

Aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Universität zu Lübeck

Direktor:
Prof. Dr. med. P. Dominiak

**Hämodynamische und metabolische Konsequenzen einer
medikamentösen Intervention des Renin-Angiotensin-
Systems bei der spontan hypertensiven Ratte**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Christopher Schwartz
aus Marburg

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Walter Raasch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Horst Pagel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.07.2006

gez. Prof. Dr. med. W. Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

*Meinem Großvater
Apotheker Albert Schoenemann,*

*meiner Familie,
deren Liebe, deren Humor, deren Unterstützung
dieses möglich machten.*

Inhalt	i
Abkürzungen	iii
1. Einleitung	1
2. Methoden	10
2.1. Tierversuche	10
2.1.1. Behandlung der Tiere mit Arzneistoffen	10
2.1.2. Blutdruckmessung am wachen Tier	12
2.1.3. Präparation der Tiere für den Clamp-Versuch	13
2.1.4. Euglykämischer Glukose-Clamp	14
2.1.5. Organentnahme	15
2.2. Analytische Methoden	15
2.2.1. Messung der momentanen Plasma-Glukose-Konzentration	15
2.2.2. Bestimmung der Serum-Insulin-Spiegel	15
2.2.3. Bestimmung des Proteingehalts im Gewebe	16
2.2.4. Bestimmung der Aktivität des Angiotensin I-Konversionsenzym	16
2.2.4.1. Prinzip	16
2.2.4.2. Vorbereitung	17
2.2.4.3. Enzymatischer Ansatz	18
2.2.4.4. Quantifizierung	19
2.2.5. Bestimmung der Endothelin-Konzentration im Serum	22
2.3. Statistische Methoden	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Zwölf-Wochen-Studie mit verschiedenen ACE-Inhibitoren	24
3.1.1. Aktivität des lokalen ACE	24
3.1.1.1. Aorta	24
3.1.1.2. Niere	25
3.1.1.3. Herz	26
3.1.2. Serum-Insulin- und Glukose-Spiegel	27
3.1.3. Endothelin	28
3.2. Vier-Wochen-Studie mit Ramipril und Candesartan	30
3.2.1. Kardiovaskuläre Veränderungen unter Behandlung	30

3.2.2. Aktivität des zirkulierenden ACE	31
3.2.3. Körpergewicht	32
3.2.4. Ventrikuläre Veränderungen	33
3.2.4.1. Linksventrikuläres Gewicht	33
3.2.4.2. Aktivität des gewebeständigen ACE im Ventrikel	34
3.2.5. Einfluss auf den Glukose-Stoffwechsel	35
3.2.5.1. Basale Glukose- und Insulin-Plasma-Konzentrationen	35
3.2.5.2. Plasma-Glukose-Spiegel	37
3.2.6. Glukose-Infusionsrate	38
3.2.7. Hämodynamische Veränderungen während des Clamps	39
3.2.7.1. Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks	39
3.2.7.2. Änderung der Herzfrequenz	40
4. Diskussion	41
4.1. Hämodynamische und ventrikuläre Veränderungen	41
4.2. Interaktion mit Endothelin	46
4.3. Einfluss auf den Glukose-Stoffwechsel	49
4.4. Einfluss auf die Glukose-Verschwinderate im euglykämischen Clamp	51
5. Zusammenfassung	58
6. Literaturverzeichnis	60
Danksagung	71
Anhang	72
○ Verwendete Substanzen	72
○ Verwendete Lösungen	73
○ Verwendete Geräte	75
○ Formeln der Arzneistoffe	76
Curriculum vitae	77

Abkürzungen

ACE	Angiotensin-I-Konversions-Enzym
ACEI	Angiotensin-I-Konversions-Enzym-Inhibitor
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	Varianzanalyse
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor, Subtyp 1
AT ₂	Angiotensin-II-Rezeptor, Subtyp 2
AUC	Fläche unter der Kurve
Can	Candesartan
Cap	Captopril
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
Ena	Enalapril
Fos	Fosinopril
GIR	Glukose-Infusionsrate
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
KG	Körpergewicht
LVG	Linksventrikuläres Gewicht
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ram	Ramipril
RIA	Radio-Immuno-Assay
rpHPLC	HPLC mit Umkehr der Phaseneigenschaften
SBP	systolischer Blutdruck
SHR	spontan hypertensive Ratte
TFA	Trifluoressigsäure

1. Einleitung

Die arterielle Hypertonie verursacht zwar beim betroffenen Patienten keinen direkten Leidensdruck, stellt jedoch einen hohen Risikofaktor für die Entstehung sekundärer kardiovaskulärer Erkrankungen dar, wie zum Beispiel die Myokardinsuffizienz oder die koronare Herzkrankheit. Durch eine rechtzeitig eingeleitete, konsequente antihypertensive Therapie lässt sich die Inzidenz der organischen Folgeereignisse erheblich senken. Die HOT-Studie konnte zeigen, dass eine Blutdruckreduktion eine Verbesserung der Lebensqualität bedeutet und dass das Ausmaß der Blutdruckreduktion mit der Häufigkeit des Auftretens kardiovaskulärer Ereignisse korreliert (Hansson et al., 1998).

Der zugrunde liegende pathophysiologische Mechanismus ist kurz umrissen folgender: Die primäre Hypertonie führt durch Überlastung des Herzens schnell zu einer Linksherzhypertrophie, die konsekutiv zu einer Herabsetzung der systolischen Wandspannung führt. Sowohl die arterielle Hypertonie als auch die hypertrophe Kardiomyopathie stellen Ursachen für die Entstehung einer Linksherzinsuffizienz dar. Diese führt unmittelbar zu einer Sauerstoffunterversorgung des Myokards, zumal auch der Sauerstoffbedarf des Herzens und damit konsekutiv der -verbrauch durch die Hypertrophie gesteigert ist. Der Myokardinfarkt und die Myokardinsuffizienz bedingen sich also in der Folge gegenseitig. Ursache für die Ausbildung des hypertrophen Herzens sind neben der Druckbelastung auch die Aktivierung neuro-humoraler Vorgänge wie eine Stimulation des sympathischen Nervensystems oder des Renin-Angiotensin-Systems (Übersicht bei Susic et al., 1995).

Die physiologische Gegenregulation des Organismus äußert sich in einem Anstieg des Sympathikotonus sowie in einer Stimulierung des Renin-Angiotensin-Systems, woraus wiederum ein Blutdruckanstieg resultiert. Aus diesem pathophysiologischen Bild leiten sich die etablierten Therapieansätze ab: Als Antihypertonika finden Arzneistoffe Anwendung, die auf das sympathische Nervensystem, das Renin-Angiotensin-System oder den Gefäßwiderstand Einfluss nehmen. Hierzu zählen α - und β -Adrenozeptorantagonisten, ACE-Hemmstoffe, Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten, Diuretika, Kalziumkanalblocker sowie direkt am Gefäß wirkende Vasodilatoren.

α_1 -selektive Rezeptorenblocker wirken vornehmlich über eine Hemmung der α_1 -vermittelten Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur. Für die β_1 -

Rezeptorenblocker wird als Mechanismus der antihypertensiven Wirkung die Senkung des Herzzeitvolumens und die Reduktion der Renin-Sekretion postuliert. Eine weitere Arzneistoffgruppe, die über eine Interaktion mit neuroendokrinen Systemen ihre antihypertensive Wirkung entfaltet, sind die ACE-Hemmstoffe. Die Wirkung beruht auf der Hemmung des Angiotensin-I-Konversionsenzym und somit einer verminderten biochemischen Genese des hochpotenten Vasokonstriktors Angiotensin II. Die noch wesentlich jüngeren Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten unterdrücken die Wirkung dieses Moleküls durch reversible Blockade des AT₁-Rezeptors. Kalzium-Antagonisten blockieren den langsamen Ca²⁺-Einstrom durch Kalziumkanäle vom L-Typ in den Gefäßmuskelzellen der Arteriolen und erniedrigen so den peripheren Widerstand. Bei den Diuretika kommt die Wirkung initial durch eine Abnahme des Plasma- und Herzzeitvolumens zustande, später vermutlich durch ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf vasokonstriktorische Reize infolge des verringerten Natriumionengehalts der Gefäßwand. Auch hier sinkt langfristig der periphere Gefäßwiderstand. Das Antisymphotonikum Clonidin ist ein Agonist an zentralen α₂-Rezeptoren. Seine antihypertensive Wirkung beruht auf einer Abnahme der Frequenz der Aktionspotentiale sowie auf einer verminderten Freisetzung von Noradrenalin pro Aktionspotential.

Die Bandbreite der Interventionsmöglichkeiten bei pathologisch erhöhtem Blutdruck ist offensichtlich ebenso groß wie das Spektrum der an seiner Entstehung potentiell beteiligten pathophysiologischen Vorgänge. Die Empfehlungen der Fachgesellschaften sind jedoch beweisgestützt auf den statistischen Auswertungen zahlreicher Studien; die „evidence-based medicine“ ist zu einem harten Kriterium für die Beurteilung einer Therapieempfehlung geworden.

Die Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks empfiehlt, die antihypertensive Therapie mit einer einzigen Substanz zu beginnen. Dabei kommen Betablocker, Diuretika, Kalziumantagonisten, ACE-Hemmer und AT₁-Antagonisten in Betracht (s. „Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung der arteriellen Hypertonie“, 2003). Es ergaben sich dabei nach den letzten ausgewerteten Studien keine qualitativen Unterschiede zwischen den Substanzklassen (Staessen et al., 2003).

Die pharmakologische Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems ist einer von verschiedenen etablierten therapeutischen Ansätzen, den pathologisch

erhöhten Blutdruck zu senken. Sowohl die ACE-Hemmstoffe, die durch die kompetitive Hemmung des Angiotensin-I-Konversions-Enzyms die Bildung des hochpotenten Vasokonstriktors Angiotensin II verhindern, als auch die Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, die die Wirkung von Angiotensin II am Erfolgsorgan unterdrücken, sind in der antihypertensiven Therapie gut evaluiert und fest etabliert.

Die ACE-Hemmer werden seit zwei Jahrzehnten therapeutisch gegen den hohen Blutdruck eingesetzt, zunächst vor allem bei Patienten mit sehr aktivem Renin-Angiotensin-System. Zahlreiche Untersuchungen belegten eine gute Wirksamkeit auch bei Patienten mit normaler Plasma-Renin-Aktivität (Kooner et al., 1989). Darüber hinaus wurden die organprotektiven Eigenschaften der Vertreter dieser Arzneistoffklasse offensichtlich, ACE-Hemmer gelten als nephro-, vaso- und kardioprotektiv (Schölkens und Linz, 1990; Juggi et al., 1993). In der Kardioprotektion liegt eine weitere Indikation dieser Substanzen begründet: die Herzinsuffizienz. Mit der Wirksamkeit gegen Folgeerkrankungen oder Begleiterkrankungen, dem Ausbleiben von Toleranzentwicklungen auch nach mehrjähriger Anwendung, der guten Kombinierbarkeit mit anderen Antihypertensiva sowie der Stoffwechselneutralität erfüllen die ACE-Hemmer wesentliche Anforderungen, die an ein modernes Antihypertensivum gestellt werden. Zahlreiche multizentrisch durchgeführte klinische Studien konnten immer wieder die Wirkung verschiedener ACE-Hemmer sowohl bei der essentiellen Hypertonie als auch bei der Herzinsuffizienz nach erlittenem Myocardinfarkt unter Beweis stellen, zum Beispiel die CONSENSUS-Studie für Enalapril (Swedberg et al., 1992), die SAVE-Studie für Captopril (Rutherford et al., 1994; Pfeffer et al., 1992), die AIRE-Studie für Ramipril (AIRE Study Investigators, 1993), die GISSI-Studie für Lisinopril (Zuanetti et al., 1997) oder die TRACE-Studie für Trandolapril (Torp-Pedersen und Kober, 1999).

Obwohl der Wirkmechanismus aller ACE-Hemmstoffe der gleiche ist, konnten jedoch auch Unterschiede innerhalb der Substanzklasse herausgearbeitet werden. In einem direkten Vergleich zwischen Captopril und Enalapril zeigten die im Rahmen einer multizentrischen Studie mit Captopril behandelten Patienten einen stärkeren positiven Impuls in Bezug auf ihre Lebensqualität als die mit Enalapril behandelten Patienten (Testa et al., 1993). ACE-Inhibitoren mit einer Sulfhydrylgruppe erwiesen sich am isolierten Meerschweinchenherzen bezüglich der linksventrikulären Entspannung als effektiver als solche ohne eine

Sulfhydrylgruppe im Molekül (Anning et al., 1997). Eine placebokontrollierte doppelblinde randomisierte klinische "crossover"-Studie mit fünf verschiedenen ACE-Inhibitoren ergab vergleichbare kardiovaskuläre Effekte, aber eine Überlegenheit von Lisinopril bezüglich der Verbesserung der Insulinsensitivität (Paolisso et al., 1992). Da diese klinisch bedeutsamen Unterschiede mit dem Wirkprofil der Arzneistoffe nicht erklärt werden können, lag es nahe zu untersuchen, ob die verschiedenen Stoffe unterschiedliche Wirkungen auf lokale Renin-Angiotensin-Systeme zeigen.

Die Existenz lokaler, gewebeständiger Renin-Angiotensin-Systeme konnte immunhistochemisch und biochemisch in mehreren Geweben demonstriert werden (Dzau, 1987). In vitro konnte die vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin II am isoliert perfundierten Rattenherz durch Captopril abgeschwächt werden (Traquandi und Riva, 1998). Dadurch hat sich das Bild des Renin-Angiotensin-Systems vom endokrinen System hin zu einem zumindest teilweise autokrin und/oder parakrin arbeitenden System gewandelt (Falkenhahn et al., 1994; Stock et al., 1995). Außerdem wurde für die Hemmung der ACE-Aktivität in einigen Geweben eine bessere Korrelation mit Ausmaß und Dauer der Blutdruckreduktion gefunden als für die Hemmung der Serum-Aktivität (Sakaguchi et al., 1988; Veltmar et al., 1991; Hirsch et al., 1992).

Insbesondere ging es um einen direkten Vergleich der einzelnen ACE-Inhibitoren bezüglich ihrer Potenz, das Renin-Angiotensin-System zu unterdrücken und um eine Aussage darüber, ob das Ausmaß der Unterdrückung in den verschiedenen Geweben unterschiedlich ist. Außerdem wurde untersucht, ob die Arzneistoffe Einfluss auf andere neurohumorale oder metabolische Prozesse nehmen, und ob diese Einflussnahme abhängig von einer Blutdruckreduktion ist oder direkt vermittelt wird. Exemplarisch fiel die Wahl dabei auf ACE-Hemmstoffe, die unterschiedliche Zinkliganden aufweisen, deren Bindungsstelle an das katalytische Zentrum des Enzyms also jeweils eine andere funktionelle Gruppe darstellt, und die sich in ihren physiko-chemischen Eigenschaften unterscheiden. So besitzen Enalapril und Ramipril eine Carboxylgruppe als Ligand, Captopril besitzt eine Sulfhydrylgruppe und Fosinopril eine Phosphorylgruppe. Um zu sehen, inwieweit die Effekte, die aus der Hemmung des lokalen Renin-Angiotensin-Systems resultieren, unabhängig sind von der systemischen blutdrucksenkenden Wirkung der Arzneistoffe, wurden die vier ACE-Inhibitoren in

jeweils zwei Dosierungen eingesetzt, nämlich einer hypotensiven und einer nicht-hypotensiven.

Die linksventrikuläre Hypertrophie ist ein Symptom, das unabhängig vom Blutdruck die Entstehung von Arrhythmien, Ischämien, koronarer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod begünstigt (Froehlich et al., 1992). Zu dieser Hypothese gelangte auch die Framingham-Studie nach der Auswertung echokardiographischer Messungen (Levy et al., 1990). Verschiedene antihypertensive pharmakotherapeutische Ansätze unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, die Linksherzhypertrophie zur Regression zu bringen, unabhängig von ihrem drucksenkenden Effekt, der konsekutiv auch eine Reduzierung der Wandspannung des Herzens bedeutet. Sowohl Studien an hypertensiven Tiermodellen als auch meta-analytische Auswertungen der Pharmakotherapie beim humanen Hypertonus unterstützen die Vermutung, dass ACE-Inhibitoren bei der Hypertrophieregression des linken Ventrikels eine entscheidende Rolle spielen (Richards et al., 1994). Der Mechanismus der Wirkung konnte jedoch noch nicht geklärt werden. In diesem Zusammenhang sollten deshalb andere Systeme untersucht werden, über deren Beeinflussung die organprotektiven Eigenschaften der ACE-Inhibitoren eventuell erklärbar sein könnten. Insulin, Endothelin und Kollagen stellen Substanzen dar, deren Synthese die Ausbildung einer Herz- oder Gefäßhypertrophie beeinflusst.

Das metabolische Syndrom, gekennzeichnet durch Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, die eine Hyperglykämie, erhöhte VLDL- und erniedrigte HDL-Werte und einen Hypertonus nach sich ziehen, ist für den diabetischen Patienten äußerst gefährlich. Es gilt als gesichert, dass Insulinresistenz und Hyperinsulinämie im engen Zusammenhang zur koronaren Herzkrankheit stehen (Baillie et al., 1998). Kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit Abstand die Haupttodesursache dieser Patientengruppe, wovon die koronare Herzkrankheit wiederum die bedeutendste ist (Herlitz und Malmberg, 1999).

Eine antihypertensive Pharmakotherapie sollte zweifelsohne nicht die Entstehung einer Hyperinsulinämie oder einer Insulinresistenz begünstigen. Da bei diabetischen Patienten und solchen, die Gefahr laufen, einen Diabetes zu entwickeln, die positiven blutdrucksenkenden Effekte einiger Substanzklassen durch die negativen diabetogenen abgeschwächt werden, werden metabolische

Aspekte in der antihypertensiven Therapie eine immer bedeutendere Rolle spielen. Für die Behandlung der Hypertonie bei Patienten mit nicht insulinpflichtigem Diabetes mellitus (NIDDM) haben sich ACE-Hemmstoffe aufgrund ihrer positiven Wirkungen auf den Stoffwechsel in vielen Studien als vorteilhaft erwiesen. Die schwedische Quinapril-Gruppe beschrieb eine Überlegenheit von Quinapril über Metoprolol nach jeweils sechsmonatiger Behandlung hypertensiver Patienten mit Typ-II-Diabetes bezüglich der oralen Glukosetoleranz und der Insulinantwort auf einen Glukosereiz (Ostmann et al., 1998).

Vor diesem Hintergrund war es wichtig, nicht nur die metabolischen Effekte der antihypertensiven Substanzklassen herauszuarbeiten, sondern darüber hinaus zu untersuchen, ob eine Kombinationstherapie mit ACE-Inhibitoren und AT₁-Antagonisten auch in dieser Hinsicht synergistisch wirkt.

Insulin bewirkt eine gesteigerte Expression von vaskulären AT₁-Rezeptoren (Nickenig und Böhm, 1998). Auch dies spricht dafür, bei diabetischen Patienten, die einer antihypertensiven Kombinationstherapie bedürfen, zwei Substanzklassen mit Wirkung auf das Renin-Angiotensin-System zum Einsatz zu bringen.

Ein weiterer Punkt ist der, dass ACE-Hemmstoffe allein das System aufgrund ihres Wirkmechanismus nicht ausreichend unterdrücken können. Durch die verminderte Angiotensin-II-Produktion kommt es nämlich durch Aktivierung eines Rückkopplungs-Mechanismus zu einer vermehrten Reninausschüttung und dadurch wiederum zu einem Anstieg der Konzentration von Angiotensin I. Außerdem sind ACE-Hemmstoffe auch nicht in der Lage, die nicht ACE-vermittelte Entstehung von Angiotensin II zu beeinflussen. So konnte in zahlreichen Versuchen belegt werden, dass *in vitro* die Herz-Chymase, eine chymotrypsinähnliche Serinprotease, in der Lage ist, Angiotensin I in Angiotensin II umzuwandeln (Kokkonen et al., 2001). Diese Reaktion ist durch ACE-Hemmstoffe nicht unterdrückbar. Da das ACE ein sehr unspezifisches Enzym ist, beeinflusst es auch andere physiologische Systeme. Die Hemmung des Kininabbaus ist dabei sicher am bedeutendsten und wahrscheinlich verantwortlich für substanzklassenspezifische Nebenwirkungen wie das häufig auftretende Angioödem. ACE-Hemmstoffe unterdrücken aufgrund ihres Wirkmechanismus außerdem die Angiotensin-II-vermittelten Wirkungen an beiden bisher bekannten Rezeptor-Subtypen, während die AT₁-Antagonisten sehr selektiv nur die AT₁-Rezeptor-vermittelten Wirkungen blockieren. Die Relevanz dieser Tatsache ist

allerdings erst zu beurteilen, wenn über die physiologische Bedeutung des AT₂-Rezeptors mehr bekannt wird. Es werden aber beispielsweise antiproliferative Wirkungen diskutiert, die über diesen Rezeptor vermittelt sein könnten (Übersicht bei Jöhren et al., 2004). Dies könnte bedeuten, dass unter Blockade der AT₁-Rezeptoren und einer konsekutiven feedback-vermittelten Mehrproduktion von Angiotensin II die antihypertrophen Effekte nicht nur durch fehlende Aktivierung der AT₁-Rezeptoren, sondern auch durch Stimulation der AT₂-Rezeptoren vermittelt werden. Dieses gilt nicht nur für die Wirkungen von Angiotensin II, sondern auch für die seiner aktiven Metaboliten wie Ang(1-7) (Ferrario, 2003) oder Ang(3-8) (Swanson et al., 1992). Da jedoch andererseits die Angiotensin-II-Spiegel im Plasma unter AT₁-Blockade um den sieben- bis zehnfachen Wert ansteigen (Raasch et al., 2002a), wodurch es bereits zu einem Verdrängen des AT₁-Antagonisten vom Rezeptor kommt (Morsing und Vauquelin, 2001), könnte die antagonistische Wirkung abgeschwächt werden.

In jedem Fall lassen die Wirkmechanismen der beiden Substanzklassen für die AT₁-Antagonisten eine vollständigere Unterdrückung des Renin-Angiotensin-Systems erwarten.

Die ACE-Inhibitoren haben sich bereits in mehreren klinischen Studien ebenso wie Kalzium-Antagonisten als stoffwechselneutral herausgestellt, während Betablocker und Diuretika die Entstehung eines metabolischen Syndroms offenbar begünstigen (Suter und Vetter, 1995). Für die wesentlich neuere Substanzklasse der AT₁-Antagonisten ist die Datenlage noch nicht so eindeutig. Es existieren jedoch Hinweise aus tierexperimentellen Arbeiten, dass auch die AT₁-Antagonisten positiven Einfluss auf eine Insulinresistenz nehmen (Higashiura et al., 2000). Diese Hinweise konnten an nicht-diabetischen Hochdruckpatienten nicht bestätigt werden (Fogari et al., 1998a). Die durchgeführte Clamp-Studie sollte noch einmal im direkten Vergleich zeigen, ob und in welchem Maße die Insulinsensitivität der spontan hypertensiven Ratte durch Dauertherapie mit einem AT₁-Antagonisten beeinflusst wird und ob dieser eventuelle Einfluss sich durch Kombination mit einem ACE-Hemmstoff steigern lässt.

ACE-Hemmstoffe haben sich auch in der Kombinationstherapie mit anderen Antihypertonika bewährt, die Kombination mit Kalziumantagonisten oder Diuretika wird von der deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks als

synergistisch eingestuft und empfohlen (AWMF-Leitlinien-Register Nr. 046/001). Eine doppelblind angelegte Studie konnte zeigen, dass die Kombination von Ramipril mit dem Diuretikum Hydrochlorothiazid zu einem additiven hypotensiven Effekt der Einzelkomponenten führte. Das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen wurde dabei deutlich gemindert (Heidbreder et al., 1991). Die antihypertensive Kombinationstherapie von einem ACE-Hemmstoff mit einem Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten hat sich hingegen noch nicht fest etabliert. Dabei wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass die hypotensive Wirkung einer Kombinationstherapie größer ist als bei einem ACE-Inhibitor oder einem Rezeptorantagonisten allein (Nunez et al., 1997). Darüberhinaus konnten Versuche von Raasch zeigen, dass sich für äquipotente Blutdruckreduktionen bei spontan hypertensiven Ratten die Dosierungen von Ramipril und Candesartan in der Kombination gegenüber der jeweiligen Monotherapie erheblich reduzieren lassen (Raasch et al., 2004). Für eine positive Beurteilung der Arzneistoffkombination ist neben dem offensichtlich synergistischen antihypertensiven Effekt wiederum die Reduktion von Nebenwirkungen sowie das Ausmaß der organprotektiven Wirkung und des stoffwechselneutralen oder unter Umständen sogar –positiven Verhaltens der Therapie entscheidend. In einer weiteren Studie mit spontan hypertensiven Ratten sollte daher eine Kombinationstherapie von Ramipril mit Candesartan mit der jeweiligen Monotherapie verglichen werden: und zwar bezüglich der Parameter Blutdruckreduktion, Hemmung von lokalem und zirkulierendem ACE, Regression der Herzhypertrophie sowie einer Beeinflussung der Insulinsensitivität.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der durchgeführten Versuche zu klären, ob es zwischen strukturell unterschiedlichen ACE-Hemmstoffen Unterschiede in ihrer Wirksamkeit gibt sowohl bezüglich ihrer Intensität der Beeinflussung lokaler Renin-Angiotensin-Systeme als auch bezüglich eventueller Interaktionen mit anderen neurohumoralen Systemen im Organismus.

Um den Einfluss der antihypertensiven Therapie auf den Glukose-Stoffwechsel über die Ermittlung der basalen Glukose- und Insulinspiegel hinaus genauer zu untersuchen, wurden euglykämische Glukose-Clamp-Versuche durchgeführt. Durch diese Versuche sollte Aufschluss darüber gewonnen werden, ob die in der Literatur beschriebenen stoffwechselpositiven Eigenschaften der ACE-

Hemmstoffe in vergleichbarem Ausmaß auch den AT₁-Antagonisten zugeschrieben werden können, und ob additive Effekte einer Kombinationstherapie nicht nur bezüglich der hypotensiven, sondern auch der stoffwechselbeeinflussenden Wirkungen auftreten.

2. Methoden

2.1. Tierversuche

Alle Tierexperimente wurden entsprechend der Deklaration von Helsinki und den entsprechenden Richtlinien zum Umgang und Verwendung von Labortieren durchgeführt. Die Versuche wurden durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Tierversuchsnummern: 9/r/95 und 9/A24/98). Es wurden männliche Spontan Hypertensive Ratten (SHR; Charles River, Sulzfeld, Deutschland, Gewicht 220-280 g) verwendet. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen in Makrolon[®] Plastik-Käfigen bei Raumtemperatur und einem 12 h/12 h Tag/Nacht-Zyklus gehalten. Sofern nicht anders angegeben, hatten sie freien Zugang zu Futter und Trinkwasser.

2.1.1. Behandlung der Tiere mit Arzneistoffen

Für die euglykämischen Glukose-Clamp-Versuche wurden 250-270 g schwere spontan hypertensive Ratten (SHR) verwendet. Sie wurden in Gruppen von fünf Tieren pro Käfig bei einem 12/12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus eine Woche an ihre Umgebung gewöhnt. Danach wurde mit der chronischen vier Wochen andauernden Arzneistoffgabe begonnen. Jeweils zwanzig Tiere bekamen entweder Ramipril, Candesartan, die Kombination Ramipril/Candesartan oder eine Lösung von Gummi arabicum in Wasser einmal täglich. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser. Die Arzneistoffe wurden den Tieren einmal täglich nachmittags oral über eine Schlundsonde appliziert. Da zwei Tiere pro Tag dem Glukose-Clamp-Versuch unterzogen wurden, wurde entsprechend mit der Arzneistoffbehandlung täglich bei zwei Tieren begonnen, so dass alle Tiere über einen gleich langen Zeitraum behandelt wurden, und der Versuch bei jedem Tier unmittelbar nach der vierwöchigen Fütterungsphase durchgeführt werden konnte. Die Dosierung betrug für Ramipril 1 mg/(kgKG-Tag), für Candesartancilexetil 2,5 mg/(kgKG-Tag) und für die Kombination der beiden Stoffe 0,15 bzw. 0,45 mg/(kgKG-Tag). Die als Kontrolle dienenden Tiere erhielten eine 10prozentige Lösung von Gummi arabicum in Leitungswasser. Die Arzneistofflösungen wurden auf folgende Weise hergestellt: Candesartancilexetil (125mg) wurde aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit in einer Reibschale mit Gummi arabicum (5g)

verrieben. Zu dem homogenen Gemenge wurde ein wenig Wasser gegeben, dieses Gemisch wurde homogen verrieben, dann wurde wieder Wasser zugegeben, wieder homogen verrieben und so fort bis ein Flüssigkeitsvolumen von 50ml erreicht wurde. Ramipril (50mg) konnte einfach im Becherglas auf einem Magnetrührer in 50ml Wasser gelöst werden. Diese Lösung wurde mit 5g Gummi arabicum angerieben. Für die Kombinationsbehandlung wurden 7,5mg Ramipril in wenig Wasser gelöst, diese Lösung wurde zu einem homogenen Gemenge aus 22,5mg Candesartancilexetil und 50g Gummi arabicum gegeben und dann weiter wie oben beschrieben bis zum Erreichen eines Volumens von 50ml verrieben. Die vier Lösungen wurden maximal für zwei Wochen kühl aufbewahrt, bei Bedarf wurden neue Lösungen angesetzt.

Die Organe der SHR-Tiere, bei denen die ACE-Aktivität in Abhängigkeit des verwendeten ACE-Hemmers und der jeweiligen Dosierung untersucht wurde, entstammten aus einer Studie, bei der die Tiere über einen Zeitraum von zwölf Wochen mit vier verschiedenen ACE-Hemmstoffen behandelt worden waren, jeweils in einer ihrer hypotensiven Wirkung bezüglich äquipotenten Dosierung, und in einer nicht-hypotensiven Dosierung. Jede der Gruppen bestand aus 15 Tieren, die allen Behandlungsgruppen als Kontrolle dienende Gruppe bestand aus 40 Tieren. Die Haltung der Tiere und das Procedere der Arzneistoffapplikation erfolgte wie in der 4-Wochen-Studie. Es ergab sich für Enalapril eine Dosierung von 10 mg/(kgKG·Tag), für Ramipril 1 mg/(kgKG·Tag), für Fosinopril 20 mg/(kgKG·Tag) und für Captopril 2·25 mg/(kgKG·Tag). Die nicht-hypotensiven Dosierungen betragen jeweils ein Prozent der vorgenannten. Die Arzneistoffe wurden in Wasser gelöst, die Lösungen wurden für maximal zwei Wochen bei 4-8°C aufbewahrt. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die unter diesen Dosierungen erzielte Blutdrucksenkung sowie den Einfluss auf die Entwicklung des linksventrikulären Gewichts und der Mediadicke der thorakalen Aorta (nach Raasch et al., 2002b).

	SBP (mmHg)	LVG (mg/g KG)	Mediadicke ($\mu\text{m}/\text{g KG}$)
KON	221 \pm 2	3,068 \pm 0,046	0,461 \pm 0,007
CAP ₅₀	161 \pm 2 *	2,527 \pm 0,046 *	0,321 \pm 0,011 *
CAP _{0,5}	216 \pm 3 \cong	2,927 \pm 0,023 \cong	0,387 \pm 0,007 * \cong
ENA ₁₀	166 \pm 5 *	2,498 \pm 0,037 *	0,315 \pm 0,007 *
ENA _{0,1}	216 \pm 3 \cong	2,881 \pm 0,046 \cong	0,360 \pm 0,013 *
RAM ₁	178 \pm 5 *	2,482 \pm 0,047 *	0,340 \pm 0,004 *
RAM _{0,01}	216 \pm 4 \cong	2,997 \pm 0,034 \cong	0,373 \pm 0,012 *
FOS ₂₀	186 \pm 6 *	2,540 \pm 0,047 *	0,338 \pm 0,010 *
FOS _{0,2}	219 \pm 3 \cong	2,963 \pm 0,027 \cong	0,362 \pm 0,008 *

Tab. 2.1: Einfluss einer 12wöchigen Behandlung von SHR mit Wasser (KON), Captopril (50 bzw. 0,5 mg/(kgKG·d); CAP₅₀ bzw. CAP_{0,5}), Enalapril (10 bzw. 0,1 mg/(kgKG·d); ENA₁₀ bzw. ENA_{0,1}), Ramipril (1 bzw. 0,01 mg/(kgKG·d); RAM₁ bzw. RAM_{0,01}) oder Fosinopril (20 bzw. 0,2 mg/(kgKG·d); FOS₂₀ bzw. FOS_{0,2}) auf den systolischen Blutdruck (SBP), das linksventrikuläre Gewicht (LVG) oder die aortale Mediadicke;

**: $p < 0,05$ vs Kontrolle, \cong : $p < 0,05$ vs. entsprechender hoher Dosierung (nach Raasch et al., 2002b)*

2.1.2. Blutdruckmessung am wachen Tier

Als Parameter für den Erfolg der antihypertensiven Therapie von SHR wurde vor Beginn sowie nach Beendigung der Behandlung der SBP der Tiere mittels modifizierter plethysmographischer Messung bestimmt (Raasch et al., 2002b). Hierfür wurden die Tiere in Zwangskäfigen immobilisiert, sodass sich der Schwanz außerhalb desselben befand. Über einen Polypropylen-Schlauch von einem mobilen Narkose-Automaten zum Käfig wurden den Tieren ein Inspirationsgemisch aus 0,8l/min Sauerstoff und 2l/min Distickstoffmonoxid zugeleitet. Dies war nötig, da die wachen Tiere anderenfalls für eine Blutdruckmessung zu aufgeregt gewesen wären, was wiederum das Messergebnis beeinflusst hätte. Für die Druckmessung wurde den Tieren zunächst eine Staumanschette und dann distal ein Piezo-Ring der Größe 7 über den Schwanz gestreift. Die Rattenschwänze wurden durch Rotlicht-Bestrahlung hyperämisiert bis ein stabiler Puls mit konstanter Amplitudenbreite durch das Piezoelement gut zu detektieren war. Die Bestimmung des systolischen arteriellen Blutdrucks erfolgte dann modifiziert nach der Methode von Riva-Rocci. Mit der proximal zum Piezo-Element angelegten Staumanschette (Gärtnercuff) wurde

über eine Membranpumpe kontinuierlich der Druck gesteigert, bis die Pulswelle durch die Kompression der Schwanzarterie unterbrochen wurde. Als systolischer arterieller Druck wurde so derjenige Manschettendruck registriert, der bereits beim Aufblasen der Manschette gerade keinen Blutfluss durch die Schwanzarterie mehr zuließ. Die Herzfrequenz wurde aus der Anzahl der Pulswellen pro Zeiteinheit ermittelt. Sowohl die Herzfrequenz als auch der systolische arterielle Blutdruck eines Tieres wurden aus jeweils fünf Einzelmessungen gemittelt. In Abbildung 2.1 ist zu erkennen, wie durch die Kompression der Staumanschette sich die Blutdruckamplitude sehr plötzlich verkleinerte; der Blutdruck war graphisch zu detektieren: An der Stelle des Ausbleibens der Amplitude wurde das Lot gefällt auf die darunter aufgezeichnete Blutdruck-Zeit-Kurve. Der zu diesem Zeitpunkt an die Manschette angelegte Druck ließ sich aus dem Schnittpunkt des Lots mit der kalibrierten Kurve ermitteln; er ließ sich über die Kalibrierung unmittelbar aus dem vertikalen Abstand des Schnittpunkts von der Basislinie der Blutdruckkurve ablesen.

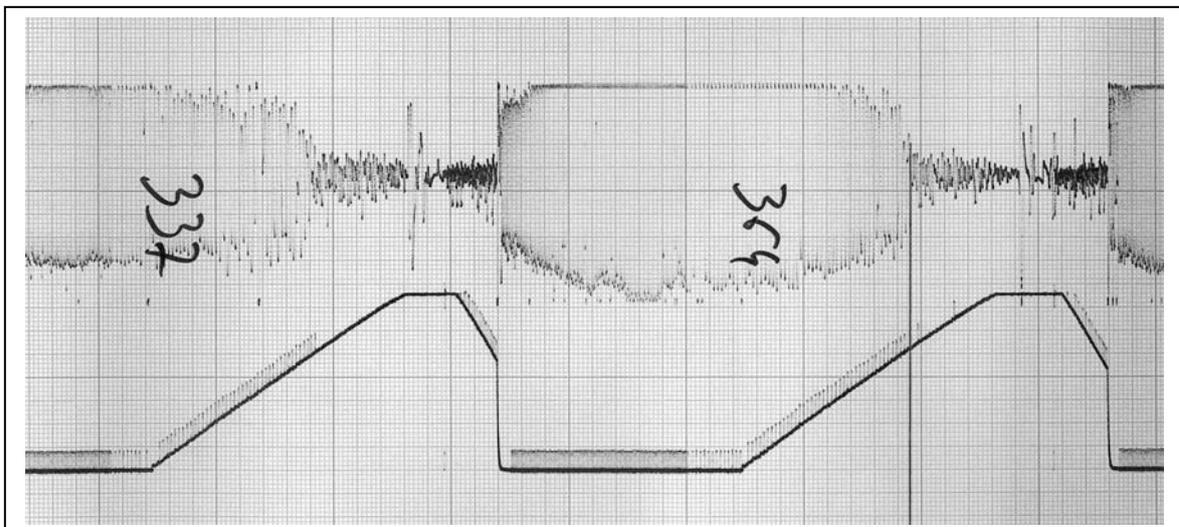


Abb. 2.1: Aufzeichnung des Registriergeräts während der plethysmographischen Blutdruckmessung in der Schwanzarterie; Oben die Blutdruckamplitude, darunter die Blutdruck-Zeit-Kurve; handschriftlich vermerkt die Herzfrequenz der Tiere zum Zeitpunkt der Messung

2.1.3. Präparation der Tiere für den Glukose-Clamp-Versuch

In den Untersuchungen an der narkotisierten Ratte wurden die Einflüsse einer chronischen Behandlung mit Ramipril, Candesartan oder einer Kombination beider

Arzneistoffe auf die Glukoseverschwinderate der Tiere untersucht. 18 Stunden vor dem Versuch wurde den Tieren die Möglichkeit der Nahrungsaufnahme entzogen.

Die Ratten wurden mit Pentobarbital-Natrium (100mg/kgKG) narkotisiert. Das entsprechende Volumen einer Lösung, die 60mg/ml enthielt, wurde den Tieren über eine Injektionskanüle Nr.20 intraperitoneal injiziert. Bei Bedarf konnte die Tiefe der Narkose durch zusätzliche intraperitoneale Injektionen nachreguliert werden.

Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurden die Tiere auf einem kleinen beheizbaren OP-Tisch in Rückenlage fixiert. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe durch Erlöschen des Kornealreflexes und Fehlen von Schmerzreaktionen gesichert worden war, wurde die Haut der Ratte mit einem Medianschnitt zervikal inzidiert und die Halsmuskulatur stumpf mit zwei Pinzetten freipräpariert. Die linke Arteria carotis wurde freigelegt und von anhaftendem Bindegewebe befreit. Zur Messung von Blutdruck und Herzfrequenz wurde ein PE-50-Katheter, der mit einem Statham P 23 Db Druckaufnehmer verbunden war, in die linke Arteria carotis eingeführt und mit zwei Fäden fixiert. Die elektrischen Signale des Druckaufnehmers wurden von einem Gould Pressure Processor gemessen, mit einem DC-Amplifier verstärkt und mit einem Computer kontinuierlich aufgezeichnet. Zur intravenösen Verabreichung von Insulin und Glukose bzw. Kochsalzlösung wurde in eine Vena femoralis ebenfalls ein PE-50-Katheter eingebunden. Über diesen Katheter wurden dem Körpergewicht entsprechend Insulin und dem momentanen Glukosespiegel entsprechend Glukose infundiert. Die Infusion von zwei verschiedenen Lösungen mit unterschiedlichen Infusionsgeschwindigkeiten wurde dadurch ermöglicht, dass der Katheter circa 7 cm vom Ende entfernt – also circa 5 cm vor der Eintrittsstelle in die Vene – eine Gabelung aufwies. Diese Gabelung bestand aus zwei verkürzten Kanülen, die derart gegeneinander fixiert wurden, dass das Ende der einen in das Lumen der anderen mündete, so dass nur ein gemeinsamer Ablauf für beide Kanülen existierte. Gegeneinander fixiert wurden die beiden Kanülen durch Eingießen in einen Plastikblock, die Dichtigkeit der Konstruktion wurde durch regelmäßige visuelle Kontrolle gewährleistet. Der gemeinsame Ablauf mündete in den Venenkatheter, die freien Enden der beiden Kanülen dienten über einen automatischen Infusor und einen PE-50-Schlauch als Zulauf.

2.1.4. Euglykämischer Glukose-Clamp

Eine halbe Stunde nach Beendigung aller chirurgischen Eingriffe wurde mit dem Clamp-Versuch begonnen. Nach einer Blutentnahme und der Bestimmung des Blutzuckerspiegels wurden den Tieren über einen automatischen Infusor und einen PE-50-Katheter 8 mU/(kgKG-min) Insulin infundiert. Nach fünf Minuten wurde ein zweiter Infusor eingeschaltet, der pro Minute 0,3ml einer 20prozentigen Glukoselösung infundierte. Im Abstand von fünf Minuten wurde der Blutzuckerspiegel laufend kontrolliert, und die Glukose-Infusionsrate derart verändert, dass möglichst schnell ein konstanter Glukose-Spiegel von 90mg/dl erreicht wurde. Dies gelang in den allermeisten Fällen so, dass während der letzten dreißig Versuchsminuten keine Veränderungen mehr an der Infusionsrate vorgenommen werden mussten. Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck wurden ebenfalls über die gesamte Versuchsdauer aufgezeichnet. Nach insgesamt 100 Minuten wurde der Versuch beendet, und die Tiere wurden getötet.

2.1.5. Organentnahme

Nach Tötung der Tiere wurden die Organe (Herz, Niere, Aorta) für analytische Zwecke entnommen. Die Organe wurden zügig freipräpariert, von anhaftendem Bindegewebe befreit, gewogen und sofort in ein 2ml-Eppendorf-Cup überführt und in diesem in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie in einer Kältetruhe bei -80°C aufbewahrt und erst unmittelbar vor der weiteren Aufarbeitung wieder aufgetaut bzw. vorher mechanisch zerkleinert.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Messung der momentanen Plasma-Glukose-Konzentration

Die Bestimmung der Plasma-Glukose erfolgte während des Glukose-Clamp-Versuchs kontinuierlich im Abstand von fünf Minuten. Über den Karotis-Katheter der narkotisierten Ratte wurden zwei Tropfen arteriellen Blutes aufgefangen, wofür der Katheter kurzzeitig vom Druckaufnehmer für die Blutdruck- und Herzfrequenzregistrierung getrennt wurde. Das Blut wurde für zehn Sekunden

zentrifugiert, zehn Mikroliter Serum wurden daraufhin für die Bestimmung in die Messküvette des Glukose-Analyse-Automaten pipettiert, der wiederum innerhalb von Sekunden das Messergebnis lieferte. Analysiert wurde dabei nach der Glukose-Oxidase-Methode.

2.2.2. Bestimmung der Serum-Insulin-Spiegel

Blut für die Bestimmung der Insulin-Spiegel wurde den narkotisierten Tieren wiederum über den Karotis-Katheter zu drei Zeitpunkten abgenommen, und zwar zu Beginn des Versuchs sowie nach 80 und nach 100 Minuten, also unmittelbar vor und nach der euglykämischen Versuchsphase.

Die Bestimmung erfolgte mit einem Radioimmunoassay-Kit der Firma Linco: 75µl Serum wurden mit 75µl einer Lösung mit ¹²⁵J-markiertem Insulin und 75µl einer Lösung mit einem spezifischen Antikörper gegen Ratten-Insulin über Nacht bei 4°C in einem Borsilikatglasröhrchen inkubiert. Der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wurde am nächsten Tag durch Zugabe eines Fällungsreagenzes abgefällt, der Überstand wurde vorsichtig vollständig dekantiert und die Radioaktivität des Pellets in einem Gamma-Counter bestimmt. Die Insulin-Konzentrationen der Proben wurden über eine Gerät-immanente Verdrängungskurve bestimmt.

2.2.3. Bestimmung des Proteingehalts im Gewebe

Die Protein-Bestimmung in den einzelnen Geweben erfolgte nach Lowry et al. (1951), und zwar jeweils direkt aus den Pellets, die während der ACE-Bestimmung (2.2.4.3) nach der Perchlorsäure-Fällung angefallen waren. Hierfür wurde das Pellet in 500µl 1N NaOH gelöst. 50µl dieser Lösung wurden mit 950µl 0,9% NaCl versetzt. Für die Bestimmung wurden 300µl dieser Lösung mit 1,5ml Lowry-Mix und 150µl Folin-Reagenz versetzt. Dieser Ansatz wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 540nm im Absorptionsphotometer die Extinktion des blau gefärbten Inkubats gemessen. Jeweils 300µl Proteinstandardlösung mit Proteinkonzentrationen zwischen 0 und 800µg/ml wurden analog behandelt, die erhaltenen Extinktionswerte dienten als Kalibrationskurve für die Bestimmung.

2.2.4. Bestimmung der Aktivität des Angiotensin-I-Konversions-Enzyms

2.2.4.1. Prinzip:

Die Bestimmung der Aktivität des Angiotensin-I-Konversions-Enzyms erfolgte modifiziert nach der Methode von Carmel und Mitarbeitern (1979) mittels Messung der enzymatischen Umsetzung eines spezifischen synthetischen Substrats. Dieses Substrat, ein Tripeptid der Zusammensetzung Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro-OH, wurde mit der zu bestimmenden Probe inkubiert, anschließend wurde als fluoreszierendes Produkt der enzymatischen Spaltung Abz-Gly-OH•HCl per rpHPLC detektiert. Die für die Fluoreszenz verantwortliche Struktur des Reaktionsprodukts wurde dabei im Substrat durch die para-Nitro-Phenylalanyl-Gruppe unterdrückt. Dieses sogenannte „quenching“ des fluoreszierenden Signals hatte den Vorteil, dass das Substrat so gut wie keine Eigenfluoreszenz hatte, die den Nachweis des Produkts empfindlich hätte stören können. Um eine eventuelle nicht-enzymatische oder unspezifische Spaltung nicht fälschlicherweise der ACE-Aktivität zuzuschreiben, wurde parallel zu jeder Probe ein entsprechender Leerwert bestimmt. Dieser Ansatz enthielt als spezifischen ACE-Hemmstoff Enalaprilat in einer Konzentration von 1 µM.

2.2.4.2. Vorbereitung des abgenommenen Blutes und der entnommenen Gewebe auf die Inkubation:

Blut:

Nach der Blutentnahme aus der Arteria carotis über einen PE-Katheter wurde das Blut für eine Stunde auf Eis in einem 2ml-Eppendorf-Cup gelagert, anschließend zentrifugiert und das Serum sofort abpipettiert. Bis zum Beginn des Assays wurden die Proben bei –80°C gelagert.

Herz:

Das tiefgefrorene Herz wurde unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einer Reibschale fein verrieben, ein Aliquot des entstandenen Pulvers wurde dann im Verhältnis 1+5 mit Homogenisationspuffer versetzt. Dieses Gemisch wurde mit einem Potter (Teflonstab im Glasrohr; 5 Minuten) noch einmal homogenisiert,

nach einer anschließenden Zentrifugation (14000 UpM; 4°C; 2 min) wurde mit einem Teil des Überstands weiter verfahren wie unter 2.2.4.3 beschrieben.

Niere:

Die tiefgefrorene Niere wurde so schnell wie möglich, um ein Antauen zu vermeiden, mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurde in einem Potter (Teflonstab im Glasrohr; 5 Minuten) mit Homogenisationspuffer im Verhältnis 1+5 homogenisiert. Nach der folgenden Zentrifugation wurde mit einem Teil des Überstands weiter verfahren wie unter 2.2.4.3 beschrieben.

Aorta:

Die Aorta wurde in einer Petrischale in isotonischer Kochsalzlösung liegend mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurde in einem Potter (Teflonstab im Glasrohr; 5 Minuten) mit Homogenisationspuffer im Verhältnis 1+50 homogenisiert. Nach der folgenden Zentrifugation wurde mit einem Teil des Überstands weiter verfahren wie unter 2.2.4.3 beschrieben.

2.2.4.3. Enzymatischer Ansatz

Die Proben wurden mit dem Inkubationspuffer bis zum Erreichen der Inkubationstemperatur von 37°C vorinkubiert, dann wurde die Substratlösung (500 mM) zugegeben. Dieser Ansatz wurde im Schüttelwasserbad inkubiert, nach genau einer halben Stunde wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 2N Perchlorsäure beendet. Die Proben wurden anschließend für eine viertel Stunde auf Eis gelagert, nach der folgenden Zentrifugation wurde ein Aliquot des Überstands in ein neues Gefäß pipettiert und mit Phosphatpuffer neutralisiert. Ein Aliquot dieser Lösung wiederum wurde mittels eines Autoinjektors in das chromatographische System injiziert, das entstandene Produkt nach der Trennung fluorimetrisch vermessen.

	Proben	Blanks
Serum bzw. Gewebehomogenat	50 µl	50 µl
Inkubationspuffer A	150 µl	-
Inkubationspuffer B	-	150 µl
Substratlösung	50 µl	50 µl
	Wasserbad 37°C; 30 min	
2N HClO ₄	100 µl	100 µl
	Eisbad 15 min	
	Zentrifuge (14000 Upm; 4°C; 10 min)	
	25 µl Überstand + 1000 µl Neutralisationspuffer	

Tab. 2.2: Pipettierschema für die Bestimmung der ACE-Aktivität;
Inkubationspuffer B enthält im Gegensatz zu Inkubationspuffer A 1 mM Enalaprilat

2.2.4.4. Quantifizierung

Bestimmung der Exzitations- und der Emissionswellenlänge:

Zur Optimierung von Reproduzierbarkeit, Messgenauigkeit und Nachweisgrenze der Bestimmung wurde je ein Exzitations- und ein Emissionsspektrum aufgenommen. Hierfür wurde eine Lösung des Produkts der enzymatischen Spaltung in die Messküvette des Fluoreszenzspektrometers gegeben, und es wurde bei 410 nm Emissionswellenlänge (Lage des Emissionsmaximums nach Carmel et al., 1979) ein Exzitationsspektrum von 200-400 nm bei einer Geschwindigkeit von 50 nm pro Minute aufgenommen. Nachdem ermittelt wurde, dass die resultierende Kurve bei 320 nm ein Maximum aufwies, wurde bei dieser Anregungswellenlänge ein Emissionsspektrum von 350-600 nm bei einer Geschwindigkeit von 50 nm pro Minute aufgenommen. Diese Kurve wies ihr Maximum bei 412 nm auf. Sämtliche folgenden Bestimmungen der enzymatisch entstandenen Mengen des Spaltprodukts Abz-Gly-OH•HCl wurden bei der Wellenlängenkombination 320/412 nm durchgeführt. Es konnte zwar beobachtet werden, dass die Strahlungsenergie der Lichtquelle bei dieser Anregungswellenlänge eine Substratspaltung bewirken konnte, die benötigte Zeit für diese nicht-enzymatische Umsetzung war aber im Vergleich zum

Messzeitraum, über den das Substrat der Strahlung ausgesetzt war, so groß, dass das Messergebnis durch diese Fehlerquelle nicht nennenswert beeinflusst wurde.

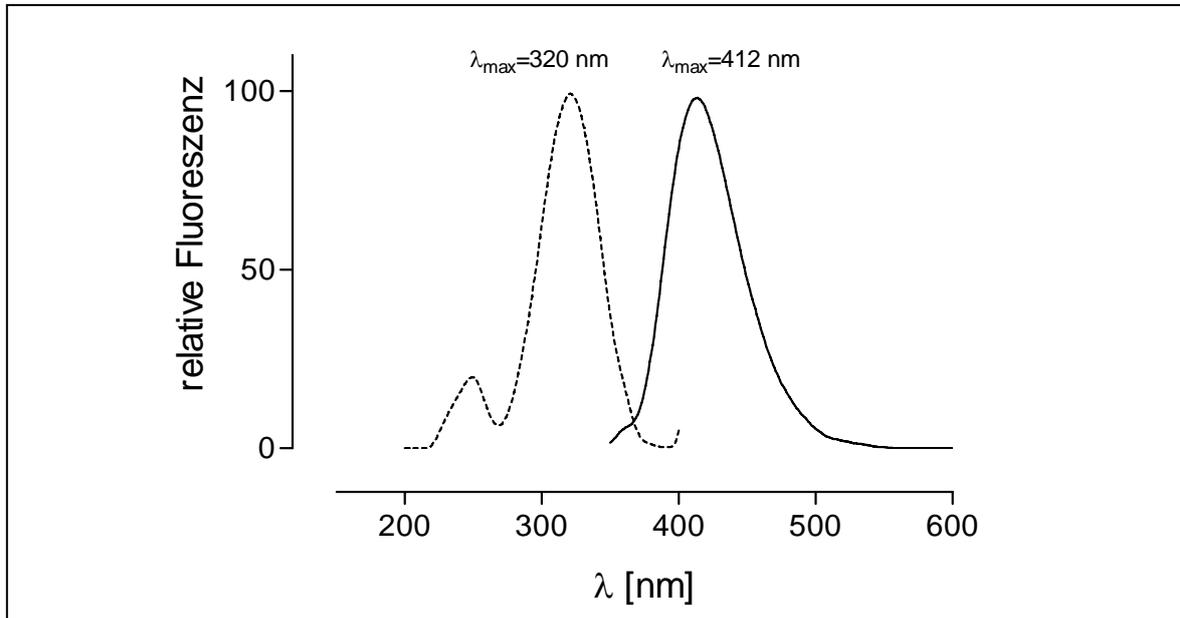


Abb. 2.2: Fluoreszenzspektrum von Abz-Gly-OH bei variabler Exzitations- (gestrichelte Linie) und bei variabler Emissionswellenlänge (durchgezogene Linie)

Detektion:

Nach der Inkubation des Substrats mit den jeweiligen Proben und der Neutralisation mit Phosphatpuffer wurde die ACE-Aktivität durch Quantifizierung des entstandenen Produkts bestimmt. Dieses erfolgte auf zweierlei Art.

Erstes Verfahren:

Die Produktlösung wurde direkt im Fluoreszenzphotometer bei der Wellenlängenkombination 320/412 nm vermessen, ebenso die als Leerwert mitinkubierte Probe. Aus den gemessenen Werten wurde die Differenz gebildet. Diese Differenz wurde mit einer Kalibrationsgeraden in Beziehung gesetzt, die aus den Bestimmungen der Fluorometrie von 0 bis 100 nM Lösungen des Reaktionsprodukts resultierte. Als Nachteil dieser Methode stellte sich heraus, dass bei niedrigen ACE-Aktivitäten die Bestimmung ungenau wurde, weil der Wert des Leerwertes einen erheblichen Anteil des Probenmesswertes ausmachte. Das gleiche Problem stellte sich dar, wenn sich zu viel Substrat im Ansatz befand, da auch dieses eine geringe Eigenfluoreszenz hat, etwa 200 Mal schwächer als die des Produkts. Um aus diesen Sachverhalten resultierende Messfehler auszuschließen, wurde ein zweites Verfahren entwickelt.

Zweites Verfahren:

Damit Substrat und Produkt nicht gemeinsam in der Probe gemessen wurden, wurden die beiden Substanzen zunächst per HPLC voneinander getrennt. Über einen Fluoreszenz-Detektor konnten nun Substrat und Produkt der Reaktion getrennt voneinander erfasst werden. Zudem erwies sich dieses Verfahren als wesentlich sensitiver als das erstere. Aufgrund dieser entscheidenden Vorteile (Trennung von Substrat und Produkt, höhere Sensitivität, Zeitersparnis und bessere Reproduzierbarkeit durch Automatisierung) wurde die ACE-Aktivität in der Folge ausschließlich nach HPLC-Analytik bestimmt.

Entwicklung der chromatographischen Methode:

Die Wellenlängenkombination des Detektors wurde aus den Versuchen mit dem Fluoreszenzphotometer übernommen. Als Fließmittel diente 20 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,6, dem über eine Gradientenpumpe in steigendem Anteil Methanol beigemischt wurde. Das Chromatogramm wies einen deutlichen Peak bei ungefähr 10% organischem Anteil im Fließmittel auf. In der Folge wurde ein Fließmittel hergestellt, das einen Methanol-Anteil von 10% hatte, der Peak erschien bei knapp sieben Minuten. Dass der Peak der eingespritzten Substanz entsprach, wurde über eine Kalibrationsreihe verifiziert, die für Lösungen mit Produktkonzentrationen zwischen 0 und 100 nM absolut linear verläuft. Durch Steigern des pH-Werts auf 7,4 konnte die Retentionszeit verkürzt und zudem der Methanol-Anteil noch weiter gesenkt werden. Ein scharfer, reproduzierbarer Peak erschien jetzt bei knapp vier Minuten, der Substratpeak verschwand bei diesen Bedingungen offensichtlich in der Front. Die Bestimmung des Reaktionsprodukts war mit dieser Methode äußerst genau und in der Durchführung sehr schnell und einfach, zudem automatisiert, was bei einer großen Probenmenge von immenssem Vorteil war.

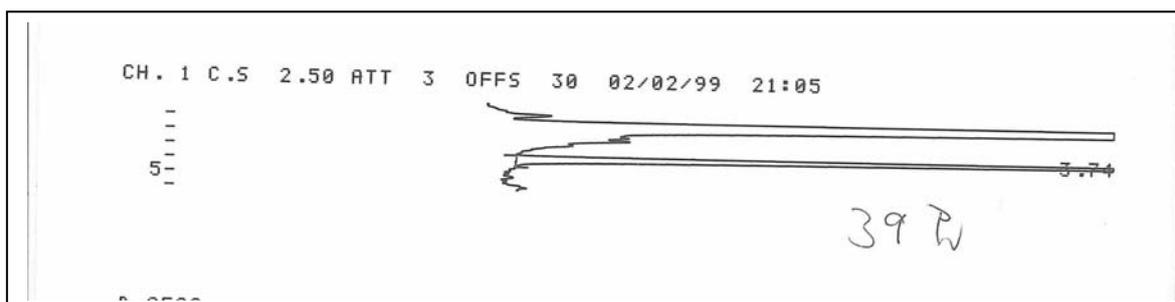


Abb. 2.3: typisches Chromatogramm einer ACE-Aktivitätsbestimmung

Quantifizierung über externe Standardisierung:

Über eine Kalibrationsgerade wurde die Konzentration des Spaltprodukts Abz-Gly-OH in der injizierten Lösung per Vergleich der Peakhöhen ermittelt. Daraus wurde über folgende Formel die Umsetzungsrate des Substrats als Äquivalent für die ACE-Aktivität errechnet:

$$\text{Akt. [pmol/(h·ml)]} = C \cdot 41 \cdot 0,35 \cdot 20 \cdot 2 / 1000$$

C: Konzentration der injizierten Lösung [nM]

Die Multiplikatoren ergeben sich aus dem Pipettierschema des Inkubationsansatzes:

41:	25µl Überstand werden mit 1ml Puffer neutralisiert
0,35:	die Konzentration [pmol/ml] wurde aus einer Lösung bestimmt, deren Gesamtvolumen 0,35ml betrug
20:	es wurden 50µl Serum für die Bestimmung eingesetzt, also der zwanzigste Teil eines Milliliters
2:	Die Inkubationszeit betrug eine halbe Stunde
1/1000:	Umrechnung von pmol auf nmol

2.2.5. Bestimmung der Endothelin-Konzentration im Serum

Die Extraktion von Endothelin aus dem Rattenserum erfolgte mittels Adsorbex[®] RP-18 Extraktionssäulen. Vor Gebrauch der Säulen wurden diese konditioniert, indem sie je dreimal mit Methanol, Acetonitril (80%ig, enthält 1% TFA) und 0,1%iger Trifluoressigsäure und anschließend noch einmal mit 0,05N HCl gespült wurden. Vor der Extraktion wurde Serum (200µl) mit 50µl 2N HCl azidifiziert. 230µl dieser Probe wurden dann auf die Säule gegeben, diese noch zwei Mal mit 1ml 0,1% TFA gewaschen. Anschließend wurde mit 1ml Acetonitril (80%ig, enthält 1% TFA) in ein 2ml-PP-Röhrchen eluiert. Die Eluate wurden bei 50°C durch Stickstoff-Begasung getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Die quantitative Bestimmung von Endothelin-1 erfolgte nach Rütten (Rütten et al., 1996).

2.3. Statistische Methoden

Alle Werte in Tabellen und Abbildungen sind als das arithmetische Mittel der gemessenen Einzelwerte \pm Standardabweichung (SEM) angegeben.

Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse gewertet, wenn die Null-Hypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% verworfen werden konnte. Wurde eine Behandlungsgruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen, so wurde ein t-Test nach Student durchgeführt. Wenn mehrere Verumgruppen mit einer Kontrollgruppe verglichen wurden, wurde mit einer einseitigen ANOVA und mit dem „post hoc test“ nach Bonferroni auf Signifikanz geprüft.

Statistische Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Programms „prism“ von Graph Pad Software.

3. Ergebnisse

3.1. Zwölf-Wochen-Studie mit vier verschiedenen ACE-Inhibitoren in jeweils zwei Dosierungen

In den folgenden Abbildungen sind die Arzneistoffdosierungen der Übersichtlichkeit halber lediglich als hoch beziehungsweise niedrig gekennzeichnet (z. B. Ram-h bzw. Ram-n). Die hohen Arzneistoffdosierungen waren folgende:

Captopril	50 mg/kgKG·pro Tag
Enalapril	10 mg/kgKG·pro Tag
Fosinopril	20 mg/kgKG·pro Tag
Ramipril	1 mg/kgKG·pro Tag

Die niedrigen Dosierungen betragen jeweils ein Prozent der vorgenannten Dosierungen.

3.1.1. Aktivität des lokalen ACE

Um den Einfluss der Arzneistoffbehandlung der Tiere auf das gewebeständige Angiotensin-Konversionsenzym zu untersuchen, wurde seine Aktivität nach Aufbereitung der Gewebe mit einem enzymatischen Assay in der abdominalen Aorta, der Niere und der linken Herzkammer ermittelt.

3.1.1.1. Aorta

Die Aktivität des endothelialen ACE betrug bei den Kontrolltieren $16,9 \pm 1,2$ pmol/(mg_{Protein}·h) und war bei allen behandelten Gruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe gesenkt. Das Ausmaß der Senkung war für jeden Arzneistoff in der hohen Dosierung signifikant höher als in der niedrigen Dosierung (Abb. 3.1; Tab. 3.1).

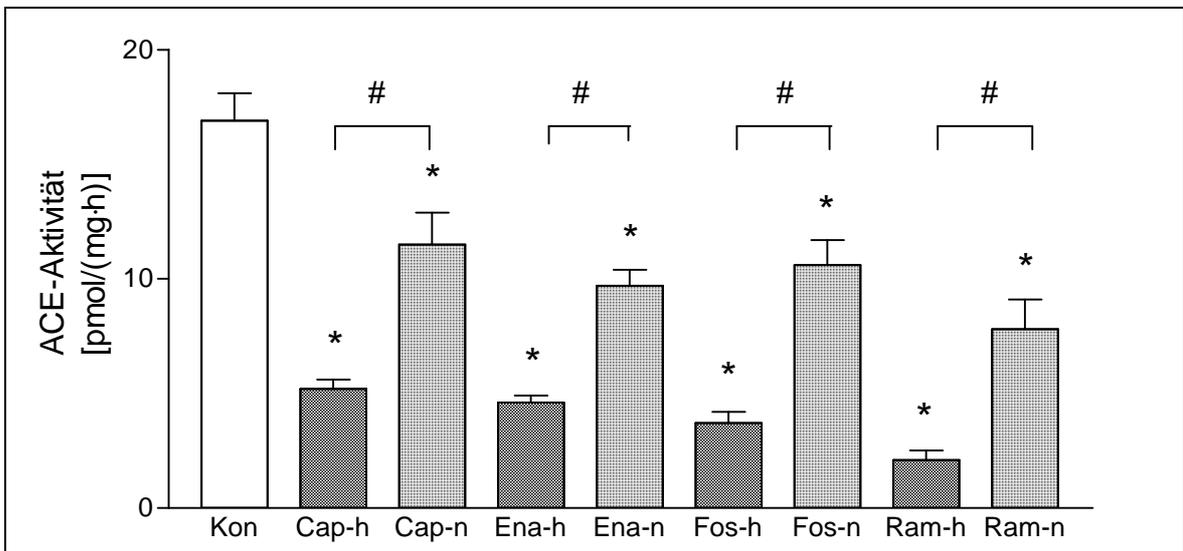


Abb. 3.1: Aktivität des ACE in den Aorten nach 12wöchiger ACEI-Behandlung; * $p < 0,05$ vs. KON; #: $p < 0,05$ für hohe Dosierung vs. niedrige Dosierung; $MW \pm SEM$; $n = 8-40$

3.1.1.2. Niere

Die lokale ACE-Aktivität war in den linken Nieren der Tiere fast aller behandelten Gruppen signifikant niedriger als in den Nieren der Kontrolltiere ($56,0 \pm 2,2$ pmol/(mg_{Protein}·h)). Darüber hinaus war die Aktivität in den Nieren der antihypertensiv behandelten Tiere für alle getesteten ACEI signifikant niedriger als in den Nieren der Tiere, die mit einer nicht-hypotensiven Dosis des jeweiligen ACEI behandelt wurden (Abb. 3.2; Tab. 3.1).

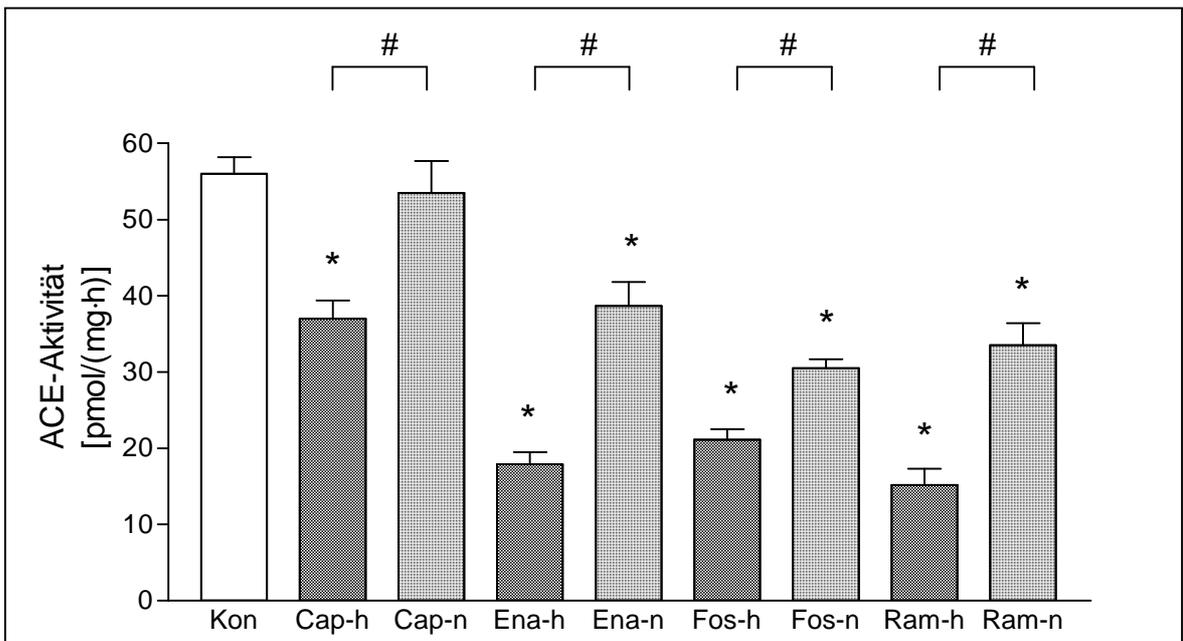


Abb. 3.2: Aktivität des ACE in den linken Nieren nach 12wöchiger ACEI-Behandlung; * $p < 0,05$ vs. Kon; #: $p < 0,05$ für hohe Dosierung vs. niedrige Dosierung; $MW \pm SEM$; $n = 8-40$

3.1.1.3. Herz

In den linken Ventrikeln der behandelten Tiere wurde die ACE-Aktivität sowohl durch die hypotensive als auch durch die nicht hypotensive Dosis der eingesetzten ACE-Hemmstoffe signifikant reduziert, mit Ausnahme der niedrigen Dosis von Captopril. Darüber hinaus war die Aktivität in den Ventrikeln der antihypertensiv behandelten Tiere für alle getesteten ACEI signifikant niedriger als in den Ventrikeln der Tiere, die mit einer nicht-hypotensiven Dosis des jeweiligen ACEI behandelt wurden (Abb. 3.3; Tab. 3.1).

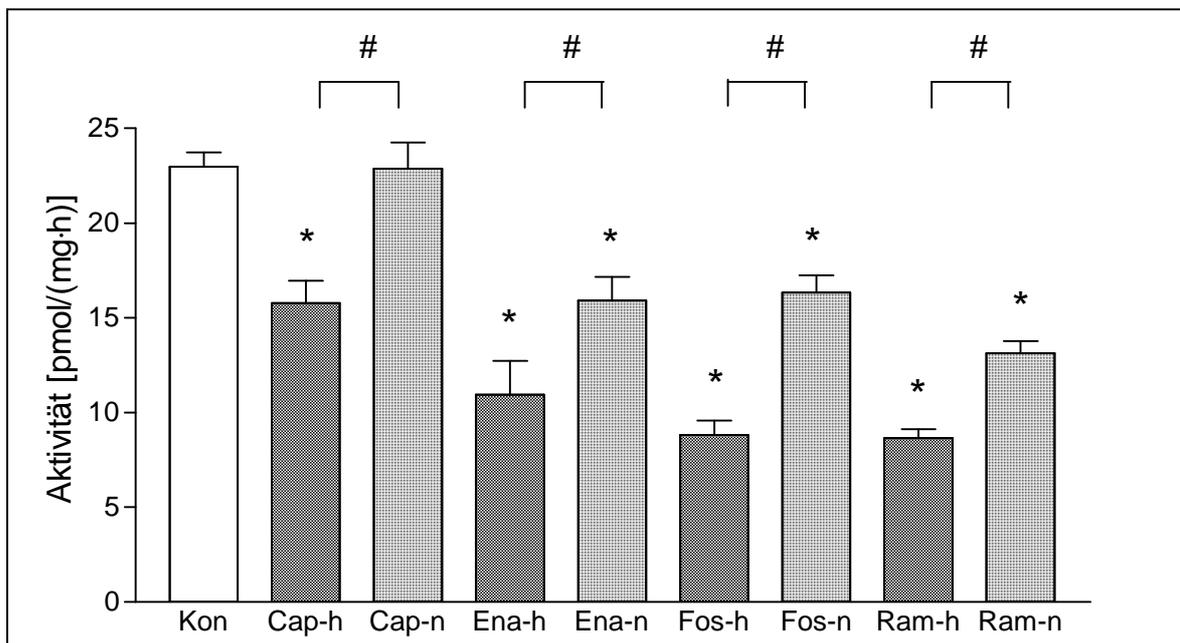


Abb. 3.3: Aktivität des ACE in den linken Ventrikeln nach 12wöchiger ACEI-Behandlung; * $p < 0,05$ vs. KON; # $p < 0,05$ für hohe Dosierung vs. niedrige Dosierung; $n = 8-40$

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über das prozentuale Ausmaß der Hemmung in den einzelnen Geweben durch die verschiedenen ACE-Hemmstoffe.

Unter- suchtes Gewebe	Cap-h	Cap-n	Ena-h	Ena-n	Fos-h	Fos-n	Ram-h	Ram-n
Aorta	69,2 ±2,4%	32,0 ±8,3%	72,8 ±1,8%	42,6 ±4,1%	78,1 ±3,0%	37,3 ±6,5%	87,6 ±2,4%	53,8 ±7,7%
Niere	33,9 ±4,3%	4,5 ±7,5%	68,0 ±2,9%	30,9 ±5,5%	62,2 ±2,5%	45,5 ±2,1%	72,9 ±3,8%	40,2 ±5,2%
Herz	31,3 ±5,1%	0,0 ±6,0%	52,4 ±7,8%	30,7 ±5,5%	61,6 ±3,3%	28,9 ±4,0%	62,3 ±2,0%	42,8 ±2,7%

Tab. 3.1: prozentuale ACE-Hemmung in den einzelnen Geweben; MW±SEM; n= 8-40

3.1.2. Serum-Insulin- und Glukose-Spiegel

Die Bestimmung der Insulin- und Glukosespiegel der Tiere sollte Aufschluss darüber geben, ob die verschiedenen Dosierungen der eingesetzten ACE-Hemmstoffe sich eventuell unterschiedlich auf den Glukose-Stoffwechsel auswirken.

Die Insulinspiegel der Tiere wurden durch die 12-wöchige antihypertensive Behandlung mit ACE-Hemmstoffen jedoch nicht beeinflusst (Abb. 3.4).

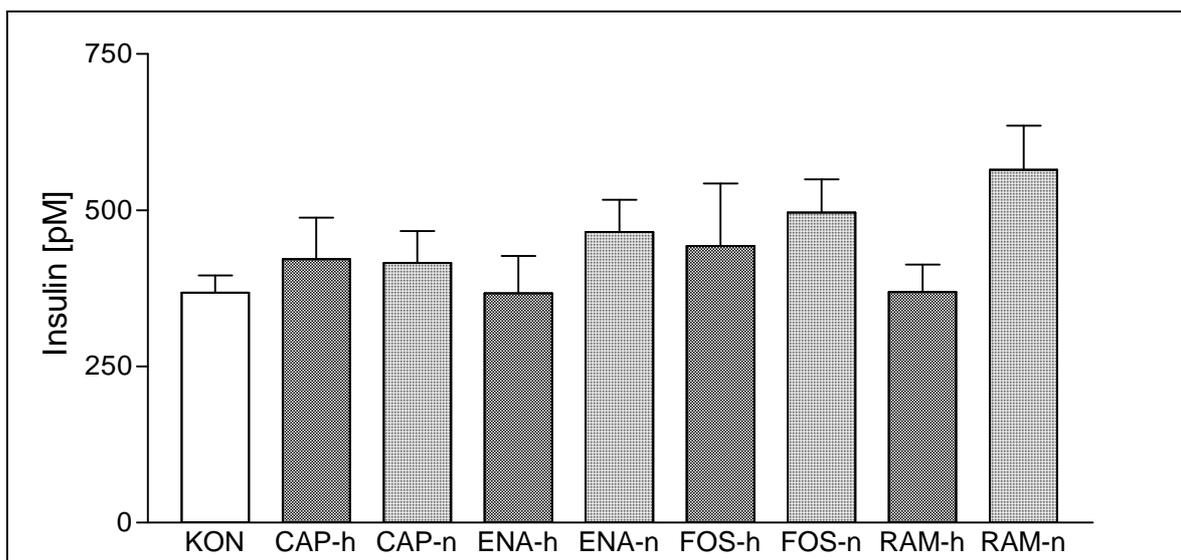


Abb. 3.4: Insulinspiegel im Serum der Tiere nach 12wöchiger ACEI-Behandlung; MW±SEM; n=8-40

Die Glukosespiegel der Tiere wurden ausschließlich durch die Behandlung mit Captopril in der antihypertensiven Dosierung leicht gesenkt. Für die anderen untersuchten ACE-Hemmstoffe ließ sich keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen (Abb. 3.5).

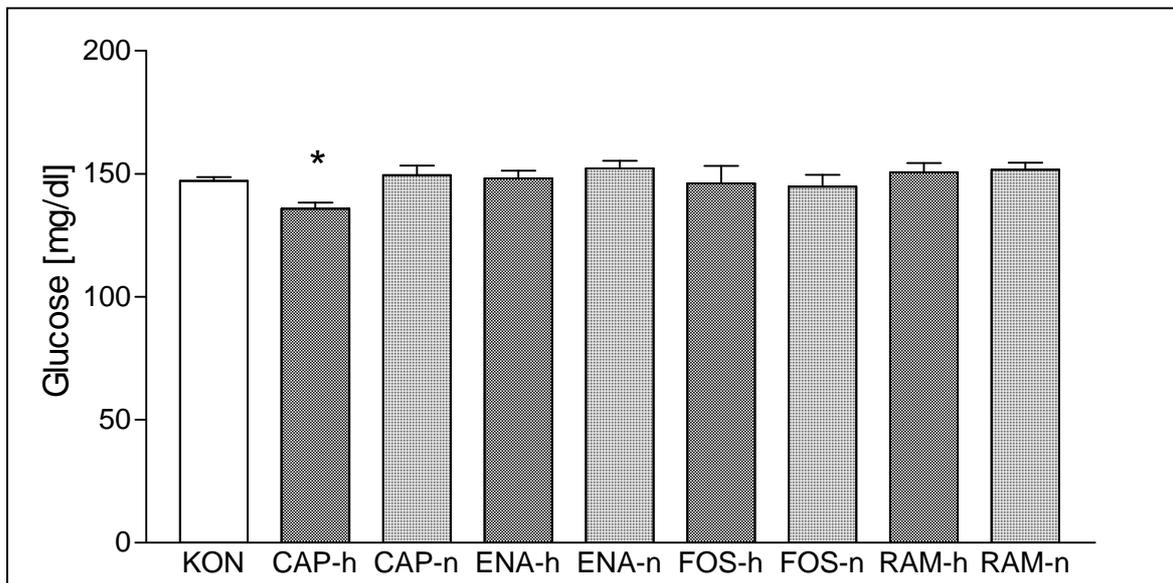


Abb. 3.5: Glukosespiegel im Serum der Tiere nach 12wöchiger ACEI-Behandlung; $MW \pm SEM$; $n=8-40$; $*p < 0,05$ vs. KON

4.1.3. Endothelin

Um zu prüfen, ob die Auswirkungen der Therapie mit ACE-Inhibitoren auf den Blutdruck oder die Hypertrophie von Herz und Gefäßen durch eine Beeinflussung des Endothelin-Systems vermittelt wurden, wurden die Endothelin-Serumspiegel sämtlicher Tiere am Ende des Behandlungszeitraums bestimmt.

Der Endothelinspiegel im Serum der antihypertensiv behandelten Tiere betrug unter Kontrollbedingungen im Mittel 22 fmol/ml. Die Serumspiegel der behandelten Tiere waren davon statistisch nicht signifikant verschieden. Keine Unterschiede waren zwischen Gruppen mit den unterschiedlichen Dosierungen der einzelnen ACE-Hemmstoffe erkennbar (Abb. 3.6).

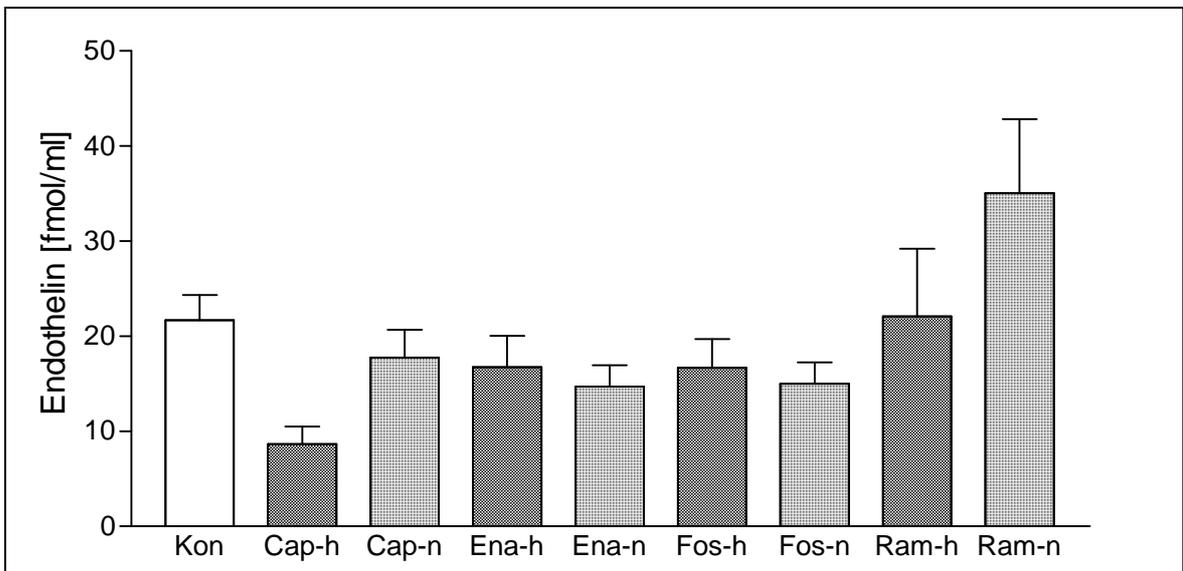


Abb. 3.6: Endothelin-Spiegel im Serum der Tiere nach 12wöchiger ACEI-Behandlung; $MW \pm SEM$; $n = 8-40$

3.2. Vier-Wochen-Studie mit Ramipril und Candesartan

Bei sämtlichen Versuchen dieser Studie wurden die Verum-Gruppen mit zwei verschiedenen Kontrollgruppen verglichen: Eine Gruppe diente als Kontrolle für die Gruppe der mit Ramipril behandelten Tiere, eine andere für die Gruppe der mit Candesartan oder mit der äquipotenten Kombination dieser beiden Arzneistoffe behandelten Tiere. Dies war aus methodischen Gründen notwendig geworden: Es wurde erst mit den Versuchen in der Candesartan-Gruppe und in der Kombinations-Gruppe begonnen, als die Versuche in der Ramipril-Gruppe und in der Kontrollgruppe bereits abgeschlossen waren. Um einen methodischen statistischen Fehler auszuschließen, wurde diesen beiden Verum-Gruppen eine neue Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Dieser Tatsache wurde in sämtlichen Darstellungen der Ergebnisse Rechnung getragen, obwohl für fast alle Parameter (Ausnahmen: basale Insulinspiegel [Abb. 3.12] und Glukose-Infusionsraten unter euglykämischen Bedingungen [Abb. 3.17]) die beiden Kontrollgruppen statistisch nicht voneinander verschieden waren.

3.2.1 Kardiovaskuläre Veränderungen unter Behandlung

Zu Beginn der Behandlung waren sowohl die systolischen Blutdrücke ($180 \pm 2,7$ mmHg) als auch die Herzfrequenzen ($349 \pm 5 \text{ min}^{-1}$) der Tiere nicht voneinander verschieden (o. Abb.).

Der systolische Blutdruck der Tiere wurde durch die antihypertensive Arzneistoffbehandlung durch alle drei Behandlungsregimes signifikant gesenkt. In der Ramiprilgruppe waren die Blutdrücke nach Abschluss der Behandlung im Mittel um 29,6 mmHg niedriger als in der Kontrollgruppe, in der Candesartangruppe um 32,7 mmHg und in der Kombinationsgruppe um 31,0 mmHg niedriger (Abb. 3.7, links).

Die vierwöchige Arzneistoffbehandlung der SHR zeigte keinen Einfluss auf die Herzfrequenz der Tiere. Weder im interindividuellen Vergleich mit der Kontrollgruppe noch im intraindividuellen Vergleich mit den entsprechenden Werten vor Beginn der Behandlung zeigte sich eine signifikante Veränderung (Abb. 3.7, rechts).

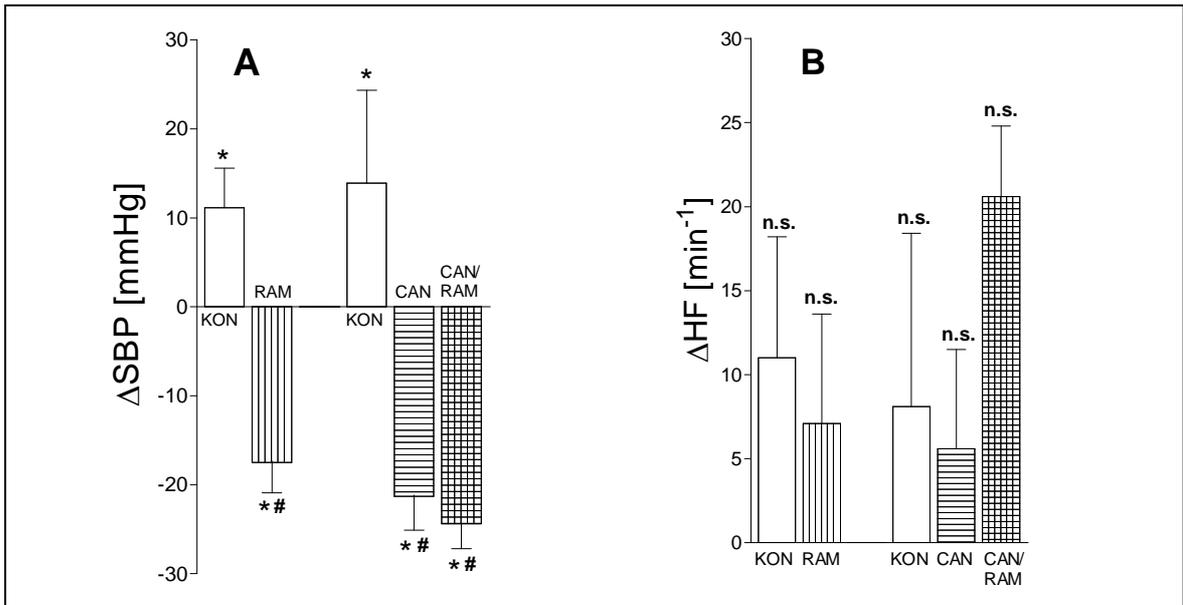


Abb. 3.7: Änderung des systolischen arteriellen Blutdrucks (A) und der Herzfrequenz (B) der Tiere nach der vierwöchigen Behandlung; * $p < 0,05$ vs. vor Therapie, # $p < 0,05$ vs. KON, n.s. $p > 0,05$ vs. vor Therapie und vs. KON; $MW \pm SEM$; $n = 9-18$

3.2.2 Aktivität des zirkulierenden ACE

Die Aktivität des zirkulierenden ACE wurde durch die Behandlung mit Ramipril und durch die Behandlung mit der Arzneistoffkombination signifikant gesenkt. Dabei bewirkte die Behandlung mit Ramipril eine Reduktion der ACE-Aktivität um im Mittel 72%, die Behandlung mit der Arzneistoffkombination eine Reduktion um im Mittel 61% im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Behandlung mit Candesartan hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des zirkulierenden ACE (Abb. 3.8).

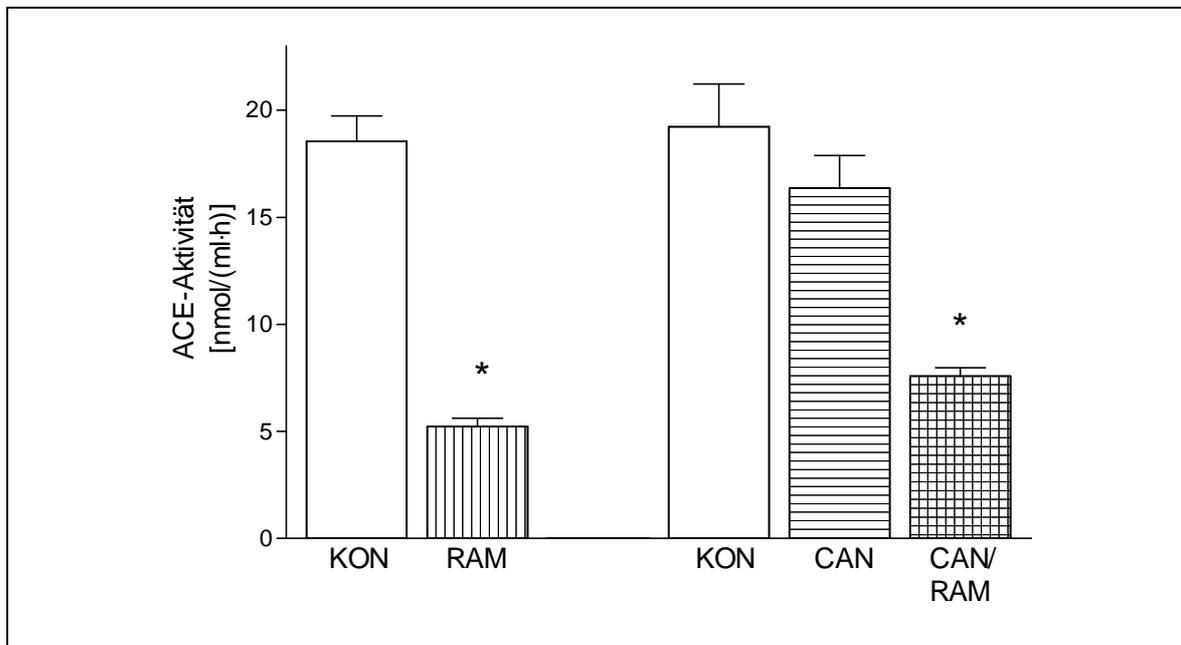


Abb. 3.8: Vergleich der Aktivität des zirkulierenden ACE nach 4wöchiger Arzneistoffbehandlung; * $p < 0,05$ vs. KON; $MW \pm SEM$; $n = 9-20$

3.2.3 Körpergewicht

Als zusätzliches Kriterium einer uniformen, gruppenübergreifenden Entwicklung der Tiere wurde die Zunahme des Körpergewichts während der vierwöchigen Behandlungszeit herangezogen. Die Auswertung der Daten zeigte, dass in allen Gruppen das Körpergewicht der Tiere signifikant um ca. 29 Gramm zunahm, wobei jedoch weder zu Beginn noch zum Ende der Behandlungszeit eine Tiergruppe schwerer oder leichter war als irgendeine andere (Abb. 3.9). Verstorben sind unter der Behandlung keine Tiere, augenscheinliche Veränderungen oder Verhaltensauffälligkeiten waren auch nicht zu registrieren.

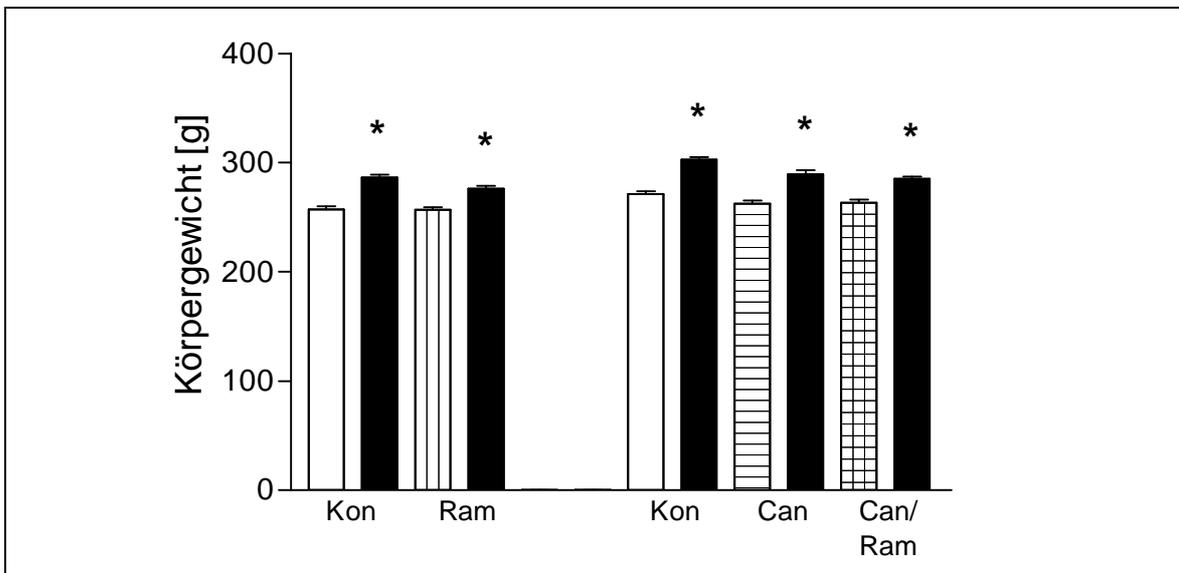


Abb. 3.9: Körpergewichte der Tiere vor (helle Balken) und nach (schwarze Balken) der vierwöchigen Arzneistoffbehandlung; * $p < 0,05$ vs Gewicht vor Behandlung; $MW \pm SEM$; $n = 10-20$

3.2.4 Ventrikuläre Veränderungen

3.2.4.1 Linksventrikuläres Gewicht

Als Parameter für den positiven Einfluss der Therapie auf die Regression der linksventrikulären Hypertrophie wurde für jedes Tier der Quotient aus dem linksventrikulären und dem Gesamtkörpergewicht ermittelt.

Der Quotient aus linksventrikulärem Gewicht und Körpergewicht der Tiere war nach der antihypertensiven Behandlung ebenfalls in den drei mit Arzneistoffen behandelten Gruppen signifikant kleiner als in den Kontrollgruppen. Die Behandlung mit Ramipril und die mit Candesartan bewirkte eine Reduktion des Quotienten aus linksventrikulärem Gewicht und Körpergewicht um im Mittel jeweils 11,4%, die mit der Arzneistoffkombination eine Verminderung um im Mittel 10,7% (Abb. 3.10).

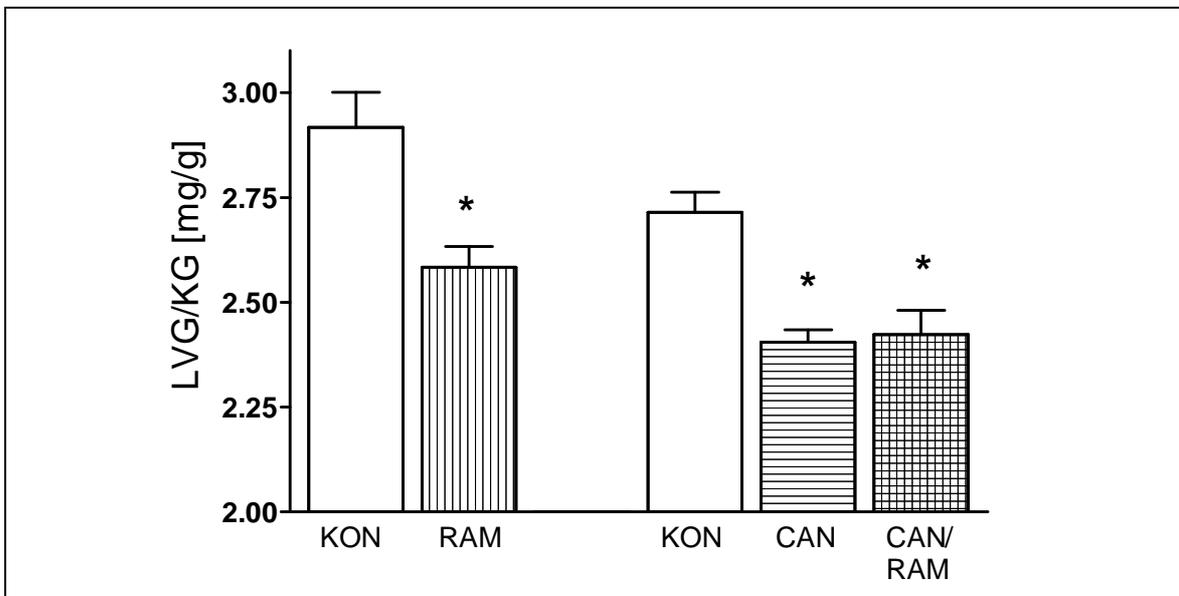


Abb. 3.10: Vergleich der Quotienten von linksventrikulärem Gewicht zu Körpergewicht der Tiere nach 4wöchiger Arzneistoffbehandlung; * $p < 0,05$ vs. KON ; $MW \pm SEM$; $n = 9-15$

3.2.4.2 Aktivität des gewebeständigen ACE im linken Ventrikel

Um die Effekte der lokalen Hemmung des ACE von denen der systemischen abzugrenzen, wurde für jedes Tier auch die Aktivität des gewebeständigen ACE im linken Ventrikel ermittelt.

Die lokale ACE-Aktivität im linken Ventrikel wurde durch die Behandlung mit Ramipril um im Mittel 66,2% gesenkt, durch die Kombinationsbehandlung mit Ramipril und Candesartan um im Mittel 55,9%. Die Behandlung mit Candesartan zeigte keinen Einfluss auf die ACE-Aktivität im linken Ventrikel (Abb. 3.11).

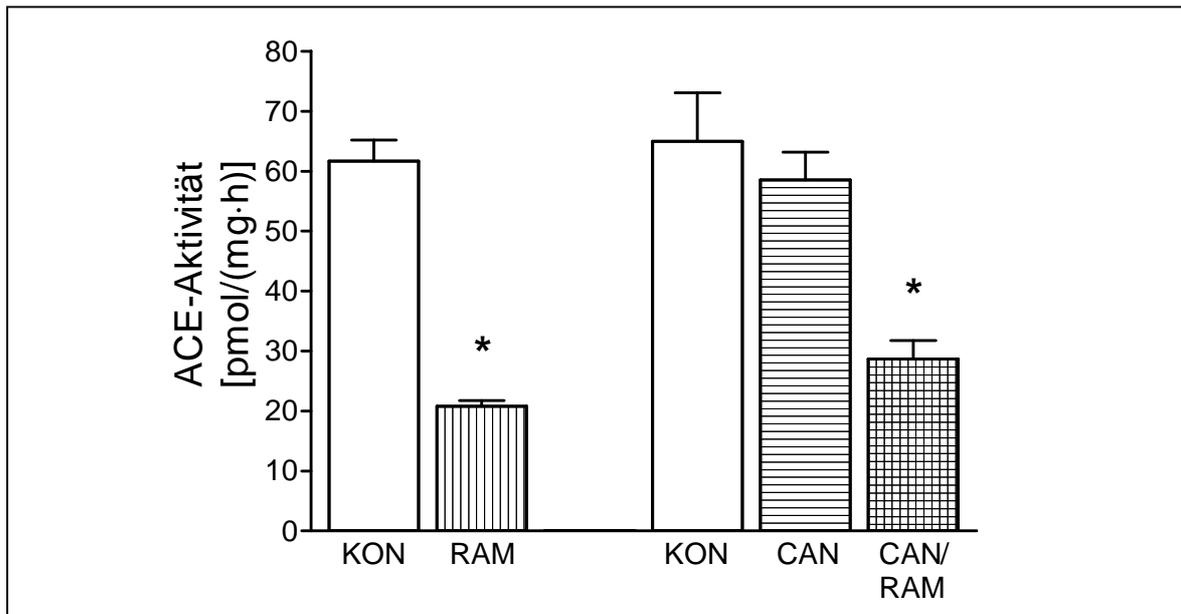


Abb.3.11: Vergleich der ACE-Aktivität im linken Ventrikel der Tiere nach 4wöchiger Arzneistoffbehandlung; * $p < 0,05$ vs. KON; $MW \pm SEM$; $n = 10-19$

3.2.5 Einfluss auf den Glukose-Stoffwechsel

3.2.5.1 Basale Glukose- und Insulin-Plasmakonzentrationen

Zu Beginn des Clamp-Versuchs waren die im Plasma gemessenen Glukose-Konzentrationen der Tiere nicht voneinander verschieden. Die Insulinspiegel im Plasma waren jedoch bei den Tieren der Ramiprilgruppe um ca. 50% höher als bei den Tieren der entsprechenden Kontrollgruppe. Die Insulinspiegel der Tiere der beiden anderen mit Arzneistoff behandelten Gruppen waren mit denen der Tiere der Kontrollgruppe vergleichbar (Abb. 3.12).

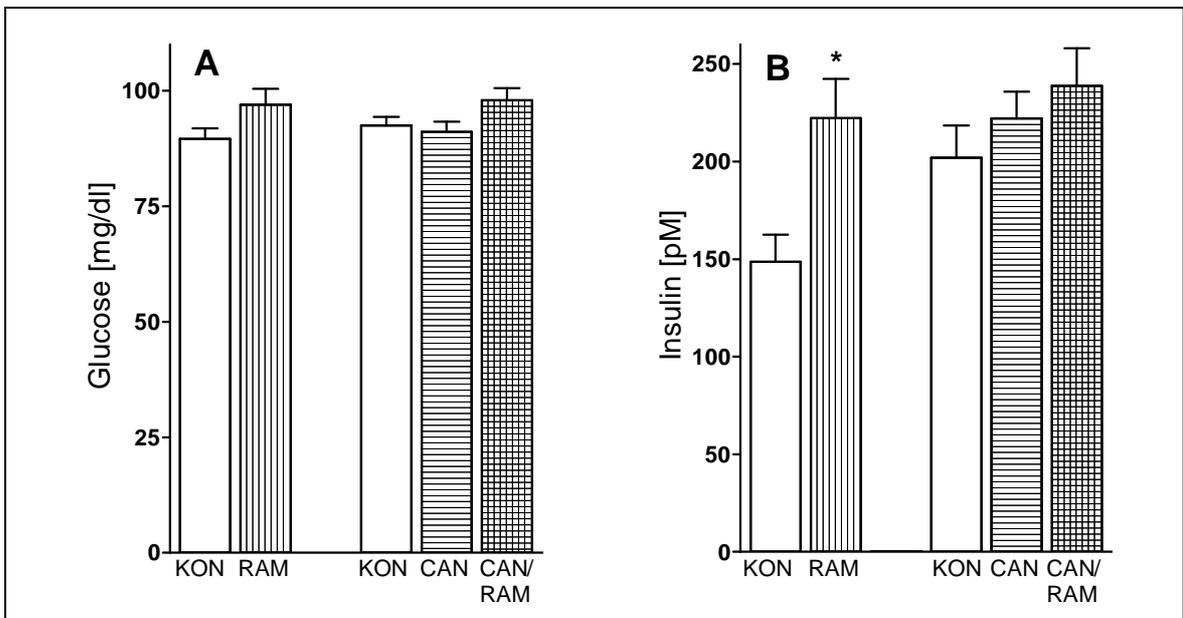


Abb. 3.12: Vergleich der basalen Plasmaspiegel von Glukose (A) und Insulin (B) nach 4wöchiger Arzneistoffbehandlung; * $p < 0,05$ vs. KON; $MW \pm SEM$; $n = 9-20$

Während der euglykämischen Phase des Clamp-Versuchs bestanden bezüglich der Plasma-Insulinkonzentration jedoch keine Unterschiede mehr zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 3.13). Die Sicherstellung dieser Tatsache war wichtig für die von Begleitparametern losgelöste folgende Beurteilung der Glukose-Infusionsrate, die für die Aufrechterhaltung eines Glukose-Spiegels von 90mg/dl erforderlich war.

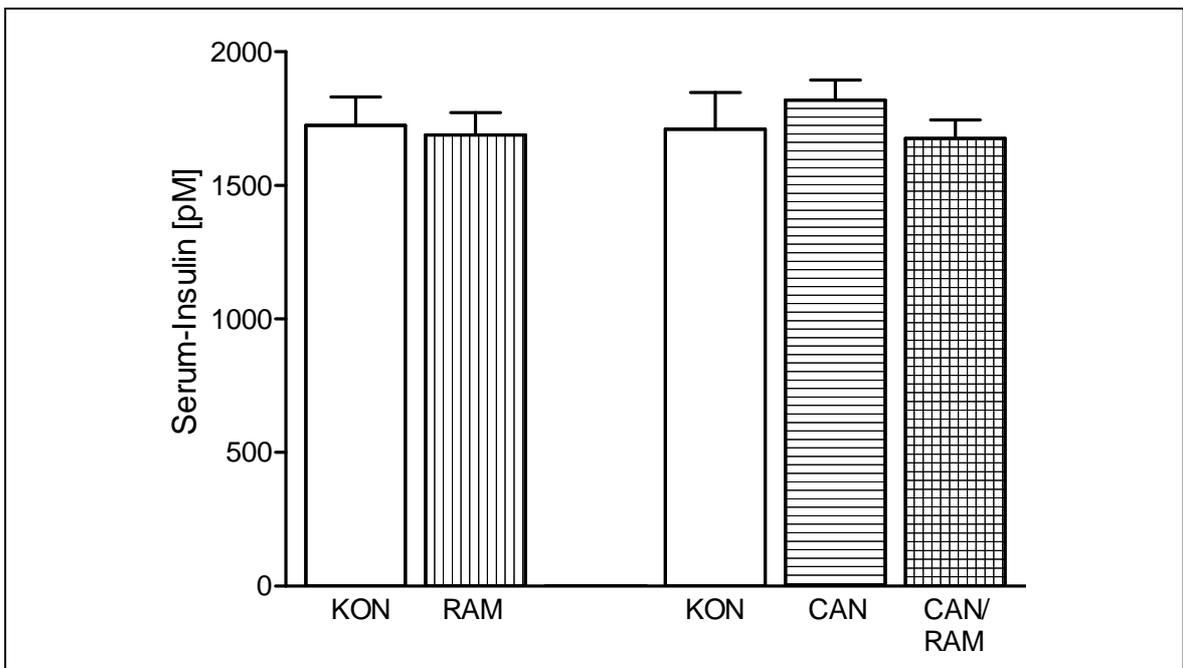


Abb. 3.13: Serum-Insulin der Tiere während der euglykämischen Phase des Versuchs; $MW \pm SEM$; $n = 9-12$

3.2.5.2 Plasma-Glukosespiegel

Die Plasma-Glukosespiegel waren in den einzelnen Gruppen nicht voneinander verschieden. Dabei gab es weder Auffälligkeiten zu irgendwelchen Zeitpunkten des Versuchs noch unterschieden sich die AUC-Werte der Gruppen voneinander (Abb. 3.14 und 3.15). Die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven wurden dabei für die letzten dreißig Versuchsminuten berechnet, also für denjenigen Versuchsabschnitt, in dem sicher euglykämische Bedingungen vorgelegen haben. Erst in diesem Versuchsabschnitt war es sinnvoll, die Glukose-Infusionsraten miteinander zu vergleichen.

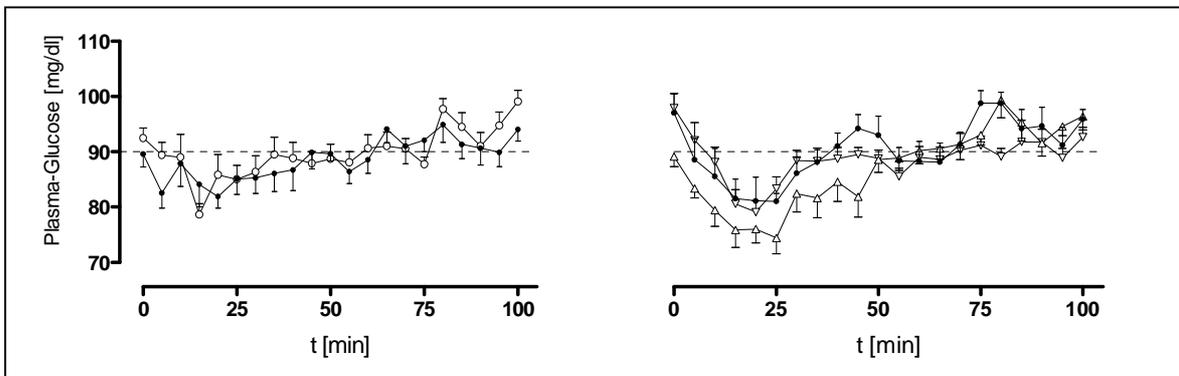


Abb. 3.14: Verlauf der Plasma-Glukosespiegel über die gesamte Versuchsdauer

- Kontrollgruppe
- RAM; △ CAN; ▽ CAN/RAM; $MW \pm SEM$; $n = 9-12$

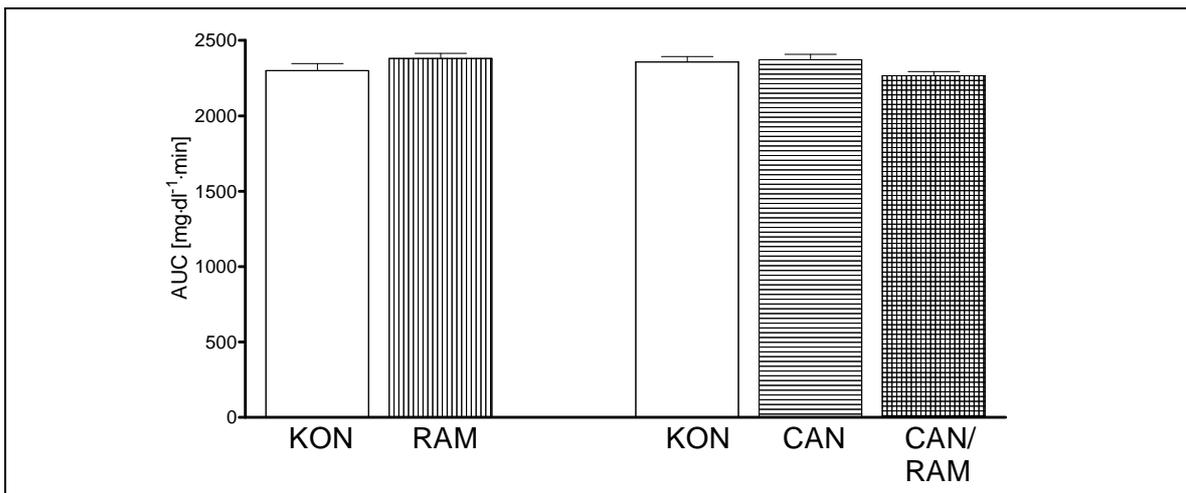


Abb. 3.15: Plasma-Glukosespiegel während der euglykämischen Phase des Versuchs – Vergleich der Flächen unter den Kurven (AUC); $MW \pm SEM$; berechnet wurden die AUC der letzten 30 Versuchsminuten, unabhängig davon, ab welchem Zeitpunkt sich eine stabile Euglykämie eingestellt hatte; $MW \pm SEM$; $n = 9-12$

3.2.6 Glukose-Infusionsrate

Die Auswertung der Plasmaspiegel von Glukose und Insulin nach einer chronischen ACE-Hemmer-Therapie konnte keinen Hinweis auf einen stoffwechselpositiven Effekt der Arzneistoffe liefern. Daher wurden in der Folge Glukose-Clamp-Versuche durchgeführt, die eine vergleichende Beurteilung der Insulinsensitivität der Tiere ermöglichten.

Die Glukose-Infusionsrate, die zur Aufrechterhaltung eines konstanten Plasma-Glukosespiegels von 90 mg/dl bei einer Dauerinfusion von 8 mU/kgKG/min Insulin notwendig war, lag bei den Verum-Tieren deutlich über den Werten der Kontrolltiere. Dies ergab sowohl die Varianzanalyse mit Messwiederholung als auch die Auswertung der Flächen unter den Kurven. Dabei war die Glukose-Infusionsrate in der Ramipril-Gruppe um im Mittel 11,4%, in der Candesartan-Gruppe um 14,4% und in der Kombinations-Gruppe um im Mittel 11,0% erhöht (Abb. 3.16 und 3.17).

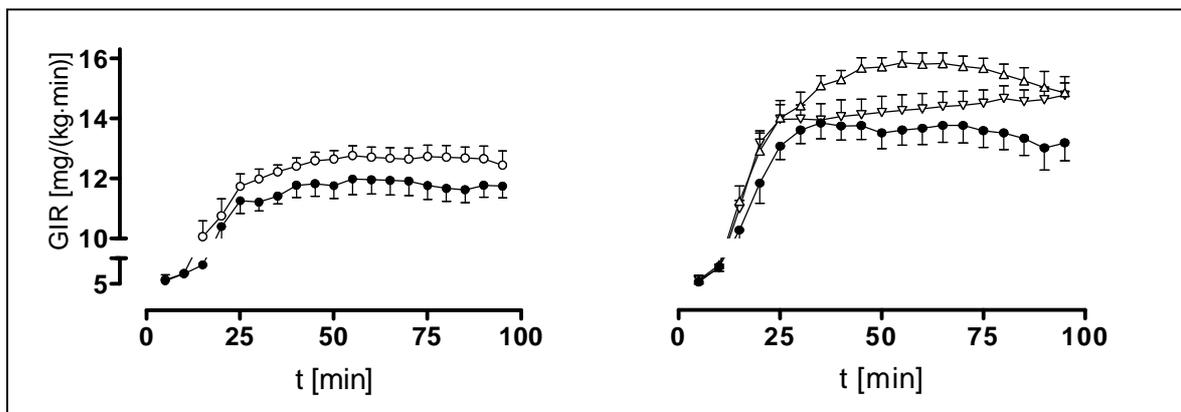


Abb. 3.16: Glukose-Infusionsraten (GIR); $MW \pm SEM$; $n = 9-12$

- Kontrollgruppe
- RAM; △ CAN; ▽ CAN/RAM

Die Flächen unter den Kurven wurden analog wieder für den Versuchszeitraum berechnet, in dem die Bedingungen für alle Tiere die gleichen waren, also wiederum nur für die letzten dreißig Versuchsminuten. Sowohl die infundierte Insulinmenge als auch die Glukose-Konzentration im Plasma war während dieses Versuchsabschnitts für alle Tiere gleich.

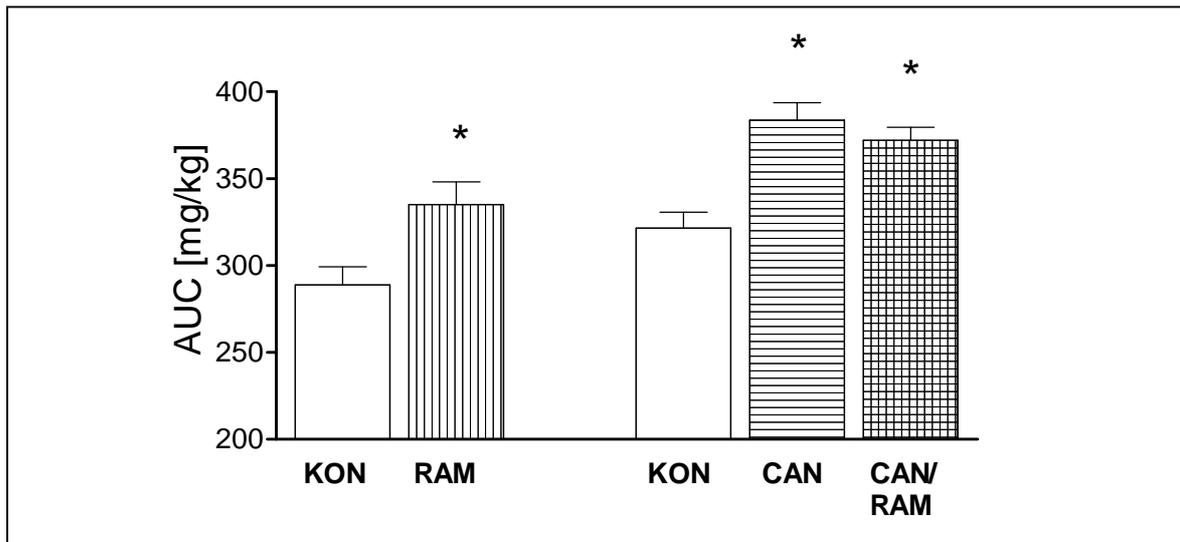


Abb. 3.17: Glukose-Infusionsraten während der euglykämischen Phase des Versuchs – Vergleich der Flächen unter den Kurven (AUC) während der letzten 30 Versuchsminuten; * $p < 0,05$ vs. KON; $MW \pm SEM$; $n = 9-12$

3.2.7 Hämodynamische Veränderungen während des euglykämischen Clamps

3.2.7.1 Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks

Zu Beginn des euglykämischen Clamps waren die mittleren arteriellen Blutdrücke der Tiere in den Kontrollgruppen nicht statistisch signifikant von denen der Verum-Gruppen verschieden.

Während des Clamp-Versuchs kam es bei allen Tieren zu einem Blutdruckanstieg. Dabei war der Blutdruck in den Kontrollgruppen in den letzten dreißig Minuten des Versuchs signifikant höher als zu Beginn des Versuchs, in der Ramipril-Gruppe erst in den letzten fünf Minuten, in der Candesartan-Gruppe in den letzten zwanzig Minuten und in der Kombinations-Gruppe in den letzten zehn Minuten.

Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe war der Blutdruck in der Ramipril-Gruppe in den letzten fünfzehn Minuten des Versuchs signifikant erniedrigt, in der Candesartan-Gruppe und in der Kombinations-Gruppe in den letzten vierzig Minuten (Abb. 3.18, oben).

3.2.7.2 Änderung der Herzfrequenz

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen kam es während des Clamp-Versuchs zu keiner Änderung der Herzfrequenz.

Im Vergleich zum Ausgangswert vor dem Versuch kam es ausschließlich in den Verum-Gruppen während des Versuchs zu einer Frequenzänderung. In der Ramipril-Gruppe war der Unterschied in den letzten zwanzig, in der Candesartan-Gruppe und in der Kombinations-Gruppe während der letzten dreißig Minuten signifikant (Abb. 3.18, unten).

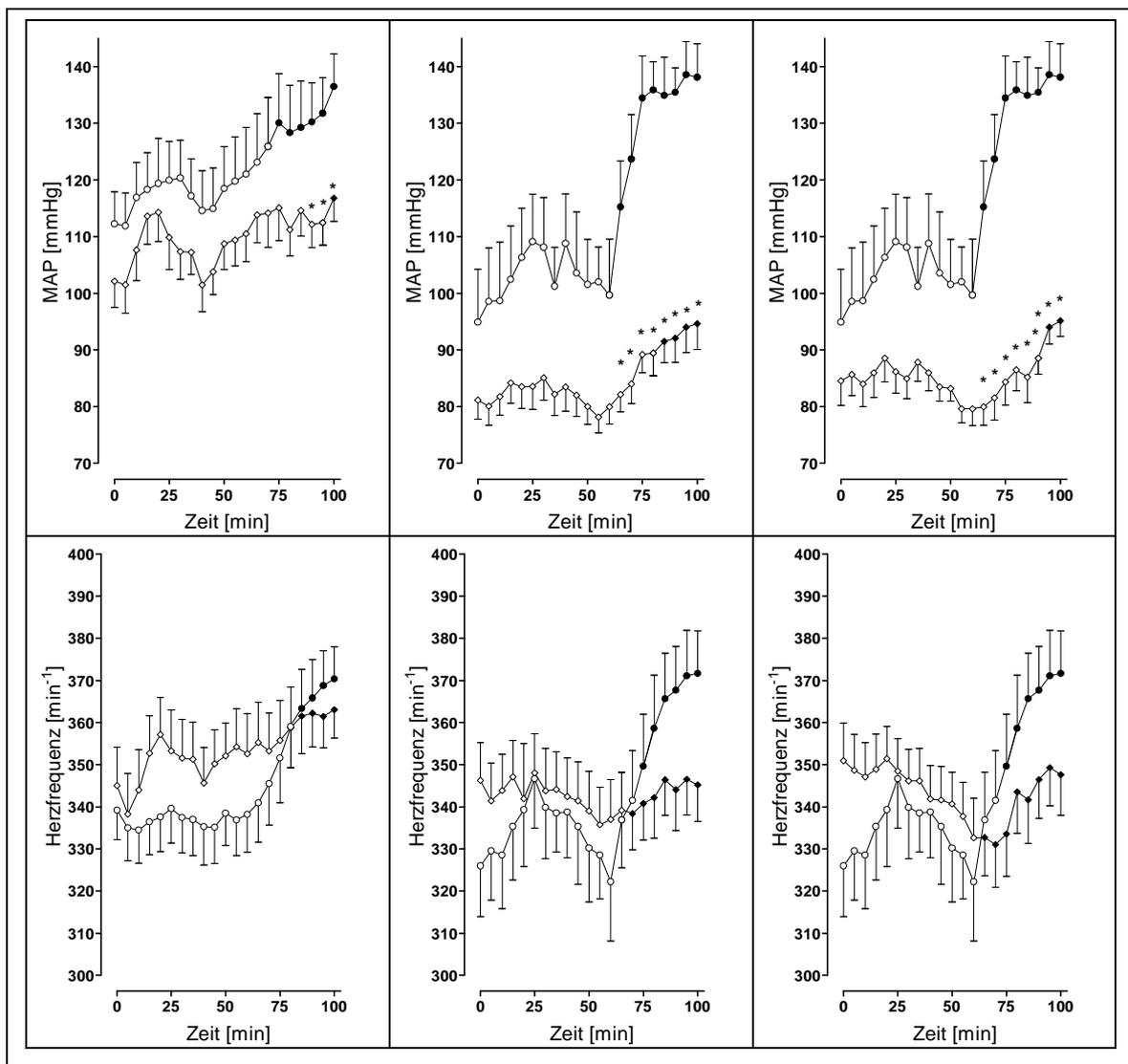


Abb. 3.18: Änderung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz der Tiere im Verlaufe des Versuchs

links: RAM; mitte: CAN; rechts: CAN/RAM

O: Kontrollgruppe; ◇: Verumgruppe

Ausgefüllte Symbole: $p < 0,05$ vs. Wert zu Versuchsbeginn

* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; MW ± SEM; n = 9-12

4. Diskussion

4.1 Hämodynamische und ventrikuläre Veränderungen

In dem Teil der Studie, in dem die SHR über einen Zeitraum von vier Wochen mit dem ACE-Hemmstoff Ramipril, mit dem AT₁-Antagonisten Candesartan oder mit einer Kombination dieser beiden Arzneistoffe behandelt wurden, konnte beobachtet werden, dass die systolischen Blutdrücke der Tiere durch die Arzneistoffbehandlung gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen um rund 30 mmHg gesenkt werden konnten. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit früheren Versuchen aus unserer Arbeitsgruppe, die zeigen konnten, dass eine gleichzeitige Hemmung beziehungsweise Blockade von ACE und AT₁-Rezeptoren einen synergistischen Effekt hat (Raasch et al., 2004) und mit anderen Ergebnissen aus der Literatur, die am gleichen Tiermodell gewonnen wurden (Wahlander et al., 1996). Wichtig ist hierbei noch einmal hervorzuheben, dass für die Kombinationstherapie Dosierungen zum Einsatz kamen, die als Monosubstanz gegeben keinen Einfluss auf Blutdruck oder kardiovaskuläre Parameter nehmen.

Die sich durch den Hypertonus ausbildende linksventrikuläre Hypertrophie konnte durch alle drei Behandlungsregimes signifikant in einem vergleichbaren Ausmaß zur Regression gebracht werden. Aufgrund dieses Befundes könnte angenommen werden, dass die Hypertrophieregression des linken Ventrikels rein mechanischer Natur, also blutdruckabhängig ist. Jedoch gibt es auch Arbeiten, die zeigen, dass eine Blutdruckreduktion nicht zwangsläufig im gleichen Ausmaß mit einer Hypertrophieregression einhergeht. So wurde für ACE-Inhibitoren ein höherer Rückgang des linksventrikulären Gewichts pro mmHg Blutdrucksenkung gefunden als für β -Blocker, Calciumkanalblocker oder Diuretika (Devereux, 2000). Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass bei äquipotenter hypotensiver Dosierung der Arzneistoffe Candesartancilexetil, Ramipril und Mibefradil die Auswirkungen auf die Reduktion des linksventrikulären Gewichts der Tiere signifikant voneinander verschieden waren. Das Ausmaß der Hypertrophieregression war dabei für Candesartancilexetil und für Ramipril sehr viel größer im Verhältnis zur blutdrucksenkenden Wirkung als für den Calciumantagonisten Mibefradil. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine Intervention in das Renin-Angiotensin-System blutdruckunabhängige Wachstumseffekte nach sich zieht (Raasch et al., 2004). Bruckschlegel und

Mitarbeiter untersuchten den Einfluss einer Blockade des Renin-Angiotensin-Systems auf die durch Aortenstenose hervorgerufene linksventrikuläre Hypertrophie bei Ratten und konnten zeigen, dass dabei sowohl das Gewicht des linken Ventrikels als auch die Größe der Myocyten bei unbehandelten oder mit dem Vasodilatator Hydralazin behandelten Tieren signifikant über den Werten der mit Ramipril oder Losartan behandelten Tiere lagen (Bruckschlegel et al., 1995). Auch die Sterblichkeitsrate der Tiere wurde durch die Behandlung mit Ramipril oder Losartan deutlich gesenkt. Diese Effekte waren offenkundig nicht blutdruckvermittelt, denn die Aortenstenose wurde über den Behandlungszeitraum beibehalten. Diese Beobachtungen deuten auf direkte Angiotensin-II-vermittelte Effekte auf das linksventrikuläre Wachstum hin.

Neben dem zirkulierenden Renin-Angiotensin-System konnte die Existenz lokaler, gewebebeständiger Renin-Angiotensin-Systeme immunhistochemisch und biochemisch in mehreren Geweben demonstriert werden (Dzau, 1987). In vitro konnte die vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin II am isoliert perfundierten Rattenherz durch Captopril abgeschwächt werden (Traquandi und Riva, 1998). Dadurch hat sich das Bild des Renin-Angiotensin-Systems vom endokrinen System hin zu einem zumindest teilweise autokrin und/oder parakrin arbeitenden System gewandelt (Falkenhahn et al., 1994; Stock et al., 1995). Außerdem wurde für die Hemmung der ACE-Aktivität in einigen Geweben eine bessere Korrelation mit Ausmaß und Dauer der Blutdruckreduktion gefunden als für die Hemmung der Serum-Aktivität (Sakaguchi et al., 1988; Veltmar et al., 1991; Hirsch et al., 1992).

Eine Hemmung des systemischen Renin-Angiotensin-Systems bewirkt offenbar eine kurzfristige Senkung des Blutdrucks, während die Hemmung lokaler Renin-Angiotensin-Systeme dauerhafte Effekte auf Blutdruck und Wachstum nach sich zieht (Übersicht bei Stock et al., 1995).

Die unterschiedlich ausgeprägte Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems in verschiedenen Geweben konnte bereits früher an spontan hypertensiven Ratten von Moursi und Mitarbeitern demonstriert werden (Moursi et al., 1986). Die in Bezug auf das Ausmaß der Hemmung voneinander abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Moursi wies in allen untersuchten Geweben eine signifikant stärkere Hemmung durch Ramipril als durch Enalapril nach) lassen sich dadurch erklären, dass Moursi für seine Versuche von jedem verwendeten Arzneistoff die

gleiche Dosis einsetzte, während hier durchweg mit äquipotenten Dosierungen bezüglich der Blutdruckreduktion gearbeitet wurde (s. Tab.3.1). Bezüglich der Hemmung des lokalen Renin-Angiotensin-Systems konnten Hirsch und Mitarbeiter (1992) Unterschiede zwischen den ACE-Hemmstoffen Captopril und Enalapril herausarbeiten, die in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnten. Nach Langzeitbehandlung mit äquipotenten Dosierungen der beiden Stoffe war die Wirkung von Enalapril auf die ACE-Aktivität in Plasma und Lunge stärker ausgeprägt als die von Captopril, die Hemmung in der Aorta schwächer. In der Niere waren die Effekte vergleichbar. Die Hemmung der Enzymaktivität in der Niere korrelierte mit den Langzeiteffekten der Blutdrucksenkung, die in Plasma oder Aorta nicht. Das verwendete Tiermodell unterschied sich allerdings wesentlich von dem unseren. Hirsch und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss auf Ratten mit Herzinsuffizienz, hervorgerufen durch Abtrennen einer Koronararterie. Außerdem wurden die Arzneistoffe einmal täglich verabreicht, die Tiere der vorliegenden Studie bekamen den Arzneistoff Captopril jedoch zweimal täglich. Dieses Behandlungsregime passt sehr viel besser zu den beschriebenen pharmakokinetischen Daten von Captopril (Bünning, 1984), sodass die Aussagen von Hirsch und Mitarbeitern in Frage gestellt werden müssen.

Die Daten der vorliegenden ACEI-Vergleichsstudie können nicht abschließend Aufschluss geben über die Frage, ob die beobachtete Reduktion des Ventrikelwachstums über das lokale oder das systemische Renin-Angiotensin-System vermittelt wird. Daten aus der Literatur zeigen jedoch, dass zur Reduktion des linksventrikulären Wachstums eine Druckentlastung des Herzens von Nöten ist (Raasch et al., 2002 b; Gohlke et al., 1996). Eine signifikante Regression der linksventrikulären Hypertrophie konnte hier nur durch die hohe, antihypertensive Dosis der ACE-Hemmstoffe erreicht werden. Allerdings wurde das lokale ventrikuläre ACE auch durch die nicht-hypotensiven Dosierungen signifikant gehemmt, mit Ausnahme von Captopril. Dies lässt sich anhand der gut untersuchten Pharmakokinetik von Captopril erklären: Der Arzneistoff-Enzym-Komplex weist eine vergleichsweise hohe Dissoziationskonstante auf und hat demzufolge eine geringe Halbwertszeit von ca. 29 Minuten (Bünning, 1984). In diesem Zeitrahmen bewegte sich auch die Inkubationsdauer bei der Bestimmung der ACE-Aktivität, sodass die Dauer der Inkubation sicherlich deutlichen Einfluss auf das Messergebnis nahm. Nach ACE-Inhibitor-Therapie von infarktgeschädigten Ratten mit Lisinopril fanden Wollert und Mitarbeiter ebenfalls

eine Regression der linksventrikulären Hypertrophie nur nach Gabe der hohen Dosis, eine Beeinträchtigung der ACE-Aktivität im Ventrikel konnten sie für keine der beiden verwendeten Dosierungen nachweisen (Wollert et al., 1994). Der antiproliferative Effekt einer ACE-Hemmung wird aber zusätzlich durch die von unserer Arbeitsgruppe beobachteten Regression der Media verdeutlicht (Raasch et al., 2002b). Eine 12wöchige Behandlung von SHR mit ACE-Hemmstoffen führte dabei auch durch die niedrigen, nicht-hypotensiven Dosierungen zu einer verminderten Dicke der Media der thorakalen Aorta.

Die Beeinflussung des lokalen Renin-Angiotensin-Systems ist also ein Faktor neben anderen, der für das ventrikuläre Wachstum relevant ist. Bei Susic und Mitarbeitern findet sich eine Übersicht über die beteiligten Systeme, zu denen Katecholamine, Endothelin, TGF- β , IGF, Bradykinin, Prostaglandine und NO gehören (Susic et al., 1995). Anders scheint es sich bei vaskulären Effekten zu verhalten: Hier konnten Versuche der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die Mediadicke der thorakalen Aorta sowohl durch die hypotensiven als auch durch die nicht-hypotensiven Dosierungen der in dieser Arbeit verwendeten ACE-Hemmstoffe signifikant reduziert werden konnte (Raasch et al., 2002 b). Hier zog die Beeinflussung des lokalen Endothel-ständigen Renin-Angiotensin-Systems blutdruckunabhängig Effekte nach sich. Auf eine Beteiligung lokaler Renin-Angiotensin-Systeme an den organprotektiven Effekten deutet auch die Beobachtung hin, dass die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems in den jeweiligen Geweben durch die Behandlung deutlich reduziert wurde.

Das ACE ist identisch mit der Kininase II, einem Enzym, das Bradykinin abbaut, indem es dieses in inaktive Fragmente zerlegt. Es wird daher in der Literatur kontrovers diskutiert, welche Peptidwirkung für die Vermittlung der Effekte verantwortlich ist: die Abschwächung der Angiotensin-II-vermittelten oder die Potenzierung der Bradykinin-vermittelten Wirkungen. Für letzteres sprechen Befunde an hypertensiven Ratten, wonach Ramipril sowohl in hypotensiver als auch in nicht hypotensiver Dosierung die Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie verhindern bzw. später eingesetzt auch zur Regression bringen konnte. Denn zumindest die Hypertrophie-vorbeugenden Effekte konnten durch die gleichzeitige Gabe des Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 unterdrückt werden (Linz et al., 1995). Zwar wurden für die beschriebenen Versuche Tiere mit einem renalen Bluthochdruck verwendet, bei denen das RAAS also stimuliert ist, eine Aussage über das vorrangig an der Wirkung beteiligte

Peptidsystem scheint aber dennoch zulässig, da die Hemmung des ACE bei einem stimulierten RAAS beide Peptidwirkungen betont. Die Fähigkeit der ACE-Inhibitoren, eine kardiale Fibrose zu verbessern, scheint ebenso auf Bradykinin-Wirkungen zurückzugehen: Kim und Mitarbeiter konnten in der Zellkultur an kardialen Fibroblasten ausgewachsener Ratten zeigen, dass Bradykinin die Produktion extrazellulärer Matrix herunterreguliert. Da dieser Effekt durch einen NO-Synthase-Inhibitor abgeschwächt wurde, ein NO-Donator jedoch den gleichen Effekt wie das Bradykinin selbst hatte, postulierten sie, dass NO und cGMP für diesen Effekt eine wichtige Rolle spielen (Kim et al., 1999).

Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen für eine starke Beteiligung der abgeschwächten Angiotensin-Wirkungen an den beobachteten Effekten. Darauf deutet vor allem hin, dass die Wirkungen der ACE-Inhibitoren auch mit dem AT₁-Antagonisten erzielt werden konnten, welcher keine Erhöhung des Bradykinin-Spiegels nach sich zieht. Zwar gibt es hier Hinweise in der Literatur, dass es nach AT₁-Blockade zu einem Anstieg nicht nur von Angiotensin, sondern auch von Bradykinin kommt, wobei die Möglichkeit diskutiert wird, dass der Anstieg von Bradykinin unmittelbar auf die Stimulation des AT₂-Rezeptors zurückzuführen ist (Liu et al., 1997). Untersucht wurden hier herzinsuffiziente Ratten ohne Bluthochdruck, die kardioprotektiven Eigenschaften der medikamentösen AT₁-Blockade konnten dabei kausal einer Stimulation der AT₂-Rezeptoren zugeordnet werden, aber nicht zwangsläufig einer dadurch provozierten Bradykinin-Freisetzung. Untersuchungen von Linz und Mitarbeitern konnten für Ratten, bei denen ein Hypertonus durch eine Aortenstenose provoziert wurde, belegen, dass neben dem Herzgewicht und dem kardialen Proteingehalt auch die Plasma-Angiotensin-II-Werte stark angestiegen waren. Bei gleichzeitig mit Ramipril behandelten Tieren lagen diese Werte unterhalb derer von Kontrolltieren (scheinoperierten Tieren), die entsprechenden Werte bei den Tieren, die einer alternativen antihypertensiven Therapie (Nifedipin oder Dihydralazin) unterzogen wurden, lagen auf dem Niveau derer unbehandelter Tiere (Linz et al., 1989). Auch eine bereits ausgebildete Herzhypertrophie konnte in diesen Untersuchungen durch Ramipril sowohl in hypotensiver als auch in nicht hypotensiver Dosierung zur Regression gebracht werden, während die anderen Behandlungsregimes ohne Wirkung auf das Renin-Angiotensin-System den Blutdruck zwar äquipotent senkten, jedoch keinen Einfluss auf das Herzgewicht nehmen konnten. Auch diese Befunde sprechen für einen Wirkmechanismus über die Unterdrückung der

Synthese des Angiotensin II mit seinen bekannten wachstumsfördernden Eigenschaften.

Die tierexperimentell gewonnenen Daten konnten durch klinische Befunde bestätigt werden: Lièvre und Mitarbeiter behandelten ein Patientenkollektiv mit Ramipril in zwei Dosierungen und fanden bei einer mit 5mg täglich behandelten Gruppe einen größeren Effekt bezüglich linksventrikulärer Hypertrophieregression und Abnahme der Herz hinterwanddicke als bei einer mit 1,25mg täglich behandelten Gruppe (Lièvre et al., 1995).

4.2 Interaktion mit Endothelin

Endothelin-1 ist ein vasoaktives Peptid mit langanhaltenden vasokonstriktorisches (Yanagisawa et al., 1988) und proliferativen Eigenschaften (Hirata et al., 1989). Es wird aus Big-Endothelin durch das Endothelin-Konversions-Enzym (ECE) generiert und ist Endothel-abhängig. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder Hypertonie zeigten sich in mehreren Studien erhöhte Plasma-Endothelinspiegel (McMurray et al., 1992; Monge et al., 1998). Verschiedene Beobachtungen deuten auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Renin-Angiotensin-System und dem Endothelin-System hin: Sowohl Angiotensin II als auch Endothelin-1 vermitteln Wirkungen wie Gefäßkontraktion, proliferative Effekte und die Generation von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. In-vitro-Versuche an kultivierten Mesangialzellen zeigten darüber hinaus, dass sich durch eine Hemmung des ACE die durch Endothelin-1 vermittelten hämodynamischen und proliferativen Effekte abschwächen lassen (Übersicht bei Ruiz-Ortega et al., 1994). Daher lag es nahe zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit verwendeten, strukturell völlig unterschiedlichen ACE-Hemmstoffe eventuell unterschiedlichen Einfluss auf das Endothelin-System nehmen. Die Konzentration des zirkulierenden Endothelins war nach der zwölfwöchigen Behandlungsdauer jedoch in den einzelnen Gruppen nicht signifikant voneinander verschieden. Es ergaben sich weder Unterschiede bezüglich der verwendeten ACE-Hemmer noch bezüglich der eingesetzten Dosierungen. Diese Daten sprechen nicht für einen klinisch relevanten Einfluss einer ACE-Hemmung auf das Endothelin-System. Damit geht die vorliegende Arbeit konform mit der Mehrzahl der publizierten Studien zu

diesem Thema. Eine Studie an 24 Patienten mit mittelschwerer Herzinsuffizienz deutete auf einen kausalen Zusammenhang zwischen erhöhtem Plasma-Endothelin und der Progression der Herzinsuffizienz hin. Bemerkenswert war dabei, dass der ACE-Inhibitor Fosinopril in der Plazebo-kontrollierten Studie in der Lage war, die erhöhten Endothelinspiegel auf Werte gesunder Probanden zu senken (Galatius-Jensen et al., 1996). Frühere vergleichbare Versuche mit den ACE-Inhibitoren Captopril und Quinapril zeigten zwar eine verbesserte Symptomatik der Herzinsuffizienz sowie eine Verbesserung der hämodynamischen Parameter der Patienten, die Arzneistoffe hatten jedoch keinen Einfluss auf die Plasma-Endothelin-Werte (Townend et al., 1994). Zu diesem Ergebnis gelangte auch eine von Grenier und Mitarbeitern durchgeführte Untersuchung mit einer einmaligen Gabe von Captopril. Der beobachtete vasodilatorische Effekt beruht dieser Untersuchung zufolge nicht auf einer Beeinflussung der pathologisch erhöhten Endothelinspiegel (Grenier et al., 1996). Teunissen und Mitarbeiter konnten ebenfalls keinen Einfluss einer Hemmung des ACE auf die Konzentration des zirkulierenden Plasma-Endothelin ausmachen und sahen auch keinerlei Zusammenhang zwischen Endothelin und der Pathophysiologie des renovaskulären Hypertonus (Teunissen et al., 1997). Eine doppelblind und Plazebo-kontrolliert durchgeführte Studie an einem großen Patientenkollektiv zeigte bei drei verschiedenen eingesetzten Dosen des ACE-Hemmers Imidapril nach dreimonatiger Behandlungsdauer eine Überlegenheit der höheren Dosen bezüglich der physischen Belastbarkeit der Patienten, jedoch nicht bezüglich des Ausmaßes der ACE-Hemmung und des Einflusses auf die Endothelin-Spiegel (van Veldhuisen et al., 1998). Die oben zitierte Studie von Galatius-Jensen beschreibt den Einfluss der ACEI-Therapie auf das Endothelin-System für den Arzneistoff Fosinopril. Auch die Autoren der Studie vermuten den Grund für diesen Sachverhalt nicht in der Hemmung des ACE, sondern in der Strukturverwandtschaft des von ihnen verwendeten ACE-Hemmers mit Phosphoramidon, einem Hemmstoff des Endothelin-Konversions-Enzyms, das inaktives Big-Endothelin in das vasoaktive Endothelin-1 umwandelt. Beide Moleküle besitzen eine Phosphoryl-Gruppe als zentrales Strukturelement, das an das katalytische Zentrum des jeweiligen Enzyms bindet.

Andererseits lässt sich sowohl die spontane als auch die Insulin-induzierte Endothelinsekretion in vitro durch eine Hemmung des ACE vermindern (Desideri et al., 1997). Auch in Versuchen an perfundierten Rattenherzen ließ sich die

endogene Endothelinsekretion durch die ACE-Hemmer Ramiprilat und Captopril unterdrücken. Dieser Effekt wird sowohl der Verminderung der Konzentration von Angiotensin II als auch der Erhöhung der Konzentration von Bradykinin und NO zugeschrieben (Brunner und Kukovetz, 1996). Über die in vitro beobachteten Effekte der ACE-Hemmer auf Endothelin-vermittelte Wirkungen hinaus zeigten sich Endothelin-Antagonisten und Endothelin-Konversionsenzym-Hemmer in Studien in der Lage, bei Patienten unter einer voll ausgeschöpften konventionellen Therapie eine zusätzliche Vasodilatation zu bewirken und den systemischen Widerstand zu senken (Kiowski et al., 1995). Es scheint daher, dass zirkulierendes Endothelin bei der chronischen Herzinsuffizienz eine eigene pathophysiologische Rolle spielt und nicht nur ein Marker der Erkrankung ist.

Die vorliegenden Daten können die in der Literatur gefundenen Unterschiede, insbesondere eine Sonderstellung des Fosinopriils, nicht bestätigen. Es kann aufgrund dieses Befundes jedoch eine Wirkung auf den Endothelinhaushalt nicht ausgeschlossen werden, denn die spontan hypertensive Ratte gehört nicht zu den Tiermodellen für einen Bluthochdruck, bei denen Endothelin-1 erhöht ist (Schiffrin, 1998). Daher wird ein eventuell endothelinspiegel-senkender Effekt einer Arzneistoffbehandlung nicht so ausgeprägt zu beobachten sein wie an Tiermodellen, die aufgrund der Endothelin-Überexpression zur Untersuchung dieses Parameters geeigneter scheinen. Hierzu gehören z.B. DOCA-Salz hypertensive Ratten, SHRsp oder 1K1C-Goldblatt Ratten (Schiffrin, 1998). So untersuchten Largo und Mitarbeiter den Effekt des ACE-Hemmstoffs Quinapril auf die ET-1 Genexpression von uninephrektomisierten SHR und fanden, dass ET-1 in diesem Tiermodell überexprimiert und die ACE-Aktivität deutlich gesteigert wird. Eine chronische Behandlung mit Quinapril senkte die ACE-Aktivität sowie die Expression und Synthese von ET-1. Der Effekt auf ET-1 lässt sich leicht damit erklären, dass Angiotensin II in mesangialen Zellen die ET-1-Synthese induziert (Largo et al., 1997).

Der Vorteil der SHR als für die vorliegende Arbeit verwendetes Tiermodell ist jedoch darin zu sehen, dass dieses Modell der humanen essentiellen Hypertonie am ehesten vergleichbar ist. Dieser Faktor ist für die gefundenen Ergebnisse sehr viel höher zu bewerten, da auf die physiologische Bedeutung der eventuell nachgewiesenen Interaktion plausibler rückgeschlossen werden kann. Die Übertragbarkeit eines Tierversuchs auf die humane Hypertonie ist umso mehr gegeben, je eher das verwendete Tiermodell auf das entsprechende humane

pathophysiologische Bild zutrifft. Somit ist die Aussagekraft des gefundenen Ergebnisses auch als sehr viel höher zu bewerten. Mit einem Endothelin-stimulierten Tiermodell ließe sich zwar an dieser Stelle eventuell eher ein Einfluss des Renin-Angiotensin-Systems auf den Endothelin Spiegel demonstrieren, jedoch keine Aussage über die Relevanz dieses Befunds für die essentielle Hypertonie beim Menschen treffen.

4.3 Einfluss auf den Glukose-Stoffwechsel

Bei einem nicht oder nur unzureichend behandelten Hypertonus stellen sich bei den betroffenen Patienten schnell Folgeerkrankungen des Glukose- und Lipidstoffwechsels ein, die selbst Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse darstellen. Die HOPE-Studie (Yusuf S et al., 2001) zeigt für ACEI wie die CHARM-Studie (Pfeffer et al., 2003) für AT₁-Blocker die potentielle Bedeutung des RAAS für die Entwicklung eines Diabetes mellitus. Die Studien zeigten für Ramipril bzw. Candesartan, dass die Therapie mit diesen Arzneistoffen das Risiko für die Entstehung eines Diabetes mindert. Aufgrund eines sich häufig ausbildenden metabolischen Syndroms, also einer parallelen Symptomatik eines Bluthochdrucks und einer diabetischen Erkrankung, lag es nahe zu untersuchen, ob die antihypertensive Therapie einen Einfluss auf die Insulin- oder Glukosespiegel der Tiere nehmen würde. Nach vierwöchiger Behandlung von SHR mit Ramipril, Candesartan oder deren Kombination zeigte sich nicht nur eine äquipotente Reduktion des systolischen Blutdrucks (s. Abb. 4.7), sondern auch dass sowohl basale Glukose- als auch Insulin-Plasmakonzentrationen unverändert waren. Auch die zwölfwöchige Therapie mit den ACE-Inhibitoren hatte auf die basalen Insulin- und Glukosespiegel der SHR keinen Einfluss, mit der einen Ausnahme, dass der basale Glukosespiegel unter der Behandlung mit der antihypertensiven Dosierung des Wirkstoffs Captopril gesenkt wurde. Dieser wirkstoffbezogene Effekt deckt sich mit den Beobachtungen von Uehara und Mitarbeitern (1994), die unter Captopril-Behandlung eine Verbesserung der Insulin-Sensitivität nachweisen konnten, nicht jedoch unter Behandlung mit Enalapril oder Delapril. Da diese Unterschiede sich bei hypertensiven Patienten nicht nachvollziehen ließen (Paolisso et al., 1992), darf die klinische Bedeutung dieser Beobachtung angezweifelt werden.

Auch hier kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die antihypertensive Therapie mit ACEI bzw. AT₁-Antagonisten die Insulinspiegel von Patienten grundsätzlich nicht beeinflusst. Die spontan hypertensive Ratte gehört nicht zu den hyperinsulinämischen Tiermodellen so wie z. B. die mit Fruktose gefütterte Ratte (FFR). An diesem Tiermodell wäre ein möglicher Einfluss sicher besser zu beobachten gewesen. Shimamoto und Mitarbeiter (1994) untersuchten den Einfluß des AT₁-Antagonisten Candesartan auf die Insulinsensitivität von FFR und fanden sowohl eine Abschwächung der im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhten Plasma-Insulinspiegel der unbehandelten FFR als auch eine erniedrigte Steady-State-Plasma-Glukosekonzentration, beobachteten also ebenfalls eine Erhöhung der Insulinsensitivität durch AT₁-Rezeptorblockade. Eine Wiederholung dieses Versuchsaufbaus mit dem ACE-Inhibitor Delapril lieferte das gleiche Ergebnis, das sich auch durch gleichzeitige Gabe des Bradykinin-Antagonisten HOE 140 nicht aufheben oder abschwächen ließ. Der positive Einfluss auf die Insulinsensitivität wird daher auf die Unterdrückung der Angiotensin-II-Bildung und nicht auf die Anreicherung von Kininen zurückgeführt (Shimamoto et al., 1996).

Vollmer und Mitarbeiter konnten anhand von Messungen bei wachen Ratten zeigen, dass eine durch Insulinzufuhr induzierte Hypoglykämie zu einer gesteigerten Adrenalinausschüttung der chromaffinen Zellen der adrenalen Medulla führt (Vollmer et al., 1997). Dieses Ansprechen der chromaffinen Zellen führt unmittelbar zu einem Blutdruckanstieg. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass sich dieser Effekt durch die Unterdrückung des RAAS sowohl mit ACEI als auch mit AT₁-Rezeptorenblockern antagonisieren ließ (s. Abb. 4.18). Eine andere tierexperimentelle Studie konnte zeigen, dass Insulin in spontan hypertensiven Ratten die vaskuläre Reaktivität auf Noradrenalin steigern kann und dass eine antihypertensive Therapie mit dem ACE-Hemmstoff Enalapril oder mit dem AT₁-Antagonisten Candesartan diesen Effekt wieder zu egalisieren vermag (Rizzoni et al., 1999). Die in diesem Experiment verwendeten Insulindosen lagen über physiologischen Werten und die Experimente wurden an isolierten Mesenterialarterien durchgeführt. Der beobachtete Effekt steht in Einklang mit tierexperimentellen Versuchen von Raasch und Mitarbeitern, die eine gesteigerte neuronale Wiederaufnahme von Katecholaminen demonstrieren konnten (Raasch et al., 2001).

Analog zu den oben bezüglich einer eventuellen Interaktion mit dem Endothelin-System gemachten Anmerkungen lässt sich auch hier festhalten, dass viel für einen Zusammenhang zwischen der Unterdrückung des Renin-Angiotensin-Systems und den Insulinwirkungen spricht. An dem hier verwendeten Tiermodell ließ sich dieser Zusammenhang allein über die Auswertung der Insulinspiegel jedoch nicht demonstrieren. Somit ließ sich auch noch keine Aussage über die Relevanz eines solchen Zusammenhangs für die stoffwechselpositiven Effekte einer Therapie mit Substanzen mit Wirkung auf das Renin-Angiotensin-System machen.

Genaueren Aufschluss über einen möglichen Einfluss der antihypertensiven Therapie auf den Glukose-Metabolismus sollten anschließend durchgeführte Clamp-Versuche unter euglykämischen Bedingungen geben.

4.4 Einfluss auf die Glukose-Verschwinderate im euglykämischen Clamp

Um den Einfluss des RAAS auf den Glukose-Stoffwechsel genauer zu spezifizieren, wurden euglykämische Clampversuche durchgeführt vor dem Hintergrund, dass die basalen Glukose- und Insulinspiegel durch die Arzneistoffbehandlung zwar unbeeinflusst blieben, die Glukoseexposition aber trotzdem besser kompensiert wird. Nach vierwöchiger antihypertensiver Therapie der Tiere mit Ramipril und Candesartan sowie deren Kombination waren die basalen Glukose-Konzentrationen unverändert. Die Glukose-Infusionsrate, die zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Glukose-Spiegels von 90mg/dl erforderlich war, war jedoch in allen drei Verum-Gruppen signifikant um circa 11% erhöht (s. Abb. 4.17).

Für Ramipril ist dieser Effekt bereits mehrfach beschrieben worden. Ein euglykämischer Glukose-Clamp-Versuch an normotensiven nicht diabetischen übergewichtigen Patienten lieferte das gleiche Ergebnis (Valensi et al., 1996). Nickenig und Böhm (1998) konnten zeigen, dass eine Hyperinsulinämie eine gesteigerte Expression von vaskulären AT_1 -Rezeptoren zur Folge hat. Allerdings ist aufgrund der nur zweistündigen Insulin-Exposition nicht mit einer veränderten Expression von AT_1 -Rezeptoren in den vorliegenden Studien zu rechnen. Die Daten von Nickenig unterstützen jedoch die Hypothese einer Interaktion des RAAS mit dem Glukosestoffwechsel auf Rezeptorebene. So muss man umgekehrt

fragen, ob die Blockade dieser Rezeptoren Einfluss auf die Insulinsensitivität nimmt. In der Literatur existieren bezüglich der Verbesserung der Insulinsensitivität über AT₁-Antagonisten widersprüchliche Angaben: Fogari und Mitarbeiter konnten bei einem euglykämischen Glukose-Clamp an hypertensiven Patienten eine erhöhte Glukoseinfusionsrate nur für Lisinopril, nicht dagegen für Losartan finden (Fogari et al., 1998b). Tomiyama und Mitarbeiter führten einen Glukose-Clamp-Versuch an spontan hypertensiven Ratten durch und fanden, dass eine dreiwöchige Losartangabe nicht in der Lage war, den Glukose-Bedarf zu steigern (Tomiyama et al., 1994). Eine weitere randomisiert durchgeführte klinische Studie an Patienten mit essentieller Hypertonie konnte im Glukose-Clamp Versuch mit Losartan keinen erhöhten Glukose-Bedarf registrieren (Laakso et al., 1996). Eine Rezeptorblockade mit Losartan erwies sich hier als metabolisch neutral in bezug auf Insulinsekretion, Glukosetoleranz sowie den Fettstoffwechsel. Auf der anderen Seite zeigten Glukose-Clamp-Versuche an jungen männlichen Patienten nach sechswöchiger Therapie mit Losartan eine Korrelation der Zunahme der Glukoseverschwinderate mit der Abnahme des Plasma-Noradrenalin-Spiegels und der Abnahme der Blutviskosität (Moan et al., 1996). Losartan reduziert den Autoren zufolge die Viskosität des Blutes möglicherweise über einen sympatholytischen Effekt, der auch teilweise für den vasodilatatorischen Effekt und die konsekutiv verbesserte Glukoseabgabe an den Skelettmuskel verantwortlich sein könnte. Eine weitere Veröffentlichung beschreibt einen hyperinsulinämischen Glukose-Clamp-Versuch mit anderen das Renin-Angiotensin-System beeinflussenden Arzneistoffen an einem anderen hypertensiven, hyperinsulinämischen Tiermodell, nämlich mit Fruktose gefütterte Sprague-Dawley Ratten (FFR). Hier wird postuliert, dass sowohl eine Enzymhemmung mit Temocapril als auch eine Rezeptorblockade mit Olmesartan Medoxomil (CS-866) in der Lage waren, die Insulinresistenz zu verbessern (Higashiura et al., 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen ebenfalls eindeutig für einen Effekt der AT₁-Antagonisten auf die Insulinsensitivität. Und zwar sowohl bezüglich der Monotherapie als auch bezüglich der vergleichsweise niedriger dosierten Kombinationstherapie mit ACEI.

Über den zugrunde liegenden Mechanismus dieses Effekts finden sich in der Literatur wiederum verschiedene Hinweise: Die Beobachtungen von Nickenig (s.o.) legen einen Angiotensin-II-vermittelten Effekt nahe. Chen und Mitarbeiter hatten bereits postuliert, dass die durch ACE-Inhibitoren erreichte Verbesserung

der Insulinresistenz nicht durch Kinine vermittelt wird (Chen et al., 1996). Dies leiteten sie aus der Beobachtung ab, dass die unter Alacepril-Behandlung notierten Effekte sich nicht durch den B2-Antagonisten Hoe 140 aufheben ließen. Jedoch sahen Damas und Mitarbeiter (1999) an ihren Glukose-Clamp Versuchen mit Kininogen-defizienten Ratten genau das Gegenteil: Captopril steigerte die Insulinsensitivität nur bei den normalen und nicht bei den defizienten Ratten. Außerdem zeigte die Plasma-Glukose-Kurve nach einer hochdosierten Bolusinjektion von Glukose bei defizienten Ratten einen höheren Verlauf als bei normalen Ratten, vergleichbar dem Verlauf bei vorher mit HOE140 behandelten normalen Ratten. Diese Beobachtungen sprechen eindeutig für eine Beteiligung von Bradykinin an der Clearance von Glukose und Insulin in den Geweben. Enalapril dagegen steigerte den Glukose-Bedarf nach dem gleichen Behandlungszeitraum deutlich, und der Effekt ließ sich mit HOE140 aufheben (Tomiya et al., 1994). Auch hier ein Hinweis darauf, dass die Verbesserung der Insulinsensitivität offenbar durch Kinine vermittelt wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Therapie einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Muskelfasern hatte. Diese Wirkungen konnten von derselben Arbeitsgruppe an Patienten mit essentieller Hypertonie bestätigt werden (Ura et al., 1999). Nach Ansicht der Autoren ist die Skelettmuskelzusammensetzung kausal mit der Insulinresistenz verknüpft, der ACE-Inhibitor moduliert also durch die vasodilatatorische Wirkung die Zusammensetzung. Für die Wirkung sei der ACE-hemmende Effekt offensichtlich wichtiger als der Kininabbau-blockierende Effekt. Einen weiteren Erklärungsansatz stellt die These von Julius dar, dass die mit dem Bluthochdruck einhergehende Gefäßverengung zu einer Verschlechterung der peripheren Durchblutung führt. Dies bedeute im Umkehrschluss, dass durch eine Drucksenkung die periphere Gewebedurchblutung verbessert würde und konsekutiv die Glukose-Verschwinderate ansteige (Julius et al., 1992). Diese Hypothese decke sich mit dem primären Wirkmechanismus vieler Pharmaka, bei denen eine Verbesserung der Insulinresistenz zu beobachten sei, ebenso wie mit den Effekten physikalischer Maßnahmen und deren Einfluss auf die Insulinresistenz. Sie ist offensichtlich auch sehr gut in Einklang zu bringen mit der Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass die Kombination aus Ramipril und Candesartan einen vergleichbaren Effekt auf die Glukose-Verschwinderate aufweist wie die Therapie mit den Monosubstanzen. In der Kombinationstherapie wurden Dosierungen eingesetzt, die in Monotherapie auf den Blutdruck keine

Effekte aufweisen. In der Kombination waren sie jedoch in der Lage, den Blutdruck äquipotent zu senken und dadurch die periphere Durchblutung zu steigern (s. Abb. 3.7).

In der Literatur ist die gegenseitige Korrelation zwischen Insulinwirkungen und Blutdruck mehrfach beschrieben worden. Chen und Mitarbeiter (1996) fanden bei FFR im hyperinsulämischen Stadium für den Insulinsensitizer Troglitazon die gleiche blutdrucksenkende Wirkung wie für Alacepril oder den AT₁-Antagonisten Candesartan. Die hypoglykämischen Effekte waren ebenfalls vergleichbar, was den engen Zusammenhang zwischen einem Hypertonus und einer Insulinresistenz verdeutlicht.

Eine wichtige Rolle für die Regulation der Insulinsensitivität spielt der nukleare Hormonrezeptor PPAR γ : Er fungiert nach seiner Aktivierung durch Liganden wie Prostaglandine oder die synthetischen Thiazolidine und Glitazone als Regulator für verschiedene Gene, die den Glukose- und Lipidstoffwechsel beeinflussen und bewirkt so eine Besserung des Typ2-Diabetes (Picard und Auwerx, 2002). Dieser Mechanismus lässt nicht unmittelbar die Möglichkeit einer Beeinflussung durch das RAAS erkennen. Es gibt in der Literatur jedoch Hinweise darauf, dass AT₁-Rezeptorenblocker die Aktivität von PPAR γ positiv beeinflussen (Schupp et al., 2004). Dies konnte in Zellkultur-Versuchen anhand einer durch AT₁-Rezeptorenblocker induzierten gesteigerten PPAR γ -abhängigen Zelldifferenzierung gezeigt werden, womit ein möglicher Mechanismus für die antidiabetischen Eigenschaften der AT₁-Rezeptorenblocker geliefert wird. Rao hatte schon vorher darauf hingewiesen, dass Angiotensin II vermutlich eine Rolle bei der Glukosehomöostase spielt (1996): An anästhesierten Ratten bewirkte eine Angiotensin-II-infusion in blutdrucksteigernder Dosierung unter euglykämischen hyperinsulinämischen Bedingungen einen Anstieg der hepatischen Glukoseausschüttung. Da die Infusion des Rezeptorantagonisten Saralasin keinen Einfluss auf die Glukoseausschüttung hatte, die Wirkung von gleichzeitig infundiertem Angiotensin II aber aufheben konnte, schlussfolgerte er, dass der metabolische Effekt nicht blutdruckabhängig ist. Moan und Mitarbeiter postulierten eine mögliche Beeinflussung der Aktivität des sympathischen Nervensystems (Moan et al., 1996). AT₁-Blockade zieht demnach einen sympatholytischen Effekt nach sich, der wiederum für die Verbesserung der Insulinsensitivität verantwortlich gemacht wird. Auch aus der eigenen Arbeitsgruppe existieren Hinweise darauf, dass eine AT₁-Blockade die Aktivität des sympathischen Nervensystems senkt. Es

konnte gezeigt werden, dass durch direkte Stimulation von ganglionären AT₁-Rezeptoren die elektrische Aktivität sympathischer Neurone gesteigert wird, was wiederum zu einer erhöhten exozytotischen Katecholamin-Freisetzung im synaptischen Spalt führt (Dendorfer et al., 2002a). Die Noradrenalin-Freisetzung konnte dosisabhängig von verschiedenen AT₁-Rezeptorantagonisten unterdrückt werden (Dendorfer et al., 2002b). In späteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Wirkung therapeutischer Dosierungen auf einer Reduktion der vaskulären Noradrenalin-Sensitivität beruht. Für ACE-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung von SHR mit Fosinopril über 14 Tage die kardiale neuronale Wiederaufnahme von Noradrenalin gesteigert wurde, also eine dämpfende Wirkung auf die Sympathikus-Aktivität (Raasch et al., 2001).

Die gegenseitige Korrelation zwischen Insulinwirkungen und Blutdruck wird durch die Befunde der vorliegenden Arbeit bestätigt: Es kam während des Clamp-Versuchs zu einem deutlichen Blutdruckanstieg durch die Insulin-Infusion. Dieser Insulin-induzierte Blutdruckanstieg war offensichtlich durch die Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems antagonisierbar, und zwar sowohl durch die Hemmung des ACE als auch durch die Angiotensin-Rezeptorblockade. Diese Beobachtung wird durch die Versuche von Nakata und Mitarbeitern bestätigt, die bei anästhesierten Ratten nach Insulin-Infusion einen dosisabhängigen Blutdruckanstieg zeigen konnten. Dieser Druckanstieg konnte durch die vorherige intracerebroventrikuläre Infusion des Angiotensin-Rezeptorantagonisten Losartan unterdrückt werden (Nakata et al., 1998). Die Autoren leiteten hieraus ab, dass der durch Hyperinsulinämie hervorgerufene Druckanstieg durch Sympathikus-Aktivierung generiert wird und dass die Hyperinsulinämie das zentrale Angiotensin-System stimuliert, die Sympathikus-Aktivität peripher zu erhöhen.

Die Mechanismen der Erhöhung der Insulin-Sensitivität auf zellulärer Ebene durch Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems wurden von Krützfeldt und Mitarbeitern beschrieben. Danach war eine Behandlung spontan hypertensiver Ratten mit Ramipril in der Lage, die Proteinexpression von Insulin-Rezeptor-Substrat-1 und über eine gesteigerte PTPase-Aktivität die Dephosphorylation des Insulinrezeptors zu erhöhen (Krützfeldt et al., 2000).

Dass sich durch eine Kombinationstherapie von Ramipril und Candesartan die periphere Insulinsensitivität möglicherweise ebenso gut verbessern lässt wie durch eine Monotherapie mit Ramipril, eröffnet für die Hochdrucktherapie neue

Perspektiven. Durch die mögliche Reduktion der Dosierung des ACE-Hemmstoffs wird sich mit großer Wahrscheinlichkeit auch das Ausmaß der Nebenwirkungen reduzieren, welche auch bei den ACE-Hemmstoffen der zweiten Generation noch bei vielen Patienten für einen Abbruch der Pharmakotherapie verantwortlich sind. Vor diesem Hintergrund scheint eine Kombination zweier Arzneistoffe, die beide das Renin-Angiotensin-System beeinflussen, sinnvoll. Ein weiterer Vorteil dabei ist, dass die Angiotensin-II-Spiegel nicht stark ansteigen wie bei der Therapie mit einem Rezeptorantagonisten allein. Sowohl die Enzymhemmung durch ACE-Inhibitoren als auch die Rezeptorblockade durch AT₁-Rezeptorantagonisten sind in therapeutischen Konzentrationen unvollständig und können somit durch konsekutiv erhöhte Reninspiegel und letztlich Angiotensin-II-Bildung kompensiert werden (Campbell, 1996). Dieser Regelkreis könnte durch eine Kombination zweier Pharmaka, die beide das Renin-Angiotensin-System an verschiedenen Angriffspunkten beeinflussen, effektiv durchbrochen werden.

Die Kombination eines ACE-Hemmstoffs mit einem anderen Antihypertensivum, vorzugsweise mit einem Diuretikum oder mit einem Calciumantagonisten, hat sich zwar bewährt, es kommt dabei jedoch nicht zu einem additiven metabolischen Effekt. Auch die Angiotensinrezeptorantagonisten konnten in Kombination mit Diuretika oder Calciumantagonisten kombiniert additive hypotensive Effekte aufweisen (McClellan und Goa, 1998), die organprotektiven Eigenschaften lassen sich aber dadurch nicht beeinflussen. Zudem addieren sich die Nebenwirkungen der verschiedenen Substanzklassen, was bei einer Kombination von ACE-Hemmstoffen und AT₁-Antagonisten so nicht zu erwarten ist.

Festzuhalten bleibt, dass sich der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan im Hinblick auf Verbesserung einer Insulinresistenz als genauso wirksam herausgestellt hat wie der ACE-Inhibitor Ramipril. Des Weiteren, dass eine Kombination dieser beiden Arzneistoffe trotz erheblicher Dosisreduzierungen gegenüber den jeweiligen Dosierungen der Monotherapie den gleichen Effekt hatte, bezogen auf die Parameter Blutdruckreduktion, Hypertrophieregression und Glukoseverschwinderate. Über den Mechanismus dieser Wirkungen müssen anschließende Versuche auf zellulärer Ebene versuchen, Aufschluss zu geben.

Die antidiabetischen Eigenschaften der das RAAS beeinflussenden Antihypertonika sind offenbar zweierlei Natur: Die publizierten klinischen

Präventionsstudien mit ACE-Hemmstoffen (HOPE) und Angiotensin-Rezeptorantagonisten (CHARM) zeigen deutliche Effekte dieser Substanzklassen, die offenbar auf einer Aktivierung anderer hormonaler Systeme wie der Aktivierung von PPAR γ beruhen. Diese Langzeiteffekte sind abzugrenzen gegen direkte Wirkungen wie die Unterdrückung der Wirkungen von Ang II am AT $_1$ -Rezeptor bei Hyperglykämie, die kurzfristig zu beobachten sind (Machado et al., 1998).

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, strukturell unterschiedliche Hemmstoffe des Angiotensin-I-Konversionsenzym bei gleicher antihypertensiver Wirkung auf Unterschiede bezüglich anderer Wirkqualitäten der Substanzklasse hin zu untersuchen. Es galt dabei insbesondere herauszufinden, ob der Einfluss auf das lokale gewebeständige Renin-Angiotensin-System der einzelnen ACE-Hemmstoffe unterschiedlich ausgeprägt ist, und ob es Unterschiede bezüglich der Interaktion mit anderen, das hämodynamische Gleichgewicht beeinflussenden endokrinen Systemen gibt. Durch den Einsatz der strukturell voneinander verschiedenen ACE-Hemmstoffe Captopril, Enalapril, Fosinopril und Ramipril in sowohl hypotensiver als auch nicht-hypotensiver Dosierung sollte gleichzeitig beurteilt werden, inwieweit die beobachteten Wirkungen blutdruckvermittelt sind oder ob sie auch ohne Druckentlastung zu erzielen sind. Die lokalen Renin-Angiotensin-Systeme wurden durch die verschiedenen in äquipotenter antihypertensiver Dosierung eingesetzten ACE-Hemmstoffe in vergleichbarem Ausmaß gehemmt. Für die nicht-hypotensiven Dosierungen der Arzneistoffe war das Ausmaß der ACE-Hemmung schwächer ausgeprägt, für Captopril teilweise gar nicht mehr vorhanden. Ein Beweis für die Interaktion mit dem Glukosestoffwechsel oder dem Endothelin-System konnte durch die gewonnenen Daten der ACE-Hemmer-Vergleichsstudie nicht erbracht werden.

Auch nach einer antihypertensiven Therapie mit dem Angiotensin-Rezeptorantagonisten Candesartan über vier Wochen blieben die basalen Spiegel von Glukose und Insulin unbeeinflusst. Um die teilweise in der Literatur beschriebenen antidiabetischen Wirkungen der das RAAS beeinflussenden Antihypertonika detaillierter zu untersuchen wurden anschließend Glukose-Clamp-Versuche unter euglykämischen Bedingungen durchgeführt, und zwar mit bezüglich ihrer blutdrucksenkenden Wirkungen äquipotenten Dosierungen von Ramipril, Candesartan und einer Kombination dieser beiden Arzneistoffe. Die Versuche konnten zeigen, dass eine Verbesserung der Insulinsensitivität durch die antihypertensive Therapie nach der Behandlung mit Candesartan und auch der mit der äquipotenten Wirkstoffkombination ebenso effektiv war wie nach der Behandlung mit Ramipril. Aus den Ergebnissen der Arbeit lässt sich eine Korrelation zwischen Insulinwirkungen und Blutdruck unmittelbar ableiten. Die hypertensiven Insulinwirkungen lassen sich dabei durch Blockade der

Angiotensin-II-Rezeptoren ebenso antagonisieren wie durch Hemmung des Angiotensin-I-Konversionsenzym. Über welche Mechanismen genau diese Wirkung vermittelt wird bleibt noch zu klären.

Auf die eingesetzten Dosierungen der antihypertensiven Arzneistoffe bezogen wird deutlich, dass sowohl die blutdruck- als auch die stoffwechselrelevanten Wirkqualitäten einer Monotherapie mit Ramipril oder Candesartan bei einer erheblichen Dosisreduzierung der Wirkstoffe auch durch eine Therapie mit einer Kombination dieser beiden Arzneistoffe erzielt werden können. Dies könnte auf Dauer betrachtet zum einen positive pharmakoökonomische Aspekte nach sich ziehen, zum anderen das Nebenwirkungsprofil einer antihypertensiven Therapie deutlich positiv beeinflussen.

6. Literaturverzeichnis

- AIRE Study Investigators: Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. *Lancet* 342: 821-28 (1993)
- Anning PB, Grocott-Mason RM, Lewis MJ: Effects of sulphhydryl- and non-sulphhydryl-containing ACE inhibitors on left ventricular relaxation in the isolated guinea pig heart. *Endothelium* 5: 265-75 (1997)
- Baillie GM, Sherer JT, Weart CW: Insulin and coronary artery disease: is syndrome X the unifying hypothesis? *Ann Pharmacother* 32: 233-47 (1998)
- Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, Grimm D, Muders F, Kromer EP, Riegger GAJ, Schunkert H: Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension* 25: 250-59 (1995)
- Brunner F, Kukovetz WR: Postischemic antiarrhythmic effects of angiotensin converting enzyme inhibitors. Role of suppression of endogenous endothelin secretion. *Circulation* 94: 1752-61 (1996)
- Bünning P: Inhibition of angiotensin converting enzyme by 2-(N-((S)-1-Carboxy-2-phenylpropyl)-L-Alanyl)-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo(3.3.0) octane-3-carboxylic acid (HOE 498 diacid): comparison with captopril and enalaprilat. *Drug Res* 34: 1406-10 (1984)
- Campbell DJ: Endogenous angiotensin II levels and the mechanism of action of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensinreceptor type 1 antagonists. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 3, Suppl: S125-31 (1996)
- Carmel A, Ehrlich-Rogozinsky S, Yaron A: A fluorimetric assay for angiotensin-I converting enzyme in human serum. *Clin Chim Acta* 93: 215-20 (1979)
- Chen S, Kashiwabara H, Kosegawa I, Ishii J, Katayama S: Bradykinin may not be involved in improvement of insulin resistance by angiotensin converting inhibitor. *Clin Exp Hypertens* 18: 625-36 (1996)
- Chen S, Noguchi Y, Izumida T, Tatebe J, Katayama S: A comparison of the hypotensive and hypoglycaemic actions of an angiotensin converting enzyme inhibitor, an AT1a antagonist and troglitazone. *J Hypertens* 14: 1325-30 (1996)

- Damas J, Bourden V, Lefebvre PJ: Insulin sensitivity, clearance and release in kininogen-deficient rats. *Exp Physiol* 84: 549-57 (1999)
- Dendorfer A, Thornagel A, Raasch W, Grisk O, Tempel K, Dominiak P: Angiotensin II induces catecholamine release by direct ganglionic excitation. *Hypertension* 40: 348-54 (2002a)
- Dendorfer A, Raasch W, Tempel K, Dominiak P: Comparison of the vascular and antiadrenergic activities of four angiotensin II type 1 antagonists in the pithed rat. *J Hypertens* 20: 1151-6 (2002b)
- Dendorfer A, Dominiak P, Tempel K, Raasch W: Peripheral sympatholytic actions of four AT1 antagonists: are they relevant for long-term antihypertensive efficacy? *J Hypertens* 23: 1861-7 (2005)
- Desideri G, Ferri C, Bellini C, De Mattia G, Santucci A: Effects of ACE inhibition on spontaneous and insulin-stimulated endothelin-1 secretion: in vitro and in vivo studies. *Diabetes* 46: 81-86 (1997)
- Devereux RB: Therapeutic options in minimizing left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 139: S9-14 (2000)
- Dzau VJ: Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol* 59: 59A-65A (1987)
- Falkenhahn M, Gohlke P, Paul M, Stoll M, Unger T: The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: new therapeutic aspects. *J Cardiovasc Pharmacol* 24, Suppl 2: S6-13 (1994)
- Ferrario CM: Contribution of angiotensin-(1-7) to cardiovascular physiology and pathology. *Curr Hypertens Rep* 5: 129-34 (2003)
- Fogari R, Zoppi A, Lazzari P, Preti P, Mugellini A, Corradi L, Lusardi P: ACE inhibition but not angiotensin II antagonism reduces plasma fibrinogen and insulin resistance in overweight hypertensive patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 32: 616-20 (1998a)
- Fogari R, Zoppi A, Corradi L, Lazzari P, Mugellini A, Lusardi P: Comparative effects of lisinopril and losartan on insulin sensitivity in the treatment of non diabetic hypertensive patients, *Br J Clin Pharmacol* 46: 467-71 (1998b)

- Froehlich ED, Apstein A, Chobanian AV, Dévereux RB, Dustan HP, Dzau V, Frauad-Tarazi F, Horan MJ, Marcus M, Massie B, Pfeffer MA, Re RN, Roggella EJ, Savage D, Shub C: The heart in hypertension, *N Engl J Med* 327: 998-1008 (1992)
- Galatius-Jensen S, Wroblewski H, Emmeluth C, Bie P, Haunsø S, Kastrup J: Plasma endothelin in congestive heart failure: effect of the ACE inhibitor, foscinopril. *Cardiovasc Res* 32: 1148-54 (1996)
- Gohlke P, Linz W, Schölkens B, Even P van, Martorana P, Unger T: Vascular and cardiac protection by ramipril in spontaneously hypertensive rats: prevention versus regression study. *Br J Clin Pract* 84, Suppl: 1-10 (1996)
- Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Pozzi M, Morganti A, Carugo S, Mancia G: Effects of chronic ACE inhibition on sympathetic nerve traffic and baroreflex control of circulation in heart failure. *Circulation* 96: 1173-79 (1997)
- Grenier O, Pousset F, Isnard R, Kalotka H, Carayon A, Maistre G, Lechat P, Guerot C, Thomas D, Komajda M: Captopril does not acutely modulate plasma endothelin-1 concentration in human congestive heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 10: 561-65 (1996)
- Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlof B, Elmfeldt D, Julius S, Menard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S: Effects of intensive blood pressure lowering and low dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT study group. *Lancet* 351: 1755-62 (1998)
- Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmaki K, Dahlof B, Faire U de, Morlin C, Karlberg BE, Wester PO, Bjorck JE: Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* 353: 611-616 (1999)
- Heidbreder H, Froer KL, Bauer B, Breitstadt A: Efficacy and safety of ramipril in combination with hydrochlorothiazide. Results of a long-term study. *J Cardiovasc Pharmacol* 18, Suppl. 2: 169-73 (1991)
- Herlitz J, Malmberg K: How to improve the cardiac prognosis for diabetes. *Diabetes Care* 22, Suppl 2: B89-96 (1999)

- Higashiura K, Ura N, Takada T, Li Y, Torii T, Togashi N, Takada M, Takizawa H, Shimamoto K: The effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist on insulin resistance in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 13: 290-97 (2000)
- Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y: Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 78: 225-28 (1989)
- Hirsch AT, Talsness CE, Smith AD, Schunkert H, Ingelfinger JR, Dzau VJ: Differential effects of captopril and enalapril on tissue renin-angiotensin systems in experimental heart failure. *Circulation* 86: 1566-74 (1992)
- Jöhren O, Dendorfer A, Dominiak P: Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovasc Res* 62: 460-467 (2004)
- Juggi JS, Koenig-Berard E, Van Gilst WH: Cardioprotection by angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. *Can J Cardiol* 9: 336-52 (1993)
- Julius S, Gudbrandsson T, Jamerson K, Andersson O: The interconnection between sympathetics, microcirculation, and insulin resistance in hypertension. *Blood Press* 1: 9-19 (1992)
- Kim NN, Villegas S, Smmerour SR, Villarreal FJ: Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradikinin and nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 31: 457-66 (1999)
- Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O: Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 346: 732-36 (1995)
- Kokkonen JO, Saarinen J, Kovanen PT: Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res* 24: 189-93 (2001)
- Kooner JS, Raimbach S, Bannister R, Peart S, Mathias CJ: Angiotensin converting enzyme inhibition lowers blood pressure in patients with primary autonomic failure independently of plasma renin levels and sympathetic nervous activity. *J Hypertens* 7, Suppl: S42-43 (1989)
- Krützfeldt J, Raasch W, Klein HH: Ramipril increases the protein level of skeletal muscle IRS-1 and alters protein tyrosine phosphatase activity in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 1-6 (2000)
- Laakso M, Karjalainen L, Lempiainen-Kuosa P: Effects of losartan on insulin sensitivity in hypertensive subjects. *Hypertension* 28: 392-96 (1996)

- Largo R, Gomez-Garre D, Liu XH, Alonso J, Blanco J, Plaza JJ, Egido J: Endothelin-1 upregulation in the kidney of uninephrectomized spontaneously hypertensive rats and its modification by the angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril. *Hypertension* 29: 1178-85 (1997)
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP: Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322: 1561-66 (1990)
- Lièvre M, Guéret P, Gayet C, Roudaut R, Haugh MC, Delair S, Boissel JP: Ramipril-induced regression of left ventricular hypertrophy in treated hypertensive individuals. *Hypertension* 25: 92-97 (1995)
- Linz W, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA: Experimental evidence for effects of ramipril on cardiac and vascular hypertrophy beyond blood pressure reduction. *Arch Mal Coeur Vaiss* 88 Spec No 2:31-34 (1995)
- Linz W, Schölkens BA, Ganten D: Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens A* 11: 1325-50 (1989)
- Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA: Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. *J Clin Invest* 99: 1926-35 (1997)
- Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75 (1951)
- Machado LJ, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC: The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors. *Braz J Med Biol Res* 31: 1349-52 (1998)
- McClellan KJ, Goa KL: Candesartan cilexetil. A review of its use in essential hypertension. *Drugs* 56: 847-69 (1998)
- McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ: Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 85: 1374-79 (1992)
- Moan A, Hoiieggen A, Nordby G, Eide IK, Kjeldsen SE: Effects of losartan on insulin sensitivity in severe hypertension: connections through sympathetic nervous system activity? *J Hum Hypertens* 9, Suppl 5: S45-50 (1996)

- Monge JC: Neurohormonal markers of clinical outcome in cardiovascular disease: is endothelin the best one? *J Cardiovasc Pharmacol* 32, Suppl 2: S36-42 (1998)
- Morsing P, Vauquelin G: How can the differences among AT₁-receptor antagonists be explained? *Cell Biochem Biophys* 35:89-102 (2001)
- Moursi MG, Ganten D, Lang RE, Unger T: Antihypertensive action and inhibition of tissue converting enzyme (CE) by three prodrug CE inhibitors, enalapril, ramipril and perindopril in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 4, Suppl.3: 495-8 (1986)
- Nakata T, Takeda K, Hatta T, Kiyama M, Moriguchi J, Miki S, Kawa T, Morimoto S, Nakamura K, Uchida A, Itoh H, Sasaki S, Nakagawa M: Blockade of angiotensin II receptors inhibits the increase in blood pressure induced by insulin. *J Cardiovasc Pharmacol* 31: 248-52 (1998)
- Nickenig G, Böhm M: Interaction between insulin and AT₁ receptor. Relevance for hypertension and arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol* 93, Suppl 2, 135-9 (1998)
- Nunez E, Hosoya K, Susic D, Froehlich ED: Enalapril and losartan reduced cardiac mass and improved coronary haemodynamics in SHR. *Hypertension* 29: 519-24 (1997)
- Okunishi H, Oka Okunishi H, Oka Y, Shiota N, Kawamoto T, Song K, Miyazaki M: Marked species-difference in the vascular angiotensin II-forming pathways: humans versus rodents. *Japan J Pharmacol* 62: 207-10 (1993)
- Ostmann J, Asplund K, Bystedt T, Dahlof B, Jern S, Kjellstrom T, Lithell H: Comparison of effects of quinapril and metoprolol on glycaemic control, serum lipids, blood pressure, albuminuria and quality of life in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients with hypertension. Swedish Quinapril Group. *J Intern Med* 244: 95-107 (1998)
- Paolisso G, Gambardella A, Verza M, D'Amore A, Sgambato S, Varricchio M: ACE inhibition improves insulin-sensitivity in aged insulin-resistant hypertensive patients. *J Hum Hypertens* 6: 175-79 (1992)

- Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, Klein M, Lamas GA, Packer M, Rouleau J, Rouleau JL, Rutherford J, Wertheimer JH, Hawkins CM: Effects of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the Survival and Ventricular Enlargement trial. The SAVE investigators. *N Engl J Med* 327: 669-77 (1992)
- Pfeffer MA, Swedber K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S: Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure. *Lancet* 362: 759-766 (2003)
- Picard F, Auwerx J: PPAR(γ) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr* 22: 167-197 (2002)
- Raasch W, Betge S, Dendorfer A, Bartels T, Dominiak P: Angiotensin converting enzyme inhibition improves cardiac neuronal uptake of noradrenaline in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 19: 1827-33 (2001)
- Raasch W, Bartels T, Gieselberg A, Dendorfer A, Dominiak P: Angiotensin I-converting enzyme inhibition increases cardiac catecholamine content and reduces monoamine oxidase activity via an angiotensin Type 1 Receptor-mediated mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 2002 300: 428-34 (2002 a)
- Raasch W, Bartels T, Schwartz C, Häuser W, Rütten H, Dominiak P: Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors? *J Hypertens* 20: 2495-2504 (2002 b)
- Raasch W, Jöhren O, Schwartz S, Gieselberg A, Dominiak P: Combined blockade of AT₁-receptors and ACE synergistically potentiates antihypertensive effects in SHR. *J Hypertens* 22: 611-618 (2004)
- Raasch W, Dominiak P, Dendorfer A: Angiotensin I-converting enzyme-dependent and neutral endopeptidase-dependent generation and degradation of angiotensin II contrarily modulate noradrenaline release: implications for vasopeptidase-inhibitor therapy? *J Hypertens* 23: 1597-604 (2005)

- Rao RH: Pressor doses of angiotensin II increase hepatic glucose output and decrease insulin sensitivity in rats. *J Endocrinol* 148: 311-18 (1996)
- Richards AM, Nicholls MG, Crozier IG: Role of ACE inhibitors in hypertension with left ventricular hypertrophy. *Br Heart J* 72, Suppl: 24-32 (1994)
- Rizzoni D, Porteri E, Piccoli A, Castellano M, Pasini G, Guelfi D, Muiesan ML, Rosei EA: High-dose, not low-dose insulin increases the vasoconstrictor effect of norepinephrine in spontaneously hypertensive rats: effects of antihypertensive treatment. *J Vasc Res* 36: 393-403 (1999)
- Ruetten H, Thiemermann C, Vane JR: Effects of the endothelin receptor antagonist, SB 209670, on circulatory failure and organ injury in endotoxic shock in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 118: 198-204 (1996)
- Ruiz-Ortega M, Gomez-Garre D, Alcazar R, Palacios I, Bustos C, Gonzales S, Plaza JJ, Gonzalez E, Egido J: Involvement of angiotensin II and endothelin in matrix protein production and renal sclerosis. *J Hypertens* 12, Suppl: S51-8 (1994)
- Rutherford JD, Pfeffer MA, Moye LA, Davis BR, Flaker JC, Kowey PR, Lamas GA, Miller HS, Packer M, Rouleau JL, Baumwald E: Effects of captopril on ischemic events after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. SAVE investigators. *Circulation* 90: 1731-38 (1994)
- Sakaguchi K, Jackson B, Chai SY, Mendelsohn FA, Johnson CI: Effects of perindopril on tissue angiotensin-converting enzyme activity demonstrated by quantitative in vitro autoradiography. *J Cardiovasc Pharmacol* 12: 710-17 (1988)
- Scheen AJ: Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the renin-angiotensin system. *Drugs* 64: 2537-65 (2004)
- Schiffirin EL: Endothelin: role in hypertension. *Biol Res* 31: 199-208 (1998)
- Scholkens BA, Linz W: Cardioprotective effects of ACE inhibitors: experimental proof and clinical perspectives. *Clin Physiol Biochem* 8, Suppl 1: 33-43 (1990)
- Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U: Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity. *Circulation* 109: 2054-57 (2004)

- Shimamoto K, Matsuda K, Takizawa H, Higashiura K, Ura N, Iimura O: Effects of an angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, on insulin sensitivity in fructose-fed rats. *Blood Press* 5, Suppl : 113-16 (1994)
- Shimamoto K, Ura N, Nakagawa M, Higashiura K, Takizawa H, Miyazaki Y, Nomura N, Hirata A, Takagawa Y, Murakami H, Iimura O: The mechanisms of the improvement of insulin sensitivity by angiotensin converting enzyme inhibitor. *Clin Exp Hypertens* 18: 257-66 (1996)
- Staessen JA, Wang J, Thijs L: Cardiovascular prevention and blood pressure reduction: a qualitative overview updated until 1 march 2003. *J Hypertens* 21: 1055-76 (2003)
- Stock P, Liefeldt L, Paul M, Ganten D: Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localisation and functional role. *Cardiology* 86, Suppl 1: 2-8 (1995)
- Susic D, Nunez E, Fröhlich ED: Reversal of hypertrophy: an active biologic process. *Curr Opin Cardiol* 10: 466-72 (1995)
- Suter PM, Vetter W: Metabolic effects of antihypertensive drugs. *J Hypertens* 13, Suppl: S11-17 (1995)
- Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, Miller-Wing AV, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, Harding J: Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 40: 409-19 (1992)
- Swedberg K, Held P, Kjeksus J, Rasmussen K, Ryden L, Wedel H: Effects of the early administration of enalapril on mortality in patients with acute myocardial infarction. Results of the Cooperative New Scandinavian Enalapril Survival Study II (CONSENSUS II). *N Engl J Med* 327: 678-84 (1992)
- Testa MA, Anderson RB, Nackley JF, Hollenberg NK: Quality of life and antihypertensive therapy in men. A comparison of captopril with enalapril. The Quality-of-Life Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 328: 907-13 (1993)
- Teunissen KE, Postma CT, Jaarsveld BC van, Derkx FH, Thien T: Endothelin and active renin levels in essential hypertension and hypertension with renal artery stenosis before and after percutaneous transluminal renal angioplasty. *J Hypertens* 15 : 1791-96 (1997)

- Tomiyama H, Kushiro T, Abeta H, Ishii T, Takahashi A, Furukawa L, Asagami T, Hino T, Saito F, Otsuka Y: Kinins contribute to the improvement of insulin sensitivity during treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor. *Hypertension* 23: 450-55 (1994)
- Torp-Pedersen C, Kober L: Effect of ACE inhibitor trandolapril on life expectancy of patients with reduced left ventricular function after acute myocardial infarction. TRACE Study Group. Trandolapril Cardiac Evaluation. *Lancet* 354: 9-12 (1999)
- Townend J, Doran J, Jones S, Davies M: Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on plasma endothelin in congestive heart failure. *Int J Cardiol* 43: 299-304 (1994)
- Traquandi C, Riva E: Cardiac effects of angiotensin I and angiotensin II: dose-response studies in the isolated perfused rat heart. *Pharmacol Res* 37: 57-65 (1998)
- Uehara M, Kishikawa H, Isami S, Kisanuki K, Ohkubo Y, Miyamura N, Miyata T, Yano T, Shichiri M: Effect on insulin sensitivity of angiotensin converting enzyme inhibitors with or without a sulfhydryl group: bradykinin may improve insulin resistance in dogs and humans. *Diabetologica* 37: 300-307 (1994)
- Ura N, Higashiura K, Shimamoto K: The mechanisms of insulin sensitivity improving effects of angiotensin converting enzyme inhibitor. *Immunopharmacology* 44: 153-59 (1999)
- Valensi P, Derobert E, Genthon R, Riou JP: Effect of ramipril on insulin sensitivity in obese patients. Time-course study of glucose infusion rate during euglycaemic hyperinsulinaemic clamp. *Diabetes Metab* 22: 197-200 (1996)
- Van Veldhuisen DJ, Genth-Zots S, Brouwer J, Boomsma F, Netzer T, Man In'T Veld AJ, Pinto YM, Lie KI, Crijns HJ: High- versus low-dose ACE inhibition in chronic heart failure: a double blind, placebo-controlled study of imidapril. *J Am Coll Cardiol* 32: 1811-18 (1998)
- Veltmar A, Gohlke P, Unger T: From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. *Am J Hypertens* 4: 263S-269S (1991)
- Vollmer RR, Balcita JJ, Sved AF, Edwards DJ: Adrenal epinephrine and norepinephrine release to hypoglycemia measured by microdialysis in conscious rats. *Am J Physiol* 273: R1758-63 (1997)

- Wahländer H, Sohtell M, Wickman A, Nilsson A, Friberg P: Therapeutic, but not low-dose, angiotensin-converting enzyme inhibition causes regression of cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 327-34 (1996)
- Wollert KC, Studer R, Bülow B von, Drexler H: Survival after myocardial infarction in the rat. Role of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* 90: 2457-67 (1994)
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura K, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yasati Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstricting peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-15 (1988)
- Yusuf S, Gerstein H, Hoogwerf P, Pogue J, Bosch J, Wolfenbuttel BH, Zinman B: Ramipril and the development of diabetes. *JAMA* 286: 1882-85 (2001)
- Yusuf S, Ostergren JB, Gerstein HC, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Olofsson B, Probstfield J, McMurray JV: Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure. *Circulation* 112: 48-53 (2005)
- Zuanetti G, Latini R, Maggioni AP, Franzosi M, Santoro L, Tognoni G: Effect of the ACE inhibitor lisinopril on mortality in diabetic patients with acute myocardial infarction: data from the GISSI-3 study. *Circulation* 96: 4239-45 (1997)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. P. Dominiak für die Überlassung des Arbeitsplatzes, für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre, für seine großzügige Förderung und sein Interesse, das er meiner Arbeit entgegen gebracht hat,

Herrn PD Dr. rer. nat. W. Raasch für die Überlassung des Themas, für viele anregende Diskussionen und für die Einweisung in die verschiedensten Techniken, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts,

Herrn Dr. H. Rütten für die Durchführung der Radio-Immuno-Assays zur Bestimmung des Endothelin-1-Gehalts von entsprechend aufbereiteten Serum-Proben,

Herrn U. Schäfer für die Einarbeitung in die Operationstechniken,

sowie bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Anhang

Verwendete Substanzen:

ABz-Gly-OH•HCl	BACHEM, Heidelberg
ABz-Gly-Phe(NO ₂)-Pro-OH	BACHEM, Heidelberg
Äther für Narkosezwecke	Hoechst, Frankfurt
Candesartan cilexetil *	Astra Zeneca AB, Sweden
Captopril	Sigma, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Enalaprilat *	MSD, München
flüssiger Stickstoff	Medizinische Universität zu Lübeck
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Fosinopril *	Bristol-Myers Squibb, München
G20-Glucose-Lösung	Braun, Melsungen
Gummi arabicum	Caelo, Hilden
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen
Insulin	Sigma, Deisenhofen
Isotonische Kochsalzlösung	Serag Wiessner, Naila
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methanol, gradient grade	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt
Pentobarbital-Natrium-Lösung	Apotheke der MUZL
Perchlorsäure (70-72%)	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Ramipril *	Astra Zeneca AB, Sweden
RIA-Kit #RI-13K (Insulin)	Linco, St. Charles, Mo.,USA
Sauerstoff für medizinische Zwecke	Messer Griesheim, Frankfurt
Serumalbumin vom Rind	Sigma, Deisenhofen
Stickoxydul pro narkosi	Messer Griesheim, Frankfurt
Tris[hydroxymethyl]aminomethan	Sigma, Deisenhofen
Triton-X 100	Serva

* Diese Substanzen wurden freundlicherweise von den entsprechenden Firmen zur Verfügung gestellt.

Verwendete Lösungen:

In der folgenden Übersicht sind die selbst hergestellten Lösungen aufgeführt, die häufiger Verwendung fanden.

Lowry-Mix:

Natriumcarbonat, 2%	1ml
Kupfer-(II)-Sulfat, 40mM	1ml
Natriumchlorid	98ml

Folin-Reagenz:

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	10ml
0,9% NaCl	30ml

Inkubationspuffer A

Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	70mM
NaCl	300mM
pH 7,4	

Inkubationspuffer B

wie Puffer A;	
zusätzlich Enalaprilat	1mM

Neutralisationspuffer:

Na ₂ HPO ₄	500mM
----------------------------------	-------

Eluent für HPLC:

20mM Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	900ml
MeOH	70ml
pH 7,4	

Perchlorsäure 2N:

HClO ₄ (70-72%)	20ml
H ₂ O	98ml

wässrige Arzneistofflösungen

bzw. Suspensionen:

Captopril	50 mg/ml
Enalapril	10 mg/ml
Ramipril	1 mg/ml
Fosinopril	20 mg/ml
Candesartan	2,5 mg/ml
Kombination	0,15 mg/ml Ram + 0,45 mg/ml Can (Herstellung s. Kap. 3.1.1.)

Substratlösung:

Abz-Gly Phe(NO₂)-Pro-OH 500mM (in InkubationspufferA)

Produktlösung für Eichreihe:

Abz-Gly-OH•HCl 0-100nM (in Neutralisationspuffer)

Homogenisationspuffer

Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	70mM
NaCl	300mM
PMSF	1mM
Triton X-100	0,3%
pH 7,4	

Verwendete Geräte:

Absaugpumpe 4151	Eppendorf, Hamburg
Absorptionsphotometer Novaspec II	Pharmacia, Freiburg
Absorptionsphotometer Uvikon	Kontron, Neufahrn
Adsorbex® RP-18 Extraktionssäulen	Merck, Darmstadt
Blutdruck-Messgerät „blood pressure monitore 8002“	TSE, Bad Homburg
Druckaufnehmer Statham P 23 Db	Hellige, Freiburg
Druckeichgerät nach Prof. Gauer	HSE, Hugstetten
Druckmessgerät Pressure Processor + DC-Amplifier	Gould, Dietzenbach
Flüssigszintillationszähler (γ -Counter)	Kontron, Neufahrn
Gewebehomogenisator	Braun, Melsungen
Heizspirale Thermomix ME	Braun Biotech International
Homogenisator Ultraturrax TP 18-10	Janke & Kunkel, Staufen
HPLC / RPLC -Anlage:	
Pumpe: Merck-Hitachi L-6220	Merck, Darmstadt
Mixer	Merck, Darmstadt
Autoinjektor: SIL-9A	Shimadzu, Düsseldorf
Nova Pak® C 18-Säule 3,9x150 mm	Waters, Eschborn
RF-551 spectrofluorometric detector	Shimadzu, Düsseldorf
Integrator: Merck- Hitachi D-2500	Merck, Darmstadt
Infusionspumpen	TSE Systems, Bad Homburg
Magnetrührer Combimag RCT	Jahnke & Kunkel, Staufen
Narkose-Automat Sulla 19	Dräger, Lübeck
Operationsinstrumente	FST, Heidelberg
Operationstisch für Kleintiere, heizbar	Werkstt Physiologie, Universität München
PE-50-Katheter-Gabelung	Werkstatt Pharmakologie
pH-Meter WTW pH 532	WTW, Weilheim
Polyethylen-Katheter (PE-10 und 50)	Clay-Adams, USA
REAX 2000 Schüttelmixer	Heidolph, Kelheim
Registriergerät Plotter Hellige Recomed	Hellige, Freiburg
Spektrofluorometer SFM 25	Kontron, Neufahrn

Waagen:

Analysenwaagen Mettler H54

Feinwaage Mettler PE 360

Feinwaage Sartorius LC 220 S

Tierwaage QS 16

Wasserbad

Zentrifuge 5402

Mettler, Giessen

Mettler, Giessen

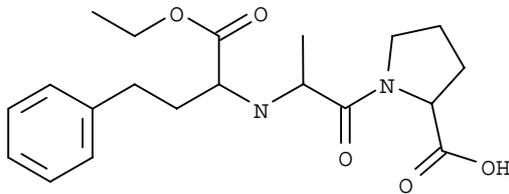
Sartorius, Göttingen

Sartorius, Göttingen

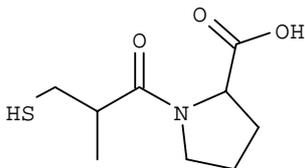
Braun, Melsungen

Eppendorf, Hamburg

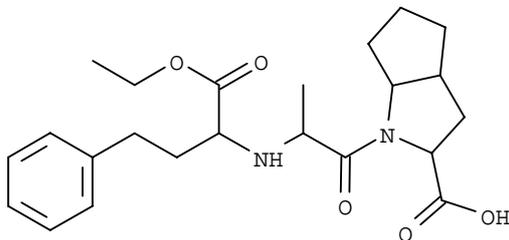
Formeln der Arzneistoffe:



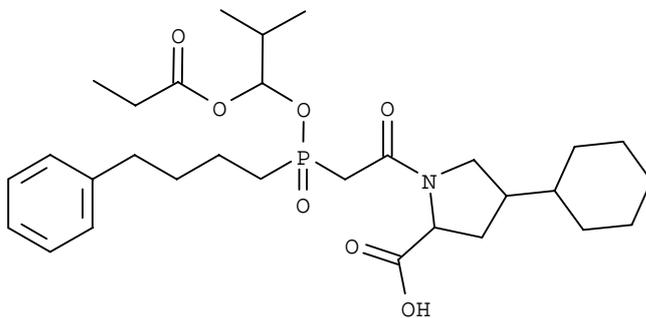
Enalapril



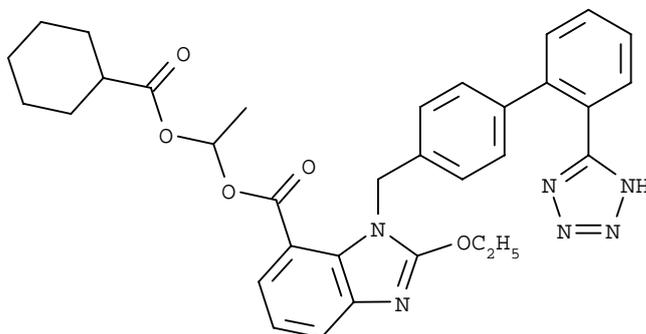
Captopril



Ramipril



Fosinopril



Candesartan-cilexetil

Curriculum Vitae

13. Januar 1967	Geboren als erstes Kind der Eheleute Dr. Hartmut Schwartz und Sigrid Schwartz, geb. Schoenemann, in Marburg
August 1973 - Dezember 1973	Besuch der Emil-von-Behring-Schule in Marburg
Januar 1974 - Juni 1977	Besuch der Grundschule Rübekamp In Pinneberg
August 1977 - Juni 1986	Besuch des Johannes-Brahms-Gymnasiums in Pinneberg mit dem Abitur als Abschluss
Juli 1986 – September 1987	Ableisten des Grundwehrdienstes
September 1987 – Juli 1988	Studium der Chemie an der California State University, San Bernardino, USA
Oktober 1988 – April 1993	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
März 1991	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
April 1993	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 1993 – Oktober 1993 und Februar 1994 – April 1994	Praktikum in der CCB-Apotheke in Hamburg
November 1993 – Januar 1994	Praktikum bei der Firma Hermal in Reinbek
Juni 1994	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Approbation als Apotheker
Januar 1995 - März 1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Universität zu Lübeck
Seit April 1999	Apotheker in der Apotheke Waldenau, Pinneberg