihydrobiopterinradikal.

Die Applikation von Vitamin C zeigte keinen Effekt auf die Endothelfunktion bei Nichtrauchern (149,154) sowie nach einer Langzeitbehandlung (146,150).

1.6. Folgende Fragestellungen werden in dieser Arbeit bearbeitet :

1. Nach welcher Zeitdauer hat die Nikotinkarenz einen Einfluss auf die Endothelfunktion bzw. der flussmedierten Vasodilatation (FMD) ?

Bislang zeigte keine zu diesem Thema durchgeführte Arbeit eine detaillierte chronologische Darstellung der Endothelfunktion bei einer größeren Probandengruppe (drei Kollektive mit jeweils 15 Probanden).

2. Welche Bedeutung haben freie Radikale bzw. deren Ausschaltung durch die antioxidative Wirkung des Vitamin C für die bei Rauchern beobachtete endotheliale Dysfunktion ? Ist bei Nikotinverzicht im Zeitverlauf eine weitere Veränderung zu verzeichnen ?

2. Material und Methoden

2.1. Studienprotokoll

Der Einfluss einer kurzfristigen Nikotinkarenz sowie die Rolle von oxidativem Stress im Rahmen der endothelialen Dysfunktion ist an drei verschiedenen Studienkollektiven untersucht worden.

Die Genehmigung des Studienprotokolls erfolgte durch die Ethikkommission der Justus Liebig-Universität-Gießen. Alle Teilnehmer der Studie wurden zunächst über die Studie aufgeklärt und erteilten dann schriftlich ihr Einverständnis. Eine Anamneseerhebung sowie eine Blutentnahme schlossen sich als nächstes an.

Der genaue Ablauf der Studie wird im Folgenden noch beschrieben.

2.2. Studienkollektiv

Das Studienkollektiv beinhaltet 45 teilnehmende Personen im Alter von 19 – 36 Jahren. Die Teilnehmer wiesen - abgesehen von den Rauchgewohnheiten bei den Rauchern - keine kardiovaskulären Risikofaktoren außer das Rauchen selbst sowie familienanamnestisch keine kardiovaskulären Erkrankungen auf. Folgende Kriterien führten zum Ausschluss aus der Studie :

Bekannte oder behandelte arterielle Hypertonie ($RR > 140/90$ mmHg)

Bekannter oder behandelter Diabetes mellitus

Bekannte oder behandelte Hyperlipoproteinämie (Cholesterin > 200 mg/dl, HDL < 45 mg/dl)

Lipoprotein(a) ≥ 30 mg/dl

Homocystein ≥ 15 mmol/l

Body-Mass-Index (BMI) > 30 kg/m²

Sonstige akute oder chronische Erkrankungen

Medikamentenallergie

Jegliche Medikamenteneinnahme

Harnsäurediathese

Verwandter ersten Grades mit prämaturer Atherosklerose (Herz- oder Hirninfarkt vor dem 50. Lebensjahr)

Alter < 18 oder > 45 Jahre

Zur Klassifizierung des Risikoprofils wurden laborchemische Parameter sowie anamnestiche Angaben herangezogen.

Das Studienkollektiv wurde in drei Gruppen mit jeweils 15 Probanden eingeteilt. Gruppe 1 und 3 beinhaltete Raucher, wobei Gruppe 1 nach der Erstuntersuchung Nikotinkarenz einhielt, Gruppe 3 ihr Rauchverhalten hingegen nicht veränderte. Gruppe 2 setzte sich aus Nichtraucher zusammen.

Als Raucher galten die Personen, die bis zum Untersuchungszeitpunkt aktive Raucher waren und täglich mindestens 10 Zigaretten über mindestens drei bis fünf Jahre geraucht hatten.

Nichtraucher waren definiert als Probanden ohne jegliche (frühere oder aktuelle) Raucheranamnese.

Gruppe 1 setzte sich aus neun Frauen und sechs Männern im Alter von 19 – 36 Jahren, Gruppe 2 aus zehn Frauen und fünf Männern im Alter von 23 – 26 Jahren und Gruppe 3 aus zwölf Frauen und drei Männern im Alter von 19 – 36 Jahren zusammen.

Sämtliche Studienteilnehmer waren freiwillige Probanden, die nach einem Aufklärungsgespräch ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme gaben.

Antropometrische und laborchemische Daten zu den unterschiedlichen Studienkollektiven sind in den Tabellen 13 bis 15 (siehe Seite 63 - 65) wiedergegeben.

2.3. Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis

Die funktionelle Erfassung der endothelabhängigen Vasodilatation wurde in der gängigen Literatur mittels hochauflösendem Ultraschall (> 10 MHz) quantifiziert (155,156). In unserer

Studie verwendeten wir einen Schallkopf mit einer Frequenz von 17 MHz. Die flussvermittelte Dilatation (FMD) spiegelt die Zunahme des Durchmessers der A. brachialis wieder. Diese wird durch die Stimulation der NO – Produktion durch Schubspannung ausgelöst (42,46,85).

$$\text{FMD} = \frac{D_{\text{post}} - D_{\text{prä}}}{D_{\text{prä}}} \times 100$$

basaler Diameter : D prä
nach Lösen Ischämie : D post

Die A. brachialis wird unter Ruhebedingungen am Oberarm etwa 5 – 10 cm oberhalb der Fossa antecubitalis aufgesucht (43,54,155). Der Gefäßabschnitt wird dann vergrößert und anschließend im Längsschnitt der Durchmesser ermittelt. Durch das Anlegen einer Blutdruckmanschette am Unterarm sowie den erzeugten Druckaufbau auf 200 mmHg über fünf Minuten (etwa 50 mmHg oberhalb des systolischen Blutdruckwertes (85)) erzeugte man eine reaktive Ischämie im Bereich der A. brachialis (43,157). Im Bereich der zugehörigen Leitungsarterie kam es durch die Ischämie zu einer Dilatation der Widerstandsgefäße im Endstromgebiet. Somit resultierte nach dem Lösen der Stauung ein erhöhter Blutfluss in der Leitungsarterie (43). Dadurch folgte eine Zunahme der Schubspannung im Gefäß. Dies stellt einen physiologischen Reiz für das Gefäßendothel zur Produktion von NO dar (54,79,85,156). Die Quantifizierung der NO – vermittelten Zunahme des Gefäßdurchmessers erfolgte nach Beendigung der Ischämie über drei Minuten.

Zur weiteren Charakterisierung und Beeinflussung der endothelialen Funktion durch freie Radikale applizierte man im zweiten Teil der Untersuchung 1000 mg Vitamin C i.v.. Da Vitamin C als Radikalfänger dient, kann man nach Minimierung bzw. Ausschalten der durch oxidativen Stress verursachten freien Radikale das Optimum des Gefäßendothels ermitteln (85). Der weitere Untersuchungsablauf mit Messung des Gefäßdurchmessers im Rahmen der reaktiven Hyperämie war identisch.

Der arterielle Diameter wird entweder anhand der Intima – Media – Linie oder anhand des größten Echos (M – Linie) gemessen (156). Bei unseren Untersuchungen erfolgten die Messungen anhand der M-Linien.

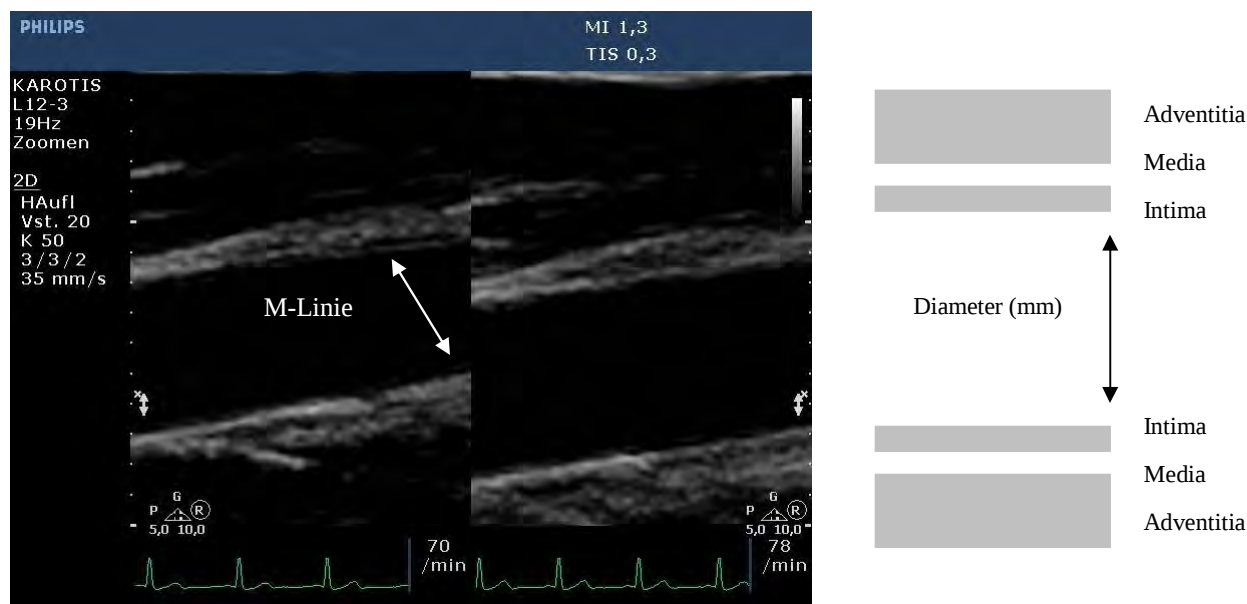
Abbildung 14 : Sonographische Darstellung der A. brachialis im Längsschnitt

Zur Erstellung der Abbildung wurde (anders als in der Studie) hier ein mit 12 MHz getackteter Linearschallkopf verwendet. Die Bezeichnung „Karotis“ im Bild bezieht sich auf ein Programm mit Voreinstellung zur optimierten Darstellung oberflächlicher Gefäßstrukturen.

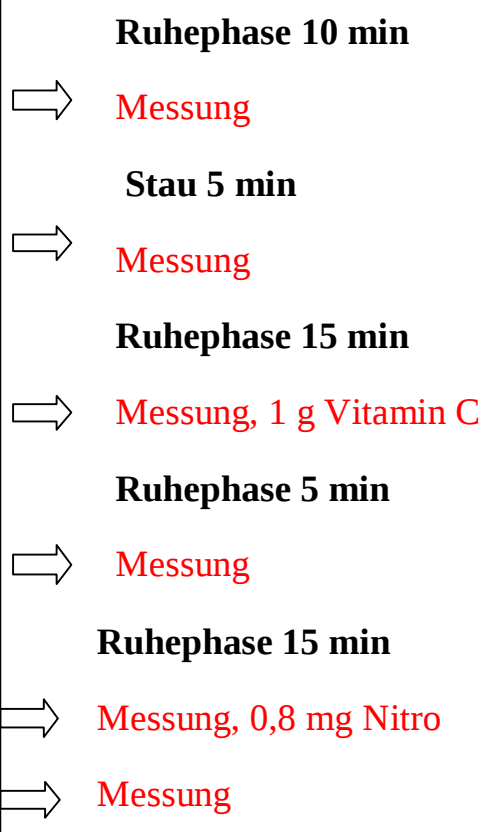


Um eine eingeschränkte FMD infolge eines vermehrten NO-Abbaus oder einem verminderten Ansprechen der glatten Muskulatur auszuschließen (54,79,152), wurde am Schluss jeder Untersuchung die endothelunabhängige Vasodilatation quantifiziert. Hierzu wurde die Zunahme des Gefäßdurchmessers der A. brachialis nach der sublingualen Applikation von 2 Hub Nitroglycerin (0,8 mg) nach zwei Minuten über die nächsten drei Minuten ermittelt.

Abbildung 15 : Sonographische Darstellung der A. brachialis vor und nach Nitroglycerin



2.3.1. Untersuchungsprotokoll



Die Untersuchungen aller drei Gruppen erfolgte morgens. Die Probanden waren seit mindestens acht Stunden nüchtern und Probanden der Gruppe 1 & 3 rauchten eine Stunde vor Untersuchungsbeginn ihre letzte Zigarette.

Alle Messungen wurden in einem klimatisierten Raum durchgeführt. Der Untersucher war gegenüber dem Status (Raucher/Nichtraucher) geblindet.

Nach einer zehnminütigen Ruhephase des Probanden in liegender Position nach Anlage von EKG – Elektroden zur getriggerten Ultraschallmessung erfolgten

die Messung des arteriellen Blutdrucks (nichtinvasiv nach Riva Rocci) sowie eine venöse Blutentnahme über eine Butterfly-Kanüle am linken Arm. Dieser Zugang wurde anschließend mit einer 0,9 %-igen physiologischen Kochsalzlösung gespült. Anschließend erfolgte die Anlage einer Blutdruckmanschette am rechten Unterarm (Abb. 16 – 18).

Nach weiteren fünf Minuten erfolgte die Einstellung der A. brachialis am rechten Arm (inkl. Vergrößerung mittels Zoomfunktion) (Abb. 19) sowie die Markierung der Schallkopfposition am Oberarm. Während der weiteren Messungen wurden weder die Schallkopfposition noch die Geräteeinstellungen verändert. Alle Bilder wurden im DICOM-Format auf der Festplatte des Ultraschallgerätes sowie einer Datensicherungs-DVD gespeichert. Die erste Messung diente zur Darstellung des systolischen Diameters in Ruhe sowie des triphasischen Flußprofils. Anschließend wurde die Blutdruckmanschette über fünf Minuten auf 200 mmHg insuffliert. Unmittelbar nach Lösung der Stauung erfolgte eine Messung des systolischen Diameters und Dokumentation eines nunmehr monophasischen Flußes. Über die nächsten drei Minuten erfolgte alle 15 Sekunden die Akquisition einer 5-sekündigen Bildschleife mit Speicherung derselben auf der Festplatte des Ultraschallgerätes zur späteren, offline erfolgenden Messung des systolischen Diameters als Folge der reaktiven Hyperämie.

Abbildung 16 : Untersuchungslage des Probanden bei dem Experiment



Abbildung 17 : Detailaufnahme



Blutdruckmanschette am rechten Unterarm, angelegte EKG – Elektroden und venöser Zugang in der linken Cubitalvene.

Abbildung 18 : Detailaufnahme



Abbildung 19 : Detailaufnahme



Nach einer 15 - minütigen Ruhephase erfolgte die intravenöse Applikation des Radikalfängers Vitamin C (1000 mg). Der verwendete Zugang wurde anschließend mit 0,9 %-iger physiologischer Kochsalzlösung gespült.

Unmittelbar danach erfolgte wieder die Messung des systolischen Diameters in Ruhe und der Fließgeschwindigkeit. Die am rechten Unterarm lokalisierte Blutdruckmanschette wurde wieder über fünf Minuten auf 200 mmHg insuffliert. Nach dem Lösen des Staus erfolgte direkt danach die Messung des systolischen Diameters und des Flußprofils. Über die nächsten drei Minuten erfolgte alle 15 Sekunden eine Messung des systolischen Diameters.

Nach einer weiteren Ruhephase von 15 Minuten erfolgte nun die Untersuchung der endothelunabhängigen Dilatation. Nach einer weiteren Ruhemessung des systolischen Diameters und der Fließgeschwindigkeit erfolgte bei allen Probanden (RR systolisch < 110 mmHg, klinisch nicht hypotensiv) die sublinguale Applikation von 2 Hub Nitroglycerin (0,8 mg). Zwei Minuten später erfolgte über die nächsten drei Minuten alle 15 Sekunden die Messung des systolischen Diameters.

Abschließend wurde der intravenöse Zugang entfernt und eine Messung des Blutdruckes durchgeführt. Bei normotensivem Zustand wurde der Proband entlassen.

Die erneute Untersuchung erfolgte nach 23 Stunden sowie erneut nach 7 Tagen.

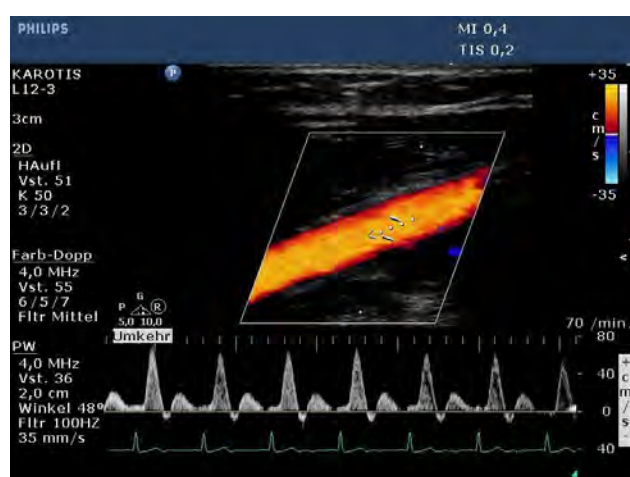
Probanden der Gruppe 1 mussten ab Tag 1 eine Nikotinkarenz einhalten, wo hingegen Probanden der Gruppe 3 weiter rauchen sollten und gebeten wurden, ihr Rauchverhalten nicht zu verändern. Eine Stunde vor der erneuten Messung sollte die letzte Zigarette geraucht werden.

2.3.2.Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers

Die Bestimmung des arteriellen Gefäßdurchmessers sowie der Fließgeschwindigkeit erfolgte mit einem 17 MHz Linear-Schallkopf (iU 22 Fa. Phillips) anhand von Längsschnitten der A. brachialis am Oberarm. Alle Messungen des Arteriendurchmessers erfolgten zur Eliminierung

der pulsatilen Schwankung des Gefäßdurchmessers während des Herzzyklus EKG-getriggert. Die Messungen wurden somit am Ende der Diastole (Beginn der R-Zacke) durchgeführt. Es wurden zehn Messungen pro Bild durchgeführt. Zur Orientierung bei der Messung des Gefäßdurchmessers bediente man sich der sogenannten M-Linien. Dabei handelt es sich um echoarme Linien, die den anatomischen Übergang zwischen Adventitia und Media darstellen. Vermessen wurde die Distanz zwischen der schallkopfnahen M – Linie zur schallkopffernen M – Linie rechtwinklig zur Gefäßachse.

Abbildung 20 : Duplexsonographische Darstellung der A. brachialis



Darstellung der A. brachialis mit
Dopplereinstellung sowie EKG -
Triggerung

2.4. Laborbestimmungen

2.4.1. Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten bei allen Probanden aus Cubitalvenen. Zur Punktion wurden Butterflykanülen der Firma Sarstedt verwendet, die während der Untersuchung im Probanden verblieben und mit 0,9 %-iger physiologischer NaCl – Lösung gespült wurden. Zur Entnahme des Routinelabors sowie des Blutes zur Bestimmung des Nikotin- und Kotoninspiegels verwendete man Vakuumröhrchen der Firma Sarstedt. Die Applikation des Vitamin C der Firma Rotexmedica erfolgte mittels Einmalspritze der Firma B.Braun.

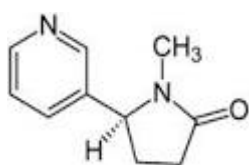
2.4.2. Bestimmung der Laborparameter

Die Bestimmung des Lipoprotein (a) erfolgte mittels Immunturbidimetrie am Analysengerät Advia der Firma Randox. Der Normalbereich für Erwachsene liegt bei < 30 mg/dl.

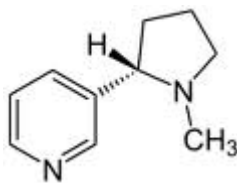
Homocystein wird über ein kompetitives Immunoassey nach dem direkten Chemilumineszenz – Verfahren mit dem Advia Centaur bestimmt.

Triglyceride, HDL – Cholesterin, LDL – Cholesterin, Cholesterin und Glucose werden mittels Photometrie mit dem Advia Chemistry Systems der Firma Bayer Health Care bestimmt.

2.4.3. Bestimmung des Kotininspiegels



(S) – Kotinin



(S) – Nikotin

Nach Hukannen J, Jacob III P, Beowitz NL; Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine; Pharmacol Rev; 2005; 57; 79 -115

Nikotin wird bei aktivem und passivem Rauchen im Körper in den Hauptmetaboliten Kotinin umgewandelt. Die Halbwertszeit von Kotinin beträgt ca. 19 Stunden. Im Gegensatz zur Bestimmung der Ursprungssubstanz Nikotin hat Kotinin den Vorteil, dass exogene Kontaminationen nahezu auszuschließen sind.

Die Bestimmung des Kotininspiegels erfolgte mit 1 ml Patientenblut. Dazu gab man 3 µl des internen Standards (300 ng /ml, Nikotin – D3 / Kotinin – D3), sowie 30 µl Phosphatpuffer mit dem pH-Wert von 6. Die Extraktion erfolgte mit 1 ml Chlorobutan / Isopropanol (95:5 v:v). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und unter Stickstoff kalt abgedampft. Die folgende Quantifizierung erfolgte mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (Hewlett Packard). Als Säule verwendete man DB 5 MS Säule mit einer Länge von 30 m.

2.5. Statistische Verfahren

Zur Berechnung der Statistik verwendete man das Programm SAS V9.1.3 des SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.

Tabelle 1 : Mittelwerte der unterschiedlichen Gruppen hinsichtlich der unterschiedlichen biometrischen und laborchemischen Parameter

	Raucher	Raucher mit Pause	Nichtraucher	P-Wert
Alter (Jahre)	24,73 ± 3,94	24,6 ± 4,33	24,8 ± 1,21	0,98699
Größe (m)	1,68 ± 0,07	1,74 ± 0,1	1,75 ± 0,1	0,09970
Gewicht (kg)	62,93 ± 10,2	68,2 ± 12,54	68,27 ± 12,2	0,36651
BMI (kg/m²)	22,13 ± 3,13	22,52 ± 3,05	22,03 ± 1,79	0,87517
Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten *	12,47 ± 3,67	14 ± 4,11	0	0,28960
Zeitraum des Rauchen (Jahre) *	8,73 ± 4,37	7,6 ± 1,12	0	0,41531
Systolischer Druck (mmHg)	115 ± 3,78	116,67 ± 6,99	116,33 ± 8,76	0,77962
Diastolischer Druck (mmHg)	58 ± 5,28	62 ± 7,98	62,33 ± 4,58	0,10991
Nüchtern glukose (mg/dl)	89,07 ± 8,11	88,07 ± 7,55	85 ± 5,51	0,27778
Gesamtcholesterin (mg / dl)	169,93 ± 20,09	160 ± 17,24	160,47 ± 17,64	0,25855
HDL - Cholesterin (mg / dl)	68,4 ± 12,68	62,07 ± 11,53	62,27 ± 15,09	0,33606
LDL - Cholesterin (mg/dl)	81,87 ± 16,8	91,13 ± 10,28	94,07 ± 16,66	0,07593
Triglyceride (mg/dl)	78,33 ± 41,11	121,47 ± 62,78	93,07 ± 51,23	0,08462
Lipoprotein (a) (mg/dl)	11,53 ± 3,31	15,58 ± 6,78	18,28 ± 14,1	0,14350
Homocystein (µMol/l)	8,5 ± 1,88	8,79 ± 2,47	8,95 ± 1,24	0,81368
Kotininwert Tag 1 *	89,25 ± 75,82	111,43 ± 75,53	XXX	0,42888

Der statistische Vergleich unterschiedlicher biometrischer und biochemischer Variablen zwischen den unterschiedlichen Gruppen erfolgte für stetige (quantitative) Variablen mit einer multifaktoriellen Varianzanalyse (MANOVA) , für kategoriale (qualitative)

Merkmale mittels Chi – Quadrat Test. Die Unterschiede in der Messung der FMD in den 3 unterschiedlichen Gruppen wurden ebenfalls mittels multifaktorieller Varianzanalyse (MANOVA) verglichen. Ein p- Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Der p-Wert bezieht sich auf die Strukturgleichheit der drei bzw. zwei Gruppen. Die p-Werte hinsichtlich der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten, des Zeitraums des Rauchens in Jahren sowie des Kotininspiegels (mit * versehen) beziehen sich auf die Gruppen der Raucher (Raucher und Raucher mit Pause), alle weiteren p-Werte beziehen sich auf einen Vergleich aller 3 Gruppen (Raucher, Raucher mit Pause und Nichtraucher).

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Studienpopulation

Es wurden für diese Studie drei Studienpopulationen mit jeweils 15 Probanden untersucht. Die erste Gruppe umfasste Raucher (9 Frauen, 6 Männer), die eine Nikotinkarenz von 7 Tagen einhalten mussten, die zweite Gruppe umfasste Nichtraucher (10 Frauen, 5 Männer) und die dritte Gruppe umfasste Raucher (12 Frauen, 3 Männer), die weiterhin rauchen durften. Hinsichtlich der Ausschlusskriterien der Studie zeigt sich eine Homogenität der Studienkollektive bzgl. des Alters, des Body – Mass – Index, der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte, des Homocysteinspiegels und der Nüchtern glukosewerte, wie es der Tabelle 1 zu entnehmen ist. Die laborchemische Bestimmung der Blutfette zeigte lediglich geringe, statistisch nicht signifikante Unterschiede.

Bei dem Studienkollektiv der Raucher und der Raucher mit Nikotinkarenz zeigte sich initial ein erhöhter Kotininspiegel und lediglich eine marginale Abweichung in Bezug auf die Packyears. Dies ist damit zu erklären, das Kotinin als Metabolit von dem aktiven Bestandteil des Zigarettenrauches Nikotin im Vergleich zu diesem eine Halbwertszeit von 19 – 20 Stunden aufweist. Die Halbwertszeit von Nikotin beträgt lediglich 2 – 4 Stunden (158). Am Tag 2 und Tag 7 wird die eingehaltene Nikotinkarenz der Gruppe 3 durch ein Absinken des Kotinspiegels deutlich, was ebenfalls in der Abbildung 25 ersichtlich wird.

Die einzelnen Werte der Kotininspiegel der unterschiedlichen Gruppen sind in den Tabellen 2 und 3 im Tabellenanhang (Seite 56-57) ersichtlich.

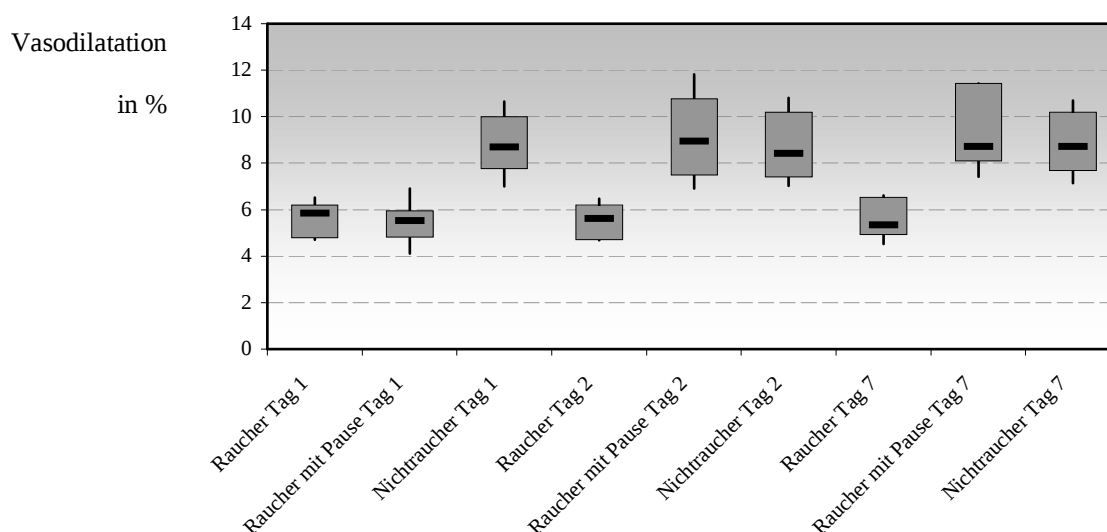
Die hierbei gefundenen Werte sind denen in der Literatur berichteten Messwerten in entsprechenden Vergleichskollektiven ähnlich (159).

3.2 Flussmodulierte Vasodilatation (nativ)

Bei der endothelabhängigen Dilatation zeigt sich bei der Gruppe der Raucher ($5,61 \pm 0,90 \%$) und der Gruppe der Raucher mit Nikotinkarenz ($5,50 \pm 1,40 \%$) bei dem Vergleich mit der Gruppe der Nichtraucher ($8,82 \pm 1,82 \%$) am Tag 1 eine deutliche Einschränkung der nativen Vasodilatation. Am Tag 2, d.h., nach einer 24 – stündigen Nikotinkarenz für eine Gruppe der Raucher zeigt sich bei dieser Gruppe der Raucher eine deutliche Zunahme der Vasodilatation auf $9,37 \pm 2,46 \%$, wohingegen die Gruppe der Raucher, die weiterhin rauchen, eine gleichbleibende reduzierte Vasodilatation ($5,60 \pm 0,87 \%$) im Vergleich zur nichtrauchenden Gruppe aufweisen ($8,91 \pm 1,82 \%$).

Dieses Ergebnis zeigt sich ebenfalls am Tag 7. Die Gruppe der Raucher mit Nikotinkarenz weisen nach 7 – tägiger Nikotinkarenz eine stabile Verbesserung der Vasodilatation ($9,28 \pm 1,86 \%$) im Vergleich zur rauchenden Gruppe ($5,57 \pm 1,05 \%$) auf. Die Nichtraucher stellen sich mit einer ebenfalls stabilen Vasodilatation ($8,92 \pm 1,78 \%$) dar. Anhand der Abbildung 21 werden die Ergebnisse bildlich verdeutlicht. Man erkennt, dass bei der rauchenden Gruppe, die eine 7 – tägige Nikotinkarenz einhalten musste, bereits nach 24 – stündiger Nikotinkarenz eine deutliche Zunahme der Vasodilatation zu verzeichnen ist, die zudem marginal über der prozentualen Vasodilatation der nichtrauchenden Gruppe liegt. Nach sieben Tagen ist keine Verbesserung der Vasodilatation bei der rauchenden Gruppe mit Nikotinkarenz mehr ersichtlich. Es zeigt sich bei dieser Gruppe lediglich ein leichter Rückgang der Vasodilatation von 0,09 %.

Abbildung 21 : Vasodilatation nativ



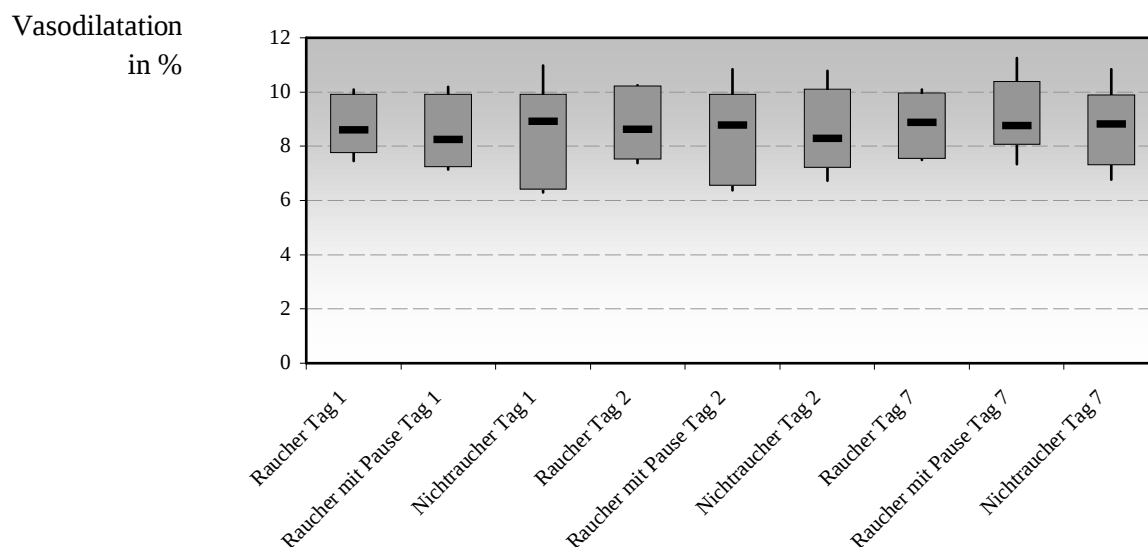
Der Boxplott stellt die native Vasodilatation der A. brachialis in Prozent des Ausgangswertes in den unterschiedlichen Probandengruppen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten dar. Dargestellt sind die 25. bis 75. Perzentile (Box), Median (fettgedruckte Linie) und die Standardabweichungen (whisker).

Am Tag 1 zeigt sich eine deutliche Differenz zwischen der Gruppe der Nichtraucher sowie der beiden Gruppen der Raucher (p jeweils $< 0,0001$ im Gruppenvergleich). Zwischen den beiden Gruppen der Raucher zeigt sich keine Änderung (p 0,9749 im Vergleich der Gruppen). Am Tag 2 stellt sich eine deutliche Differenz ($p < 0,0001$) zwischen der Gruppe der Raucher im Vergleich zu der Gruppe der Nichtraucher und im Vergleich zu der Gruppe der Raucher mit Pause dar. Zwischen den Gruppen der Raucher mit Pause und der Nichtraucher stellt sich keine wesentliche Differenz dar (p 0,9749 im Vergleich der Gruppen). Das Gleiche zeigt sich an Tag 7 (Nichtraucher und Raucher mit Pause p 0,8124, rauchende Raucher im Vergleich zu der Gruppe der Nichtraucher und im Vergleich zu der Gruppe der Raucher mit Pause $p < 0,0001$).

3.3. Flussmodulierte Vasodilatation mit Vitamin C

Nach der intravenösen Gabe von Vitamin C zeigt sich am Tag 1 sowohl bei den Rauchern ($8,78 \pm 1,32 \%$) als auch bei den Rauchern mit folgender Nikotinkarenz ($8,67 \pm 1,53 \%$) eine Verbesserung der Vasodilatation im Vergleich zu den initialen nativen Werten. Die Gruppe der Nichtraucher zeigt bei den Tagen 1, 2 und 7 keinen relevanten Unterschied der Dilatation im Vergleich zur initialen nativen Messung. Am Tag 2 und Tag 7 zeigt sich bei der Gruppe der Raucher ohne Rauchkarenz weiterhin der positive Effekt des Vitamin C auf die Vasodilatation ($8,81 \pm 1,43 \%$ und $8,80 \pm 1,30 \%$). Bei der Gruppe der Raucher mit 24 – stündiger Nikotinkarenz zeigt sich keine weitere Verbesserung der Vasodilatation ($8,61 \pm 2,23 \%$). Nach 7 – tägiger Nikotinkarenz zeigt sich jedoch eine geringgradige, statistisch nicht signifikante Verbesserung der Vasodilatation auf $9,30 \pm 1,96 \%$ im Vergleich zu den initialen Messungen. Die Abbildung 23 zeigt ebenfalls, dass Vitamin C in der Gruppe der Nichtraucher zu keiner Verbesserung der Vasodilatation führt und in der Gruppe der Raucher zu einer durchgehenden Verbesserung der Vasodilatation führt. Die Gruppe der Raucher mit Nikotinkarenz zeigt am Tag 1 eine Verbesserung der Vasodilatation, am Tag 2 (nach 24 – stündiger Nikotinkarenz) keine weitere Verbesserung der Vasodilatation und am Tag 7 (nach 7 – tägiger Nikotinkarenz) wieder eine leichtgradige Verbesserung der Vasodilatation.

Abbildung 22 : Vasodilatation mit Vitamin C



Der Boxplot stellt die Vasodilatation der A. brachialis nach der Gabe von Vitamin C in Prozent des Ausgangswertes in den unterschiedlichen Probandengruppen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten dar. Dargestellt sind die 25. bis 75. Perzentile (Box), Median (fettgedruckte Linie) und die Standardabweichungen (whisker).

An den Tagen 1,2 und 7 ist keine relevante Änderung zwischen den 3 Gruppen zu verzeichnen (Tag 1 : Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern p 0,9749, Raucher im Vergleich zu Rauchern mit Nikotinkarenz p 0,9824, Nichtraucher im Vergleich zu Rauchern mit Pause p 0,9993; Tag 2 : Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern p 0,9964, Raucher im Vergleich zu Rauchern mit Nikotinkarenz p 0,9561, Nichtraucher im Vergleich zu Rauchern mit Pause p 0,9772; Tag 7 : Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern p 1,000, Raucher im Vergleich zu Rauchern mit Nikotinkarenz p 0,7249, Nichtraucher im Vergleich zu Rauchern mit Pause p 0,7289).

Abbildung 23 : Vasodilatation mit Vitamin C an Tag 1,2 und 7 im Vergleich zur nativen Vasodilatation

Vasodilatation

in %

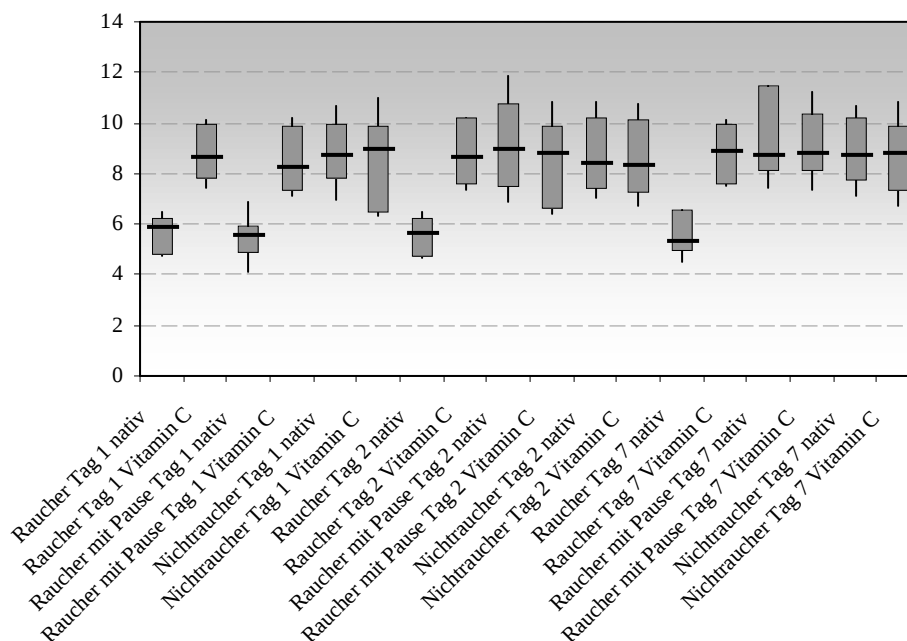
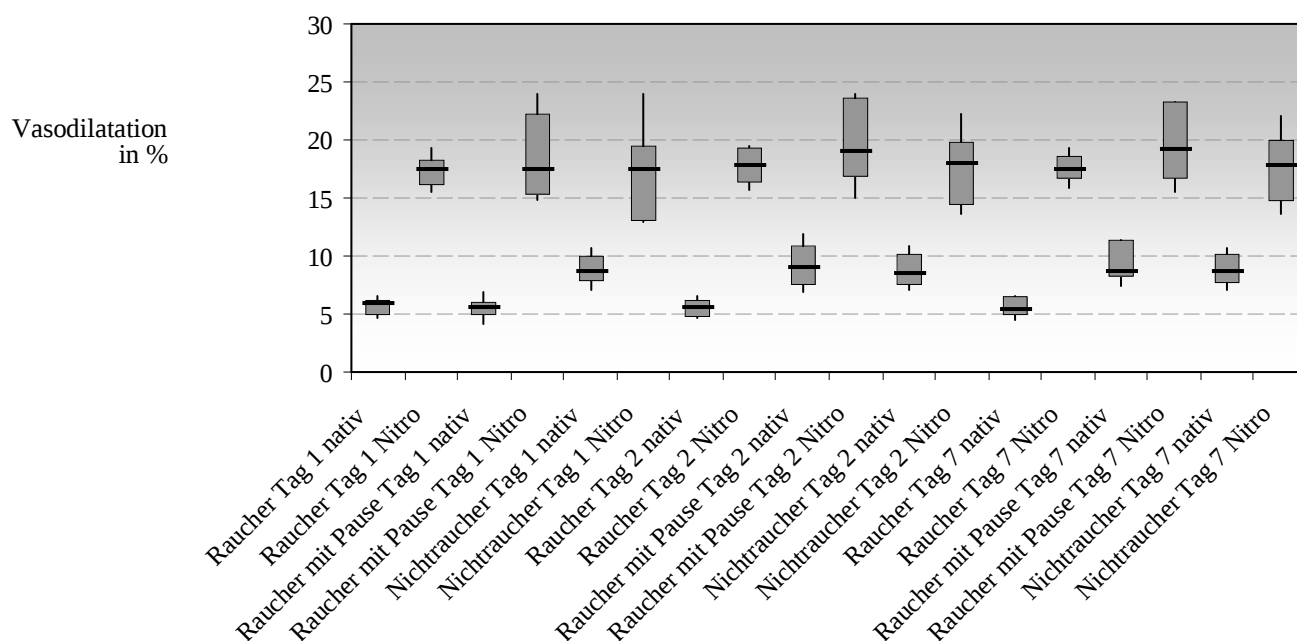


Abbildung 24 : Vasodilatation nach Nitroglycerin im Vergleich zur nativen Vasodilatation



4.2. Methodenkritik

4.2.1. Messung der endothelialen Dysfunktion mit Hilfe der flussvermittelten Dilatation

Zur Quantifizierung der endothelialen Dysfunktion können zur Erfassung mehrere Untersuchungstechniken zur Hilfe genommen werden. Man unterscheidet dabei invasive (intraarterielle Gabe von Acetylcholin) von nicht – invasiven (FMD) Techniken. In der vorliegenden Arbeit wurde die endothelabhängige Dilatation mit der nicht – invasiven Technik der FMD – Messung der A. brachialis verwendet. Dabei induziert man mittels eines physikalischen Stimulus eine daraus resultierende Dilatation. Man erzeugt durch die Anlage einer Blutdruckmanschette am Unterarm sowie das Aufpumpen über fünf Minuten auf suprasystolische Werte (200 mmHg) eine Ischämie im Versorgungsgebiet der A. brachialis. Nach dem Lösen der Stauung kommt es zu einer reaktiven Hyperämie. Durch die Änderung des Blutflusses und dem damit verbundenen mechanischen Stimulus des Shear Stress (Scherkräfte) kommt es zu einer Konformitätsänderung des endothelialen Zytoskeletts. Es werden calciumabhängige Kaliumkanäle geöffnet. Dadurch werden die Endothelzellen hyperpolarisiert, so dass Calcium vermehrt in die Zelle einströmen kann. Dies führt zu einer Phosphorylierung der eNOS und bewirkt eine Steigerung der Calciumsensitivität. Daraus resultierend ist eine gesteigerte NO – Produktion, welche eine Vasodilatation der Leitungsarterien bewirkt (7,16,41,42,53,57,59,60,68,78). Diese kann sonographisch bestimmt werden (27).

Die endothelabhängige Dilatation bzw. die Genauigkeit der Quantifizierung dieser ist von mehreren Faktoren abhängig :

1. biologische Faktoren
2. untersucherseitige Variabilitäten
3. methodische Variabilitäten

Verschiedene biologische Einflussfaktoren können die endothelabhängige Dilatation beeinflussen. Neben den bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie (3-7), Diabetes mellitus (4-7), arterielle Hypertonie (4-7) etc., haben

auch weitere Einflussfaktoren eine Einschränkung der endothelabhängigen Dilatation zur Folge. Dazu gehören akuter physischer Stress (88), eine fettreiche Mahlzeit (54,73), das weibliche Geschlecht (Konzentration der weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron während des Menstruationszyklus) (64) sowie Zigarettenkonsum (5,6). Um die Auswirkungen der biologischen Faktoren gering zu halten, wählten wir in der vorliegenden Studie eines der Studienkollektive frei von den üblichen kardiovaskulären Risikofaktoren. Zwei der drei Gruppen wiesen jedoch einen regelmäßigen Nikotinkonsum auf.

Des Weiteren führten wir unsere Untersuchung jeweils morgens zur gleichen Tageszeit durch. Die Probanden waren seit mindestens acht Stunden nüchtern und rauchten 60 Minuten vor der Untersuchung ihre letzte Zigarette. Der Untersuchungsraum war klimatisiert und vor dem Beginn der Untersuchung wurde eine zehnminütige Ruhephase in liegender Position eingehalten. Die Messung des arteriellen Blutdruckes sowie der Herzfrequenz, welche als Parameter der sympathoadrenergen Stimulation dienen, unterschieden sich nicht signifikant vor und nach der Untersuchung. Als Einschränkung der zugrundeliegenden Studie muss man die ungleiche Geschlechterverteilung in den einzelnen Gruppen (Gruppe Raucher 12 Frauen, 3 Männer, Gruppe Raucher mit Nikotinkarenz 9 Frauen, 6 Männer, Gruppe Nichtraucher 10 Frauen, 5 Männer) sehen.

Als Hauptquellen der untersucherseitigen Variabilität sind

- 1) die technische Ausrüstung,
- 2) der Untersucher sowie
- 3) die Auswertung zu nennen.

Die Durchführung der Messungen sollten mindestens mit einem linearen Schallkopf und einer Frequenz von zumindest > 7 MHz erfolgen (46,150). Die Messungen dieser Studie erfolgten mit einem linearen Schallkopf der Firma Phillips mit einer Ultraschallfrequenz von 17 MHz. Die Untersuchung und Auswertung erfolgte von einem gut geschulten Untersucher, der diese Untersuchung bereits zuvor mehrfach durchgeführt hatte (>300 gleichartige vorherige Untersuchungen). Nur einem gut geschulten Untersucher ist es möglich, Diametermessungen von 0,1 mm zu erkennen und somit die technischen Voraussetzungen auszuschöpfen. Alle Messungen erfolgten mit den gleichen Geräteeinstellungen. Die Auswertung erfolgte nach doppelter Sicherung der Daten im DICOM – Format auf der Festplatte des Ultraschallgerätes

sowie auf einer Datensicherungs – CD.

Neben den bereits erwähnten Einflussfaktoren auf die FMD kommen ebenfalls folgende Einflussfaktoren als mögliche Quellen methodischer Variabilität in Betracht :

- 1) die Ischämiezeit,
- 2) die Größe des ischämischen Gebietes,
- 3) der zur Diametermessung herangezogene Bereich,
- 4) der Zeitpunkt der Messung nach Beendigung der Ischämie und
- 5) die Abhängigkeit vom Herzzyklus.

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass eine maximale Dilatation erst nach einer Ischämie von 4,5 Minuten erreicht wird. Durch eine längere Ischämiezeit kann diese nicht mehr signifikant gesteigert werden (43). Man wählte daher für die zugrundeliegende Arbeit eine für den Probanden tolerable Ischämiezeit von 5 Minuten. Bezüglich der bevorzugten Lage der Blutdruckmanschette (Ober- oder Unterarm) zur Erzeugung der Ischämie gibt es in der gängigen Literatur keinen Konsens (43,157). Corretti et al (43) sowie Tousoulis et al (54) empfahlen bzw. führten in ihren Studien jeweils die Messung mit einer Blutdruckmanschette am Unterarm durch. Bei der Durchführung einer proximalen Okklusion am Oberarm kann es zu höheren Messergebnissen der Dilatation kommen. Dies ist durch eine Anhäufung von Metaboliten, v.a. Adenosin begründet (155). Bei der Durchführung einer distalen Okklusion am Unterarm sind diese Auswirkungen auf den Gefäßabschnitt nicht erkennbar.

Des Weiteren wäre in der vorliegenden Arbeit eine direkte Kompression der A. brachialis erfolgt. Aus den eben erwähnten Gründen erfolgte daher die Okklusion distal am Unterarm. Zur Messung orientierte man sich an der sogenannten M – Linie, welche den anatomischen Übergang zwischen Adventitia und Media darstellt (43). Die Vermessung erfolgte von der schallkop

durchgeführt. Aus jeweils zehn Messungen pro erfasstem Bild erfolgte die Berechnung eines Mittelwertes des Gefäßdiameters. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das verwendete Untersuchungsprotokoll den in den Leitlinien empfohlenen Standards entspricht (43). In der zugrundeliegenden Arbeit betrug die native Messung der FMD in den Kontrollgruppe der Nichtraucher am ersten Tag $8,82 \% \pm 1,82 \%$, am zweiten Tag $8,91 \% \pm 1,89 \%$ und am siebten Tag $8,92 \% \pm 1,78 \%$. In der Gruppe der rauchenden Raucher am ersten Tag $5,61 \% \pm 0,9 \%$, am zweiten Tag $5,60 \% \pm 0,8 \%$ und am siebten Tag $5,57 \% \pm 1,05 \%$. Die sehr niedrige Varianz der FMD in den beiden Kontrollgruppen belegt die hohe Qualität und Reproduzierbarkeit der Messungen.

Zur Beschreibung der Variabilität zwischen zwei bzw. drei Messtagen wurde für jeden Probanden die intraindividuelle Variabilität bestimmt und diese Variabilität über alle Probanden gemittelt. Die intraindividuelle Variabilität betrug zwischen zwei Messtagen im Mittel 0,18965 (Min 0,02121, Max 0,39598) und zwischen drei Messtagen im Mittel 0,19533 (Min 0,03512, Max 0,35529) als Maß, wie stark diese intraindividuelle Variabilität zwischen den Probanden schwanken kann.

Als weiteren möglichen Kritikpunkt könnte man anführen, daß Kotininbestimmungen nur bei Rauchern und nicht bei der Gruppe der Nichtraucher durchgeführt wurden. Wir halten einen hierdurch bedingten möglichen Einfluss auf die Studienergebnisse aber für vernachlässigbar, da sich die an Tag 7 der Nikotinkarenz bei den Rauchern mit Rauchpause gemessenen Werte sehr gut mit denen in der Literatur bei nicht mehr aktiven Rauchern und Nichtrauchern gemessenen Werten vergleichen lassen (159).

untersuchtes Kollektiv waren gesunde Personen ohne positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen. Durchschnittlich wiesen seine Probanden 13,5 Packyears auf. Die FMD der Gruppe der Raucher betrug $6,9 \pm 4,4 \%$, der Nichtraucher $10,5 \pm 6,2 \%$, also durchschnittlich 3,6 % Unterschied zwischen den beiden Kollektiven, was einen signifikanten Unterschied darstellte. Die untersuchten Probanden dieser Studie wiesen zum einen $8,73 \pm 4,37$ (Gruppe der Raucher) und $7,6 \pm 1,12$ Packyears (Gruppe der Raucher mit Nikotinkarenz) auf.

Im Vergleich zu der Gruppe der Nichtraucher wiesen die beiden Gruppen der Raucher in dieser Studie eine Reduktion der endothelabhängigen Vasodilatation von durchschnittlich etwa 3,21 % trotz relativ geringer Raucheranamnese auf. Die Reversibilität der endothelialen Dysfunktion konnte ebenfalls in zahlreichen Studien belegt werden.

Ein mit der vorliegenden Arbeit nicht ganz vergleichbares Kollektiv untersuchte Raitakari et al (50). Dieser untersuchte in seiner Studie Personen im Alter von 15 – 39 Jahren, von denen eine Gruppe Nichtraucher, eine Gruppe Passivraucher und eine Gruppe frühere Passivraucher waren. Die Gruppe der Passivraucher waren bei Beginn der Studie ein Jahr lang keinem Tabakrauch mehr ausgesetzt. Raitakari belegte mit seiner Studie, dass bei den früheren Passivrauchern eine Verbesserung der endothelialen Funktion eingetreten war, die jedoch immer noch durchschnittlich 3,8 % unterhalb der Endothelfunktion der Nichtraucher lag. Moreno et al (96) zeigten, dass bei starken Rauchern (mindestens 20 py) nach einer Nikotinkarenz eine Normalisierung der bradykinininduzierten Dilatation der Handvene innerhalb von 24 Stunden erreicht wurde.

Celermajer et al (111) unters

dem Nikotinkonsum. Mit steigendem Nikotinkonsum, der in Packyears angegeben wird, resultiert eine Abnahme der FMD. Die in dieser Studie dargest

Schlafapnoesyndrom leiden, zu einer Verbesserung der FMD führt. In dieser Studie wurde in den ersten Minuten ein Vitamin C Plas

verzeichnen ist. Padayatti et al (154) zeigten, dass eine orale Aufnahme von Vitamin C nicht zu einer suffizienten Wirkung führt. Die orale

von Vitamin C auf die Endothelfunktion untersucht haben, lässt sich festhalten, dass zumindest die orale

15 Raucher, die ihr Rauchverhalten nicht änderten. Die Messung der FMD der A. brachialis

at any point of time.

Endothelial function in smokers is restored completely as early as 24 hours after smoking cessation. The improvement of FMD after application of antioxidant vitamin C is in favour of oxidative stress being responsible for the endothelial dysfunction in smokers.

6. Tabellenanhang

