

**Oxidativ modifiziertes LDL:
Untersuchungen zu seiner Bildung
und seinen zellulären Effekten**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2000

vorgelegt von

Patricia Friederike Dalferth

Tag der mündlichen Prüfung:

05. Juni 2000

Dekan:

Prof. Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Heinle

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Drews

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet**

	Inhaltsverzeichnis	Seite
1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerotische Plaquentwicklung	2
1.2	Risikofaktor Fettstoffwechselstörungen und Bedeutung der LDL-Oxidation in der Atherogenese	3
1.3	LDL-Oxidation <i>in vitro</i>	7
1.4	Freie Radikale, antioxidative Schutzmechanismen und Antioxidative Kapazität	10
1.5	Zielsetzung	14
2	Material	15
2.1	Geräte	15
2.2	Chemikalien und Reagenzien	16
2.3	Lösungen	17
3	Methoden	19
3.1	Isolierung und Modifizierung von LDL	19
3.1.1	Isolierung von LDL	19
3.1.2	Oxidative Modifizierung	20
3.1.2.1	Bestimmung der Oxidierbarkeit von LDL über Dienbildung	20
3.1.2.2	Bestimmung freier Aminogruppen mit TNBS und Fluorescamin	21
3.1.2.3	Carbonylgruppenbestimmung	22
3.1.2.4	Gehalt an mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (TBARS)	22
3.1.2.5	Veränderungen von LDL in der elektrophoretischen Mobilität	23
3.2	Bestimmung freier Aminogruppen in LDL durch Fluorescamin-Titration im Plasma	24
3.3	Proteinbestimmung (nach Lowry)	25
3.4	Messung der Antioxidativen Kapazität durch die „AAPH-Reaktion“	25
3.5	Einfluß verschiedener Pharmaka auf die <i>in vitro</i> Oxidation von LDL	29
3.5.1	Allopathische Wirkstoffe (CSE-Hemmer, β -Blocker usw.)	29
3.5.2	Pflanzliche Wirkstoffe	29
3.6	<i>In vivo</i> Beeinflussung der LDL-Oxidierbarkeit im Tiermodell	30
3.6.1	Applikation von Antioxidantien und Carvedilol in WHHL-Kaninchen	30
3.6.2	Fütterungsinduzierte Hypercholesterinämie in Neuseeland-Kaninchen	31
3.7	Beeinflussung der LDL-Oxidierbarkeit und Parameter des oxidativen Stresses beim Menschen	32
3.7.1	Effekt von Akutbelastung und Ausdauertraining	32
3.7.2	Antioxidative Kapazität und Fluorescamin-Titration von LDL im Plasma von Koronarpatienten	33

3.8	Einfluß von oxLDL auf zelluläres Ca²⁺	34
3.8.1	Calcium-Signale durch Fura-Fluoreszenz-Imaging	34
3.8.2	Versuchsdurchführung der Calciummessungen	36
3.8.3	Inkubation von glatten Muskelzellen mit LDL bzw. Angiotensin II	38
3.8.3.1	Applikation von kurzzeitig oxidiertem LDL	38
3.8.3.2	Langzeitapplikation mit lang oxidiertem LDL	38
3.8.3.3	Effekt von Angiotensin II und AT 1-Rezeptorblockade	39
4	Ergebnisse	41
4.1	<i>in vitro</i> Untersuchungen zur oxidativen Modifizierung von LDL	41
4.1.1	Charakterisierung des kupferinduzierten LDL-Oxidationsprozesses	41
4.1.1.1	MDA-Gehalt (TBARS) und die Bildung konjugierter Diene während der kupferinduzierten LDL-Oxidation	41
4.1.1.2	Bestimmung freier Aminogruppen während der kupferinduzierten LDL-Oxidation	42
4.1.1.3	Carbonylgruppenbestimmung während der kupferinduzierten LDL-Oxidation	43
4.1.1.4	Auswirkungen der Oxidation von LDL auf die elektrophoretische Mobilität	45
4.1.2	Einfluß von Therapeutika verschiedener Wirkstoffgruppen auf die <i>in vitro</i> Oxidation von LDL	47
4.1.2.1	Allopathische Wirkstoffe (CSE-Hemmer, β -Blocker usw.)	47
4.1.2.2	Pflanzliche Wirkstoffe	49
4.2	Bestimmung von Aminogruppen in LDL durch Fluorescamin-Titration im Plasma	52
4.3	Untersuchungen zur Antioxidativen Kapazität mit der AAPH-Reaktion	55
4.3.1	Voruntersuchungen	55
4.3.2	Standardisierung mit Vitamin E (Trolox [®])	56
4.3.3	Einfluß verschiedener Antioxidantien bzw. Plasma auf die AAPH-Reaktion	57
4.3.4	Antioxidative Kapazität von Plasma nach Einnahme von Vitamin E	61
4.3.5	Einfluß von nativem und oxidiertem LDL auf die AAPH-Reaktion	61
4.4	<i>In vivo</i> Beeinflussung der Oxidierbarkeit von LDL im Tiermodell	62
4.4.1	Einfluß von Antioxidantien und Carvedilol in WHHL-Kaninchen auf die <i>in vitro</i> LDL-Oxidierbarkeit	62
4.4.2	Einfluß von fütterungsinduzierter Hypercholesterinämie in Neuseeland-Kaninchen auf die Antioxidative Kapazität und <i>in vitro</i> LDL-Oxidierbarkeit	63
4.5	Untersuchungen am Menschen	65
4.5.1	Effekt von Akutbelastung und Ausdauertraining auf LDL-Oxidierbarkeit und Parameter des oxidativen Stresses	65
4.5.2	Antioxidative Kapazität und Fluorescamin-Titration von LDL im Plasma von Koronarpatienten	72

4.6	Beeinflussung der zellulären Calciumhomöostase durch LDL und Angiotensin II	78
4.6.1	Akute Wirkung von kurzzeitig oxidiertem LDL auf glatte Muskelzellen	78
4.6.2	Chronische Wirkung von lang oxidiertem LDL auf glatte Muskelzellen	81
4.6.3	Wirkung von Angiotensin II und AT-1-Rezeptorblockade auf glatte Muskelzellen	82
5	Diskussion	85
5.1	Untersuchungen zur oxidativen Modifizierung von LDL	85
5.1.1	Charakterisierung des kupferinduzierten Oxidationsprozesses	86
5.1.2	Einfluß von Therapeutika verschiedener Wirkstoffgruppen auf die <i>in vitro</i> Oxidation von LDL	89
5.1.2.1	Allopathische Wirkstoffe	89
5.1.2.2	Pflanzliche Wirkstoffe	90
5.1.3	Einfluß von Antioxidantien und Carvedilol auf die <i>in vitro</i> Oxidation von LDL in WHHL-Kaninchen	92
5.2	Untersuchungen zum Einfluß von Antioxidantien und Plasma auf die AAPH-Reaktion	94
5.3	Untersuchungen zu fütterungsinduzierter Hypercholesterinämie in Kaninchen	98
5.4	Untersuchungen am Menschen zur LDL-Oxidierbarkeit und Antioxidativen Kapazität	100
5.4.1	Beeinflussung der LDL-Oxidierbarkeit und Antioxidativen Kapazität durch Akutbelastung und Ausdauertraining	100
5.4.2	Bestimmung der Antioxidativen Kapazität des Plasma bei Koronarer Herzkrankheit	105
5.4.3	Bestimmung von Aminogruppen in LDL durch Fluorescamin-Titration im Plasma bei Koronarer Herzkrankheit	106
5.5	Einflüsse von LDL und Angiotensin II auf glatte Muskelzellen	110
5.5.1	Akute Wirkung von LDL auf glatte Muskelzellen	110
5.5.2	Wirkung von LDL auf den zellulären Angiotensin II-Effekt	111
5.5.3	Wirkung von Angiotensin II und AT 1-Rezeptorblockade auf glatte Muskelzellen	113
6	Zusammenfassung	115
7	Literaturverzeichnis	119
	Anhang	133
	Abkürzungen	133
	Strukturformeln	134

1 Einleitung

Atherosklerose ist die häufigste Systemerkrankung der Arterien, bei der am Anfang als Antwort auf verschiedene auslösende Faktoren eine entzündliche fibroproliferative Schutzreaktion steht. Das Ergebnis einer über einen langen Zeitraum chronisch bestehenden Entzündung ist eine überschießende Reaktion, die dann selbst als krankhaft zu bezeichnen ist (*Ross 1998*). Fortschreitende zelluläre und gewebliche Stoffwechselstörungen lassen Schäden an den Gefäßwänden entstehen. Dieser Prozeß kann bis zu einem gewissen Grade als altersphysiologischer Vorgang gesehen werden, der vor allem zu einer allgemeinen Arterienverhärtung (=Arteriosklerose) führt, ohne daß innerhalb der normalen Lebenserwartung klinisch relevante Ereignisse auftreten. Durch zusätzliche Faktoren kann diese generelle Gefäßwandveränderung jedoch lokal derart moduliert werden, daß es über fokale Atherombildung (=Atherosklerose) zu Gefäßeinengungen und Gefäßverschlüssen kommt, die in die verschiedenen Manifestationsformen der Atherosklerose, wie Koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Schlaganfall oder periphere Verschlusskrankheit, münden. Diese Folgeerkrankungen, insbesondere die von den Koronararterien ausgehenden, stellen in den westlichen Industrienationen die Hauptursache für Frühinvalidität und verlorene Lebensjahre dar. Zu den wichtigsten Faktoren, die zu einem forcierten Ablauf der atherosklerotischen Gefäßveränderungen führen, gehören erhöhte Werte von Blutdruck und Blutzucker, ungünstige Werte der Fettstoffwechselformen (Lipide, Lipoproteine, Apo-Lipoproteine), Rauchen, Übergewicht sowie weitere Variablen wie psychosozialer Stress, Infektionen der Gefäßwände, Lp(a)-Serumspiegel und Fibrinogen-Plasmaspiegel (*Cremer et al. 1991*). Es konnte aber auch gezeigt werden, daß die überschießende, entzündliche, fibroproliferative Antwort rückgängig gemacht werden kann, wenn die schädigenden Faktoren geändert werden (*Ross 1998*).

Nachdem lange Zeit vor allem erhöhten Cholesterinwerten eine zentrale Rolle bei der Ursachenforschung der Atherosklerose beigemessen wurde, rückte in den letzten zehn Jahren verstärkt die LDL-Oxidations-Hypothese in den Mittelpunkt der Diskussion (*Steinberg et al. 1989*). Diese Hypothese geht ursprünglich von der Beobachtung aus, daß LDL, das von Zellen modifiziert (oxidiert) wurde, die Schaumzellbildung bei der Atherogenese verstärkt. Weitergehend kann man von einer

Störung des oxidativen/antioxidativen Gleichgewichts an der Gefäßwand sprechen, wodurch verstärkt oxidierte LDL-Partikel auftreten, die im Gegensatz zu nativem LDL weitere Eigenschaften aufweisen, die die Entwicklung einer Atherosklerose begünstigen können.

Diese Oxidations-Hypothese wird von epidemiologischen Studien (*Hertog et al. 1993*) gestützt, die regional stark variierende Inzidenzen der Koronaren Herzkrankheit zeigen. Eine Erklärung dafür ist möglicherweise der unterschiedliche Gehalt an Flavonoiden in der Nahrung, die neben hydro- und lipophilen Strukturen antioxidative Eigenschaften aufweisen (*Cook und Samman 1996, Rice-Evans et al. 1996*) und damit vermutlich hemmend in den, entsprechend der Oxidationshypothese der Atherogenese (s. u.) ablaufenden Pathomechanismus eingreifen. Weitere Substanzgruppen mit antioxidativer Aktivität stehen in der Diskussion einen positiven Beitrag bei der Prävention der Atherosklerose zu leisten (*Heller et al. 1998*).

Allein die Bandbreite dieser Einflußfaktoren macht die Probleme deutlich, die mit der Erforschung der Atherogenese, der dabei zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sowie der daraus abgeleiteten Therapieansätzen verbunden sind.

1.1 Atherosklerotische Plaquentwicklung

Bereits 1925 wurden die sogenannten Fettstreifen „fatty streaks“ an Arterien von Kindern im Detail beschrieben und vermutet, daß hier der Ausgangspunkt für die Entwicklung von komplizierteren Plaques zu suchen ist (*McMillan 1995*). Diese These gilt heute immer noch. Nach dem histologischen Bild teilt man die atherosklerotischen Wandveränderungen in unterschiedliche Stadien ein (*Ross 1986*). Die erwähnten Frühveränderungen sind Lipidflecke, die sich durch Ansammlung von lipid- und cholesterinüberladenen Makrophagen im subendothelialen Raum bilden, und die zusammen mit den im weiteren Verlauf entstehenden lipidangereicherten, glatten Muskelzellen die sogenannten Schaumzellen darstellen (Stadium I und II). Diese im Anfangsstadium beteiligten Zellen sind klassische Komponenten eines chronisch-entzündlichen Prozesses, der in die Migration und Proliferation arterieller glatter Muskelzellen mündet. Im weiteren Verlauf findet man im Prä-Atherom (Stadium III) extrazellulär vorkommende Lipide, die im IV. Stadium zu einem Lipidkern zusammengewachsen sind, was wiederum mit massiven strukturellen Schädigungen der

Intima verbunden ist. In diesem Stadium lassen sich auch eindeutig feste Bestandteile wie Kalk und Cholesterinkristalle nachweisen. Im Gegensatz zu Kalk und fibrösem Material können weiche Fetteinlagerungen aus der Gefäßwand abtransportiert werden, wenn die Ursache der Fetteinlagerung beseitigt ist.

Durch lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren kommt es zu einer Aktivierung glatter Muskelzellen, die in die Intima einwandern und dort proliferieren. Kennzeichen fortgeschrittener Atherosklerose ist das Auftreten fibro-atheromatöser Plaques (Stadium V) mit der Entwicklung deutlicher Kollagenschichten und Vermehrung von glatten Muskelzellen über dem Lipidkern. Durch fortschreitende Endothelläsionen ist die Produktion endothelialer Mediatoren wie NO, Prostacyclin und endothelialer Plasminogen-Aktivatoren gestört. Es kommt zur Anlagerung von thrombotischem Material, wodurch das Lumen verengt und so die Blutversorgung lebenswichtiger Organe gefährdet wird. Für den Gefäßverschluß bei Myocardinfarkt oder Apoplex sind meistens Thrombosen verantwortlich.

1.2 Risikofaktor Fettstoffwechselstörungen und Bedeutung der LDL-Oxidation in der Atherogenese

Zahlreiche klinische, epidemiologische und experimentelle Studien belegen, daß Fettstoffwechselstörungen, vor allem LDL-assoziierte Hypercholesterinämie, wichtige Risikofaktoren für die Atherogenese darstellen (*Steinberg et al. 1989, Cremer et al. 1991, Grundy 1995*).

Die 22 nm großen und circa drei Millionen Dalton schweren Lipoproteine geringer Dichte (low-density lipoproteins, LDL) sind die wichtigsten Cholesterin-Transporter des Blutes. Sie bestehen zu 45 % aus Cholesterin, wobei etwa 1500, meist mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Linolat, veresterte Cholesterinmoleküle einen stark hydrophoben Kern bilden (*Stryer 1990*). Dieser Kern ist von einer Hülle aus Phospholipiden und unverestertem Cholesterin umgeben, in die ein einzelnes Proteinmolekül, Apo B-100, mit einer Masse von 514 kd (*Knott et al. 1986*) eingelagert ist. Die Bindung des LDL an spezifische Rezeptoren zur rezeptorvermittelten Endozytose in Leber und anderen Geweben wird durch dieses Proteinmolekül vermittelt. Dabei reagiert eine positiv geladene Region des Apo B-100 mit negativ geladenen Seitenketten in der LDL-bindenden Domäne des LDL-Rezeptors.

Der Cholesteringehalt in den Zellen des peripheren Gewebes wird über den Cholesterinspiegel durch negative Rückkopplungen gesteuert: zum einen wird die Neusynthese von Cholesterin über die HMG-CoA-Reduktase beeinflusst und zum anderen unterliegt die Genexpression für die Synthese von Rezeptorproteinen einer solchen Rückkopplungsregulation. Damit ist eine vermehrte Anhäufung von Cholesterin in Zellen nicht möglich (*Brown und Goldstein 1986*).

Zur Versorgung der Gefäßwandzellen mit Cholesterin verlassen die LDL-Partikel das Blutplasma durch Filtration und vesikulären Transport über das Endothel. Überschüssiges LDL wird von Makrophagen aus der Intima entfernt um Akkumulation und Alterung des LDL zu verhindern. Treten bei hohem intravasalem Druck oder durch hohen Plasmaspiegel vermehrt LDL-Partikel in den subendothelialen Raum über, ist dieser Gleichgewichtszustand gefährdet. Durch eine längere Verweildauer des LDL in der Gefäßwand wird eine Oxidierung der LDL-Partikel durch Radikale wahrscheinlicher. Modifizierungsreaktionen an LDL ermöglichen dessen verstärkte Aufnahme durch den sogenannten Scavenger-Rezeptor. Dieser zuerst beschriebene Scavenger- oder Acetyl-LDL-Rezeptor weist eine hohe Affinität zu stark oxidativ modifiziertem LDL auf und ist neben weiteren möglichen oxLDL-Rezeptoren auf Makrophagen wie dem CD36- und F_c-Rezeptor (*Hiltunen und Ylä-Herttuala 1998*) und LOX-1 auf Endothelzellen (*Sawamura et al. 1997*) für die Anhäufung von LDL-Lipiden in Zellen verantwortlich (*Steinberg 1997*). Die Bildung der „fatty streaks“ wird über diesen Mechanismus erklärt (*Steinberg et al. 1989*). Grundy (1995) geht von einem 2-Stufen-Prozeß bei der Entstehung atherosklerotischer Plaque aus, dessen erste Stufe, die Entwicklung der „fatty streaks“, durch das Vorhandensein von LDL ermöglicht wird, daß aber die Umwandlung zu fibrösen Plaques im zweiten Schritt durch die Risikofaktoren Rauchen, Bluthochdruck und Diabetes gefördert wird.

Der Modifizierungsreaktionen von LDL wird damit eine große Bedeutung in der Atherogenese zugesprochen (*Reaven 1994*). Goldstein und Brown haben als erste eine modifizierte Form des LDL, das Acetyl-LDL beschrieben (*Brown und Goldstein 1986*), das rasch von Makrophagen aufgenommen wird, die sich dann in Schaumzellen umwandeln. Für die Aufnahme des LDL durch den Scavenger-Rezeptor ist weniger eine Veränderung der Struktur verantwortlich als viel mehr eine Verschiebung der elektrischen Gesamtladung des Moleküls zum Negativen hin (*Vanderyse et al. 1992*).

Haberland et al. (1984) stellten fest, daß vor allem die Modifizierung bestimmter Lysin-Bereiche dafür notwendig ist und daß die ersten 23 % der Primärsequenz von ApoB-100 für die Erkennung durch den Scavenger-Rezeptor ausreichen (*Kreuzer et al. 1997*). Weiterhin scheinen für die Oxidationsempfindlichkeit des LDL Größe und Dichte ausschlaggebend zu sein (*de Graaf et al. 1991*).

Nach Inkubation von LDL mit Endothelzellen konnten *Henriksen et al. (1981)* eine Reihe physikalischer und chemischer Veränderungen an diesen LDL-Partikeln zeigen. Auch das durch andere Zellarten modifizierte LDL wurde von kultivierten Makrophagen viel schneller aufgenommen als natives LDL. Mit verschiedenen weiteren Zellsystemen, wie glatten Muskelzellen und Monocyten/Macrophagen, konnten physikochemische Veränderungen nachgewiesen werden, die alle einen gemeinsamen ersten Reaktionsschritt aufweisen: die Peroxidation von LDL-Lipiden (*Parthasarathy et al. 1992*) (Abb. 1-1).

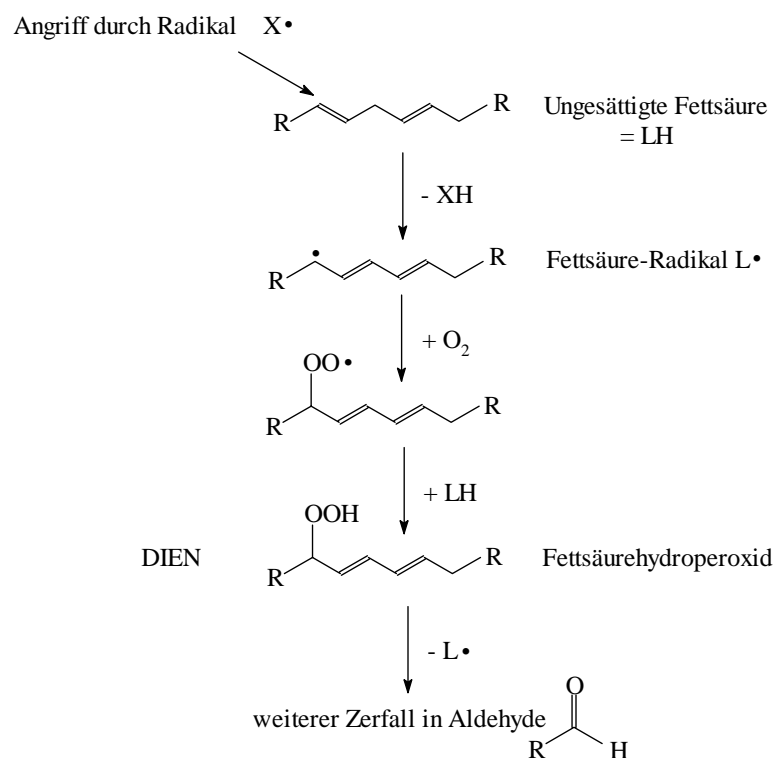


Abb. 1-1: Lipidperoxidationsreaktion z. B. in LDL

Die Umwandlung von LDL zu oxidiertem LDL kann aber auch durch unterschiedliche Enzyme wie Myeloperoxidase, Lipoxxygenasen und Cyclooxygenasen bewirkt werden (*Ylä-Herttuala 1998*), ebenso durch Radikalbildner und zweiwertige

Kationen wie Kupfer und Eisen (*Esterbauer und Jürgens 1993, Esterbauer und Ramos 1995*). Das mit Kupfer oxidierte LDL ähnelt dem aus atherosklerotischen Läsionen von Mensch und Kaninchen isoliertem LDL und zeigt ähnliche Veränderungen wie das in Zellkultur erzeugte modifizierte LDL. *Steinbrecher et al. (1987)* erzeugten in Gegenwart von Kupferionen modifiziertes LDL, das von durch Endothelzellen modifiziertem LDL in seinen physikalischen Eigenschaften, der Zusammensetzung und dem biologischem Verhalten nicht zu unterscheiden war.

Oxidiertes LDL und seine Bestandteile haben, abhängig vom Ausmaß der Oxidation, eine Vielzahl von Auswirkungen auf die an der Atherogenese beteiligte Zellen und deren Funktion (Auswahl in Tab. 1-1).

Tab. 1-1: Atherogene Effekte von oxLDL – Auswahl (*Penn und Chisolm 1994*)

-
- OxLDL wirkt chemotaktisch auf zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten
 - OxLDL wird schnell von Makrophagen aufgenommen und führt dann zur Anreicherung von Cholesterin und zur Schaumzellbildung
 - OxLDL hemmt die Beweglichkeit von Gewebsmakrophagen
 - OxLDL verändert die Genexpression von Zellen und induziert die Bildung von Koloniestimulierende Faktoren, Il-1 und MCP 1 (Monozyten-chemotaktisches Protein)
 - OxLDL ist zytotoxisch
 - OxLDL führt zur Expression von Adhäsionsmolekülen an der Endothelzelloberfläche
 - OxLDL hemmt die endotheliale Gefäßrelaxation
 - OxLDL fördert den Gerinnungsablauf
 - OxLDL ist immunogen und induziert Antikörperbildung
-

Für das Vorhandensein von oxidiertem LDL in atherosklerotischen Läsionen sowohl beim Menschen als auch bei experimentellen Modellen sprechen folgende Tatsachen: aus atherosklerotischem Gewebe isoliertes LDL gleicht in seinen physikalischen, chemischen und immunologischen Eigenschaften dem *in vitro* oxidiertem LDL, und Antikörper gegen oxidiertes LDL zeigen positive Reaktivität in atherosklerotischen Läsionen. Als weiterer Hinweis kann die Reaktion von Autoantikörper aus dem Plasma von Mensch und Tier mit verschiedenen Formen von modifiziertem LDL gewertet werden (*Ylä-Herttuala 1998*). Es spricht vieles dafür, daß LDL-Partikel in der Intima der arteriellen Gefäßwand durch O₂-Metabolite peroxidiert werden, die von Endothelzellen, glatten Muskelzellen sowie aktivierten Makrophagen und Granulozyten frei-

gesetzt werden. Trotzdem sind die eigentlichen *in vivo* Oxidantien und das Ausmaß der oxidativen Modifikation des Lipid- und des Proteinanteils von LDL immer noch zum größten Teil unbekannt. Inzwischen gibt es immer mehr Beweise dafür, daß die intimalen (Lipo-)Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten der Atherogenese unterschiedlichen Oxidantien ausgesetzt sind. Im frühen Stadium der Atherosklerose könnten die oxidativen Veränderungen am Protein durch die Myeloperoxidase ausgelöst werden, später dann durch Hydroxylradikale bzw. Übergangsmetalle. Zur intimalen Lipidperoxidation könnten 15-Lipoxygenase und nicht enzymatische, durch freie Radikale ausgelöste Prozesse beitragen (*Stocker et al. 1998*).

Inwieweit aber modifiziertes LDL im Blutkreislauf vorhanden ist, kann derzeit noch nicht eindeutig beantwortet werden, obwohl in einer neueren Publikation ein positiver Nachweis gelungen war (*Jankowski et al. 1998*). Gegen die Bildung von oxLDL im Plasma sprechen die dort vorhandenen antioxidativen Schutzsysteme, doch ist eine Freisetzung z. B. aus der Gefäßwand denkbar. Dabei ist zu berücksichtigen, daß zirkulierendes oxidiertes LDL von den hepatischen Kupferzellen rasch aufgenommen wird.

1.3 LDL-Oxidation *in vitro*

Ein Modell für die LDL-Oxidationsreaktionen wurde in der *in vitro* Oxidation von isoliertem LDL mit Kupferionen (*Esterbauer et al. 1989*) gefunden. Die je nach Gehalt an Antioxidantien unterschiedlich schnell verlaufende Peroxidationsreaktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu Dienen (Abb. 1-1) kann zur Beurteilung des antioxidativen Potentials von LDL herangezogen werden. Die entstehenden konjugierten Lipidhydroperoxide weisen eine hohe UV-Absorption ($\epsilon = 29.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) auf und können bei 234 nm kontinuierlich im Photometer gemessen werden (Abb. 1-2).

Der zeitliche Verlauf der Oxidation kann in drei Phasen eingeteilt werden:

1. lag-Phase Verbrauch von im Lipoprotein endogen vorhandenen Antioxidantien, wie Vitamin E, β -Carotin, Ubichinon u. a., die die LDL-Partikel vor radikalischen Angriffen schützen

2. Propagations-Phase Beginn der radikalischen Kettenreaktion. Wenn keine Antioxidantien mehr vorhanden sind, kommt es zu einem rapiden Anstieg an Lipidperoxiden = Beginn der Dienproduktion
3. Dekompositions-Phase Weiterreaktion der Peroxide zu Aldehyden und anderen Zersetzungsprodukten u. a. Malondialdehyd, Hexanal und 4-Hydroxynonenal

Bereits während der Propagationsphase beginnen Zerfallsreaktionen, so daß es zu Überschneidungen zwischen diesen beiden Phasen kommt.

Der Reaktionsverlauf, der z. B. durch Messung der Extinktion bei 234 nm erfaßt werden kann, ist weiterhin gekennzeichnet durch die Höhe der maximalen Extinktionsdifferenz und der Steigung der Reaktionskurve. Das Extinktionsmaximum entspricht der Menge der aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstandenen Diene und ist abhängig vom individuellen Gehalt dieser Fettsäuren. Die Steigung der Kurve stellt die Geschwindigkeit der Reaktion dar (Abb. 1-2).

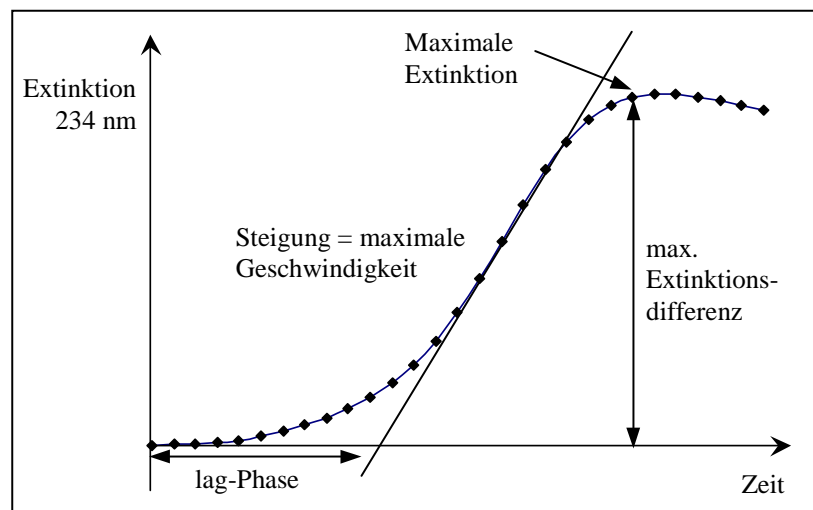


Abb. 1-2: Beispielhafter Kurvenverlauf der Dienentstehung bei der kupfervermittelten LDL-Oxidation im Photometer bei 234 nm: graphische Auswertung von Extinktionsmaximum, maximaler Steigung und lag-Phase

Die Dauer der lag-Phase gibt Information über die Oxidationsempfindlichkeit des LDL. Dabei erklärt der Antioxidantiengehalt des LDL nicht alleine die individuellen Unterschiede in dieser Bestimmungsmethode. Bei der Oxidation spielen weiterhin die

Zusammensetzung der Fettsäuren und die Größe der LDL-Partikel eine Rolle. So sind kleine, dichte LDL-Partikel für die Oxidation anfälliger als große Partikel; einfach ungesättigte Fettsäuren weniger anfällig als mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*Ylä-Herttuala 1998*).

Der Zusatz von Testsubstanzen mit antioxidativen Eigenschaften führt in diesem System zu einer Verlängerung der lag-Phase, über die dann eine Aussage zur antioxidativen Wirksamkeit dieser Substanzen gemacht werden kann. Ebenso eignet sich der Test zur Untersuchung des Einflusses von *in vivo* applizierten Substanzen auf die LDL-Oxidierbarkeit *in vitro*. Zahlreiche Studien haben den Zusammenhang zwischen Einnahme von Antioxidantien und LDL-Oxidation bzw. Entwicklung der Atherosklerose untersucht (*Dieber-Rotheneder et al. 1991 Noguchi et al. 1994, O'Leary et al. 1996*), wobei allerdings auch prooxidative Effekte von Antioxidantien gefunden wurden (*Stait und Leake 1994, Bowry und Stocker 1993*).

Das Modell dient neben der Bestimmung der lag-Phase auch zur Untersuchung der mechanistischen und kinetischen Aspekte der Oxidationsreaktion in LDL. Dabei ist die Oxidation von LDL ein sehr komplexer Prozeß. Sowohl Aminosäurereste im Proteinanteil als auch verschiedene Anteile der Lipide (Cholesterin, ungesättigte Fettsäuren in Phospholipiden, Triglyceriden bzw. in Cholesterinestern) können oxidativ angegriffen werden. Das Ausmaß der Veränderungen in LDL ist im wesentlichen vom Gehalt endogener Antioxidantien, den prooxidativen Bedingungen und von der Einwirkungsdauer dieser Bedingungen abhängig. Deshalb kann man nicht von *dem* „oxidierten LDL“ als einheitlich definiertes Molekül sprechen, sondern muß von einem breiten Spektrum an oxidativ verändertem LDL ausgehen (*Steinberg 1997*). Ob der primäre oxidative Angriffsort in den Lipiden oder eher in den Aminosäureresten zu sehen ist, kann derzeit noch nicht beantwortet werden.

1.4 Freie Radikale, antioxidative Schutzmechanismen und Antioxidative Kapazität

In Geweben führen Radikale zu strukturellen Schäden an einer Vielzahl von Verbindungen wie zum Beispiel an DNA, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden, wobei vor allem die in Tabelle 1-2 enthaltenen reaktiven Sauerstoffverbindungen wichtig sind. Radikale entstehen nicht nur in der Atmungskette der Mitochondrien, sondern auch bei vielen anderen enzymatischen Umsetzungen und im Verlauf der Phagozytose. Weitere exogene Quellen des sogenannten oxidativen Stresses können Zigarettenrauch, diverse toxische Chemikalien, Hitzeschock sowie ultraviolette und ionisierende Strahlung sein. Die unspezifische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Lipoproteinen und Membranen von Zellen, die „Lipidperoxidation“, führt über instabile Fettsäure-Radikale und Umlagerung zu Fettsäurehydroperoxiden, aus denen eine Vielzahl stabiler Abbauprodukte entstehen.

Tab. 1-2: Reaktive Sauerstoffspezies, die Bedeutung für den oxidativen Stress haben (nach Sies 1986)

Spezies	Name	Bemerkung
$O_2^{\cdot-}$	Superoxid-Anion-Radikal	Bei vielen Autooxidationsreaktionen gebildet, durch Superoxid-Dismutase inaktiviert
HOO^{\cdot}	Perhydroxyl-Radikal	Protonierte Form von $O_2^{\cdot-}$, besser lipidlöslich als $O_2^{\cdot-}$
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	Zersetzt durch Katalase
HO^{\cdot}	Hydroxyl-Radikal	Über die Fenton-Reaktion oder die Metall(Eisen)-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion gebildet, sehr reaktiv $t_{1/2}=10^{-9}$ s, initiiert Lipidperoxidation
RO^{\cdot}	Alkoxy-Radikal	Organisches (z. B. Lipid-)Radikal, $t_{1/2}=10^{-6}$ s
ROO^{\cdot}	Peroxy-Radikal	Aus organischem Hydroperoxid ROOH (z. B. Lipid-Hydroperoxid) gebildet, $t_{1/2}=7$ s
1O_2	Singulett-Sauerstoff	Elektronisch angeregter Zustand von Sauerstoff, daher sehr reaktionsfähig, $t_{1/2}=10^{-5}$ s
NO^{\cdot}	Stickstoffmonoxid-Radikal	Gebildet von NO-Synthase, $t_{1/2}: 1 - 10$ s
$ONOO^{\cdot}$	Peroxyinitrit	Gebildet aus NO und $O_2^{\cdot-}$, $t_{1/2}: 0,05 - 1$ s

Die Protektion gegen freie Radikale bzw. oxidativen Streß besteht aus nicht-enzymatischen Abfängern („Scavenger“), den im engeren Sinn gemeinten Antioxidantien, sowie aus enzymatischen Systemen, wie den Enzymen Katalase und Superoxiddismutase, die ausschließlich für die Umsetzung von reaktiven Sauerstoff-Spezies gebildet werden und Glutathion-Peroxidase, die auch z. B. Fettsäurehydroperoxide reduzieren kann. Beide Systeme ergänzen sich gegenseitig. Die Zusammenstellung einiger antioxidativer Schutzsysteme findet sich in Tabelle 1-3.

Tab. 1-3: Antioxidantien in biologischen Systemen (nach Sies 1986 und Halliwell und Gutteridge 1990)

Antioxidans	Bemerkung
<i>Nicht-enzymatisch</i>	
α -Tocopherol (Vitamin E)	Membranständig (Lipidphase), unterbricht Kettenreaktion der Lipidperoxidation, in Wechselwirkung mit Ascorbat und GSH
Ascorbinsäure (Vitamin C)	Wasserlöslich, vor allem extrazellulär, zur Regeneration der lipophilen Antioxidantien nötig
Flavonoide	Pflanzliche Antioxidantien z. B. Rutin, Quercetin
β -Carotin	Singulett-Sauerstoff-Fänger, lipophil
Ubichinon 10	Lipophil, u. a. Radikalfänger
Harnsäure	Hemmt die Lipidperoxidation, Radikal- und Singulett-Sauerstoff-Fänger
Glutathion	Tripeptid mit Sulfhydrylgruppe, 2 GSH oxidieren zu GSSG, reagiert mit H_2O_2 und organischen Peroxiden, Substrat der Glutathion-Peroxidase
Plasmaproteine	(Albumin, Ceruplasmin, Haptoglobin, Transferrin)
Weitere: Bilirubin, Glucose	
<i>enzymatisch</i>	
Superoxid-Dismutase	CuZn-, Mn-, Fe-Enzyme, wandelt $O_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 und O_2 um
GSH-Peroxidasen	Selenoenzym, katalysiert Reaktion von GSH mit Peroxiden
Katalase	Hämenzym, katalysiert Dismutierung von H_2O_2 zu H_2O und O_2
Peroxidasen	

LDL selbst enthält lipidlösliche Antioxidantien wie Ubichinon 10, α -Tocopherol und β -Carotin, die das Lipoprotein vor Lipidperoxidation schützen. Die Regenerierung dieser kettenbeendenden Antioxidantien geschieht *in vivo* im Zusammenspiel mit den

wasserlöslichen Antioxidantien Ascorbinsäure und Harnsäure und ist bei der Bestimmung der Oxidierbarkeit von isoliertem LDL mit Kupferkatalyse nicht möglich. Der isolierte Vorgang, der dieser weitverbreiteten Bestimmungsmethode zu Grunde liegt, trifft daher für den Organismus nur unter Bedingungen eines verstärkten oxidativen Stresses, bei Mangel an wasserlöslichen Antioxidantien oder bei langer Verweildauer von LDL in der Intima zu. Deshalb besteht weiterhin die Frage, inwieweit durch diese Bestimmungsmethode die oxidative Situation an der Gefäßwand *in vivo* dargestellt wird. Es kann davon ausgegangen werden, daß die Konzentrationen vieler Antioxidantien im Extrazellulärraum der Gefäßwand den Konzentrationen im gesamten Blutplasma entsprechen. Die Messung der Antioxidativen Kapazität des Plasmas liefert deshalb weitere Informationen zum oxidativ/antioxidativen-Gleichgewicht, dessen Störung ein Auslöser für die Oxidation von LDL sein könnte.

Die Bestimmung der Antioxidativen Kapazität mit der sogenannte „TRAP“-Methode (total peroxy radical-trapping capability of plasma) liefert Informationen über den Gehalt an Antioxidantien im Plasma, die eine radikalische Kettenreaktion beenden können, ohne daß diese (z. B. Harnsäure, Vitamin C, Vitamin E und SH-Gruppen an Proteinen) einzeln gemessen werden müssen bzw. es werden bisher noch nicht identifizierte Antioxidantien mit erfaßt und das Zusammenspiel verschiedener Antioxidantien wird berücksichtigt (*Wayner et al. 1985*). TRAP gibt an, wieviele Radikale durch Plasma abgefangen werden können bzw. kann durch Vergleich mit der Trolox-Wirkung geeicht werden.

Durch den spontanen Zerfall eines Azoradikalbildners (AAPH) werden in Gegenwart von Sauerstoff kettenreaktionauslösende Peroxylradikale erzeugt (Abb. 1-3, (1a) + (1b)). Freie Radikale können in einem Photonenzähler durch Luminolvermittelte Chemilumineszenz (LEC) gemessen werden (*Metsä-Ketelä 1991*). Bei einer im allgemeinen hohen Additionsrate von Sauerstoff zu Alkylradikalen läuft Reaktion (1b) in Abbildung 1-3 quantitativ ab – „AAPH-Reaktion“. Die direkte Reaktion des Azoradikals mit Luminol ist bei geringer Konzentration an Luminol zu vernachlässigen (*Lissi et al. 1992*).

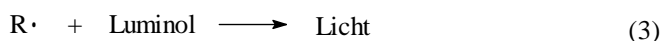
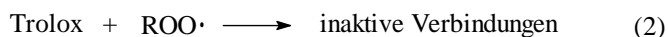
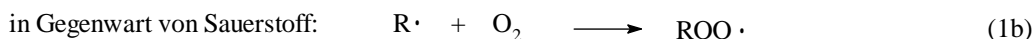
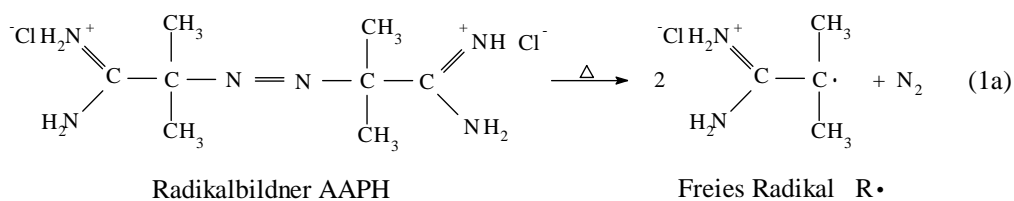


Abb. 1-3: (1a) Zerfallsreaktion von 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH) in zwei kationische freie Radikale
 (1b) Reaktion des Radikals mit Sauerstoff unter Bildung eines Peroxylradikals
 (1a) + (1b): „AAPH-Reaktion“
 (2) Reaktion des Peroxylradikals mit Trolox zu inaktiven Verbindungen
 (3) Reaktion von Radikal mit Luminol unter Abgabe von Licht
 (nach Lissi *et al.* 1992)

Antioxidative Eigenschaften von Testsubstanzen führen zur Unterdrückung der lichterzeugenden Reaktion zwischen Radikal und Luminol. Die Intensität der lichterzeugenden Reaktion steigt wieder an, sobald die radikalabfangende Kapazität des Antioxidans erschöpft ist. Die Dauer dieser Auslöschungsphase ist linear zur radikalabfangenden Kapazität der Probe und kann mit Trolox[®], einem wasserlöslichen Tocopherol, geeicht werden (Abb. 1-3 (2)).

1.5 Zielsetzung

Folgende Fragestellungen lagen der vorliegenden Arbeit zu Grunde:

- ⇒ Können durch gezielte Modifizierungsreaktionen Hinweise gewonnen werden, wo die kupferinduzierte oxidative Modifizierung von LDL zeitlich beginnt, an den Lipiden oder an den Aminosäureresten des Apo B 100?
- ⇒ Inwieweit kann die *in vitro* LDL-Oxidation durch pflanzliche Antioxidantien bzw. aktuelle Herz-Kreislauf-Pharmaka beeinflusst werden, die entweder *in vitro* oder *in vivo* appliziert wurden?
- ⇒ Verändert oxidativer Stress die *in vitro* LDL-Oxidation?
- ⇒ Ergeben sich Befunde für zirkulierendes modifiziertes LDL im Plasma?
- ⇒ Inwiefern spielt die Antioxidative Kapazität bei vaskulären Veränderungen eine Rolle und besteht ein Zusammenhang zur *in vitro* LDL-Oxidierbarkeit z. B. bei Cholesterinfütterung in Kaninchen, bei Ausdauertraining von Sportlern und bei Koronarpatienten?
- ⇒ Inwieweit hat natives und oxidiertes LDL Auswirkungen auf die zelluläre Calcium-homöostase und kann diese mit Angiotensin II und AT-1-Rezeptorblockade moduliert werden?

2 Material

2.1 Geräte

2.1.1 LDL-Isolierung und -Oxidation

Beckman Ultrazentrifuge L7 mit Rotor Ti 70.1	Beckman, Palo Alto, Californien
Quick Seal Centrifuge Tube 16x76mm	Beckman, München
Metallblock-Thermostat DB-3D	thermo-DUX, Wertheim/Main
Spectrophotometer U-2000 mit 6fach Küvettenwechsler, Temperatur Controller und PC-Einheit	Hitachi Tokyo, Japan
Wasserbad mit Thermostat	Colora, Lorch
Halbmikro-Küvetten	Sarstedt, Nürnberg

2.1.2 Antioxidative Kapazität

Berthold Biolumat LB 9500	Berthold, Wildbad
Kompaktschreiber SE 120	ABB Goerz AG, Wien, Austria
Digitalaufzeichnungseinheit PC mit AD-Wandler-Karte und Tintenstrahldrucker	

2.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
ICCD-Kamera mit IC-100 Controller	Photon Technology International Inc., U.S.A.
Optical Filter Changer Lambda 10-2 mit Filterradeneinheit und Steuergerät	Satter Instrument Co., U.S.A.
PC-Einheit mit Photokarte und Drucker	Pacomp und Hewlett Packard
Software Axon Imaging Workbench 2	Axon Instr. Inc., Foster City, U.S.A
Quecksilberdampfламpe	Zeiss, Oberkochen
Rollerpumpe	Desaga, Heidelberg
Absaugpumpe	Wisa
Thermostat	Julabo, Seelbach
Zellkulturplatten	Greiner, Solingen
Deckgläser	

2.1.4 Sonstige verwendete Geräte

Beckman Microfuge E TM	Beckman, Palo Alto, Californien
Digital pH-Meter 646	Knick, Berlin
Hettich EBA 3S Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Inkubationsschrank	
Magnetrührer mit Heizung	Ikmag-Ret, Staufen i. Br.
Photometer PM Q2	Zeiss, Oberkochen
Vortex-Genie	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Folgende Substanzen wurden von Sigma, Deisenhofen bezogen:

Angiotensin II, Butylhydroxytoluol (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol BHT), 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH), Fluorescamin, Homocystein, Lysin, Methansulfonsäure, Natriumbromid (NaBr), Natriumlaurylsulfat (Sodium dodecyl sulfate SDS), N-methyl-2-Phenylindole, Nordihydroguarsäure (NDHGA), Picrylsulfonsäure (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonicacid TNBS), Rinderserumalbumin (BSA), 1,1,3,3-Tetramethoxypropan, Thiobarbitursäure (TBA), Apigenin, Apigenin-7-glucosid, Luteolin, Luteolin-7-glucosid, Quercetin Dihydrat, Rutin Trihydrat und Vitexin-2-o-rhamnosid.

Trolox[®] (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) war von Aldrich, Steinheim, Fura-2-Acetoxymethylester und Ionomycin wurden von Molecular Probes, Oregon, U.S.A. bezogen. Der Cholesterin-Test CHOL, reduziertes Glutathion, Carvedilol und der Carvedilol-Metabolit BM 91.0228 stammten von Boehringer Mannheim, Mannheim. Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan (TRIS) wurde von Paesel+Lorei, Frankfurt und Ethylendiamintetraessigsäure Di-natrium-Calcium Salz (EDTA) wurde von Fluka, Buchs, Schweiz bezogen.

Der Azoradikalbildner V-50 (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)-dihydrochloride AAPH) der Firma Wako Chemicals, Neuss wurde vom Arbeitskreis Prof. Bayer, Organische Chemie I, der Crataegus-Extrakt von der Firma Lichtwer, Berlin und Valsartan wurde von Novartis, Nürnberg zur Verfügung gestellt. Die Antioxidantien U-74389G, U-74500A und U-83836E stammten von Pharmacia & Upjohn, Inc., U.S.A. Fluvastatinatrium war von Sandoz Pharma, Basel und Losartan, Simvastatin und Lovastatin von MSD, Haar. Metoprololtartrat stammte von Astra, Wedel.

Die übrigen verwendeten Chemikalien waren Produkte der Firma Merck oder Serva bzw. stammten von Roth, Karlsruhe und wurden in den höchsten Reinheitsstufen bezogen.

Die Sephadex Säulen Sephadex Column PD-10 (Sephadex G-25 M) und Sephadex NAPTM 10 Column (Sephadex G-25 Medium of DNA Grade) wurden von Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen, die Blutabnehmeröhrchen Monovette[®], EDTA KE 9ml und Serum 9ml, stammten von Sarstedt, Nürnbrecht. Der Elektrophorese-Kit Hydragel + Lp(a) und die entsprechende Kammer waren von Sebia, Fulda.

2.3 Lösungen

2.3.1 Puffer- und Substratlösungen

Isotonische Kochsalzlösung:	0,145 M NaCl-Lösung (0,9g/100 ml)
TRIS-Puffer pH 7,4:	10 mM Tris in 0,9%iger NaCl-Lösung, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt
Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS pH 7,4):	8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,74 mM KH_2PO_4 0,14 M NaCl 2,7 mM KCl mit HCl auf pH 7,4 eingestellt
Phosphatpuffer pH 8,5:	0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf pH 8,5 eingestellt
Calcium-freier Ringer:	145 mM NaCl 10 mM Hepes 5 mM KCl 1 mM MgCl_2 10 mM Glucose mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
Calcium-Ringer:	Calcium-freier Ringer mit Zusatz von 2 mM CaCl_2

2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry (modifiziert nach *Markwell et al. 1981*)

Lösung A:	2 % Na_2CO_3 0,2 % KNaTartrat 0,1 % Natriumlaurylsulfat (SDS) in 0,1 N NaOH
Lösung B:	4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
Lösung C:	100 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B
Lösung D:	Folin-Ciocalteus Phenolreagenz 1:1 verdünnt mit H_2O

3 Methoden

3.1 Isolierung und Modifizierung von LDL

3.1.1 Isolierung von LDL

Als Ausgangsmaterial diente frisches, mit 9 ml EDTA-Monovetten abgenommenes humanes Blut bzw. Blut von Kaninchen, das über 5 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurde. Das Plasma wurde abpipettiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder mit Saccharose (Endkonzentration 0,6 %) stabilisiert (*persönliche Mitteilung von Prof. Leonhardt, Dresden*) und bei -70°C eingefroren.

In 3 ml EDTA-Plasma wurden 1,638 g Natriumbromid vorsichtig aufgelöst, in ein 13,5 ml Zentrifugenröhrchen (Beckman) überführt und bis zum oberen Rand mit einer 0,9prozentigen Kochsalzlösung überschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen verschweißt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Ultrazentrifuge (Beckman Ultrazentrifuge L7) mit Festwinkelrotor (Beckman, Ti 70.1-Rotor) bei 15°C und mit einer Geschwindigkeit von 65000 U/min über eine Zeit von 9 Stunden.

Die nach der Zentrifugation im oberen Drittel der Zentrifugenröhrchen gut sichtbare gelb- bis orangefarbene Bande enthält ca. 95 % LDL. Die Dichte dieser Bande lag zwischen 1,022 und 1,047 g/ml. Die Bande wurde mit Hilfe einer Spritze abgezogen (etwa 1 ml) und über eine Sephadex G-25-Säule (Pharmacia) von noch vorhandenem EDTA und Natriumbromid abgetrennt. Dazu wurde zuerst die Säule 3 x mit je 1 ml TRIS-Puffer (10 mM in 0,9prozentiger Kochsalzlösung pH 7,4) gespült und anschließend 1 ml des isolierten LDL aufgetragen. Danach folgte 0,5 ml TRIS-Puffer und ein weiterer Milliliter desselben Puffers um die LDL-Fraktion zu eluieren. Zur Aufbewahrung der Säulen wurden diese erneut mit 3 x je 1 ml TRIS-Puffer und 1 ml Natriumazidlösung (0,1 % in TRIS-Puffer) gespült. Damit die Säulen nicht trocken fielen, erfolgte die Aufbewahrung im Kühlschrank in Natriumazidlösung. Die Säulen wurden 6-8 mal verwendet (*Gugeler 1997*).

In Versuchen, bei deren Durchführung TRIS-Puffer nicht zu verwenden war (z. B. bei der Bestimmung von Aminogruppen), diente PBS pH 7,4 als Ersatzmedium.

Das isolierte LDL wurde in der Regel sofort weiter verwendet oder für kurze Zeit bei 4°C zwischengelagert.

Um die LDL-Konzentration des gereinigten Konzentrates zu bestimmen, wurde eine Cholesterinbestimmung mit dem Cholesterin-Monotest (Boehringer-Mannheim) nach der CHOD-PAD-Methode durchgeführt. Mit dieser Methode werden das freie Cholesterin und die Cholesterinester bestimmt. Die Messung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm gegen einen Standard (2 mg/ml Cholesterin).

3.1.2 Oxidative Modifizierung

3.1.2.1 Bestimmung der Oxidierbarkeit von LDL über Dienbildung

Zur Oxidation von LDL wurde Lösung entsprechend 50 µg Protein aus 3.1.1 eingesetzt. Als Katalysator für die Oxidation dienten in allen Versuchen 10 µl einer 1 mM CuSO₄-Stammlösung (10 µM Endkonzentration). Das Gesamtvolumen wurde mit TRIS-Puffer auf 1 ml gebracht. Die Proben wurden gut durchlüftet und bei 37°C in einem Hitachi Spectrometer U2000 mit sechsfach Küvettenwechsler bei 234 nm über den gesamten Meßzeitraum in Zeitabständen von 5 Minuten gemessen (*Esterbauer et al. 1989*).

Die Bestimmung der lag-Phase erfolgte durch graphische Auswertung der in Microsoft Excel erhaltenen Kurven. Dazu wurde die Tangente im Bereich der größten Steigung (= maximale Geschwindigkeit) an die bei Null beginnende Kurve gelegt. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Zeit-Achse stellt die ermittelte lag-Phase dar.

Bei Versuchen, bei denen die antioxidative Wirkung von Substanzen getestet und verglichen werden sollte, wurde die lag-Phase der Kontrolle, d. h. des unbeeinflussten Oxidationsansatzes 100 % gesetzt und die Werte der Ansätze mit zugesetzten Antioxidantien darauf bezogen. Dadurch wurden die interindividuellen Streuungen vermindert, die sich zwangsläufig ergaben, da nicht immer Plasma vom selben Spender zur Verfügung stand und auch bei demselben Spender Tagesschwankungen festgestellt wurden. Deshalb wurde für Versuche, die nicht die individuelle Oxidierbarkeit feststellen sollten, möglichst gepooltes, mit Saccharose (0,6 g/100 ml) stabilisiertes und bei -70°C gelagertes EDTA-Plasma verwendet.

3.1.2.2 Bestimmung freier Aminogruppen mit TNBS und Fluorescamin

Zur weiteren Charakterisierung des kupferinduzierten LDL-Oxidationsprozesses wurden die Änderungen der freien Aminogruppen quantitativ bestimmt.

Die LDL-Oxidation erfolgte hierbei mit 150 $\mu\text{mol Cu}^{2+}$ pro g Protein. Die Proben wurden gut belüftet und bei 37°C inkubiert.

Der Verlauf der Oxidation wurde durch Dienbestimmung zu festgelegten Zeitpunkten kontrolliert. Dazu wurde das 50 μg Protein entsprechende Volumen der LDL-Lösung mit PBS pH 7,4 auf 1 ml ergänzt und die Extinktion bei 234 nm gemessen. Anschließend beendete die Zugabe von jeweils 5 μl 2 mM Butylhydroxytoluol (BHT) und 2 mM EDTA den Oxidationsprozeß. Die Proben wurden bei 4°C maximal einen halben Tag für folgende Bestimmungen gelagert:

a) Bestimmung freier Aminogruppen mit 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)

Hierfür wurden jeweils 500 μl der LDL-Lösung aus der Dienbestimmung verwendet, mit derselben Menge einer 4prozentigen NaHCO_3 -Lösung pH 8,4 verdünnt und mit 25 μl einer 0,1prozentigen TNBS-Lösung bei 37°C inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte nach einer Stunde bei 340 nm (*Habeeb 1966, Steinbrecher et al. 1987*).

b) Bestimmung freier Aminogruppen mit Fluorescamin

Fluorescamin, das in Aceton gelöst eine stabile und nicht fluoreszierende Verbindung ist, reagiert mit freien Aminogruppen sehr schnell zu einem stark fluoreszierenden Produkt. Nicht gebundenes Fluorescamin wird in Wasser sofort hydrolysiert und zeigt keine Fluoreszenz mehr.

200 μl der LDL-Lösung aus der Dienbestimmung wurden mit 600 μl 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8,5 gemischt. 2 Minuten nach Zugabe von 5 μl Fluorescaminlösung (5 mg/ml Aceton, eisgekühlt) wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt (Anregungswellenlänge 405 nm, Emission 470 nm) (*Koksich et al. 1992, Böhlen et al. 1973*).

Bei beiden Bestimmungsmethoden wurde bei jedem Versuchsansatz eine Eichkurve mit Lysin aufgestellt.

Die Proteinbestimmung wurde entsprechend Kapitel 3.3 mit 200 μl LDL-Lösung aus der Dienbestimmung durchgeführt.

3.1.2.3 Carbonylgruppenbestimmung

Die Zunahme der Carbonylgruppen während des Oxidationsprozesses (*Levine et al. 1990*) wurde nach der Methode von *Hazell et al. 1994* bestimmt. Dabei reagieren Carbonylgruppen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu 2,4-Dinitrophenylhydrazonen, die photometrisch erfaßt werden können.

Die Analyse wurde mit je 50 μl des in Kapitel 3.1.2.2 beschriebenen Oxidationsansatzes durchgeführt. Diese 50 μl wurden mit 150 μl PBS pH 7,4 verdünnt, je 5 μl BHT (2 mM) und EDTA (2 mM) zugegeben und mit 200 μl 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)-Lösung (1 mM in 1 M Salzsäure) 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Proben wurden abgekühlt und mit 600 μl Natronlauge (1 M) gut gemischt. Die photometrische Messung erfolgte bei 450 nm ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Drei Ansätze wurden nach der Inkubation mit 400 μl einer 0,6 normalen Perchlorsäure versetzt und zur Proteinausfällung 10 Minuten auf Eis gekühlt. Nach der Zentrifugation wurde dem Überstand 200 μl einer 5 normalen Natronlauge zugefügt und photometrisch vermessen. Der Niederschlag wurde in 200 μl PBS pH 7,4 gelöst, anschließend nacheinander 600 μl 1 N Natronlauge und 200 μl 1 M Salzsäure zugegeben und die Extinktion bei 450 nm bestimmt.

3.1.2.4 Gehalt an mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (TBARS)

Bei der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren entstehen über Zwischenstufen wie den Hydroperoxiden Aldehyde, vor allem Malondialdehyd (MDA), Hexanal und 4-Hydroxynonenal. MDA bildet mit Thiobarbitursäure einen Komplex, der photometrisch gemessen werden kann und als MDA-Gehalt angegeben wird.

LDL bzw. Reaktionsansätze wurden mit je 5 μl BHT (2 mM) und EDTA (2 mM) versetzt und mit PBS pH 7,4 zu 2 ml ergänzt. Nach Zugabe von 500 μl einer

1prozentigen H_3PO_4 -Lösung wurden die Proben mit 200 μl einer 0,6prozentigen Thiobarbitursäure-Lösung für 60 Minuten bei 100°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Der während der Inkubationszeit entstandene rote Farbstoff wurde in 1 ml Butanol ausgeschüttelt und die organische Phase durch Zentrifugation (5 Minuten mit Beckmann Mikrofuge E) von der wässrigen Phase abgetrennt. Die photometrische Messung erfolgte bei zwei Wellenlängen $E_1 = 535 \text{ nm}$ und $E_2 = 520 \text{ nm}$. Die Differenz von E_1 und E_2 diente zur Auswertung mittels einer Eichkurve, die zu jedem Versuch mit Malondialdehyd aufgestellt wurde (*Heinle und Liebich 1980*).

3.1.2.5 Veränderungen von LDL in der elektrophoretischen Mobilität

Durch die Oxidation von LDL wird, wie oben erwähnt, der Proteinanteil so modifiziert, daß das Molekül zunehmend negativer wird, die anionische elektrophoretische Mobilität steigt. Diese Veränderung läßt sich in der Agarose-Gelelektrophorese nachweisen (*Esterbauer et al. 1989*).

Dazu wurde der Elektrophorese-Kit Hydragel + Lp(a) der Firma Sebia verwendet:

- 2 μl der Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert
- 10 Minuten Wartezeit zur Diffusion der Probelösung ins Gel
- die Elektrophorese wurde in der dazugehörenden Kammer über 70 Minuten bei einer Spannung von 70 V in Tris-Barbital-Puffer durchgeführt
- anschließend wurde das Gel getrocknet und mit einer Sudanschwarzfärbung 15 Minuten lang gefärbt, mit 45prozentigem Ethanol 5 Minuten entfärbt und gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend wurde das Gel erneut getrocknet.

Gemessen wurden die Laufstrecken der Proben, die als relative Laufstrecke zu nativem LDL angegeben wurden.

Vor der Elektrophorese wurde LDL nach 3.1.2.1 oxidiert, danach mit je 20 μM EDTA und BHT bis zu weiteren Verwendung aufbewahrt. Der Extinktionverlauf bei 234 nm diente als Kontrolle für die Oxidation. Da dadurch die Proteinkonzentration für eine sichtbare Bande im Elektrogramm zu gering war, wurden die Proben

aufkonzentriert. Dazu wurde die Lösung eingefroren. Das Wasser gefror zuerst und das zurückbleibende Konzentrat wurde für die Elektrophorese verwendet.

Ergänzend dazu wurden zwei Proben mit 0,5 M Acetanhydrid versetzt, um das so modifizierte LDL mit kupferoxidiertem LDL vergleichen zu können.

3.2 Bestimmung freier Aminogruppen in LDL durch Fluorescamin-Titration im Plasma

Analog zu 3.1.2.2 wurde die Reaktion von Fluorescamin auf freie Aminogruppen in LDL auch direkt im Plasma durchgeführt. Um einen Überschuß an Fluorescamin zu gewährleisten, wurden vorher niedermolekulare Bestandteile des Plasmas über eine Sephadex[®]G-25-Säule PD-10 (Pharmacia) abgetrennt. PBS pH 7,4 wurde zum Spülen der Säulen und zum Eluieren der Proben verwendet. Zum so behandelten Plasma wurde bis zu 2,7 mg Fluorescamin (1 mg/10µl Aceton) pro ml Plasma portionsweise zupipettiert und gut vermischt. Stand weniger als 3 ml Plasma zur Verfügung wurde entsprechend mit 0,9prozentiger NaCl-Lösung ergänzt. In dieser leuchtend gelben Lösung wurden dann 1,638 g Natriumbromid aufgelöst und LDL entsprechend 3.1.1 durch Ultrazentrifugation isoliert. Die Dichte der so erhaltenen deutlich gelben LDL-Bande lag zwischen 1,006 und 1,038. Das LDL wurde analog 3.1.1 gereinigt und der Cholesteringehalt mit dem Cholesterin-Monotest bestimmt.

Zur fluorimetrischen Bestimmung wurde LDL entsprechend 50 µg Protein mit 0,1 mM NaHPO₄ pH 8,5 auf 900 µl gebracht und bei 470 nm gemessen (Anregungswellenlänge 405 nm). Der erhaltene Wert wurde auf den Cholesteringehalt der jeweiligen Probe bezogen.

Die Bestimmung der Aminogruppen in LDL wurde zunächst mit Plasma von Einzelpersonen bzw. fünf Patienten und fünf Gesunden durchgeführt, zu einem späteren Zeitpunkt aber mit Plasma einer größeren Anzahl Koronarpatienten bzw. Gesunder wiederholt (3.7.2)

3.3 Proteinbestimmung (nach Lowry)

250 μl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 750 μl der in 2.3.2 beschriebenen „Lösung C“ 15 Minuten inkubiert. Danach wurden 75 μl „Lösung D“ zugegeben, gut gemischt und weitere 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 660 nm gegen einen Leerwert. Zur Bestimmung der Proteinmenge diente eine bei jedem Versuchsansatz mitgeführte Eichreihe aus Rinderserumalbumin (*Lowry et al. 1951, Markwell et al. 1981*).

Für die Proteinbestimmung des isolierten LDL wurden 20 μl der nach 3.1.1 erhaltenen Lösung mit 230 μl PBS pH 7,4 verdünnt.

Zur Proteinbestimmung in Plasma wurden 10 μl mit 990 μl PBS pH 7,4 verdünnt. Davon wurden 20 μl mit 200 μl einer 0,6 normalen Perchlorsäure versetzt und 10 Minuten im Eisbad zur Proteinausfällung gekühlt. Nach der Zentrifugation (Beckman Mikrofuge E) über 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag in 250 μl PBS pH 7,4 bei 37°C innerhalb 10 Minuten gelöst. Dieser Ansatz diente zur Bestimmung des Proteingehaltes.

3.4 Messung der Antioxidativen Kapazität durch die „AAPH-Reaktion“

Die Bestimmung der Antioxidativen Kapazität wurde mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Messung durchgeführt. Durch den spontanen Zerfall eines Azoradikalbildners, „AAPH-Reaktion“, entstehen Peroxylradikale, die von antioxidativ wirkenden Plasmabestandteilen bzw. anderen Testsubstanzen abgefangen werden. Ist diese Kapazität der Probe erschöpft, tritt wieder durch die freien Radikale Luminol-vermittelt Chemilumineszenz auf. Die Bestimmung der Antioxidativen Kapazität des Plasmas wird als „TRAP“ (= Total peroxy radical-trapping capability of plasma) abgekürzt.

Die Reaktion wurde in einem Biolumat LB 9500 (Berthold) durch Zugabe von 50 μl 100 mM bzw. 40 mM AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)di-hydrochloride) zu 450 μl PBS pH 7,4 und 5 μl Luminol (2 mg/ml DMSO; Endkonzentration 0,2 mM) bei 37°C gestartet. Nach 15 Minuten war eine konstante Radikalbildungsrate erreicht, und

10 μ l Testlösung bzw. EDTA-Plasma wurden zupipettiert, gut gemischt und unverzüglich weiter gemessen (*Metsä-Ketelä 1991, Lissi et al. 1992*). EDTA-Plasma führte zu den mit Serum nahezu identischen Ergebnissen. Demnach hatte EDTA keinen Einfluß auf die AAPH-Reaktion.

Neben humanem Plasma, Plasma von Neuseeland-Kaninchen (unverdünnt je 10 μ l) und nativem bzw. oxidiertem LDL (je 20 μ l nach 3.1.2.2) wurden die in Tabelle 3-1 aufgeführten Substanzen in der AAPH-Reaktion getestet. Dabei lagen die eingesetzten Konzentrationen zwischen 0,2 und 40 μ M.

Tab. 3-1: Substanzen, deren Einfluß auf die AAPH-Reaktion getestet wurde

Antioxidans	Lösungsmittel der Stammlösung
Trolox	100 mM Methanol, weitere Verdünnungen mit H ₂ O
Vitamin C	H ₂ O
Homocystein	H ₂ O
Glutathion	H ₂ O
Nordihydroguarsäure	10 mM DMSO, weitere Verdünnungen mit H ₂ O

(Methanol und DMSO hatten in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Reaktion)

Der Ablauf der Reaktion wurde kontinuierlich mit angeschlossenem Schreiber (Metawatt SE 120) registriert bzw. später parallel dazu, als ein PC zur Verfügung stand, die Photonenzahl alle 5 Sekunden an diesen ausgegeben und anschließend graphisch dargestellt. Die Intensität der lichterzeugenden Reaktion wurde am Schreiber in *mV* abgelesen. Bei Messungen, deren Registrierung mittels PC erfolgte, wurden die Intensitäten über Vergleichsaufzeichnungen am Schreiber in *mV* umgerechnet. Die Dauer der Lichtsignalunterdrückung ist ein Maß für die radikalabfangende Kapazität der Probe.

Bei der Auswertung der Reaktionsverläufe lassen sich zwei Arten von Antioxidationswirkung unterscheiden:

- ⇒ Typ I, Antioxidantien, bei denen die Intensität der lichterzeugenden Reaktion nach der Auslöschungsphase wieder das Niveau der Intensität vor Zugabe der Probe erreichte (Abb. 3-1). Hier erfolgte die Bestimmung der Dauer der Lichtsignalunterdrückung auf Höhe der Ausgangsintensität.

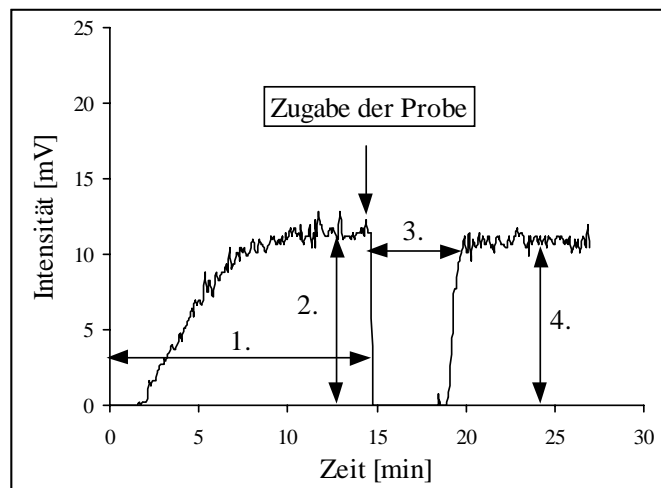


Abb. 3-1: Reaktionsverlauf Typ I der AAPH-Reaktion bei Zugabe von z. B. Trolox® (Chemilumineszenzmessung)

1. Vorlauf bis eine konstante Radikalbildungsrate erreicht ist (15 min)
2. Intensität der Radikalproduktion vor Zugabe der Probe (Ausgangsintensität)
3. Dauer der Lichtsignalunterdrückung
4. Intensität der Radikalproduktion nach der Auslöschungphase durch die Probe

⇒ Typ II, Antioxidantien, bei denen die Intensität der lichterzeugenden Reaktion nach der Auslöschungphase um ein Vielfaches über die Intensität vor Zugabe der Probe hinaus anstieg (Abb. 3-2). Hier erfolgte die Bestimmung der Dauer der Auslöschungphase auf Höhe der Intensität von 40 mV.

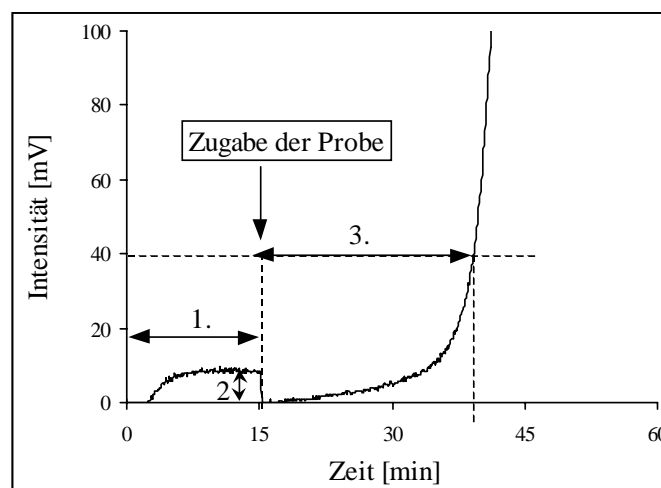


Abb. 3-2: Reaktionsverlauf Typ II der AAPH-Reaktion bei Zugabe von z. B. Plasma (Chemilumineszenzmessung)

1. Vorlauf bis eine konstante Radikalbildungsrate erreicht ist (15 min)
2. Intensität der Radikalproduktion vor Zugabe der Probe (Ausgangsintensität)
3. Dauer der Lichtsignalunterdrückung nach dem Auswertungsverfahren II für Antioxidantien, bei denen die Intensität nach der Auslöschungphase über die Anfangsintensität hinaus anstieg

Die Dauer der Auslöschungsphase wurde in diesem Fall nicht auf Höhe der Ausgangsintensität ermittelt, da dadurch in manchen Fällen nur ein sehr kurzer Zeitraum der Auslöschungs- und Anstiegsphase erfaßt worden wäre. Aus der Anfangsphase konnte aber nicht auf den weiteren Verlauf der Kurven geschlossen werden, da die Kurven verschiedener Proben gerade in der Anfangsphase einen unterschiedlich schnellen Anstieg zeigten. Es konnte deshalb durchaus sein, daß anfänglich unterschiedliche Kurvenverläufe sich später einander annäherten bzw. anfänglich ähnliche Kurven später auseinander liefen. Zur graphischen Auswertung wurde die Höhe von 40 mV festgelegt, da der weitere Intensitätsanstieg dann in der Regel mit konstanter Steigung erfolgte.

Der gesamte Kurvenverlauf war auf dem zunächst allein zur Verfügung stehenden Schreiber bei einem Maximalausschlag von 100 mV nicht sichtbar. Erst als ein PC für die Aufzeichnungen zur Verfügung stand, konnten die gesamten Kurvenverläufe dargestellt werden und die Maxima der Proben-Anstiegsphase sichtbar gemacht werden. Das graphische Auswertungsverfahren wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit beibehalten.

Die Berechnung der Antioxidativen Kapazität $TRAP_{Probe}$ wurde mittels einer Trolox[®]-Eichkurve durchgeführt. Aus dem Volumen der eingesetzten Probe und der Tatsache, daß Trolox[®] pro Molekül ebenso wie andere phenolische Antioxidantien zwei Radikale abfangen kann (*Wayner et al. 1985, Esterbauer und Jürgens 1993*), wurde die Antioxidative Kapazität in $\mu\text{mol/l}$ berechnet. Aus zeitlichen Gründen wurde bei größeren Versuchsreihen an jedem Versuchstag mehrere Einzelmessungen über den Tag verteilt mit $2 \mu\text{M}$ Trolox[®] durchgeführt und die Ergebnisse der Proben auf deren Mittelwert bezogen.

3.5 Einfluß verschiedener Pharmaka auf die *in vitro* Oxidation von LDL

3.5.1 Allopathische Wirkstoffe (CSE-Hemmer, β -Blocker usw.)

Die LDL-Oxidation und Bestimmung der lag-Phase wurde nach 3.1.2.1 in Gegenwart der in Tabelle 3-2 aufgeführten Substanzen durchgeführt.

Tab. 3-2: Substanzen, deren Einfluß auf die lag-Phase der kupferinduzierten LDL-Oxidation getestet wurde

Pharmka bzw. Derivat	Lösungsmittel der Stammlösung
U-74500A	10 mM HCl
U-74389G	10 mM HCl
U-83836E	H ₂ O
Metoprolol	H ₂ O
Carvedilol	DMSO/H ₂ O/HAc
Carvedilol-Metabolit BM91.0228	DMSO/H ₂ O/HAc
Fluvastatinnatrium	H ₂ O
Simvastatin	DMSO/H ₂ O/NaOH
Lovastatin	DMSO/H ₂ O/NaOH
Lovastatin (offen)	Lactonöffnung von Lovastatin nach <i>Jakóbisiak et al. (1991)</i>
Losartan	H ₂ O

Die Substanzen wurden in Konzentrationen zwischen 0,01 μ M und 10 μ M eingesetzt. Das verwendete LDL stammte von verschiedenen Spendern, so daß die lag-Phase der jeweiligen Kontrollmessung ohne Substanzzusatz zu 100% gesetzt wurde.

3.5.2 Pflanzliche Wirkstoffe

Für die Untersuchung pflanzlicher Wirkstoffe wurde LDL aus gepooltem EDTA-Plasma gesunder, männlicher Probanden gewonnen, das mit Saccharose (0,6 %) stabilisiert bei -70 °C gelagert worden war. Folgende Flavonoide kamen in methanolischer Lösung in Konzentrationen von 0,05 bis 1 μ M zum Einsatz:

- Apigenin-7-glucosid
- Apigenin
- Luteolin
- Luteolin-7-glucosid
- Quercetin Dihydrat
- Rutin Trihydrat
- Vitexin-2-o-rhamnosid

Als Beispiel einer therapeutisch eingesetztem Flavonoid-Mischung wurde ein auf 2,03% Flavonoide standardisierter methanolischer Crataegus-Extrakt verwendet. Zur Berechnung der Konzentration des Crataegus-Extraktes in μM wurde als mittleres Molekulargewicht 430 angenommen. Inhaltsstoffe von Crataegus sind u. a. Rutin, Vitexin, Vitexinrhamnosid, Luteolin-7-O-glucosid und Hyperosid.

3.6 *In vivo* Beeinflussung der LDL-Oxidierbarkeit im Tiermodell

In der Atherosklerose-Forschung werden häufig zwei durch zahlreiche Publikationen belegte Kaninchen-Modelle verwendet, in denen Auslösung und Entwicklung atherosklerotischer Läsionen, Plaquebildung und damit auch antiatherogene Wirkstoffe untersucht werden können:

- Watanabe-Kaninchen (WHHL) entwickeln eine genetisch bedingte Hypercholesterinämie, da der LDL-Spiegel auf Grund fehlender LDL-Rezeptoren erhöht ist.
- Bei Weißen Neuseeland-Kaninchen (NZW) entsteht unter cholesterinreicher Fütterung ein erhöhter VLDL-Spiegel, der zur Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen führt.

3.6.1 Applikation von Antioxidantien und Carvedilol in WHHL-Kaninchen

An insgesamt 60 Watanabe-Kaninchen wurde der Einfluß von Carvedilol und verschiedenen Antioxidantien auf die *in vitro* Oxidation von LDL untersucht. Die Tierhaltung, Applikation der Substanzen und Gewinnung des Plasmas erfolgte am Universitätsklinikum Hamburg (Labor Prof. Beisiegel). Die über ein Jahr lang der Standarddiät (Altromin, Lage) beigefügten Substanzen, deren Dosierung bezogen auf die therapeutische Dosierung beim Menschen, und die Zusammensetzung der sechs Gruppen findet sich in Tabelle 3-3. Zu Beginn der Studie waren die Tiere 3 Monate alt.

Tab. 3-3: Zusammenstellung der Gruppen mit WHHL-Kaninchen

Gruppen- nummer	Fütterung		Anzahl der Tiere	davon	
	Substanz	Dosierung		w	m
1	—	Kontrollgruppe	n=10	5	5
2	DL- α -Tocopherol	4,3 mg / kg Körpergewicht / Tag	n=10	5	5
3	Ubichinon-10	4,3 mg / kg Körpergewicht / Tag	n=10	5	5
4	Probucol	15 mg / kg Körpergewicht / Tag	n=10	5	5
5	Carvedilol 1	25 mg / Tag	n=10	4	6
6	Carvedilol 2	75 mg / Tag	n=8	4	4

Nach Versuchsende wurde EDTA-Plasma gewonnen, mit Saccharose stabilisiert (Endkonzentration 0,6 %), schockgefroren und bei -70°C gelagert. Aus diesen Proben erfolgte die LDL-Isolierung mit anschließender Bestimmung der LDL-Oxidierbarkeit durch kupferinduzierte Dienbildung (3.1.1 und 3.1.2.1).

Dieser Versuch wurde mit insgesamt 20 weiteren männlichen Watanabe-Kaninchen wiederholt, wobei 9 Tiere auf die Kontrollgruppe entfielen und 11 Tiere Carvedilol (25 mg / Tag) erhielten.

3.6.2 Fütterungsinduzierte Hypercholesterinämie in Neuseeland-Kaninchen

Diese Untersuchung wurde als Induktions- / Regressionsstudie an insgesamt 65 männlichen Weißen Neuseeland-Kaninchen durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte bei der Firma Steigerwald in Darmstadt.

Während der Induktionsphase der Hypercholesterinämie bekamen 55 Kaninchen sechs Wochen lang eine Cholesterindiät (2 %). Anschließend wurde den Tieren bis zu weiteren 34 Wochen Standarddiät (Altromin International, Lage) gefüttert (Regressionsphase). Nach Abschluß der Induktionsphase wurden die Tiere random in fünf Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe von 15 Tieren wurde unmittelbar (Zeitpunkt 6. Woche), die weiteren Gruppen mit je zehn Tieren nach verschiedenen langen Zeitabständen (14., 21., 29. und 40. Woche) getötet und den weiterführenden morphologischen und funktionellen Untersuchungen zugeführt. Als Kontrollgruppe (0. Woche) dienten 10 Tiere, die Normalfutter erhielten. Die Zusammenstellung der Tiergruppen ist in Tabelle 3-4 dargestellt.

Das Plasma wurde bei Versuchsende gewonnen und umgehend bis zur Bestimmung der Antioxidativen Kapazität nach 3.4 gut gekühlt. Außerdem wurden folgende Parameter in Zusammenarbeit mit dem analytischen Labor der Firma Steigerwald, Darmstadt, bestimmt: Gesamtplasmacholesterin, Gesamtplasmaprotein und LDL-Oxidierbarkeit (Cu-induzierte Dienbildung).

Tab. 3-4: Zusammenstellung der Gruppen mit Neuseeland-Kaninchen

Gruppen- nummer	Fütterung		Versuchsdauer [Wochen]	Anzahl der Tiere
	Cholesterindiät (2%)	anschließend Standarddiät		
1	—	Kontrollgruppe	0	n=10
2	6 Wochen	—	6	n=15
3	6 Wochen	8 Wochen	14	n=10
4	6 Wochen	15 Wochen	21	n=10
5	6 Wochen	23 Wochen	29	n=10
6	6 Wochen	34 Wochen	40	n=10

3.7 Beeinflussung der LDL-Oxidierbarkeit und Parameter des oxidativen Stresses beim Menschen

3.7.1 Effekt von Akutbelastung und Ausdauertraining

16 Freiwillige (11 weiblich und 5 männlich) nahmen unter der Regie der sportmedizinischen Abteilung des Universitätsklinikums an einem 8wöchigen Ausdauertraining teil. Die Eingangsuntersuchung bestand u. a. aus einer stufenförmigen erschöpfenden Laufbandspiroergometrie (Anfangsgeschwindigkeit: 4 km/h, Steigung 5 % und Stufendauer 3 min). Vor deren Durchführung (in Ruhe), unmittelbar danach und 15 Minuten nach Ende der Belastung auf dem Laufband wurde Blut für die weiteren Untersuchungen entnommen (Tab. 3-5). In den folgenden acht Wochen fand das Ausdauertraining statt, das im Bereich der anaeroben Schwelle von 4 mmol/l Laktat individuell gesteuert, 3 mal pro Woche über 30 Minuten durchgeführt wurde. Alle Probanden betätigten sich bis dahin nicht regelmäßig sportlich und waren Nichtraucher mit geringem Alkoholkonsum. Für die Dauer des Ausdauertrainings sollten sie ihre

Ernährungsgewohnheiten nicht umstellen bzw. keine zusätzlichen Vitaminpräparate einnehmen. Am Ende des Ausdauertrainings stand eine weitere laufbandspiroergometrische Untersuchung, die analog der Eingangsuntersuchung durchgeführt wurde. Laufbandspiroergometrie, Ausdauertraining und Blutentnahme der Probanden erfolgte unter der Leitung von Privatdozent Dr. Heitkamp.

Tab. 3-5: Zusammenstellung der Zeitpunkte der Blutentnahme bei den Teilnehmern des Ausdauertrainings

Abkürzung	Zeitpunkt der Blutentnahme	
A	Vor dem Ausdauertraining	Vor Ausbelastung auf dem Laufband
B	"	Unmittelbar nach Belastung auf dem Laufband
C	"	15 min nach Belastungsende
<i>8wöchiges Ausdauertraining</i>		
D	Nach dem Ausdauertraining	Vor Ausbelastung auf dem Laufband
E	"	Unmittelbar nach Belastung auf dem Laufband
F	"	15 min nach Belastungsende

Die Oxidationsempfindlichkeit von LDL *in vitro* wurde mittels Dienbildung in Gegenwart von $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$ bei 37°C bestimmt (3.1.1 und 3.1.2.1).

Als Maß für die Plasmalipidperoxidation galt die Menge von mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (TBARS) (wurde in der Sportmedizin durchgeführt nach 3.1.2.4).

Außerdem wurde die Antioxidative Kapazität im Plasma mittels AAPH-Reaktion gemessen (3.4).

3.7.2 Antioxidative Kapazität und Fluorescamin-Titration von LDL im Plasma von Koronarpatienten

Bestimmt wurde die Antioxidative Kapazität mit der AAPH-Reaktion nach 3.4 im Plasma von 24 Patienten und von 21 Mitarbeitern und Studierenden des Physiologischen Institutes. Die Blutproben wurden von der Medizinischen Klinik in anonymisierter Form erhalten, die Blutproben der Kontrollgruppe wurden am Physiologischen Institut entnommen.

Als laborchemische Vergleichsparameter aus dem Blut dienten Triglyceride, gesamtes Cholesterin, die Werte aus der Lipoprotein-Elektrophorese HDL-, VLDL-

und LDL-Cholesterin, Lipoprotein(a), außerdem Eiweiß, Kreatinin und Harnsäure. Alle laborchemischen Bestimmungen wurden nach allgemein anerkannten Methoden im Zentrallaboratorium des Klinikums der Universität Tübingen durchgeführt, als Mittelwerte der Patientengruppe zur Verfügung gestellt bzw. die Werte der Kontrollgruppe übermittelt und mit den vom Zentrallabor angegebenen Referenzen verglichen.

Außerdem wurden bei beiden Gruppen die freien Aminogruppen von LDL durch Fluorescamin-Titration im Plasma nach 3.2 bestimmt, bei der Kontrollgruppe wurde zusätzlich die lag-Phase der kupferinduzierten LDL-Oxidation nach 3.1.1 und 3.1.2.1 gemessen.

3.8 Einfluß von oxLDL auf zelluläres Ca²⁺

3.8.1 Calcium-Signale durch Fura-Fluoreszenz-Imaging

Freies Calcium kann in Zellen mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2 nachgewiesen werden (*Grynkiewicz et al. 1985*). Die Fluoreszenzeigenschaften und -intensitäten dieses Indikators hängen von der Calciumkonzentration der Lösung ab. Um die hydrophile Säure Fura-2 in Zellen einschleusen zu können, wird Fura-2 zu einem hydrophoben Acetoxymethylester, dem Fura-2AM, verestert. Dieser Ester gelangt durch passive Diffusion in die Zellen, und zelleigene Esterasen spalten die Bindung hydrolytisch. Die nun im Cytosol vorliegende freie Säure kann nur noch durch aktive Mechanismen wieder in den Extrazellulärraum transportiert werden. Calcium-gesättigtes Fura-2 liefert bei Bestrahlung mit der Wellenlänge 340 nm maximale Fluoreszenz. Bei der Anregungswellenlänge 380 nm wird die freie Säure von Fura maximal angeregt (Abb. 3-3). Das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 510 nm. Diese Emission, die mittels digitaler ICCD-Kamera und Fotokarte erfaßt wird, ist abhängig von der Calciumbindung, aber auch von der Fura-Konzentration in den Zellen, die allerdings nicht genau bekannt ist. Durch alternierende Anregung der Zellen mit den beiden Wellenlängen 340 und 380 nm kann das Verhältnis aus den beiden Fluoreszenzintensitäten gebildet werden, die sogenannte Ratio, die immer noch abhängig von der Calciumkonzentration, aber unabhängig von der Konzentration des Farbstoffes in der Zelle ist.

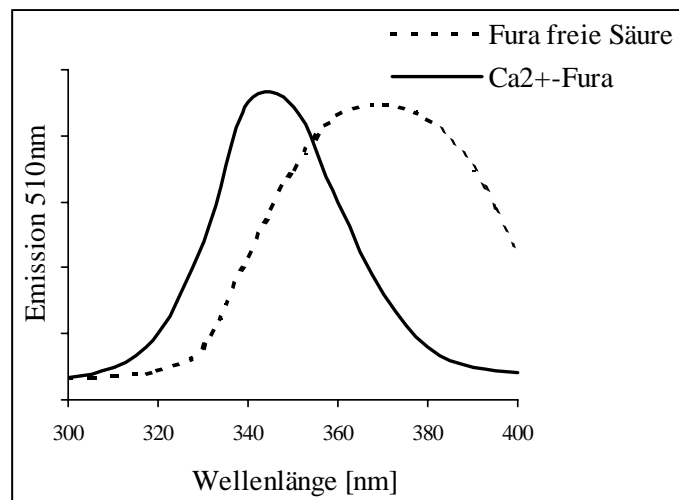


Abb. 3-3: Fluoreszenzspektrum des Fluoreszenzindikators Fura-2 in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration

Die absolute Calciumkonzentration errechnet sich nach *Grynkiewicz et al. (1985)* wie folgt:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \times \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

K_d :	Dissoziationskonstante für Ca^{2+}	(bei 37°C: 224)
R :	Ratio $F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$	(F: Intensität)
S_{f2} :	$F_{380\text{nm}}$ calciumfrei	
S_{b2} :	$F_{380\text{nm}}$ max. Calcium	
R_{\min}, R_{\max}	siehe Abbildung 3-4	

Zur Bestimmung von R_{\min} und R_{\max} wird zuerst der extrazelluläre Calciumgehalt durch Auswaschen mit Calcium-freiem Ringer mit 1 mM EGTA minimiert. Anschließend wird durch Zugabe von 10 μM Ionomycin die Zellmembran für Calcium durchlässig gemacht und so das intrazelluläre Calcium ausgewaschen, das durch EGTA komplexiert wird. Dadurch sinkt der intrazelluläre Calciumgehalt auf ein Minimum ab, Ratio R_{\min} kann bestimmt werden. Bei Zugabe von überschüssiger calciumhaltiger Lösung (2 mM Calcium) steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration durch die Membrandurchlässigkeit maximal an, R_{\max} wird bestimmt (Abb. 3-4).

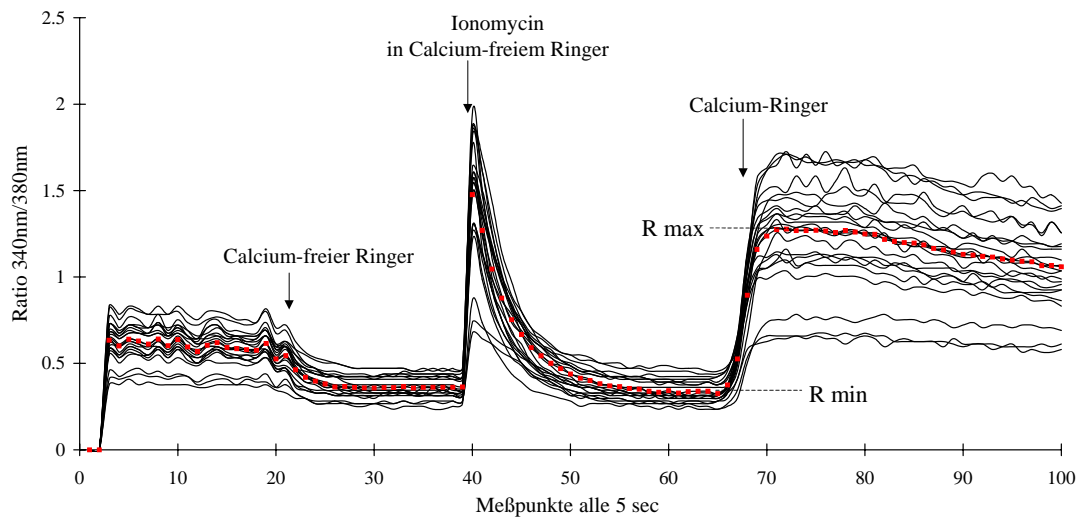


Abb. 3-4: Aufzeichnung einer Calcium-Eichung mit A7r5-Zellen

Die einzelnen Kurven stellen den Verlauf der Calciumkonzentration in jeweils einer Zelle dar. Die mittlere Kurve aller Zellen ist durch Punkte hervorgehoben, der Abstand zwischen zwei Punkten entspricht 5 Sekunden.

3.8.2 Versuchsdurchführung der Calciummessungen

Alle Versuche wurden mit auf Deckgläschen in 6-Well-Platten kultivierten glatten Muskelzellen aus Rattenaorta (A7r5) durchgeführt. Die Zellen wurden nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens nach 3 bis 5 Tagen verwendet. Das Beladen der Zellen erfolgte in Medium mit 1 μM Fura-2AM für eine Stunde bei 37°C unter Wasserdampfsättigung und 5 % CO_2 -Gehalt. Die Zellen wurden anschließend vorsichtig mit temperierter Ringerlösung mehrmals gespült und die Deckgläschen anschließend zügig in die Halterung (Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Institutes) für die Arbeitsplatte des Mikroskops (Axiovert 135, Zeiss) überführt. Die Zellen und das Medium konnten über die Halterung mittels einer Rollerpumpe mit temperiertem Wasser auf 32-36°C gehalten werden. Mittels der Rollerpumpe wurde in einem zweiten Schlauchsystem der auf 37°C vortemperierte Calcium-Ringer kontinuierlich auf das Deckgläschen in der Halterung geleitet und über eine Absaugpumpe laufend entfernt (Ringer-Durchfluß). Die vortemperierten Versuchslösungen, die mit Calcium-Ringerlösung hergestellt worden waren, wurden zupipettiert und nach Beendigung des Calciumsignals mittels der Absaugpumpe wieder entfernt. Der Flüssigkeitsspiegel in der Halterung änderte sich dadurch nicht.

Aus dem von der UV-Lampe ausgehenden Licht wurde mit Hilfe von zwei monochromatischen Filtern die Wellenlängen 340 und 380 nm selektiert und durch die Steuerung eines Filtrerrades alternierend auf die Zellen geleitet. Die einzelnen Zellen wurden mittels des Video-Imaging-Systems über eine am Mikroskop installierte ICCD-Kamera markiert und die Änderungen der Fluoreszenz in diesen Zellen beobachtet (Abb. 3-5).

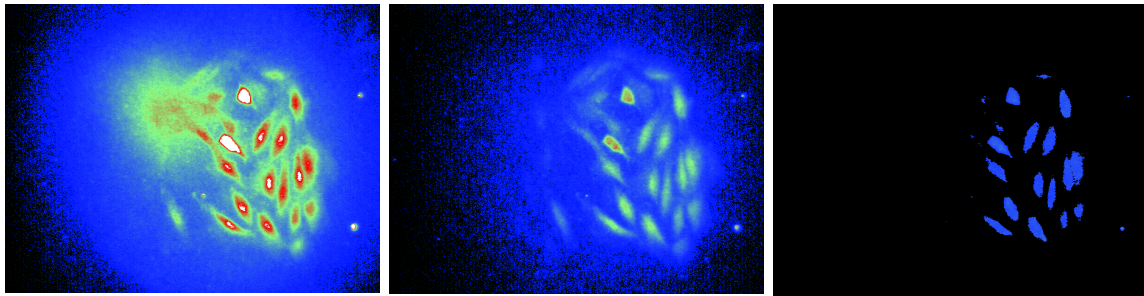


Abb. 3-5 a

Abb. 3-5 b

Abb. 3-5 c

Abb. 3-5 Fluoreszenz-Imaging-Aufnahmen von A7r5-Zellen bei a) 380 nm, b) 340nm und c) Ratio 340nm/380nm (Zellen vor Beginn der Stimulation)

Die Steuerung der Messungen erfolgte durch ein Digidata 2000 Image Lightning Computer Board und der Software Axon Imaging Workbench 2 (Axon Instruments), wobei die Meßergebnisse anschließend in MS Excel übertragen und weiterverarbeitet wurden.

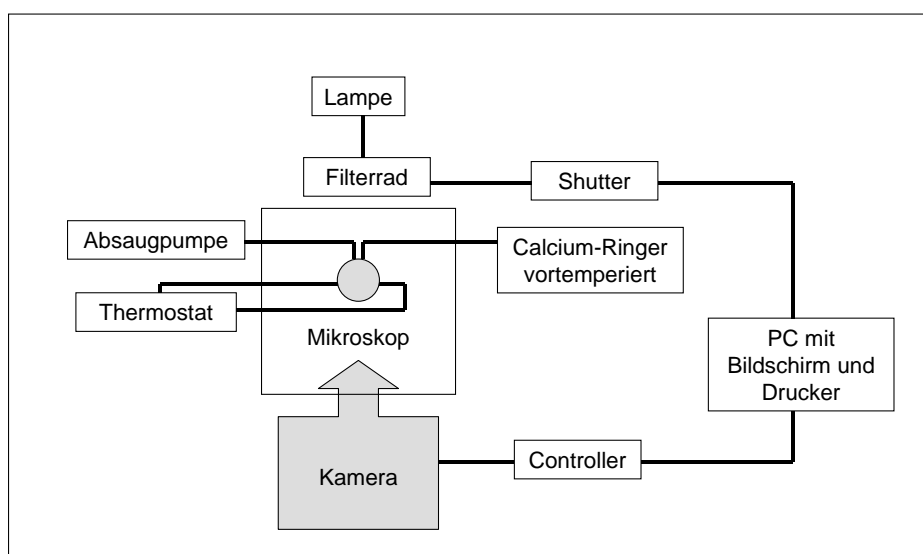


Abb. 3-6: Schematischer Versuchsaufbau für Calcium-Signal-Messungen durch Fura-Fluoreszenz-Imaging

3.8.3 Inkubation von glatten Muskelzellen mit LDL bzw. Angiotensin II

3.8.3.1 Applikation von kurzzeitig oxidiertem LDL

Isolierung und Oxidation erfolgte wie unter 3.1.1 und 3.1.2.2 beschrieben, wobei die Zunahme der Extinktion bei 234 nm als Kontrolle diente (Extinktionsanstieg zwischen 0,5 und 0,7; Oxidationsdauer 3-4 Stunden). Als Vergleich diente unbehandeltes LDL, das mit Butylhydroxytoluol versetzt, mit PBS pH 7,4 auf dieselbe Konzentration wie das behandelte LDL gebracht und bei 4°C gelagert wurde. Proteinbestimmung erfolgte nach 3.3, die LDL-Versuchslösungen wurden mit Calcium-Ringer hergestellt und am selben Tag für die Calciummessungen nach 3.8.2 verwendet: Die beladenen Zellen wurden unter dem Mikroskop zunächst mit temperierter Calcium-Ringer-Lösung durchspült, dann wurde der Durchfluß gestoppt, die Ringerlösung abpipettiert und zügig die auf 37°C vortemperierte Versuchslösung zugegeben. Nach Abflauen des Calciumsignals wurde der Ringerdurchfluß wieder angestellt und nach einer Wartezeit die Zellstimulation mit Angiotensin II 1 µM wiederholt.

3.8.3.2 Langzeitapplikation mit lang oxidiertem LDL

Isolierung und Oxidation erfolgte ebenfalls wie unter 3.1.1 und 3.1.2.2 beschrieben, wobei das LDL über 24 Stunden oxidiert wurde. Das unbehandelte LDL, das als Vergleich diente, wurde wie unter 3.8.3.1 beschrieben aufgearbeitet und gelagert. Proteinbestimmung erfolgte nach 3.3.

Am nächsten Tag wurde sowohl das unbehandelte als auch das modifizierte LDL mit sterilem Medium unter Laminar-Flow entsprechend den einzusetzenden Konzentration verdünnt, sterilfiltriert und A7r5-Zellen in dem so hergestellten Versuchsmedium für 20 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Beladung der Zellen mit Fura-2AM und die Durchführung der Calciummessungen erfolgte nach 3.8.2. Als Versuchslösung zur Stimulation der Zellen diente eine 1 µM AT II-Lösung. Bestimmt wurden die durch diese gefäßaktive Substanz herbeigeführten Änderungen des zellulären Calciumsignals, wobei die Meßwerte der mit LDL behandelten Zellen auf die Meßwerte der unbehandelten Zellen bezogen wurden.

3.8.3.3 Effekt von Angiotensin II und AT 1-Rezeptorblockade

Um den Einfluß der Angiotensin II-Wirkung auf die zelluläre Calciumhomöostase näher zu untersuchen, wurden Calciummessungen nach 3.8.2 mit AT II und Valsartan, einem AT 1-Rezeptorblocker, durchgeführt. Dazu wurde als erste Versuchslösung 1 μM Angiotensin II verwendet, nach Abflauen des so ausgelösten Calciumsignals die Zellen mit Calcium-Ringer gespült und nach einer Wartezeit der Versuch mit einer zweiten Versuchslösung aus Valsartan 5 μM und Angiotensin II 1 μM wiederholt.

4 Ergebnisse

4.1 *in vitro* Untersuchungen zur oxidativen Modifizierung von LDL

4.1.1 Charakterisierung des kupferinduzierten LDL-Oxidationsprozesses

4.1.1.1 MDA-Gehalt (TBARS) und die Bildung konjugierter Diene während der kupferinduzierten LDL-Oxidation

Der Verlauf des Oxidationsprozesses von LDL wurde zunächst in der Lipidfraktion durch Bestimmung der mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen und der Dienbildung aus ungesättigten Fettsäuren verfolgt (Abb. 4-1). Dabei diente die Zunahme an konjugierten Dienen als Nachweis für eine stattgefundene Oxidation, in Kontrollansätzen mit durch einen Überschuß an EDTA gehemmter Oxidation wurden weder Dien- noch MDA-Bildung beobachtet.

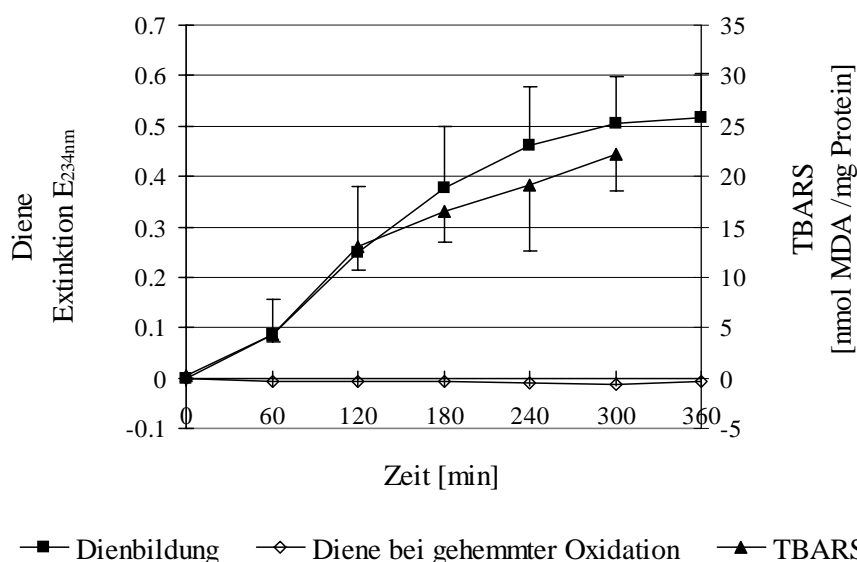


Abb. 4-1: Verlauf der Entstehung von TBARS und Dienen bei der LDL-Oxidation

Dargestellt ist die Zunahme der mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen ($n=3$) und der konjugierten Diene aus ungesättigten Fettsäuren ($n=9$) als Mittelwerte \pm S. D. während der LDL-Oxidation mit $150 \mu\text{mol Cu}^{2+}$ pro g Protein. Kurve \diamond zeigt als Beispiel den Verlauf bei durch EDTA gehemmter Oxidation (Kontrollbedingungen)

4.1.1.2 Bestimmung freier Aminogruppen während der kupferinduzierten LDL-Oxidation

Die Veränderungen der Aminogruppen im Proteinanteil des isolierten LDL im Verlauf des Oxidationsprozesses wurden parallel mit zwei unterschiedlichen Methoden ermittelt. Die Bestimmung mit 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonsäure (TNBS) erfolgte photometrisch, die Reaktion mit Fluorescamin wurde fluorimetrisch erfaßt.

Die Abnahme der Zahl freier Aminogruppen in Abhängigkeit von der Dauer der LDL-Oxidation ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Nach 120 Minuten war mit der Fluorescamin-Methode eine Abnahme um 10 % festzustellen bzw. 20 % mit der TNBS-Methode, nach sechs Stunden war der Gehalt an reagierenden Aminogruppen bei beiden Methoden auf 60 % des Anfangswertes zurückgegangen.

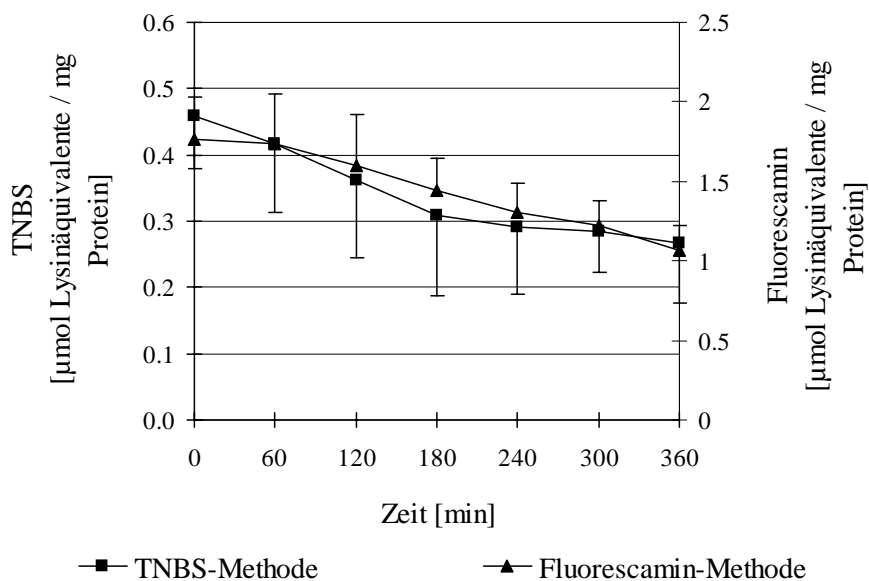


Abb. 4-2: Einfluß der kupferinduzierten LDL-Oxidation auf die Zahl freier Aminogruppen in LDL: Nachweis durch Reaktion mit 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonsäure und Fluorescamin

Dargestellt ist die Abnahme der freien Aminogruppen als Mittelwerte \pm S. D. ($n=9$) während der LDL-Oxidation mit $150 \mu\text{mol Cu}^{2+}$ pro g Protein.

Die Kontrollansätze mit durch EDTA gehemmter Oxidation zeigten keine Abnahme in der Zahl freier Aminogruppen (Abb. 4-3).

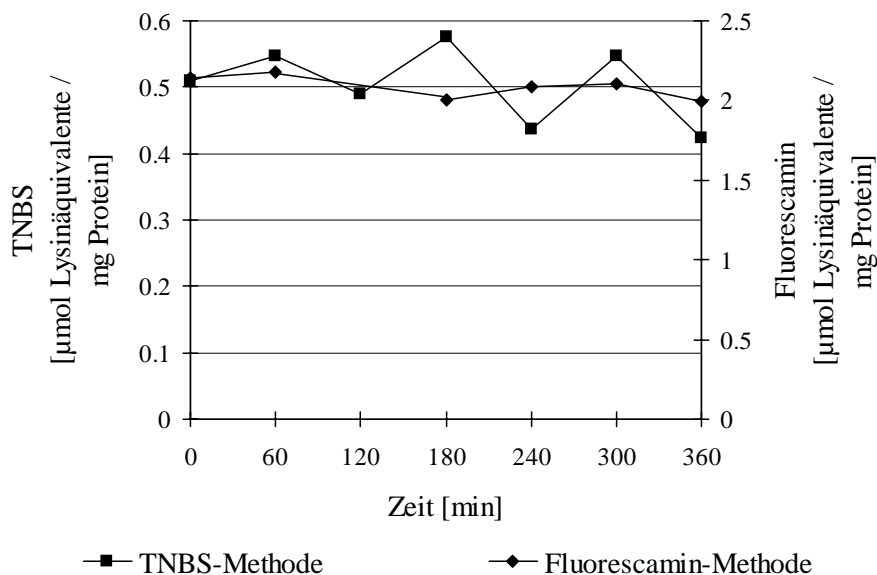


Abb. 4-3: Beispiel einer Bestimmung freier Aminogruppen in LDL mit 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonsäure und Fluorescamin unter nicht oxidierenden Kontrollbedingungen

4.1.1.3 Carbonylgruppenbestimmung während der kupferinduzierten LDL-Oxidation

Carbonylgruppen entstehen bei der LDL-Oxidation als Aldehyde einerseits aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren über verschiedene Zwischenstufen wie Hydroperoxide und andererseits aus freien Aminogruppen des Apolipoproteins.

Die Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und anschließender Proteinfällung zeigte, daß Carbonylgruppen nicht nur in den Lipiden des LDL, sondern vor allem auch im Proteinanteil entstehen (Abb. 4-4).

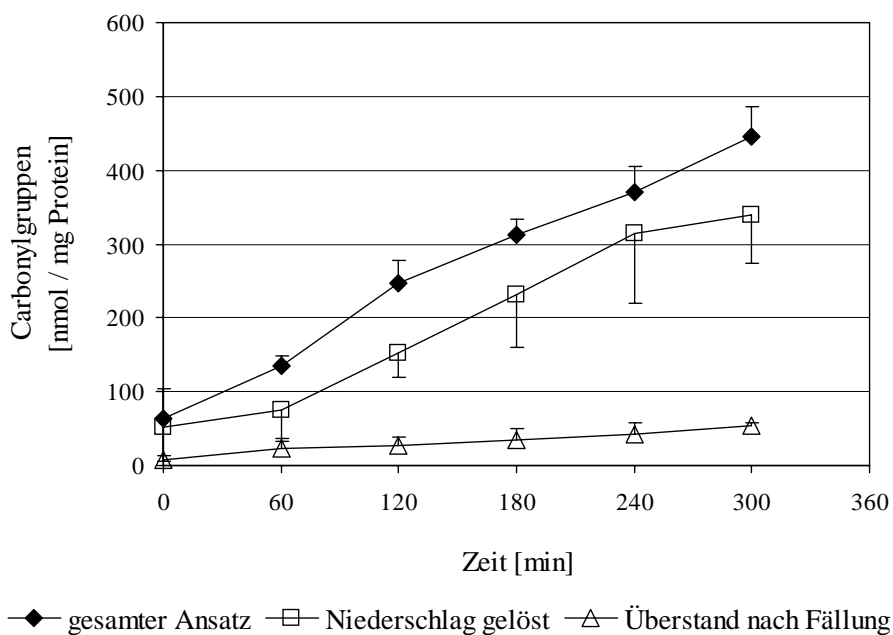


Abb. 4-4: Bildung von Carbonylgruppen während der Oxidation von LDL
(Nachweis mit Dinitrophenylhydrazin)

Dargestellt ist die Zunahme der Carbonylgruppen ($n=3$) als Mittelwerte \pm S. D. während der LDL-Oxidation mit $150 \mu\text{mol Cu}^{2+}$ pro g Protein. Gemessen wurde die Extinktion bei 450 nm , der Extinktionskoeffizient beträgt $\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Das Protein wurde gefällt und sowohl der wieder aufgelöste Niederschlag (\square) als auch der Überstand (\triangle) vermessen.

Auf der anderen Seite bestand ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Entstehung der Carbonylgruppen und mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (TBARS). Dies ist in Abbildung 4-5 dargestellt.

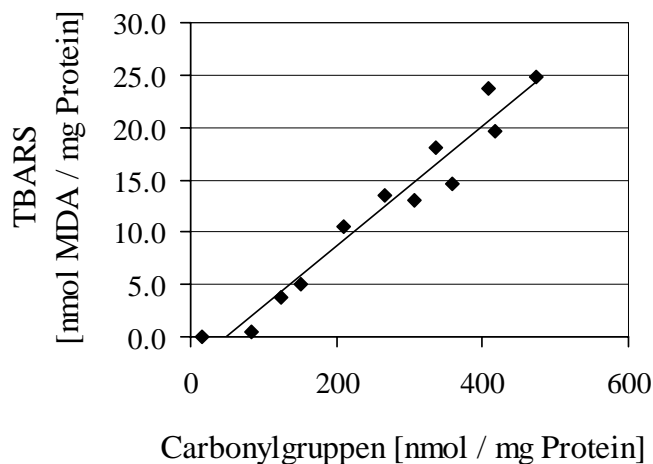


Abb. 4-5: Zusammenhang zwischen TBARS und Carbonylgruppen

Aufgetragen sind die Werte aller TBARS- und der Carbonylgruppenbestimmung aus zwei Versuchen der LDL-Oxidation mit $150 \mu\text{mol Cu}^{2+}$ pro g Protein bis zu 300 min Inkubationszeit. R^2 beträgt 0,95.

4.1.1.4 Auswirkung der Oxidation von LDL auf die elektrophoretische Mobilität

Die Oxidation von LDL verursacht durch den Angriff auf die Aminogruppen des Proteinteils Veränderungen in der elektrischen Ladung der Partikel und hat damit Auswirkungen auf die elektrophoretischen Mobilität. Mit der hier durchgeführten Elektrophorese sollte u. a. festgestellt werden, nach welchen Oxidationszeiten elektrophoretische Veränderungen von LDL nachzuweisen sind.

Zunächst wurde der Verlauf des Oxidationsprozesses von LDL in der Lipidfraktion durch die Dienbildung verfolgt (Abb. 4-6). Die Oxidation einer LDL-Probe wurde in der Propagations-Phase der Dienbildung (Probe 1), die Oxidation einer weiteren, aber identischen LDL-Probe bei maximaler Dienkonzentration (Probe 2) abgebrochen. Eine dritte Probe (Probe 3) wurde in der fortgeschrittenen Dekompositions-Phase für die Elektrophorese verwendet.

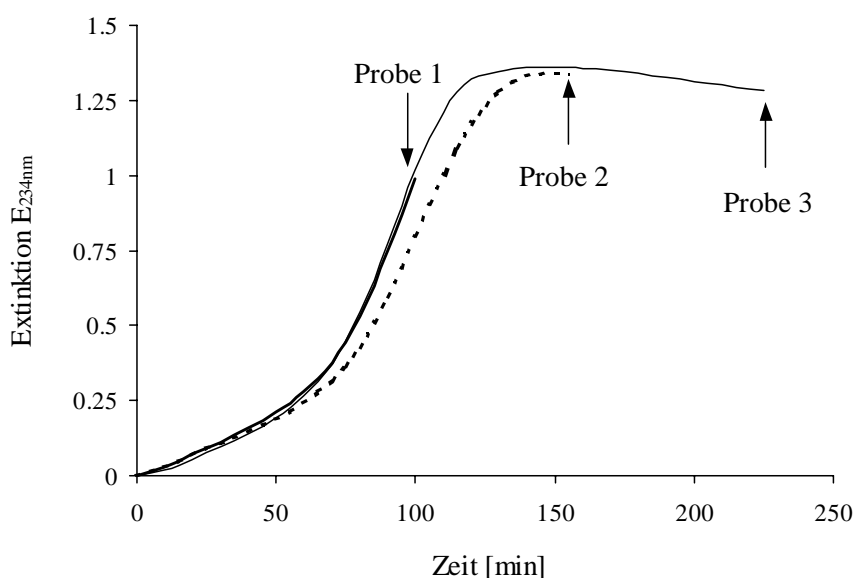


Abb. 4-6: Dienbildung der für die Elektrophorese (Abb. 4-7) verwendeten, kupferoxidierten LDL-Proben

- Probe 1: Bande 4 in der Elektrophorese**
Probe 2: Bande 5 in der Elektrophorese
Probe 3: Bande 6 in der Elektrophorese (Extinktionsmessung bei 225 min, Oxidationszeit 255 min)

Pro Ansatz wurden 100 µl LDL mit 10 µM CuSO₄ bei 37°C oxidiert.

Abbildung 4-7 zeigt die Ergebnisse der Elektrophorese mit unterschiedlich behandelten LDL-Proben.

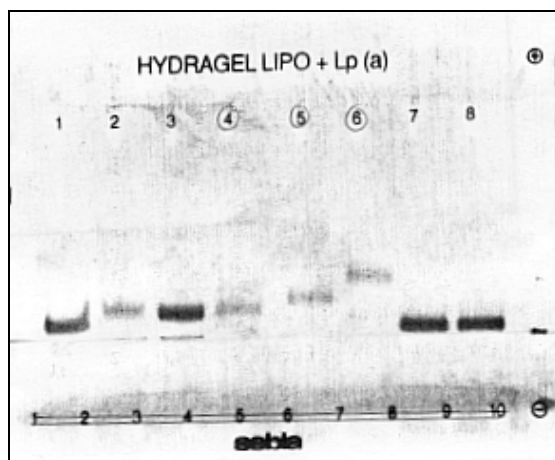


Abb. 4-7: Elektrophoretische Darstellung von unterschiedlich behandelten LDL-Proben

<u>Bande</u>		<u>Rel. Laufstrecke</u>
1	natives, gereinigtes LDL	1
2	LDL mit 0,5 M Acetanhydrid, 30 min	2
3	LDL mit 0,5 M Acetanhydrid, 20 h	1,8
4	oxLDL 100 min oxidiert	$\Delta E_{234nm} = 0,99$
5	oxLDL 155 min oxidiert	$\Delta E_{234nm} = 1,34$
6	oxLDL 255 min oxidiert	$\Delta E_{234nm} = 1,28$ nach 225 min
7	natives, ungereinigtes LDL; 24 h, 4°C	
8	natives, gereinigtes LDL; 24 h, 4°C	1

Bei der Kupfer-Oxidation nahm mit zunehmender Oxidationszeit die elektrophoretische Mobilität des LDL zu. Bereits die LDL-Probe 1 (= Bande 4) mit einer Oxidationszeit von 100 Minuten zeigte eine deutliche Zunahme der relativen Laufstrecke bezogen auf natives LDL. Das Maximum der Extinktion bei 234 nm, und damit der maximale Gehalt an Dienen wurde bei ungefähr 150 Minuten erreicht (Probe 2 in Abb. 4-6). Die elektrophoretische Mobilität nahm aber auch darüber hinaus in der Dekompositions-Phase der Diene noch zu (Probe 3 = Bande 6).

Aufbewahrung bei 4°C für 24 Stunden hatte genauso wie die Reinigung über die Sephadex-Säule keine Auswirkung auf die elektrophoretische Mobilität des LDL.

Der Zusatz von Acetanhydrid verdoppelte die relative Laufstrecke, wobei die Einwirkdauer keinen Einfluß hatte. Das so modifizierte LDL zeigte eine geringere elektrophoretische Mobilität als das mit Kupfer oxidierte LDL.

4.1.2 Einfluß von Therapeutika verschiedener Wirkstoffgruppen auf die *in vitro* Oxidation von LDL

4.1.2.1 Allopathische Wirkstoffe (CSE-Hemmer, β -Blocker usw.)

Es wurden die Effekte verschiedener allopathischer Wirkstoffe auf die kupferinduzierte LDL-Oxidation untersucht. Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 4-1 dargestellt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen zwischen 0,01 und 10 μ M bzw. 100 μ M.

Tab. 4-1: Einfluß verschiedener Pharmaka auf die relative lag-Phase bei der kupfervermittelten LDL-Oxidation. Kontrolle = 100%.

Konzentration [μ M]	Simvastatin	Fluvastatin Natrium	Lovastatin	Lovastatin (offen)	Losartan
0	100	100	100	100	100
0,01	112	100	108	125	88
0,1	102	100	107	126	
1	120	100	140	108	90
10	162	117	117	108	85

Konzentration [μ M]	U-74500A (21-Aminosteroid)	U-74389G	U-83836E (Vitamin E- Derivat)	Metoprolol	Carvedilol	BM 91.0228
0	100	100	100	100	100	100
0,01	103	117	100	82	96	102
0,1	100	95	138	90	100	90
1	194	117	275	87	100	130
10		164		89	126	

Die LDL-Oxidation wurde durch Zugabe von 10 μ M CuSO₄ katalysiert. Die für die Einzelmessungen verwendeten LDL-Proben stammten von fünf verschiedenen Blutspendern.

Die hemmenden Effekte von Simvastatin bzw. Fluvastatin-Natrium sind auch in Abbildung 4-8 bzw. 4-9 dargestellt. Am Beispiel von Simvastatin wird die Zunahme der lag-Phase mit steigender Konzentration deutlich, Abbildung 4-9 zeigt am Beispiel

von Fuvastatin-Natrium die geringe Streuung gleicher Versuchsansätze innerhalb eines Versuches.

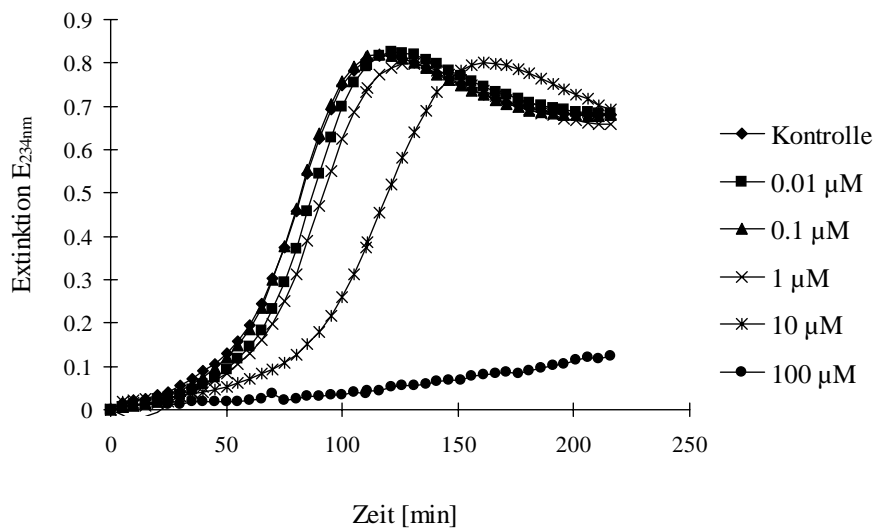


Abb. 4-8: Einfluß von Simvastatin auf die LDL-Oxidation (Originalaufzeichnung eines Einzelversuches)

Dargestellt ist der Extinktionsverlauf der LDL-Oxidation bei 234 nm. Die Simvastatin-Konzentrationen lagen zwischen 0 und 100 μM . Die LDL-Oxidation wurde durch Zugabe von 10 μM CuSO_4 katalysiert. Die verwendete LDL-Probe stammte von einem Blutspender.

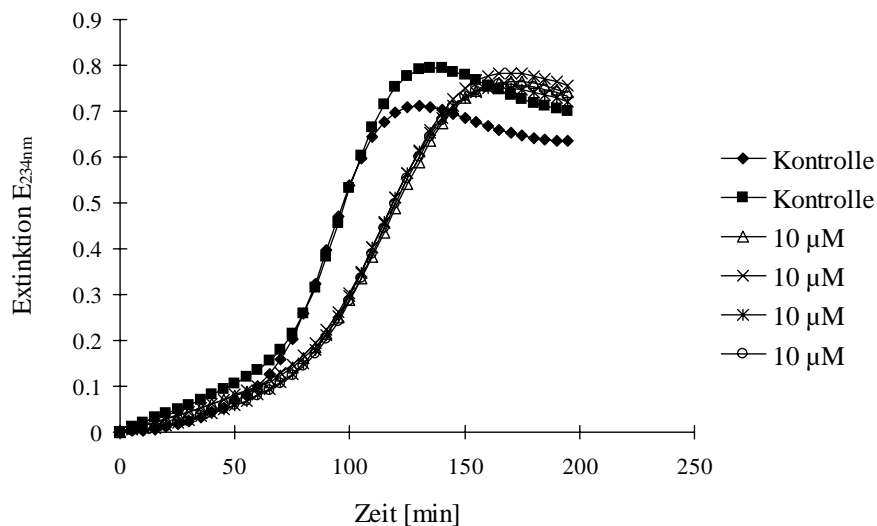


Abb. 4-9: Einfluß von Fluvastatin auf die LDL-Oxidation (Originalaufzeichnung eines Einzelversuches)

Dargestellt ist der Extinktionsverlauf der LDL-Oxidation bei 234 nm. Die Konzentration von Fluvastatinatrium lag bei den vier parallel durchgeführten Messungen bei 10 μM , die Kontrolle erfolgte in Doppelbestimmung. Die LDL-Oxidation wurde durch Zugabe von 10 μM CuSO_4 katalysiert. Die verwendete LDL-Probe stammte von einem Blutspender.

Wie in Tabelle 4-1 dargestellt zeigten alle drei untersuchten CSE-Hemmer hemmende Effekte auf die LDL-Oxidation. Stärker als Fluvastatin verlängerte Simvastatin die lag-Phase, vor allem bei einer, allerdings therapeutisch nicht relevanten Konzentration von 10 μM . Lovastatin mit geöffnetem Lactonring hemmte die Oxidation in Konzentrationen von 0,01 und 0,1 μM stärker als Simvastatin. Bei 1 und 10 μM war die lag-Phase wieder verkürzt. Der Lovastatin-Ansatz, bei dem der Lacton-Ring nicht nach *Jakóbišiak et al. (1991)* geöffnet wurde, zeigte dagegen geringere Effekte auf die LDL-Oxidation. Erst Konzentration von 1 μM und 10 μM wiesen einen deutlichen Einfluß auf die Verlängerung der lag-Phase auf.

Bei dem AT 1-Rezeptorantagonist Losartan konnte eine eher prooxidative als eine antioxidative Wirkung festgestellt werden.

Dagegen zeigten sowohl die beiden Aminosterioide U-74500A und U-74389G als auch das Vitamin E-Derivat U-83836E eine deutliche Hemmung der LDL-Oxidation, vor allem ab Konzentrationen von 1 μM . U-83836E zeigte bereits bei 0,1 μM eine deutliche Verzögerung der lag-Phase und bei einer Konzentration von 1 μM war die lag-Phase um das 2,75fache verlängert.

Der β -Blocker Carvedilol und sein Metabolit BM91.0228 zeigten ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die LDL-Oxidation, wobei BM91.0228 in einer Konzentration von 1 μM , Carvedilol aber erst bei 10fach höherer Dosierung deutliche Wirkung zeigte. Bei einem weiteren untersuchten β -Blocker, Metoprolol, ließ sich dagegen, vergleichbar mit der Wirkung von Losartan, kein antioxidativer Effekt beobachten. Diese Ergebnisse legen ebenfalls eine möglicherweise prooxidative Wirkung dieser Substanz nahe.

4.1.2.2 Pflanzliche Wirkstoffe

Neben den genannten allopathischen Wirkstoffen wurden auch Flavonoide und ein Crataegus-Extrakt in ihrer Wirkung auf die LDL-Oxidation getestet.

Luteolin, gefolgt von Quercetin, Luteolin-7-glucosid und Rutin zeigten bereits in einer Konzentration von 0,5 μM einen deutlich verlängernden Effekt auf die lag-Phase (Abb. 4-10). Bei einer Konzentration von 1 μM war dieser Effekt erwartungsgemäß noch stärker ausgeprägt, und bei 5 μM konnte bei diesen vier Substanzen innerhalb der

Meßzeit von 250 Minuten kein Extinktionsanstieg beobachtet werden. Dagegen hemmten Apigenin und Apigenin-7-glucosid die LDL-Oxidation erst bei dieser Konzentration nennenswert. Vitexin-2-o-rhamnosid hatte kaum meßbare Auswirkungen auf die lag-Phase der LDL-Oxidation und wurde nicht im Schaubild dargestellt.

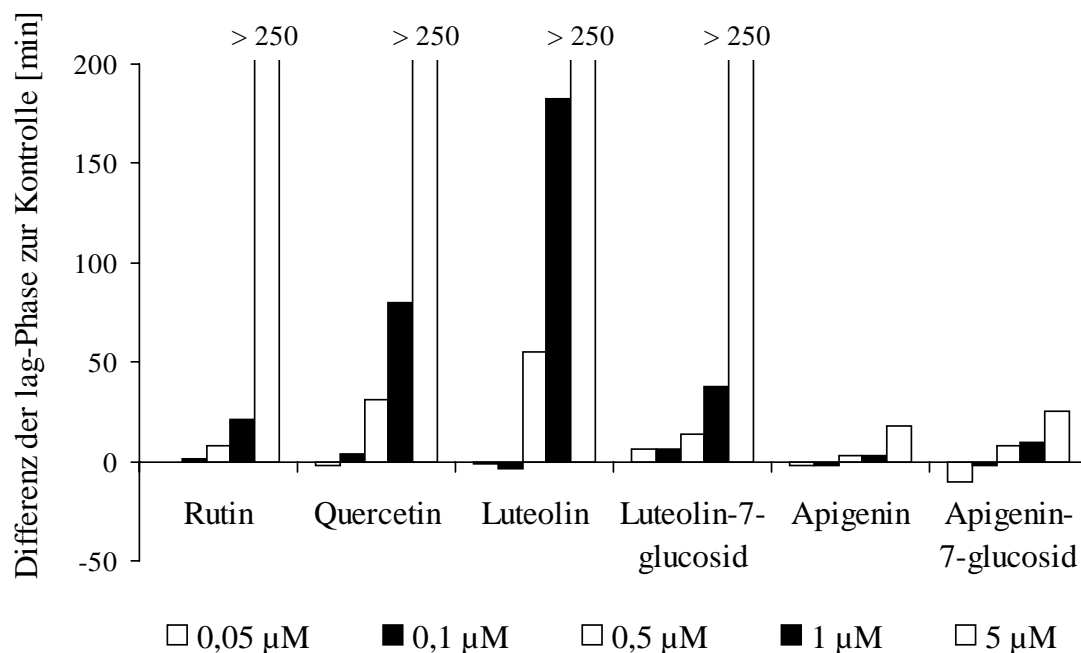


Abb. 4-10: Einfluß verschiedener Flavonoide auf die LDL-Oxidation

Dargestellt sind die Differenzen der lag-Phase zur entsprechenden Kontrolle (jeweils Einzelmessungen). LDL wurde aus gepooltem EDTA-Plasma gesunder, männlicher Probanden gewonnen, das mit Saccharose (0,6 %) stabilisiert bei -70°C gelagert wurde. Die Katalyse erfolgte mit $10\ \mu\text{M}$ CuSO_4 . Der Mittelwert der lag-Phase aus 10 Kontrollmessungen betrug 59 ± 11 Minuten.

Als Beispiel einer Flavonoid-Mischung wurde ein auf 2,03 % Flavonoide standardisierter methanolischer Crataegus-Extrakt verwendet. Dabei zeigte sich, daß bereits eine Konzentration von ca. 3,5 nM eine Verlängerung der lag-Phase um 6 Minuten zur Folge hatte und eine 10fach höhere Konzentration eine Verlängerung von 12 Minuten bewirkte. Bei einer Konzentration von ungefähr $0,35\ \mu\text{M}$ lag die Verlängerung der lag-Phase bei der LDL-Oxidation in Gegenwart des Gemisches deutlich über den Werten der einzelnen Flavonoiden (Tab. 4-2).

Tab. 4-2: Einfluß eines Crataegus-Extraktes auf die LDL-Oxidation im Vergleich zu ausgewählten Flavonoiden

Konzentration [µM]	Veränderung der lag-Phase der LDL-Oxidation [min]				
	Luteolin	Luteolin-7- glucosid	Quercetin	Rutin	Crataegus- Extrakt
0,0035	—	—	—	—	6
0,035	—	—	—	—	12
0,05	-1	6	-2	0	—
0,1	-4	6	4	1	—
0,35	—	—	—	—	153
0,5	55	14	31	8	—
1	183	38	80	21	—

Es sind die Differenzen der lag-Phase zur entsprechenden Kontrolle (jeweils Einzelmessungen) in Minuten angegeben. (Werte aus Abbildung 4-10). Zur Berechnung der Konzentration des Crataegus-Extraktes in µM wurde als mittleres Molekulargewicht der Flavonoide 430 angenommen und ist nur als Näherung zu den Einzelsubstanz-Konzentrationen zu sehen. Die Bestimmung der Wirkung des Crataegus-Extraktes auf die lag-Phase wurde mit LDL von zwei verschiedenen Spendern in Doppelbestimmung durchgeführt.

4.2 Bestimmung von Aminogruppen in LDL durch Fluorescamin-Titration im Plasma

Ausgehend von dem Befund, daß modifiziertes LDL eine verringerte Fluorescaminbindung zeigt, wurde die Frage untersucht, ob durch Fluorescaminmarkierung bereits im Plasma unterschiedliche LDL-Eigenschaften bei Koronarpatienten im Vergleich zu Gesunden gefunden werden können.

Um sicher zu gehen, daß die eingesetzte Fluorescaminmenge auch zu einer sättigenden Reaktion führte, wurde zunächst der Einsatz verschiedener Mengen Fluorescamin getestet. Dazu wurden entweder 1,3, 2 oder 2,7 mg Fluorescamin pro ml Plasma eingesetzt. Die mit dem daraus isolierten LDL gefundenen Meßwerte zeigten mit 2 und 2,7 mg Fluorescamin pro Milliliter Plasma kaum Streuungen, wohingegen die Werte beim Einsatz von 1,3 mg/ml Plasma deutlich darunter lagen (Abb. 4-11). Bei allen weiteren Untersuchungen wurde deshalb 2 mg Fluorescamin pro ml Plasma verwendet.

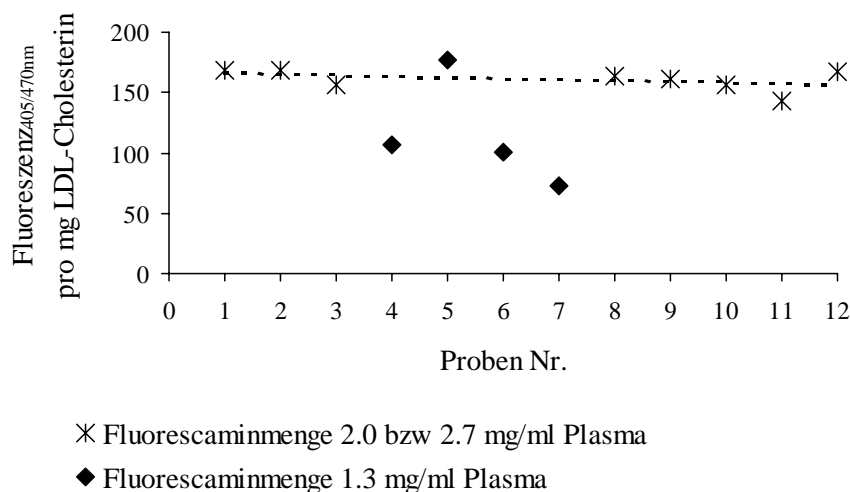


Abb. 4-11: Abhängigkeit der LDL-Fluoreszenz 405/470 nm von der eingesetzten Fluorescaminmenge

Dargestellt sind die Ergebnisse mit LDL eines Probanden. Bei den Proben 1-3 wurden 2,7 mg Fluorescamin pro ml Plasma eingesetzt, bei Probe 8-12 waren es 2 mg und bei den Proben 4-7 1,3 mg Fluorescamin pro ml Plasma. Die gestrichelte Linie ist die Ausgleichsgerade zwischen den Werten mit 2,7 und 2 mg Fluorescamin pro ml Plasma (Proben 1-3 und 8-12).

Die Messung der Fluoreszenz selbst war linear zur eingesetzten LDL-Menge (Abb. 4-12).

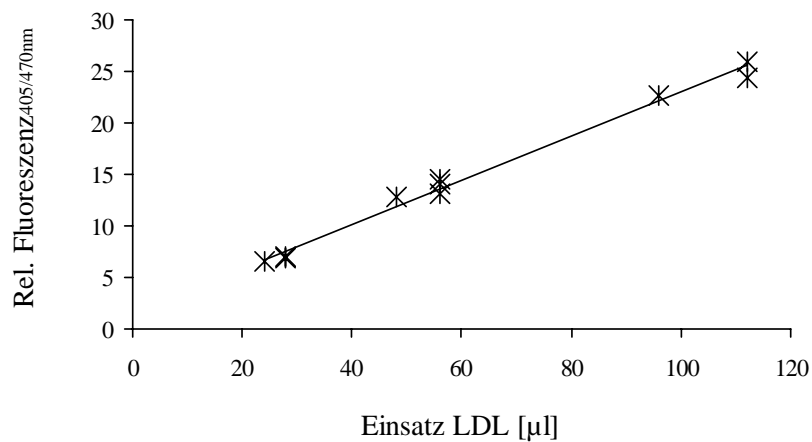


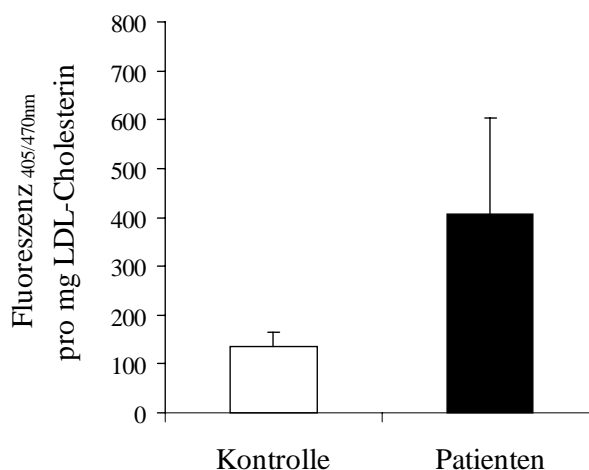
Abb. 4-12: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Menge des eingesetzten LDL nach Reaktion von Plasma mit Fluorescamin (2 mg/ml) und anschließender LDL-Isolierung

Diese Bestimmung der Aminogruppen in LDL wurde zunächst mit Plasma einer kleinen Gruppe Patienten und Gesunder durchgeführt und dann mit einer größeren Anzahl Patienten und Gesunder wiederholt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser zweiten Gruppe wird hier dargestellt, die ausführliche Beschreibung der Gruppenzusammensetzung und eine genaue Aufschlüsselung der Ergebnisse findet sich in 4.5.2.

Die erste Gruppe bestand aus fünf Koronarpatienten mit einem durchschnittlichen Gesamtcholesterinspiegel von 299 ± 40 mg/dl und aus fünf jungen, gesunden Probanden, deren Plasmacholesterinspiegel durchschnittlich bei 223 ± 35 mg/dl lag. Die Mittelwerte aus dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 4-13 dargestellt. Die Patientengruppe zeigte dabei deutlich höhere Werte als die Kontrollgruppe, d. h. daß dort mehr Fluorescamin an freie Aminogruppen des LDL gebunden worden war (t-Test $p = 0,05$).

**Abb. 4-13: Fluorescamin-Titration
von LDL im Plasma
(Ergebnis der beiden
Vorversuchsgruppen)**

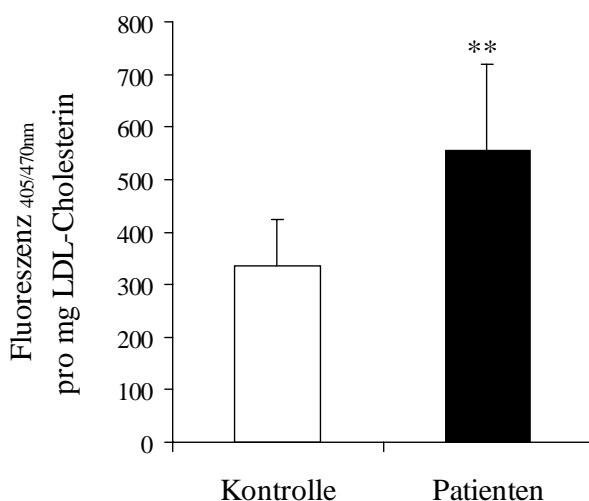
*Fluoreszenz_{405/470nm} des LDL bezogen
auf den Cholesteringehalt nach Reaktion
von Plasma mit Fluorescamin n=5 pro
Gruppe, Mittelwerte \pm S. D.
(t-Test $p = 0,05$)*



Nicht viel anders sah das Ergebnis der später untersuchten zweiten Gruppe aus. Die Gruppen bestanden aus 21 gesunden Kontrollpersonen mit einem durchschnittlichen Plasma-Cholesterinspiegel von 191 ± 29 mg/dl und aus 24 Patienten der kardiologischen Station mit einem durchschnittlichen Cholesterinspiegel von 241 ± 75 mg/dl. Auch hier zeigte die Patientengruppe einen höheren Quotienten aus Fluoreszenz_{405/470nm} und LDL-Cholesterin (t-Test $p = 0,001$) (Abb. 4-14). Allerdings lagen die Werte dieses Quotienten bei dieser zweiten Versuchsreihe höher als bei der ersten, was aber die qualitative Aussage der Messung nicht beeinträchtigt.

**Abb. 4-14: Fluorescamin-Titration
von LDL im Plasma
(Ergebnis des Haupt-
versuches)**

*Fluoreszenz_{405/470nm} des LDL bezogen
auf den Cholesteringehalt nach Reaktion
von Plasma mit Fluorescamin
Kontrollgruppe n=21, Patienten n=24,
Mittelwerte \pm S. D. (t-Test $p = 0,001$)*



4.3 Untersuchungen zur Antioxidativen Kapazität mit der AAPH-Reaktion

4.3.1 Voruntersuchungen

Zunächst mußten die Versuchsbedingungen der AAPH-Reaktion so optimiert werden, daß einerseits eine maximale Intensität des Lichtsignals in der Chemilumineszenz auftrat, daß aber andererseits die Dauer der Lichtauslöschung durch die radikalabfangende Wirkung der Testsubstanzen für die Praxis überschaubar gehalten wurden.

Bei unterschiedlichen Konzentrationen des Radikalbildners AAPH wurde die Dauer der Auslöschungsphase mit 2 μM Trolox[®] und die Intensität der Photonenemission bei gleichmäßiger Radikalproduktion, d. h. nach den ersten 15 Minuten, bestimmt. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 4-15a und Abbildung 4-15b dargestellt. Als optimale Konzentration von AAPH im Ansatz wurde danach 10 mM ermittelt, da bei dieser Konzentration die Intensität der Photonenemission ein Plateau erreichte und die Dauer der Lichtsignalunterdrückung noch relativ gering ausfiel.

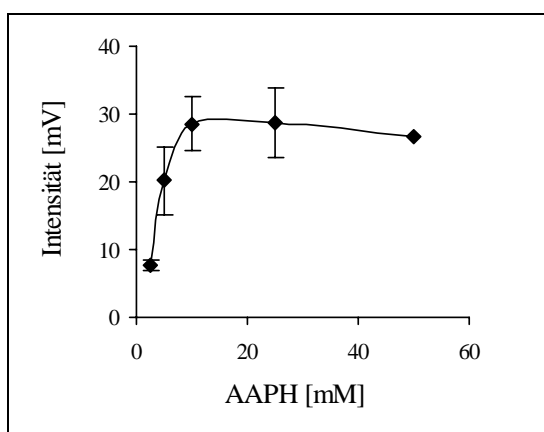


Abb. 4-15 a

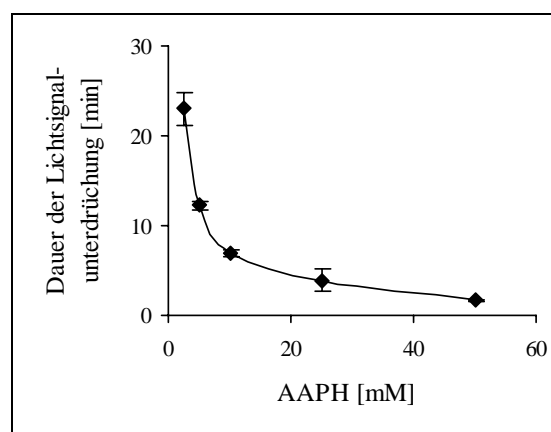


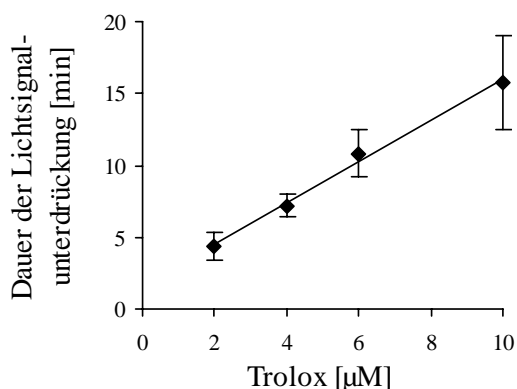
Abb. 4-15 b

Abb. 4-15: Einfluß der AAPH-Konzentration auf die Intensität der Luminol-induzierten Chemilumineszenz (a) bzw. auf die Dauer der Lichtauslöschung durch 2 μM Trolox[®] (b) (n=3)

4.3.2 Standardisierung mit Vitamin E (Trolox®)

Die Berechnung der Antioxidativen Kapazität $TRAP_{Probe}$ wurde mit Hilfe von Trolox®-Eichgeraden durchgeführt. In Abbildung 4-16 ist die mit 10 mM AAPH aufgestellte Gerade dargestellt.

Abb. 4-16: Trolox®-Eichkurve mit 10 mM AAPH (Endkonzentration) (jeweils n=6)



Zur Verkürzung der Meßzeiten bei größeren Versuchsreihen wurden an jedem Versuchstag mehrere Einzelmessungen mit 2 µM Trolox® über den Tag verteilt durchgeführt. Die Mittelwerte aus diesen Messungen diente dann zur Berechnung der Antioxidativen Kapazität. In Tabelle 4-3 werden als Beispiel für die Reproduzierbarkeit die Ergebnisse dieser Einzelmessungen von sechs Tagen mit 2 µM Trolox® in Gegenwart von 10 mM AAPH gezeigt.

Tab. 4-3 Reproduzierbarkeit von Einzelmessungen mit 2 µM Trolox® und 10 mM AAPH

Angegeben sind die Mittelwerte \pm S. D. von sechs Meßtagen.

Tag	1	2	3	4	5	6
Mittelwert	5,08	4,25	3,67	3,92	3,50	5,17
\pm S. D.	\pm 0,29	\pm 0,43	\pm 0,52	\pm 0,38	\pm 0,0	\pm 0,29
Anzahl	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 2	n = 3

4.3.3 Einfluß verschiedener Antioxidantien bzw. Plasma auf die AAPH-Reaktion

Verschiedene Antioxidantien wurden auf ihr Verhalten gegenüber dem Radikalbildner AAPH hin untersucht.

Die Fähigkeit, d. h. die Zeit, die Chemilumineszenz der Radikalreaktion zu unterdrücken, ist von Vitamin C, Nordihydroguarsäure, Glutathion, Homocystein und vergleichend dazu Trolox, in Abbildung 4-17 dargestellt. Nordihydroguarsäure (NDHGA) wies dabei die größte Fähigkeit zur Radikalunterdrückung auf. Eine 2 μmolare NDHGA-Lösung hemmte die Photonenemission in der Chemilumineszenz genauso stark wie die 40 μmolare Lösungen von Glutathion oder Vitamin C. Neben NDHGA zeigte Trolox eine lang andauernde Auslöschung der lichterzeugenden Radikalreaktion. Diese Fähigkeit nimmt dann in der Reihenfolge Homocystein, Vitamin C bzw. Glutathion weiter ab. Die verwendeten Konzentrationen lagen zwischen 0,2 und 40 μM .

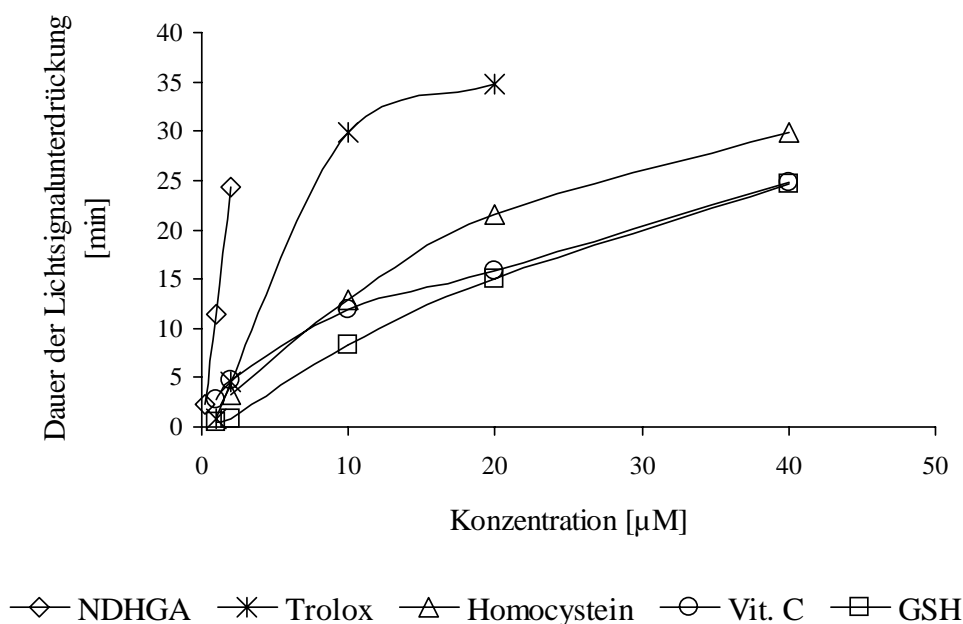


Abb. 4-17: Einfluß verschiedener Antioxidantien auf die Dauer der Lichtsignalunterdrückung in der AAPH-Reaktion

Die Meßpunkte repräsentieren die Mittelwerte von jeweils zwei bis drei Einzelmessungen.

Die Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der Chemilumineszenzreaktion nach der Zugabe der Antioxidantien ergab ganz unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 4-18 a – d). Vereinfacht konnten zwei Fälle unterschieden werden: erstens Antioxidantien, bei denen die Intensität der lichterzeugenden Reaktion nach der Auslöschungsphase wieder das Niveau der Intensität vor Zugabe der Probe erreichte und zweitens Antioxidantien, bei denen die Intensität der lichterzeugenden Reaktion nach der Auslöschungsphase um ein Vielfaches über die Intensität vor Zugabe der Probe hinaus anstieg.

Bei Vitamin C nahm die Intensität der Photonenemissionen nach der lichtauslöschenden Phase mit steigender Konzentration zu (Abb. 4-18 a).

Homocystein wies ein ähnliches Verhalten wie Vitamin C auf. Auch hier wurde die Intensität nach der Auslöschungsphase konzentrationsabhängig größer (Abb. 4-18 b).

Dagegen sah das Erscheinungsbild der Kurven nach Zugabe von Glutathion anders aus: nach der Auslöschungsphase bildete sich ein transientes Maximum mit anschließenden niedrigeren Plateau, dessen Intensität wiederum konzentrationsabhängig war (Abb. 4-18 c).

Nach Zugabe von Nordihydroguarsäure wurden bei allen Konzentrationen nach der Auslöschungsphase, vergleichbar mit Trolox[®], die Anfangsintensitäten erreicht (Abb. 4-18 d). Es kam bei beiden Substanzen zu keiner überschießenden Reaktion.

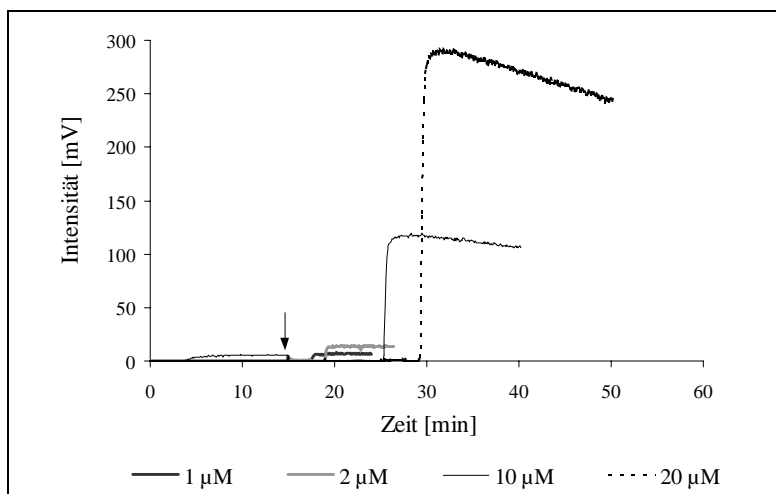


Abb. 4-18 a Vitamin C

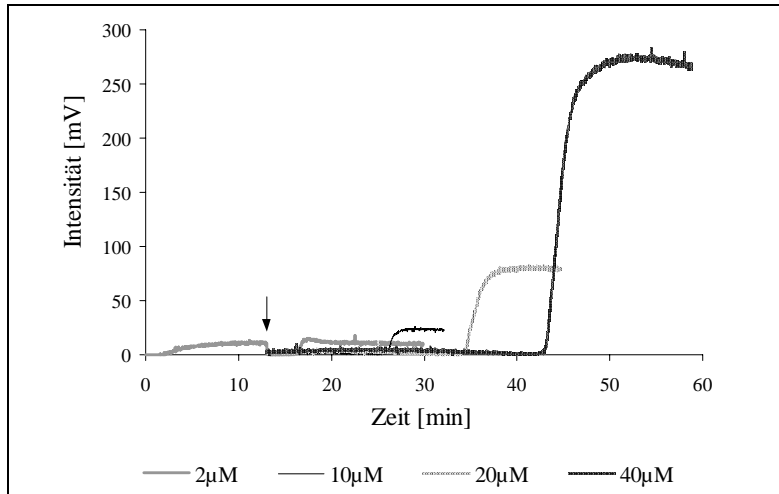


Abb. 4-18 b Homocystein

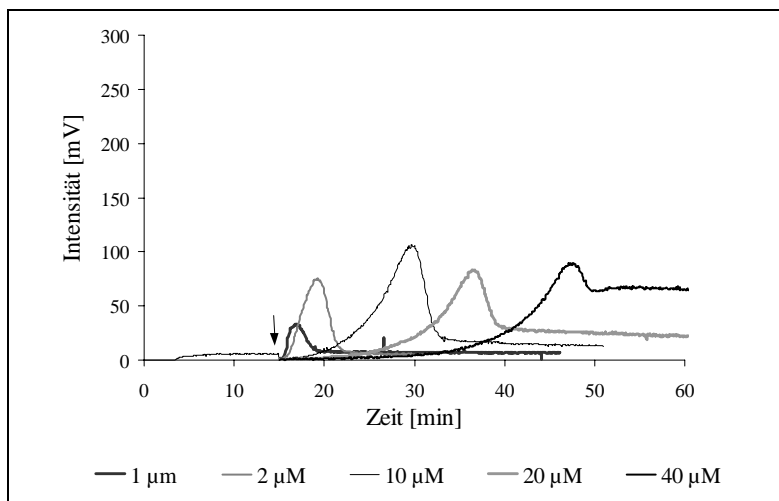


Abb.4-18 c Glutathion

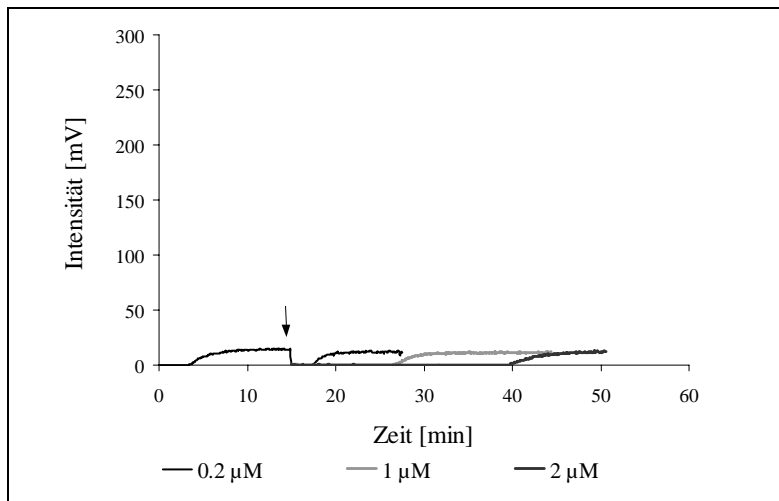


Abb.4-18 d Nordihydroguar-säure

Abb. 4-18: Kurvenverläufe und Auslöschung des radikalisch bedingten Lichtsignals in der AAPH-Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration

- a) Vitamin C
- b) Homocystein
- c) Glutathion
- d) Nordihydroguar-säure

(↓ = Zugabe der Probe)

Die Zugabe von Plasma zu dem Radikalbildner AAPH und Luminol führte ebenfalls zu einer Auslöschung des Lichtsignals. Anschließend stieg auch hier die Intensität der Photonenemission auf ein Vielfaches des ursprünglichen Wertes an (Abb. 4-19). In Abbildung 4-19 a wurde humanes Plasma (in einem Fall nach Vitamin E Gabe, vgl. nächste Seite), in Abbildung 4-19 b Plasma von Kaninchen zugegeben.

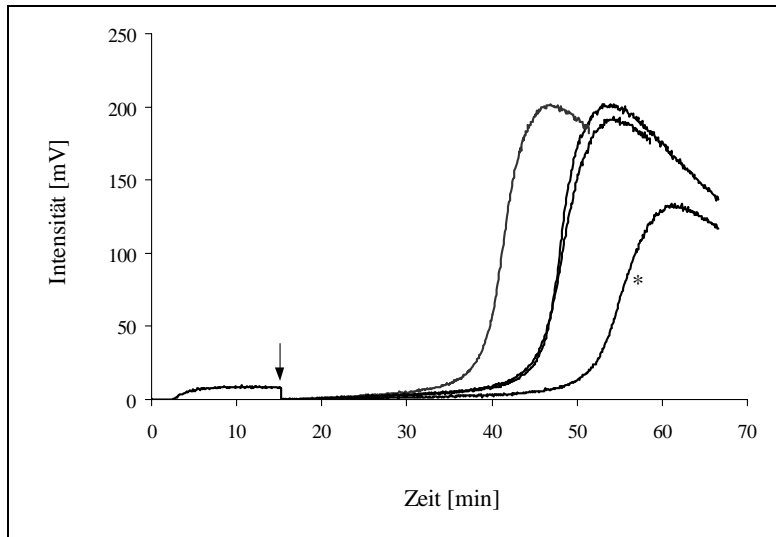


Abb. 4-19 a

Einfluß von humanem Plasma auf die AAPH-Reaktion

*Kurve mit *: nach Einnahme von Vitamin E (vgl. nächste Seite)*

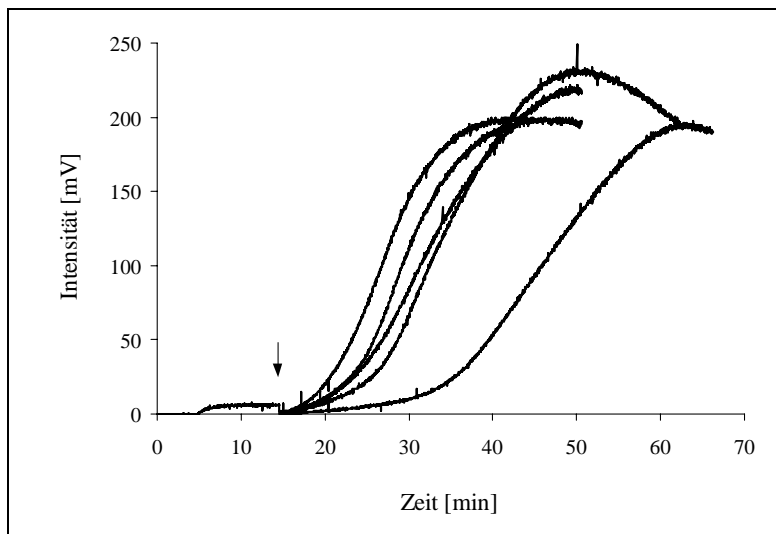


Abb. 4-19 b

Einfluß von Kaninchen-Plasma auf die AAPH-Reaktion

Abb. 4-19: Einfluß vom Blutplasma auf die AAPH-Reaktion

a) Humanes Plasma

b) Plasma von Kaninchen

15 Minuten nach Beginn der AAPH-Zerfallsreaktion wurden je 10 µl Plasma zu pipettiert (Pfeil). Jede dargestellte Kurve repräsentiert eine Plasmakurve.

4.3.4 Antioxidative Kapazität von Plasma nach Einnahme von Vitamin E

Die Einnahme von 400 I. E. Vitamin E pro Tag über sechs Wochen erhöhte den Wert der Antioxidativen Kapazität um 44% (Tab. 4-4). Die maximale Intensität der behandelten Probe lag dabei deutlich unter der von unbehandelten Proben (s. o. Abb. 4-19 a, Kurve mit *).

Tab. 4-4: Antioxidative Kapazität vor und nach Einnahme von Vitamin E

	Ausgangswert	Nach Einnahme von 400 I.E. Vitamin E über 6 Wochen
Antioxidative Kapazität	1320 $\mu\text{mol/l}$ (100 %)	1900 $\mu\text{mol/l}$ (144 %)

4.3.5 Einfluß von nativem und oxidiertem LDL auf die AAPH-Reaktion

Der Zusatz von 20 μl nativem LDL (0,48 g Protein/l) bewirkte nur eine kurzzeitige Auslöschung der Lichtreaktion, wobei die Intensität wieder auf das Ausgangsniveau anstieg (Abb. 4-20 a). Dieselbe Menge an oxidiertem LDL (vgl. 3.1.2.2; 7 h; Dien-Extinktionzunahme_{234nm} von 0,6) führte zu keiner Auslöschungsreaktion, dagegen stieg die Intensität der Radikalbildung an (Abb. 4-20 b).

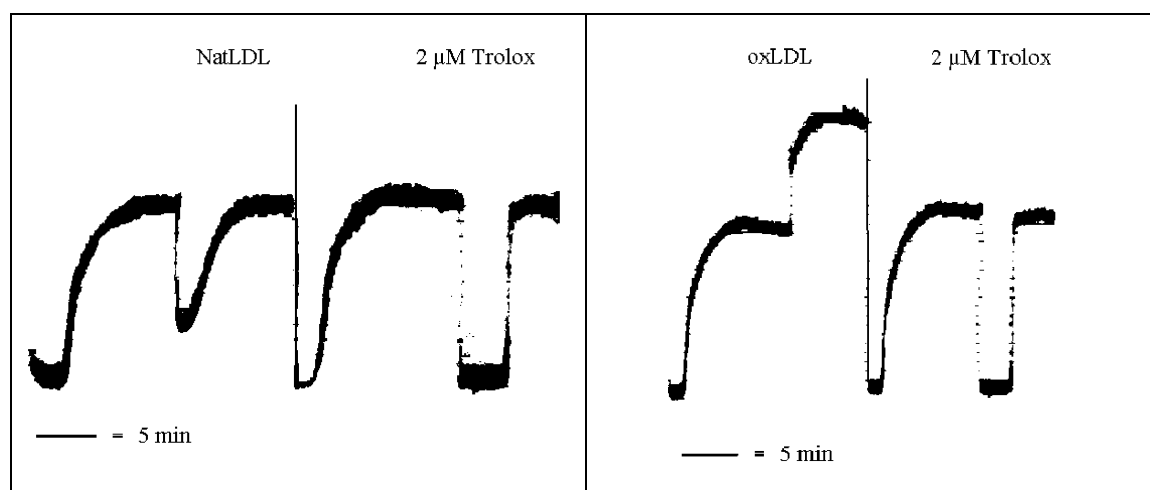


Abb. 4-20 a

Abb. 4-20 b

Abb. 4-20: Einfluß von LDL auf die AAPH-Reaktion (Originalregistrierung)

- a) natives LDL (20 μl) *Es handelte sich um eine identische Probe von b), wurde aber sofort vermessen = selbe Cu^{2+} - Konzentration.*
- b) oxidiertes LDL (20 μl) *Oxidationsbedingungen: 150 μmol Cu^{2+} /g Protein bzw. 0,1 mM / 7 h bei 37°C; Extinktionszunahme $E_{234 \text{ nm}}$: 0,6*

4.4 *In vivo* Beeinflussung der Oxidierbarkeit von LDL im Tiermodell

4.4.1 Einfluß von Antioxidantien und Carvedilol in WHHL-Kaninchen auf die *in vitro* LDL-Oxidierbarkeit

In Watanabe-Kaninchen wurden die Auswirkungen verschiedener Antioxidantien auf die *in vitro* LDL-Oxidierbarkeit untersucht.

Die Ergebnisse der kupferinduzierten LDL-Oxidation zeigten in der jeweiligen eingesetzten Dosierung eine Verlängerung der lag-Phase in folgender Abstufung (Abb. 4-21): Kontrolle < Ubichinon Q10 < Carvedilol < Tocopherol < Probuco

Allerdings führte nur die Applikation von Probuco zu signifikanten Unterschieden mit der Kontrollgruppe (t-Test $p = 0,01$), Tocopherol verfehlte dieses Signifikanzniveau knapp, alle anderen Substanzen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

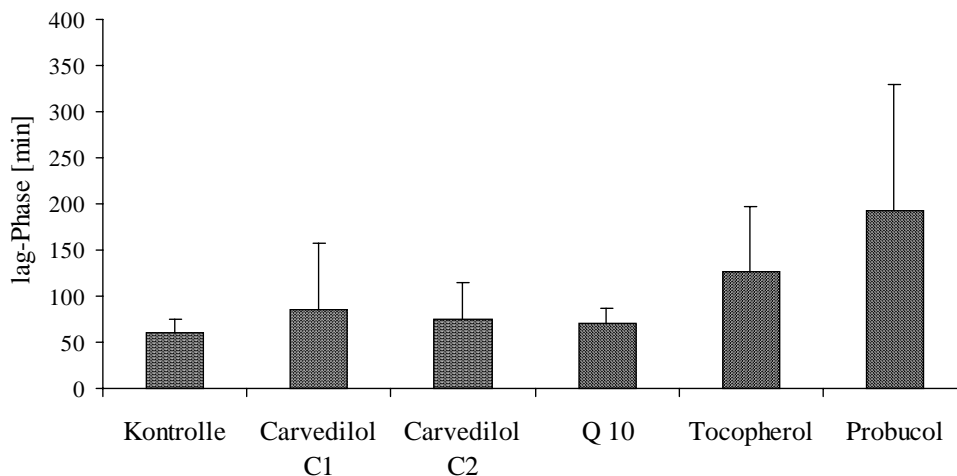


Abb. 4-21: Effekt verschiedener *in vivo* applizierter Antioxidantien auf die LDL-Oxidierbarkeit *in vitro* von Watanabe-Kaninchen (weibliche und männliche Tiere gemeinsam)

Angegeben sind die Mittelwerte \pm S. D. der einzelnen Gruppen. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug in der Carvedilol-2-gruppe $n = 8$, in allen anderen Gruppen $n = 10$.

Auf eine nach Geschlechtern getrennte Darstellung wurde verzichtet. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht wesentlich von den gezeigten, die Gruppengröße hätte sich dann aber auf vier bis sechs Tiere reduziert.

Die Bestimmung der *in vitro* LDL-Oxidierbarkeit wurde zu einem späteren Zeitpunkt an 20 weiteren männlichen Watanabe-Kaninchen mit einer *in vivo*-Applikationsmenge von 25 mg Carvedilol / Tag wiederholt. Das Ergebnis dazu ist in Tabelle 4-5 dargestellt und zeigt einen verbesserten Schutz des LDL in der *in vitro* Oxidation mit Kupfer durch die Carvedilol-Fütterung, der allerdings nicht signifikant war.

Tab. 4-5: Bestimmung der Oxidierbarkeit von LDL aus männlichen Watanabe-Kaninchen nach *in vivo* Applikation von Carvedilol (25 mg/Tag) (Mittelwerte \pm S.D.)

	Lag-Phase der LDL-Oxidation	Anzahl der Tiere
Kontroll-Gruppe	53,7 \pm 11,2 min (100%)	n = 9
Carvedilol-Gruppe	60,4 \pm 8,0 min (112%)	n = 11

Unterschied der Mittelwerte nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$)

4.4.2 Einfluß von fütterungsinduzierter Hypercholesterinämie in Neuseeland-Kaninchen auf die Antioxidative Kapazität und *in vitro* LDL-Oxidierbarkeit

In NZW-Kaninchen wurden die Effekte einer fütterungsinduzierten Hypercholesterinämie mit anschließender Regression auf die LDL-Oxidierbarkeit und die Antioxidative Kapazität des Plasma untersucht. Zusätzlich wurden in weiteren Arbeiten die atherosklerotischen Plaques untersucht, worauf in der Diskussion Bezug genommen wird.

Die Hypercholesterindiät wurde in den meisten Fällen gut toleriert. Drei Tiere aus verschiedenen Gruppen wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen, da ihre Bilirubinwerte über 10 mg/dl lagen.

Am Ende der Fütterungsphase (nach sechs Wochen) war der Cholesterinspiegel erwartungsgemäß am höchsten und fiel dann bis zur 21. Woche stark ab. Der Rückgang des Cholesteringehaltes dauerte dennoch bis in die 40. Woche hinein an und lag dann immer noch um das Doppelte über dem Ausgangswert (Tab.4-6).

Die lag-Phase der LDL-Oxidation verlängerte sich durch die sechs Wochen Cholesterinfütterung um über 100 %. Diese starke Verlängerung der lag-Phase hielt bis

zur 29. Woche an, um dann am Ende des Beobachtungszeitraumes (40. Woche) wieder signifikant auf den Ausgangswert der LDL-Oxidierbarkeit zurückzukehren (Tab. 4-6).

Dagegen war die Antioxidative Kapazität des Plasma nur zum Zeitpunkt des höchsten Cholesterinwertes (6. Woche) signifikant erhöht. In der anschließenden Regressionsphase, als auch der Cholesterinspiegel zwar zurückging, aber immer noch stark erhöhte Werte aufwies, fiel die Antioxidative Kapazität signifikant sogar unter den Ausgangswert ab.

Tab. 4-6: Zusammenstellung der gemessenen Parameter von über 6 Wochen lang cholesterinreich ernährten Neuseeland-Kaninchen mit anschließender Normalfutter-Phase über weitere 34 Wochen (Mittelwerte \pm S.D.)

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Dauer [Wochen]	0	6	14	21	29	40
Gesamtplasmacholesterin [mg/dl]	35 \pm 8	* 2779 \pm 795	* 1604 \pm 1161	* 349 \pm 318	100 \pm 142	71 \pm 159
Gesamtplasmaprotein [g/dl]	5.50 \pm 0.31	5.53 \pm 0.49	6.27 \pm 0.72	6.12 \pm 0.43	5.83 \pm 0.32	5.55 \pm 0.29
Antioxidative Kapazität TRAP [μ mol/l]	401 \pm 126	* 632 \pm 126	* 344 \pm 62	327 \pm 134	288 \pm 60	321 \pm 111
Lag-Phase der LDL- Oxidation [min]	24.3 \pm 5.9	* 52.9 \pm 11.5	56.2 \pm 13.7	67.3 \pm 21.4	48.1 \pm 21.1	* 24.6 \pm 3.9
n	10	14	10	9	9	10

*) $p < 0,05$ (t-Test, untersucht wurde die Differenz zur vorausgegangenen Messung)

4.5 Untersuchungen am Menschen

4.5.1 Effekt von Akutbelastung und Ausdauertraining auf LDL-Oxidierbarkeit und Parameter des oxidativen Stresses

Es wurde sowohl der Einfluß einer einmaligen als auch einer regelmäßigen körperlichen Belastung bei Untrainierten auf die Oxidierbarkeit von LDL untersucht.

Zur Beurteilung des Trainingserfolges werden zunächst die Ergebnisse der Leistungsparameter kurz vorgestellt (*PD Dr. Heitkamp, persönliche Mitteilung*): Als maximale Leistungsparameter wurden die erreichte Geschwindigkeit bei Abbruch der Belastung, die maximale- und die relative Sauerstoffaufnahme-fähigkeit und die höchste Laktat-konzentration gemessen. Alle Parameter veränderten sich nach 8 Wochen signifikant und das Ziel einer Verbesserung der aeroben Ausdauerleistungsfähigkeit wurde erreicht. Als Leistungsparameter an der anaeroben Schwelle wurden die Geschwindigkeit bei 4 mmol/l Laktat, die maximale- und die relative Sauerstoffaufnahme-fähigkeit und die Herzfrequenz gemessen. Alle Parameter, mit Ausnahme der Herzfrequenz an der anaeroben Schwelle, verbesserten sich ebenfalls signifikant.

Im folgenden werden dann die Ergebnisse der LDL-Oxidation und Parameter des oxidativen Stresses dargestellt:

- Gehalt an mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (MDA-Konzentration)
- Auswirkungen auf die LDL-Oxidierbarkeit
- Antioxidative Kapazität im Plasma

Der Gehalt an mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (MDA-Konzentration) wurde vor und nach Laufbandbelastung als Maß für die Lipidperoxidation im Plasma bestimmt. Bei neun der elf weiblichen Probanden erhöhte sich die MDA-Konzentrationen vor dem Ausdauertraining unmittelbar durch die Belastung. Nach dem Ausdauertraining gab es nur noch bei sieben der elf Teilnehmerinnen einen belastungsinduzierten Anstieg und bei drei zeigte sich keine Veränderung. Bei den männlichen Probanden hingegen war die durchschnittliche MDA-Konzentration direkt nach Belastungsabbruch geringer als in Ruhe und erst 15 Minuten danach höher. Bei allen männlichen Probanden fiel die MDA-Konzentration des Ruhewertes nach dem Ausdauertraining niedriger aus (Daten übernommen, Tab. 4-7).

Tab. 4-7: Einfluß von kurzzeitiger körperlicher Belastung und Ausdauertraining auf die Malondialdehyd-Konzentrationen

*A, D: in Ruhe B, E: direkt nach Belastungsabbruch C, F: 15 Minuten nach Belastungsabbruch
(gemessen in der Med. Klinik Abt. Sportmedizin)*

	Vor dem Ausdauertraining			Nach dem Ausdauertraining		
	A	B	C	D	E	F
Alle Probanden	0,528 ± 0,519	0,578 ± 0,488	0,581 ± 0,612	0,450 ± 0,497	0,547 ± 0,633	0,538 ± 0,460
Frauen n = 10	0,323 ± 0,433	* 0,422 ± 0,433	0,395 ± 0,359	0,404 ± 0,539	* 0,591 ± 0,735	0,439 ± 0,415
Männer n = 5	0,978 ± 0,417	0,92 ± 0,463	0,990 ± 0,612	0,552 ± 0,426	0,450 ± 0,367	0,758 ± 0,523

*) $p < 0,05$ (Statistik: Wilcoxon-Paardifferenz; Differenz der Werte vor und direkt nach Belastung)

Die Auswirkungen auf die LDL-Oxidierbarkeit stellten sich wie folgt dar: Weder durch das Ausdauertraining noch durch Belastung auf dem Laufband konnte eine deutliche Verschiebung der lag-Phase ermittelt werden (Abb. 4-22).

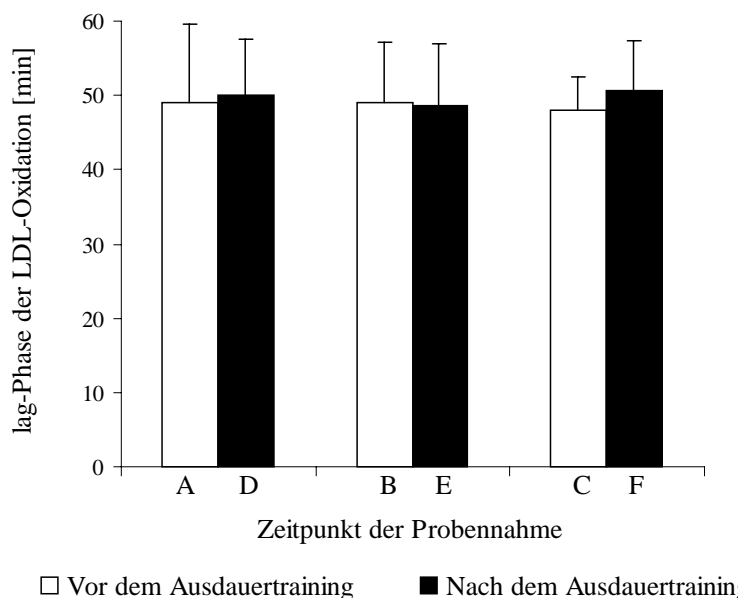


Abb. 4-22: Einfluß von kurzzeitiger körperlicher Belastung und Ausdauertraining auf die LDL-Oxidierbarkeit

Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.D. der lag-Phase der 15 Teilnehmer zu den verschiedenen Zeitpunkten. A, D = in Ruhe; B, E = direkt nach Belastungsabbruch; C, F = 15 Minuten nach Belastungsabbruch; A, B, C = vor dem Ausdauertraining; D, E, F = nach dem Ausdauertraining

Die Werte der einzelnen Probanden zeigten bei den verschiedenen Meßzeitpunkten große Streuungen. Sie werden als Einzelwerte in Tabelle 4-8 aufgeführt. Vor dem Ausdauertraining führte Belastung bei sieben der 15 Probanden zu einer Verkürzung lag-Phase, bei einem Teilnehmer blieb die LDL-Oxidierbarkeit gleich und bei den restlichen sieben verlängerte sie sich. Nach dem Ausdauertraining zeigten fünf Probanden nach Belastungsabbruch eine verkürzte LDL-Oxidierbarkeit, bei zwei gab es keine Veränderung und acht Teilnehmer zeigten eine Verlängerung der LDL-Oxidierbarkeit.

Ein Vergleich der Ruhewerte vor und nach dem Ausdauertraining zeigte ebenfalls kein einheitliches Bild für die LDL-Oxidierbarkeit. Bei sieben bzw. sechs Probanden war die lag-Phase verkürzt bzw. verlängert, bei zwei gab es keine Veränderung.

Tab. 4-8: Einzelwerte der lag-Phase bei der Oxidation von LDL

A, D: in Ruhe B, E: direkt nach Belastungsabbruch

C, F: 15 Minuten nach Belastungsabbruch

	Proband Nr.	Vor dem Ausdauertraining			Nach dem Ausdauertraining		
		A	B	C	D	E	F
Weibl. Teilnehmer	1	33	39	40	52	48	49
	2	38	52	40	52	55	56
	3	43	44	45	44	44	48
	4	46	45	46	46	46	46
	5	41	40	35	41	42	52
	6	46	51	49	43	45	49
	7	52	52	52	49	51	52
	8	46	48	51	40	44	38
	9	53	50	51	43	48	51
	10	78	69	70	59	57	60
Männl. Teilnehmer	1	47	51	52	73	53	52
	2	46	51	49	47	45	54
	3	54	53	53	51	53	56
	4	45	44	45	40	43	37
	5	66	62	58	50	46	61

Die maximale Extinktion, die die Menge der aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstandenen Diene widerspiegelt, veränderte sich sowohl durch das Ausdauertraining als auch, allerdings nur geringfügig, durch Belastung auf dem Laufband. Nach dem Ausdauertraining wurden kleinere Werte gemessen, die Belastung erhöhte den Gehalt an Dienen. Die Mittelwerte dazu sind in Abbildung 4-23 dargestellt, Einzeldarstellungen folgen in den Abbildungen 24 und 25.

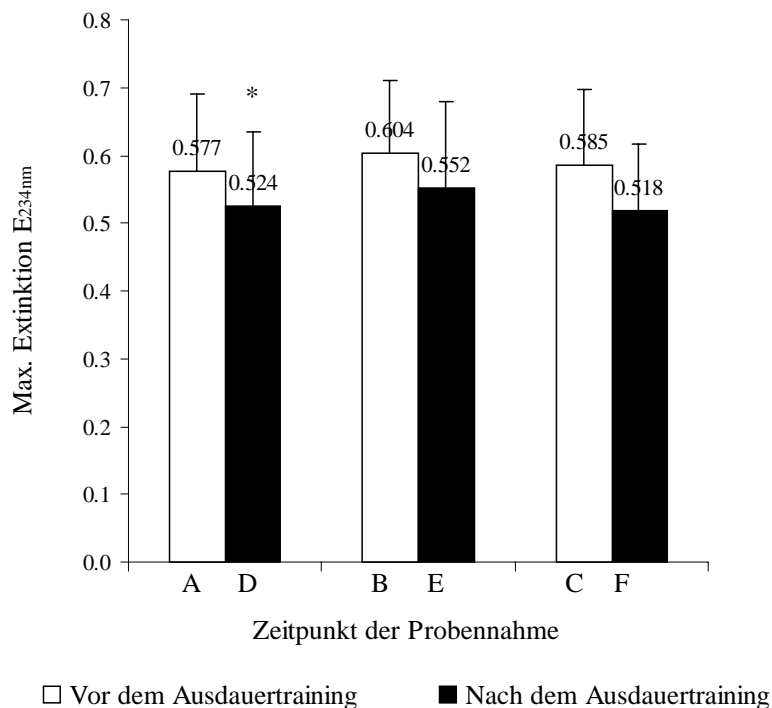


Abb. 4-23: Auswirkung kurzzeitiger körperlicher Belastung und Ausdauertraining auf die maximale Extinktion konjugierter Diene

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. der maximalen Extinktion der 15 Teilnehmer zu den verschiedenen Zeitpunkten. A, D = in Ruhe; B, E = direkt nach Belastungsabbruch; C, F = 15 Minuten nach Belastungsabbruch; A, B, C = vor dem Ausdauertraining; D, E, F = nach dem Ausdauertraining * $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen mit Differenz der Werte in Ruhe vor und nach dem Ausdauertraining)

Nach dem Ausdauertraining wurde in Ruhe bei 12 der 15 Probanden ein geringerer Gehalt an konjugierten Dienen bei der LDL-Oxidation gemessen (Abb. 4-24). Diese Abnahme der maximalen Extinktion war für alle Probanden signifikant niedriger als vor dem Ausdauertraining ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test für Paardifferenzen mit Differenz der Werte in Ruhe vor und nach dem Ausdauertraining).

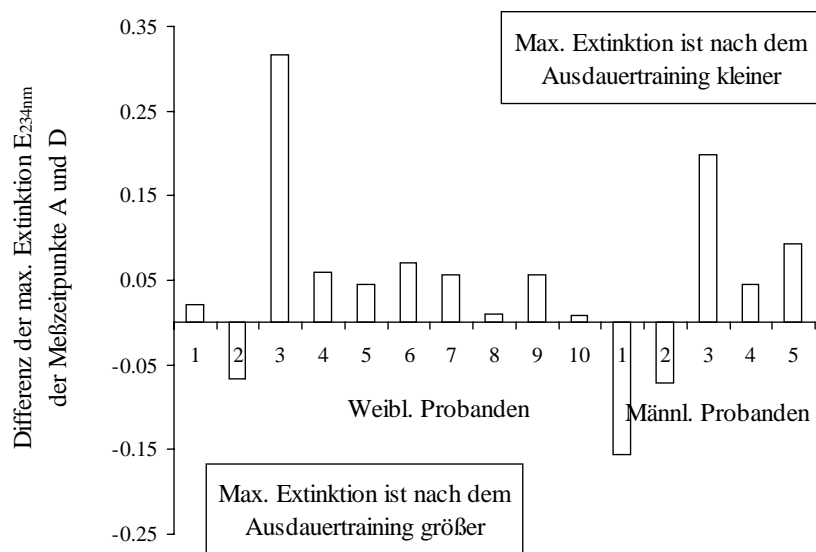


Abb. 4-24: Einfluss von Ausdauertraining auf die maximale Extinktion der konjugierten Diene (Einzeldarstellung)

Dargestellt sind die Differenzen der maximalen Extinktion der Zeitpunkte A und D (Ruhewerte).

Direkt nach Belastungsabbruch war die Bildung konjugierter Diene sowohl vor dem Ausdauertraining als auch danach am größten. Der Anstieg der maximalen Extinktion durch die Laufbandbelastung erwies sich allerdings nur für die weiblichen Probanden von Zeitpunkt D zu E, also nach dem Ausdauertraining, als signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test für Paardifferenzen mit Differenz der Werte in Ruhe und nach Belastungsabbruch nach dem Ausdauertraining).

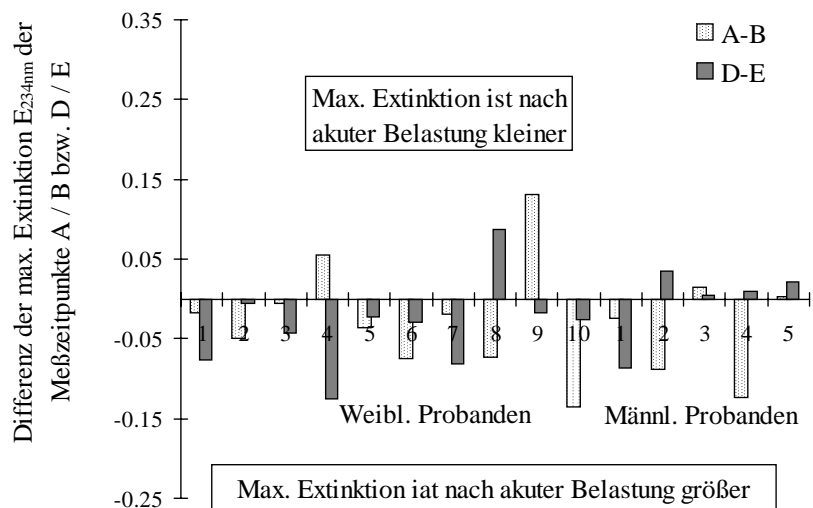


Abb. 4-25: Einfluss von körperlicher Belastung auf die Bildung konjugierter Diene (Einzeldarstellung)

Dargestellt sind die Differenzen der maximalen Extinktion der Zeitpunkte A und B bzw. D und E.

Das Ausdauertraining hatte in der vorliegenden Trainingsstudie leichte Auswirkungen auf die Antioxidative Kapazität des Plasma. Das Plasma der meisten Probanden zeigte vor dem Ausdauertraining höhere Werte für die Antioxidative Kapazität (Abb. 4-26).

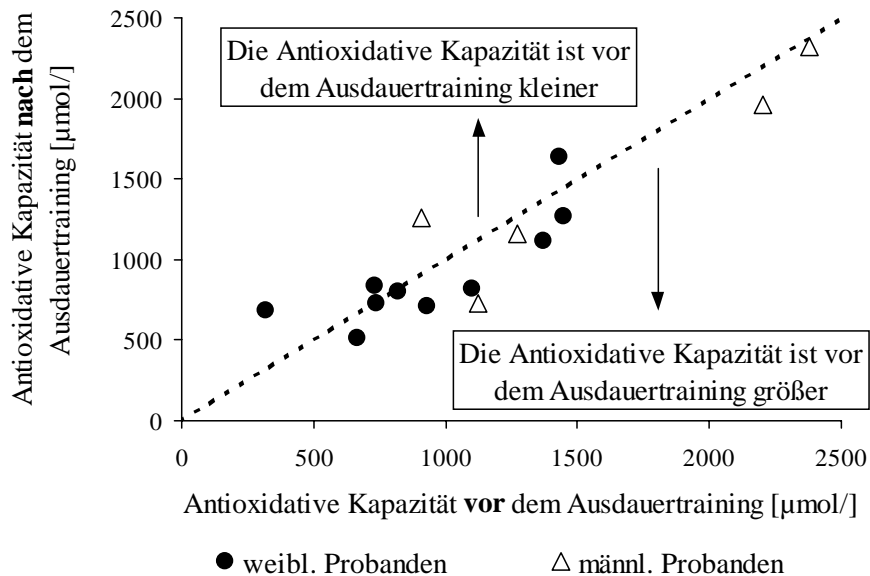


Abb. 4-26: Einfluß von Ausdauertraining auf die Antioxidative Kapazität des Plasma (Einzelwerte)

Dargestellt sind die Zeitpunkte A und D (Ruhewerte).

Erläuterung zur Darstellungsweise: Punkte, die auf der gestrichelten Winkelhalbierenden liegen, weisen vor und nach dem Ausdauertraining denselben Wert auf. Befindet sich ein Punkt unterhalb der gestrichelten Linie, war der Wert für die Antioxidative Kapazität vor dem Ausdauertraining größer als nach dem Ausdauertraining. Für Punkte darüber gilt der umgekehrte Fall.

Zusätzlich wurde auch die Frage untersucht, ob sich eine Beziehung zwischen der lag-Phase der kupferinduzierten LDL-Oxidation und der Antioxidativen Kapazität des Plasma herstellen läßt. Diese Frage muß sowohl für die Trainingsgruppe als auch für die Kontrollgruppe der Patienten (4.5.2) negativ beantwortet werden. Es ließ sich bei beiden untersuchten Gruppen kein Zusammenhang zwischen der lag-Phase der kupferinduzierten LDL-Oxidation und der Antioxidativen Kapazität des Plasmas feststellen (Abb. 4-27 a und b).

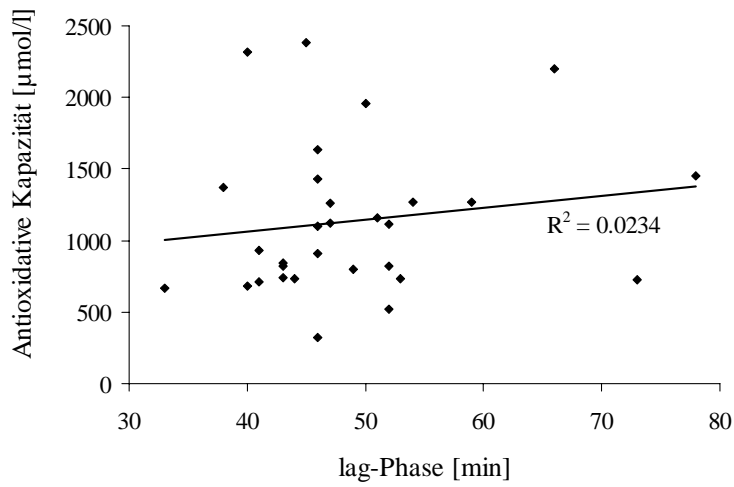


Abb. 4-27 a
Trainingsgruppe

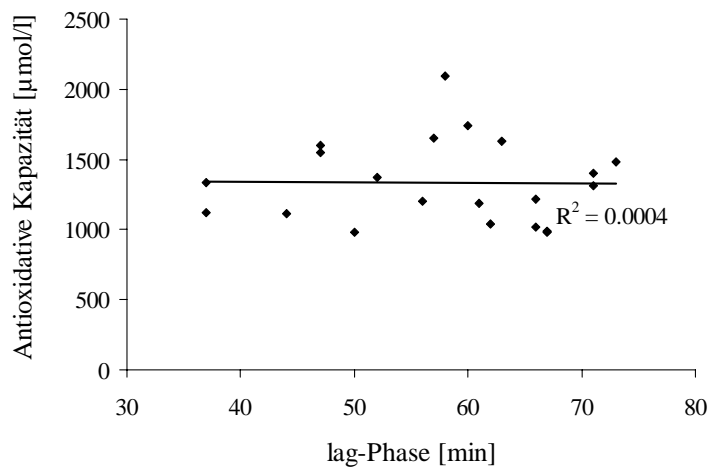


Abb. 4-27 b
Kontrollgruppe zu Koronarpatienten

Abb. 4-27: Zusammenhang zwischen lag-Phase der LDL-Oxidation und Antioxidativer Kapazität des Plasma

a) bei der Trainingsgruppe

b) bei der Kontrollgruppe der Koronarpatienten (siehe 4.5.2)

4.5.2 Antioxidative Kapazität und Fluorescamin-Titration von LDL im Plasma von Koronarpatienten

Die Antioxidative Kapazität des Plasma wurde bei einer Gruppe von Koronarpatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht. Ferner wurde die Aminogruppenbestimmung in LDL durch Fluorescamin-Titration im Plasma durchgeführt.

Die Patienten wurden in folgende Gruppen eingeteilt: Gruppe I und II bestanden aus Patienten, bei denen Koronare Herzkrankheit (KHK) mittels Herzkatheter nachgewiesen bzw. ausgeschlossen (Gruppe II) worden war. In Gruppe III wurden sonstige kardiologische Patienten zusammengefaßt, bei denen kein Verdacht auf KHK bestand und keine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt worden war. Das jeweilige Durchschnittsalter, die Zusammensetzung der Gruppen und die medikamentöse Behandlung der Patienten ist in Tabelle 4-9 zusammenfassend dargestellt.

Als Kontrollgruppe nahmen zehn, nach eigenen Angaben gesunde Männer und elf ebenfalls nach eigenen Angaben gesunde Frauen mit einem Durchschnittsalter von 35,2 Jahren an den Untersuchungen teil.

Tab. 4-9 a + b: Zusammensetzung und Medikation der Patientengruppen

Gruppe I bestand aus Patienten mit diagnostizierter Koronarer Herzkrankheit und Gruppe II aus Patienten ohne KHK (Nachweis durch Herzkatheter). Bei Patienten der Gruppe III bestand kein Verdacht auf KHK und es war keine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt worden.

Tab. 4-9 a: Zusammensetzung der Patientengruppen

	Gruppe I KHK nachgewiesen	Gruppe II KHK mit Herzkatheter ausgeschlossen	Gruppe III sonstige kardiolog. Patienten, kein Herzkatheter
Anzahl n	16	4	4
davon m / w	12 / 4	1 / 3	4 / 0
Durchschnittsalter	59,1	55,5	67,3

Tab. 4-9 b: *Medikation des Patientenkollektivs*

Medikamentengruppe		Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III
β- Blocker	Metoprolol(11), Carvedilol(3), Celiprolol(2)	13	2	1
Thrombozyten- aggregationhemmer	Acetylsalicylsäure(14)	14	0	0
ACE-Hemmer	Enalapril(6), Rampiril(2), Captopril(1)	6	1	2
CSE-Hemmer	Atorvastatin(4), Fluvastatin(1), Simvastatin(1)	6	0	0
Diuretikum	Xipamid(5), +Furosemid(1) bzw. Spironolacton(1)	5	0	1
Nitrate	Isosorbidmononitrat(2), Molsidomin(1)	3	0	0
Herzglykoside	Digitoxin(3), Acetyldigoxin(2)	2	2	1

Die Ergebnisse der Blutuntersuchungen im Zentrallabor sind in den Abbildungen 4-28 und 4-29 und in Tabelle 4-10 am Ende des Kapitels als Mittelwerte angegeben.

Bei der Kontrollgruppe lagen alle Mittelwerte der laborchemischen Untersuchungen in den vom Zentrallabor angegebenen Referenzbereichen.

Die HDL-Cholesterin-Mittelwerte der vier Gruppen befanden sich innerhalb des Referenzwertes, wobei sich der höchste Wert, und damit in diesem Fall der Beste, bei der Kontrollgruppe fand. Für alle anderen Parameter des Lipidstoffwechsels wies Gruppe I mit nachgewiesener KHK die höchsten Mittelwerte auf, die alle, wenn auch zum Teil geringfügig, oberhalb des Referenzbereiches lagen. Bei Gruppe II und III wurde der Referenzwert der Triglyceridkonzentration überschritten, bei Gruppe III waren außerdem noch die Werte für VLDL erhöht.

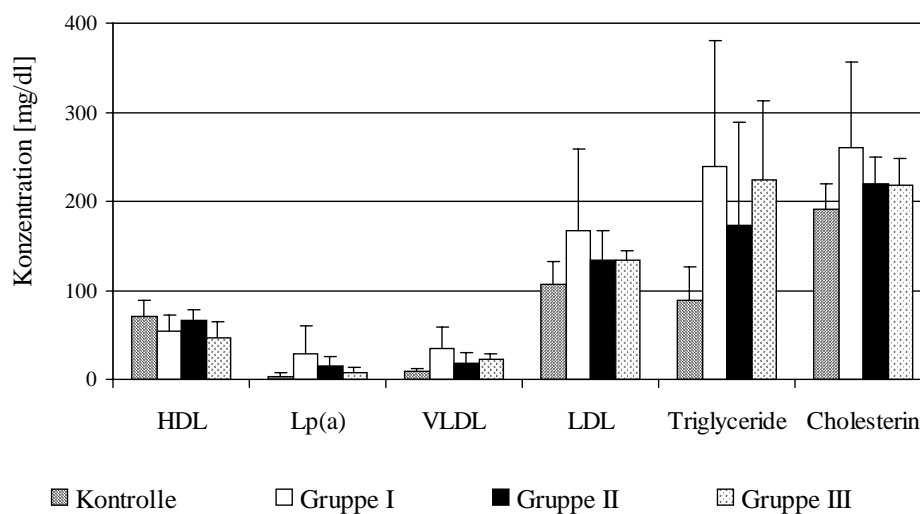


Abb. 4-28: Laborchemische Parameter des Lipidstoffwechsels

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S. D. der vier Gruppen: Kontrolle, Gruppe I (Patienten mit nachgewiesener KHK), Gruppe II (KHK ausgeschlossen) und Gruppe III (ohne KHK Verdacht).

Die durchschnittlichen Eiweiß-, Kreatinin- und Harnsäurekonzentrationen lagen für die Kontrollgruppe und die Patientengruppen I und II innerhalb des vorgegebenen Referenzbereiches. Bei Gruppe III überschritten die Kreatinin- und die Harnsäurekonzentration den Referenzwert. Letztere war bei Gruppe I und III im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 4-29).

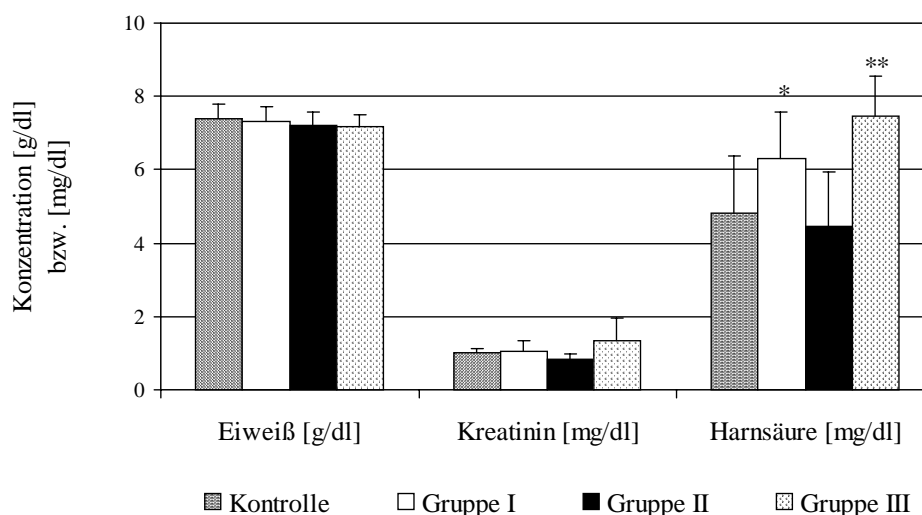


Abb. 4-29: Eiweiß-, Kreatinin- und Harnsäurekonzentrationen im Blut

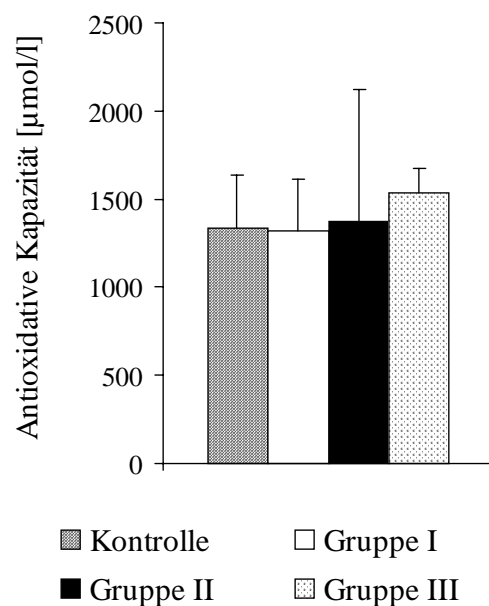
Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S. D. aller vier Gruppen. Für Harnsäure ist außerdem die Statistik (bezogen auf Kontrolle) angegeben: *t*-Test ** $p = 0,001$, * $p = 0,1$

Die Bestimmung der Antioxidative Kapazität des Plasma ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten (Abb. 30). Bei den Patienten ohne KHK-Verdacht (Gruppe III) war die Antioxidative Kapazität im Durchschnitt am größten und unterschied sich am stärksten von der Kontrollgruppe (t-Test, $p = 0,5$).

Für die beiden anderen Gruppen konnte kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Allerdings ist zu beachten, daß Harnsäure einen nicht unerheblichen Beitrag zur Antioxidativen Kapazität des Plasma leistet (ungefähr 30 %, *Wayner et al. 1985*), und daß Gruppe I und Gruppe III signifikant höhere Harnsäurekonzentrationen aufweisen als die Kontrolle (Abb. 4-29). Wird dies in Betracht gezogen, so ist davon auszugehen, daß evtl. der „verbleibende Rest“ der Antioxidativen Kapazität für die Patienten mit nachgewiesener KHK (Gruppe I) deutlich niedriger ausfällt als zunächst angenommen.

Abb. 4-30: Antioxidative Kapazität des Plasmas in den untersuchten Gruppen

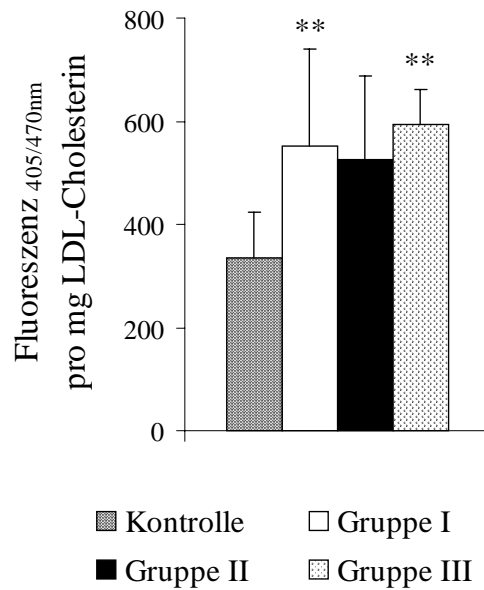
Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S. D. der vier Gruppen: Gruppe I Patienten mit nachgewiesener KHK, Gruppe II KHK ausgeschlossen und Gruppe III kein KHK-Verdacht.



Die Bestimmung der Aminogruppen in LDL durch Fluorescamin-Titration im Plasma brachte einen deutlichen Unterschied zwischen der Kontrolle und allen Patienten hervor (t-Test, $p = 0,001$). Der aus der Fluoreszenzmessung des isolierten LDL gewonnene Wert bezogen auf den LDL-Cholesteringehalt war bei Gruppe III am höchsten, gefolgt von Gruppe I und II. Der Wert für die Kontrollgruppe fiel dagegen deutlich niedriger aus (Abb. 4-31).

Abb. 4-31 : Fluorescamin-Titration von LDL im Plasma

Fluoreszenz_{405/470nm} des LDL bezogen auf den Cholesteringehalt nach Reaktion von Plasma mit Fluorescamin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S. D. der vier Gruppen: Gruppe I Patienten mit nachgewiesener KHK, Gruppe II KHK ausgeschlossen und Gruppe III kein KHK-Verdacht. *t*-Test (bezogen auf Kontrolle): ** $p = 0,001$,



Zusätzlich wurde bei der Kontrollgruppe die lag-Phase der kupferinduzierten LDL-Oxidation bestimmt. Die Korrelation des Wertes der Fluorescamin-Titration mit der lag-Phase der LDL-Oxidation führte zu dem in Abbildung 4-32 dargestellten Ergebnis. Je länger die lag-Phase der LDL-Oxidation war, desto weniger Fluorescamin bezogen auf Cholesterin war an freie Aminogruppen des LDL gebunden worden. Das heißt, je kleiner der ApoB / Cholesterinquotient war, desto besser war das LDL vor Oxidation geschützt.

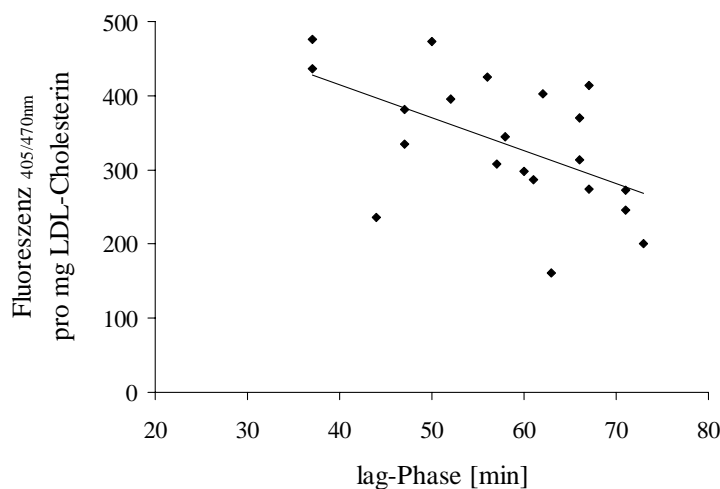


Abb. 4-32: Zusammenhang zwischen lag-Phase der LDL-Oxidation und Fluorescamin-Titration von LDL im Plasma

Dargestellt sind die Werte der Kontrollgruppe. Die LDL-Oxidation wurde bei den Patientengruppen nicht durchgeführt.

Es konnte wie bei den Ausdauersportlern (Abb. 4-27 a) kein Zusammenhang zwischen lag-Phase der LDL-Oxidation und der Antioxidativen Kapazität des Plasma festgestellt werden (Abb. 4-27 b) (dargestellt in 4.5.1).

Tab. 4-9: Laborchemische Parameter (Mittelwerte)

Parameter		Kontrolle	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III
			KHK nachgewiesen	KHK ausgeschlossen	sonstige kardiol. Patienten, kein Herzkatheter
HDL	[mg/dl]	71,4	53,9	66,5	46,0
Lp(a)	[mg/dl]	3,2	29,3 ⁺	15,8	7,3
VLDL	[mg/dl]	9,0	34,6 ⁺	18,3	22,0 ⁺
LDL	[mg/dl]	107,4	167,6 ⁺	133,3	133,3
Triglyceride	[mg/dl]	88,4	239,6 ⁺	173,0 ⁺	224,5 ⁺
Cholesterin	[mg/dl]	191,0	259,6 ⁺	219,0	217,5
Eiweiß	[g/dl]	7,4	7,3	7,2	7,2
Kreatinin	[mg/dl]	1,0	1,1	0,9	1,4 ⁺
Harnsäure	[mg/dl]	4,8	6,3	4,5	7,5 ⁺
Antioxidative Kapazität	[μ mol/l]	1334,0	1320,0	1370,9	1537,4
Fluoreszenz pro mg Cholesterin		335,7	552,2	525,5	593,7

⁺: außerhalb des Referenzbereiches

<i>Referenzbereiche:</i>	<i>HDL-Cholesterin</i>	<i>Männer / Frauen</i>	<i>> 35 / 45 mg/dl</i>
	<i>Lipoprotein(a)</i>		<i>< 25 mg/dl</i>
	<i>VLDL-Cholesterin</i>		<i>< 20 mg/dl</i>
	<i>LDL-Cholesterin</i>		<i>< 160 mg/dl</i>
	<i>Triglyceride (nüchtern)</i>		<i>< 150 mg/dl</i>
	<i>Cholesterin, gesamt</i>	<i><40 Jahre</i>	<i>< 230 mg/dl</i>
		<i>>40 Jahre</i>	<i>< 250 mg/dl</i>
	<i>Eiweiß, gesamtes</i>		<i>6,5 - 8,5 g/dl</i>
	<i>Kreatinin</i>		<i>0,5 - 1,2 mg/dl</i>
	<i>Harnsäure</i>	<i>Männer, Frauen -postmenopausal</i>	<i>3,4 - 7,0 mg/dl</i>
		<i>-prämenopausal</i>	<i>2,4 - 5,7 mg/dl</i>

4.6 Beeinflussung der zellulären Calciumhomöostase durch LDL und Angiotensin II

4.6.1 Akute Wirkung von kurzzeitig oxidiertem LDL auf glatte Muskelzellen

Um den akuten Effekt von nativem und oxidiertem LDL auf die Calciumhomöostase in A7r5-Zellen zu untersuchen, wurden Fluoreszenzmessungen mit Fura-2 durchgeführt. Das LDL wurde 3-4 Stunden oxidiert und am selben Tag verwendet.

Sowohl natives als auch oxidiertes LDL erhöhte akut appliziert die intrazelluläre Calciumkonzentration, wobei der Anstieg konzentrationsabhängig war. Als Beispiele für den Verlauf der Fura-messungen sind in Abbildung 4-33 a und b die Ergebnisse der Applikation von nativem und oxidiertem LDL zu A7r5-Zellen mit jeweils 32 µg LDL-Protein / ml dargestellt.

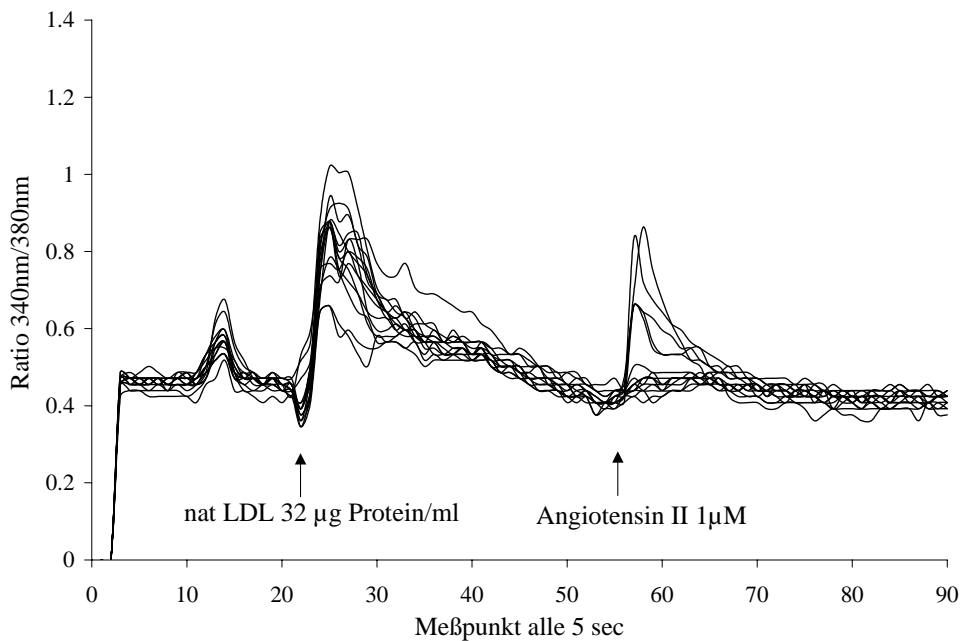


Abb. 4-33 a

Abb. 4-33 a: Akute Wirkung von nativem LDL auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in glatten Muskelzellen (anschließend wurde zusätzlich mit Angiotensin II stimuliert)

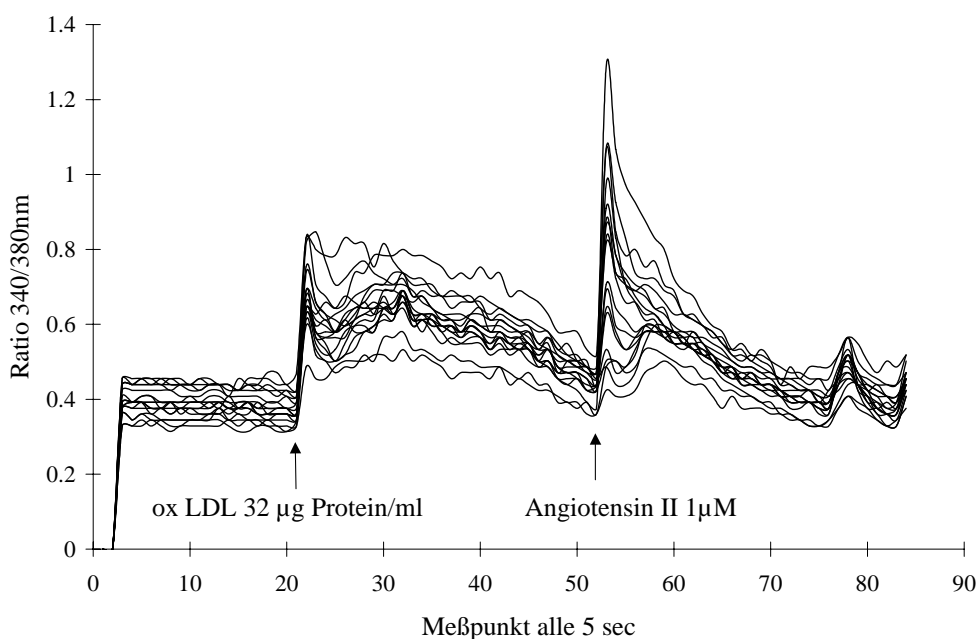


Abb. 4-33 b

Abb. 4-33 b: Akute Wirkung von kurzzeitig oxidiertem LDL auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in glatten Muskelzellen (anschließend wurde zusätzlich mit Angiotensin II stimuliert)

Wird allein der transiente maximale Anstieg der Ratio $_{340/380nm}$ betrachtet, erhöhte in unseren Versuchen natives LDL kurzzeitig die intrazelluläre Calciumkonzentration stärker als oxidiertes LDL (Tab. 4-11).

Tab. 4-11: Effekt von nativem und kurzzeitig oxidiertem LDL auf die intrazelluläre Calciumkonzentration (Maximalwert der Ratio 340nm/380nm)

Angegeben sind die Mittelwerte der Ratio $_{340/380nm}$ -Zunahmen \pm S. D. bei der Fura-messung. In Klammern ist die jeweilige Anzahl untersuchter Zellen und eingesetzter Kulturen angegeben (Zellzahl; Anzahl der Kulturen).

	Natives LDL	Oxidiertes LDL
16 µg Protein / ml	0,205 \pm 0,15 (49; 2)	0,18 \pm 0,04 (27; 2)
32 µg Protein / ml	0,33 \pm 0,06 (53; 4)	0,24 \pm 0,09 (30; 2)

Wird aber berücksichtigt, daß bei oxidiertem LDL ein Plateaueffekt auftritt, so zeigte eine Auswertung der Area unter der Kurve (AUC) eine um 50 % größere Wirkung durch oxLDL als durch natives LDL (Abb. 4-34).



Abb. 4-34: Vergleich der Fläche unter den Kurven (AUC) bei Applikation von nativem und oxidiertem LDL

Dargestellt sind als Näherung die Mittelwertskurven aus Abb. 4-33 a + b. Die Fläche unter der Kurve ist bei oxLDL 1,5mal größer als bei natLDL.

Nachdem die intrazelluläre Calciumkonzentration wieder das Ausgangsniveau erreicht hatte, wurde Angiotensin II appliziert. Es ließen sich Unterschiede im intrazellulären Calciumanstieg in Abhängigkeit von der Vorbehandlung feststellen:

Wurde zunächst oxidiertes LDL auf die glatten Muskelzellen appliziert und anschließend AT II, so war der durch AT II ausgelöste Calciumanstieg größer als wenn zuerst natives LDL appliziert worden war. Dieser Effekt ist in Abbildung 4-33 sichtbar, trat aber nicht in allen Experimenten so deutlich auf.

4.6.2 Chronische Wirkung von lang oxidiertem LDL auf glatte Muskelzellen

Die Ergebnisse einer 20stündigen Inkubation der A7r5-Zellen mit jeweils zwei Konzentrationen nativem und lang oxidiertem LDL bei 37°C sind in Abbildung 4-35 im Vergleich zu LDLfreien Kontrollzellen dargestellt. Im Anschluß an die Inkubationsphase wurden die Zellen nach Beladung mit Fura-2 durch Angiotensin II stimuliert. Alle Zellen zeigten eine Reaktion auf die AT II-Applikation. Das durch Angiotensin II ausgelöste Calciumsignal war mit den Zellen, die mit der höheren Konzentration oxidiertem LDL behandelt wurden, stärker als das Signal mit den unbehandelten Kontrollzellen (=Vergleich).

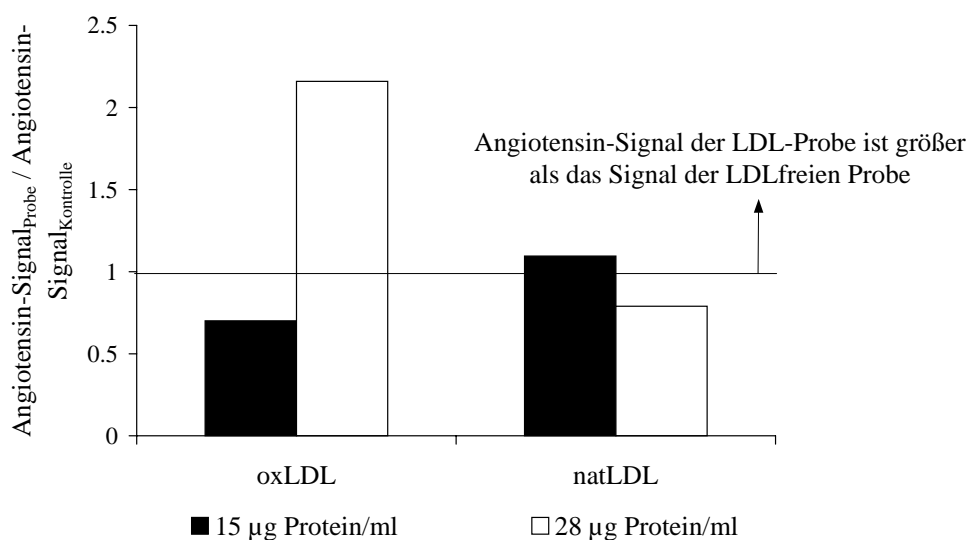


Abb. 4-35: Inkubation von A7r5 mit LDL über 20 h und anschließender Stimulierung mit Angiotensin II

Die Zellen wurden mit nativem und oxidiertem LDL über 20h inkubiert bzw. in LDLfreiem Zustand belassen. Die Höhe des durch AT II ausgelösten Calciumsignals der behandelten Proben wurde in Beziehung zum AT II-Signal der LDLfreien Probe gesetzt. Bei einem Wert <1 löst AT II in den unbehandelten Zellen eine stärkere Calciumfreisetzung aus als in den behandelten Zellen. Bei einem Wert >1 wird in den behandelten Zellen durch AT II eine stärkere Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ausgelöst. Dargestellt sind die Mittelwerte.

Anzahl der verwendeten Zellen und Kulturen (Zellzahl; Anzahl der Kulturen):

	Natives LDL	Oxidiertes LDL
15 µg Protein / ml	28; 2	26; 2
28 µg Protein / ml	39; 3	60; 4

4.6.3 Wirkung von Angiotensin II und AT-1-Rezeptorblockade auf glatte Muskelzellen

Angiotensin II induzierte an glatten Muskelzellen eine wiederholbare Erhöhung cytoplasmatischer Calciumionen und führte damit zu einem Calcium-Fluoreszenzsignal mit Fura-2. Dieses Signal wurde durch eine von Valsartan ausgelöste AT1-Rezeptorblockade unterdrückt (Abb. 4-36 a + b).

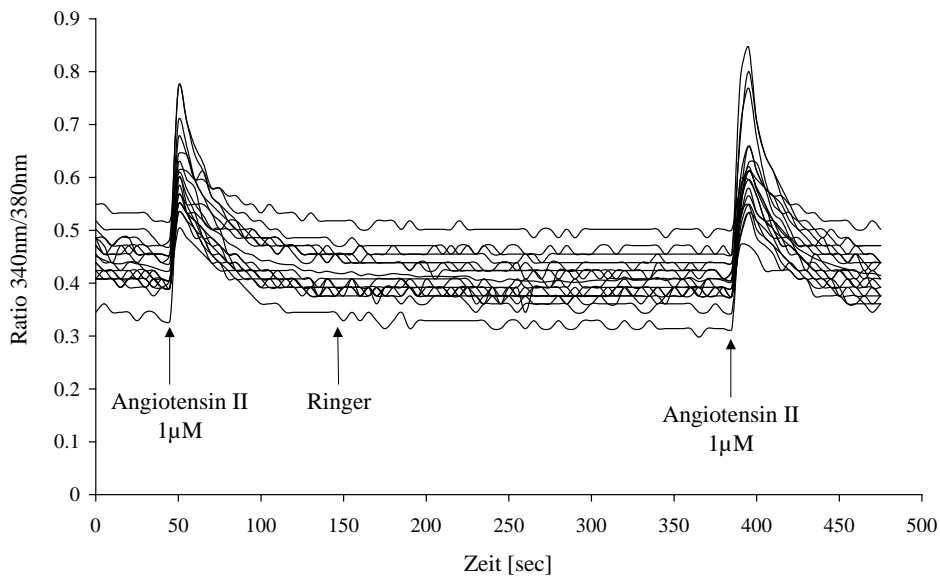


Abb. 4-36 a

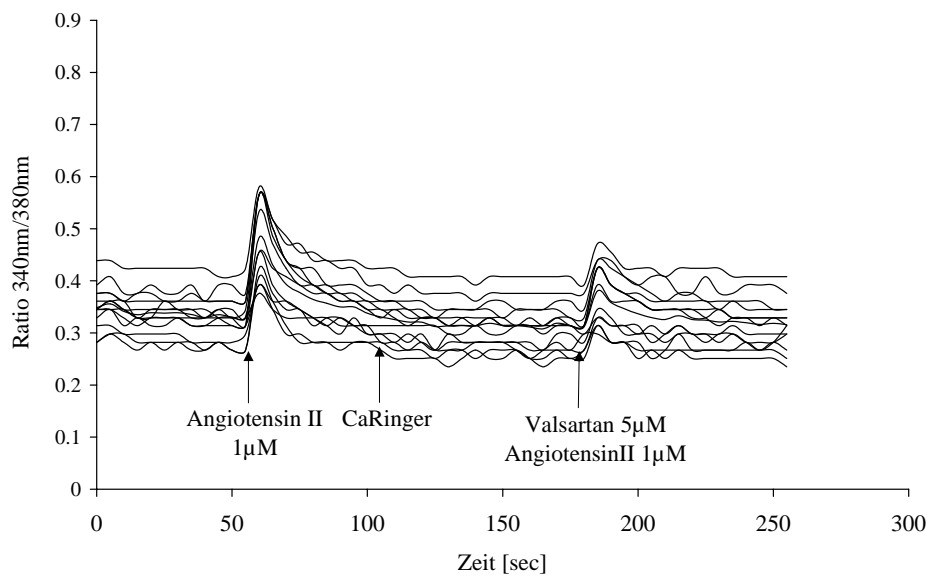


Abb. 4-36 b

Abb. 4-36 : Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration in glatten Muskelzellen bei Stimulation mit Angiotensin II mit (b) und ohne (a) AT1-Rezeptorblockade

In Abbildung 4-37 sind die Ergebnisse aus zwölf Versuchen zur Stimulation von glatten Muskelzelle mit Angiotensin II und direkter AT1-Rezeptorblockade zusammengefaßt. Man findet eine Hemmung um ca. 40 %, die allerdings nicht signifikant war.

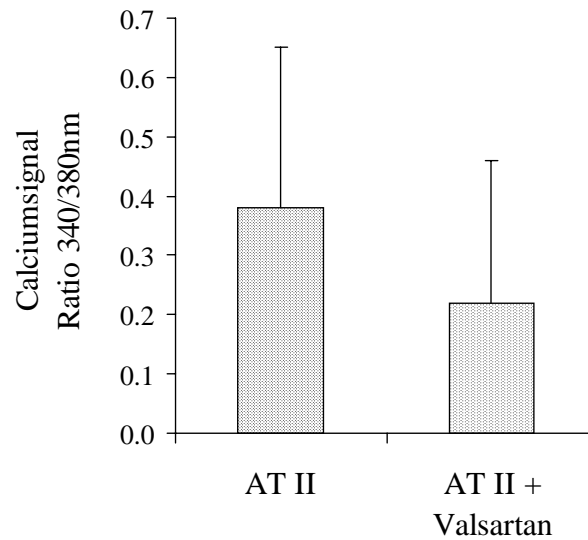


Abb.4-37: Effekt von AT 1-Rezeptor Hemmung auf AT II induziertes Calciumsignal (Valsartan wurde direkt mit AT II appliziert)

Die Blockade der AT 1-Rezeptoren führte zu einem geringeren Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (n=12 Kulturen; Mittelwerte ± S. D.).

5. Diskussion

5.1 Untersuchungen zur oxidativen Modifizierung von LDL

Oxidiertes LDL rückte in den letzten zehn Jahren verstärkt in den Mittelpunkt der Ursachenforschung über den Pathomechanismus der Atherosklerose (*Steinberg et al. 1989, Ylä-Herttuala 1998*). Die vor allem in *in vitro* Studien gefundenen atherogenen Effekte von oxidiertem LDL stützen die LDL-Oxidationshypothese (*Henriksen et al. 1981, Parthasarathy et al. 1992*). Dazu gehört u. a., daß oxLDL rasch von Makrophagen aufgenommen wird und durch die Bildung von Schaumzellen einen wichtigen Schritt in der Atherogenese einleitet (*Steinberg 1997*). Außerdem wirkt oxidiertes LDL zytotoxisch und immunogen, es hemmt die endotheliale Gefäßrelaxation und fördert den Gerinnungsablauf (*Penn und Chisolm 1994*). Allein diese Auswahl macht deutlich, welche zentrale Rolle diesen oxidativ veränderten Partikeln in der Pathogenese der Atherosklerose zukommen kann.

Ein Modell der LDL-Oxidationsreaktion wurde in der *in vitro* Oxidation von isoliertem LDL mit Kupferionen gefunden (*Esterbauer et al. 1989*). Bereits die Gegenwart geringer Mengen Kupferionen katalysiert die Oxidation von LDL und führt zu fortschreitenden Schädigungen (*Kleinveld et al. 1992, Puhl et al. 1994*). Das auf diese Weise veränderte LDL zeigt ein nahezu identisches Muster der entstandenen Produkte wie das durch Endothelzellen oxidierte LDL (*Esterbauer und Ramos 1995*). Außerdem könnte dieser Prozeß auch *in vivo* eine Rolle spielen, da Kupferionen in der Arterienwand vorhanden sind und gezeigt wurde, daß Plaqueextrakte LDL *in vitro* oxidieren können (*Yan et al. 1997*). Ferner können mit dieser Methode potenzielle antioxidative Eigenschaften von Testsubstanzen untersucht werden. Antioxidativ wirksame Substanzen zeigen eine hemmende Wirkung auf die kupfervermittelte LDL-Oxidation und haben damit möglicherweise hemmenden Einfluß auf die Atherogenese. Dabei werden Testsubstanzen sowohl *in vivo*, wobei später dann das isolierte LDL untersucht wird, als auch *in vitro* eingesetzt.

5.1.1 Charakterisierung des kupferinduzierten LDL-Oxidationsprozesses

Die Mehrzahl der Forschungsaktivitäten zur Oxidation von LDL schenken der Fragestellung, was während des Oxidationsprozesses mit den Lipiden des LDLs geschieht, ihre ungeteilte Aufmerksamkeit. Untersuchungen zu Veränderungen am Apolipoprotein B wurden dagegen seltener durchgeführt. Das liegt wahrscheinlich daran, daß primär von einem Oxidationsbeginn an den ungesättigten Fettsäuren ausgegangen wird (*Esterbauer und Ramos 1995, Reaven 1994*), einem daran anschließenden Peroxidationsschritt (*Parathasarthy et al. 1992*) mit Oxidation der Lipide zu Aldehyde und schließlich der Reaktion dieser Aldehyde mit dem Proteinanteil des Lipoproteins (*Steinberg et al. 1989*). Gut untersucht sind dabei die Reaktionen von 4-Hydroxynonenal bzw. Malondialdehyd mit Histidin, Lysin und Cystein (*Esterbauer und Ramos 1995*), wobei es zu einer Zunahme der entsprechenden Fluoreszenz an ApoB kommt (*Jürgens et al. 1987, Vanderyse et al. 1992*).

In Proteinen reagieren allgemein vor allem die Seitenketten von Histidin, Arginin, Lysin und Prolin empfindlich gegenüber metallkatalysierter Oxidation (*Amici et al. 1989*). Auch die Veränderungen an ApoB in LDL gehen neben der Fragmentation mit einem Verlust an Histidin, Lysin und Prolin einher (*Steinbrecher et al. 1987*) und führen zu einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität. Dabei stellt sich die Frage, ob dieser Verlust der Aminosäuren durch die oben beschriebene Reaktion mit den Aldehyden zustande kommt oder durch einen eigenen direkten Prozeß.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte nun mit zwei Methoden, Fluorescamin und TNBS, gezeigt werden, daß bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine Abnahme der bestimmaren Aminogruppen in LDL meßbar ist. Für diese frühzeitige Erfassung der Veränderung in LDL war die Elektrophorese nur bedingt geeignet, da die Wanderstrecken noch zu gering waren. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß Aminogruppen in LDL nicht nur durch die Reaktion mit Aldehyde modifiziert werden, sondern auch anderen verändernden Mechanismen unterworfen sind.

Auch *Arnold et al. (1989)* fanden eine Abnahme an Aminogruppen in LDL mit Fluorescamin, die aber unter Autooxidationsbedingungen erst nach Stunden feststellbar war. Außerdem wurden diese Daten nicht in direkten Zusammenhang zur Oxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebracht.

Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich im betrachteten Zeitraum bis zu sechs Stunden einerseits eine Abnahme in der Aminogruppenzahl um 60 % und andererseits entstanden aus den Lipiden TBARS und Diene, deren Maximum ungefähr am Ende des Zeitraumes erreicht war. Außerdem nahm die Zahl der Carbonylgruppen zu. Unter nicht-oxidativen Kontrollbedingungen nahm weder die Zahl der Aminogruppen ab, noch konnte ein Extinktionsanstieg durch die Diene bei 234 nm beobachtet werden.

Der Vergleich der vorliegenden Ergebnisse beider Aminogruppen-Bestimmungsmethoden zeigt einen parallelen Verlauf in der Abnahme der Aminogruppen mit fortschreitender Oxidationszeit. Obwohl in beiden Fällen Lysin zur Eichung verwendet wurde, lag das Ausgangsniveau der Fluorescamin-Methode ungefähr viermal höher als das der TNBS-Methode. Dieser Befund spricht für eine unterschiedliche Zugänglichkeit der NH₂-Gruppen durch die beiden Reagenzien oder aber Fluorescamin bindet noch an andere Gruppen.

90 % der freien Aminogruppen in LDL werden nach *Arnold et al. (1989)* auf Lysin zurückgeführt, die restlichen sollen prosthetische Gruppen der Phospholipide darstellen. Nach *Steinbrecher (1987)* hängt die Abnahme der TNBS-Reaktivität während einer 20stündigen LDL-Oxidierung ebenfalls vor allem mit der Modifizierung der Lysinreste zusammen. Die Menge an Lysin wurde hier mit 377 mol Lysine/mol ApoB angegeben, berechnet aus Aminosäurebestimmungen mit 4536 Aminosäuren pro mol ApoB. *Vanderyse et al. (1992)* gibt 356 Lysine an, von denen 324 TNBS-Reaktivität zeigten.

Weiterhin muß bei der Charakterisierung des LDL-Oxidationsprozesses der Frage nachgegangen werden, aus welchen Bestandteilen des LDL Carbonylgruppen entstehen: In Betracht kommen zum einen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die zu freien Aldehyden zerfallen, zum anderen freie Aminogruppen des Apolipoproteins, die zu proteinständigen Carbonylverbindungen reagieren können. Die durchgeführte Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin und anschließender Proteinfällung führte zu dem Ergebnis, daß Carbonylgruppen vor allem im Proteinanteil entstanden sind. Die Gegenüberstellung der TBARS-Werte und des Carbonylgruppengehalts zeigte zwar eine gute Korrelation, legt aber auch nahe, daß vor Malondialdehyd zuerst Carbonylgruppen aus Aminogruppen mit einer höheren Bildungsrate entstanden sind.

Die hier durchgeführte metallionenkatalysierte Oxidation von Proteinen erhöht allgemein den Gehalt an Carbonylgruppen. Diese Zunahme dient auch als Biomarker für die Höhe der Schädigung von Proteinen (*Stadtman und Oliver 1991*). Ein Ausgangspunkt für die Carbonylgruppenbildung an ApoB während der kupferinduzierten LDL Oxidation könnte die direkte Bindung von Kupfer an spezifische Domänen des ApoB sein. Durch Entstehung freier Radikale an diesen Stellen kann ein direkter Angriff auf die Aminosäuren erfolgen. Mehr als 80 % des an ein LDL-Partikel gebundenen Kupfers soll sich im Proteinanteil befinden (*Kuzuya et al. 1992*). Die genaue Anzahl dieser Kupferbindungsstellen ist noch nicht bekannt (*Esterbauer und Jürgens 1993*). *Ramos et al. (1995)* geben eine Zahl von 19 Kupferionen pro LDL für eine 50prozentige Sättigung der Bindungsstellen an, *Puhl et al. (1994)* gehen von 16 Kupfer pro LDL für die LDL-Oxidation aus.

Ein zweiter Mechanismus könnte über Lipidperoxidationsprodukte laufen. Peroxylradikale, die aus Lipidperoxiden in Gegenwart von Kupfer entstehen, können in LDL zum einen durch direkte Reaktion an Apolipoprotein B Carbonylbildung auslösen, zum anderen durch Reaktion mit Lipidbestandteilen im Inneren des Lipoproteins die Lipidperoxidation dort voran bringen, was zur Propagation-Phase und der Bildung von TBARS führt. Wird die Lipidperoxidation durch das lipidlösliche Antioxidans Probucol verhindert, reduziert dies auch die Carbonylgruppenbildung am Protein (*Yan et al. 1997*). Erst die Gegenwart von Lipidhydroperoxiden verstärkt demnach die kupfervermittelte Protein-Carbonylbildung. Dabei scheint Histidin eine Rolle zu spielen. Untersuchungen von *Wagner und Heinecke (1997)* haben gezeigt, daß bei LDL, das mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) modifiziertes Histidin enthält, die Lipidperoxidation während der Propagation-Phase verlängert ist, aber die Reduktion von Cu^{2+} nicht verändert wird. Dies spricht wiederum dafür, daß es in LDL mindestens zwei Arten für die Kupferbindung gibt: Stellen mit Histidin, die die Lipidperoxidation während der Propagation-Phase fördern und andere, die Cu^{2+} reduzieren und kein Histidin enthalten.

Die vorliegende Arbeit zeigt also, daß sich durchaus auch bei der von *Esterbauer et al. (1989)* beschriebenen Methode der kupferinduzierten LDL-Oxidation unter den gewählten Bedingungen Veränderungen am Proteinteil des LDLs nachweisen lassen, die primär dort induziert wurden und parallel zu Veränderungen am Lipidteil einhergehen.

5.1.2 Einfluß von Therapeutika verschiedener Wirkstoffgruppen auf die *in vitro* Oxidation von LDL

5.1.2.1 Allopathische Wirkstoffe

Zunächst wurde der Effekt verschiedener allopathischer Wirkstoffe auf die *in vitro* Oxidation von LDL unter einheitlichen Bedingungen untersucht. Dazu wurden zum einen Pharmaka eingesetzt, die bei der Therapie von Atherosklerose-Risikopatienten Anwendung finden. Für diese Patienten wäre es von Vorteil, wenn die verwendeten Pharmaka in ihrem Wirkspektrum zusätzlich eine antioxidative Komponente beinhalten würden und die LDL-Oxidierbarkeit hemmen könnten (Heller *et al.* 1998). Zum anderen wurden Substanzen aus der Forschung untersucht, die als Antioxidantien in der Prävention von Interesse sein könnten. Allgemein ist dabei allerdings anzumerken, daß die in der vorliegenden Arbeit zumindest ab einer Konzentration von 1 µM gemachten pharmakologischen Beobachtungen eventuell keine klinische Relevanz mehr haben. Dies müßte noch weitreichender untersucht werden.

Von den beiden untersuchten β -Blockern Metoprolol und Carvedilol zeigte Carvedilol stärkere antioxidative Eigenschaften bei der *in vitro* Oxidation von LDL als Metoprolol. Für die antioxidativen und radikal-abfangenden Effekte soll der Carbazol-Anteil im Carvedilol-Molekül verantwortlich sein (Yue *et al.* 1992a). Auch in anderen Vergleichen von β -Blockern ließ sich vor allem für Carvedilol ein Einfluß auf die LDL-Oxidation feststellen (Yue *et al.* 1992b). Dabei scheint die antioxidative Wirksamkeit mit der Lipophilie der Substanzen zu korrelieren. Die *in vivo* beobachtete antioxidative Wirkung von Carvedilol läßt sich nach den hier vorliegenden Ergebnissen aber auch gut mit dem Einfluß des Carvedilol-Metaboliten BM91.0228 erklären, der in einer geringeren Konzentration in der Lage war, die LDL-Oxidation zu hemmen. Für die verstärkte antioxidative Aktivität des Metaboliten scheint die Hydroxylgruppe am Carbazol-Ring verantwortlich zu sein. Yue *et al.* (1992a) stellten fest, daß Hydroxylierung am Carbazol-Ring und, aber nicht ganz so ausgeprägt, am ortho-substituierten Phenoxyethylamin-Teil den antioxidativen Effekt verstärkt. BM91.0228 zeigte aber auch hier im Vergleich zu anderen hydroxylierten Metaboliten mit die höchste Aktivität.

Alle drei untersuchten HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (bzw. Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer) verzögerten die Bildung von Dienen bei der LDL-Oxidation, wobei Lovastatin den stärksten Einfluß zeigte, vor Simvastatin und Fluvastatin. Dieser Effekt konnte sowohl von *Giroux et al. (1993) in vitro* mit Simvastatin als auch mit Lovastatin von *Aviram et al. (1992) in vitro* und *in vivo* an vier Patienten festgestellt werden.

Der AT 1-Rezeptorantagonist Losartan dagegen zeigte nach den hier vorliegenden Ergebnissen keinen antioxidativen Einfluß. Er wies vielmehr prooxidative Tendenzen auf. Auch *Heller et al. (1998)* konnten keine signifikanten Veränderungen der LDL-Oxidierbarkeit bei Bluthochdruck-Patienten, die Losartan bekamen, feststellen.

Die drei Substanzen aus der Antioxidantien-Forschung führten zu einer deutlichen Verzögerung der LDL-Oxidation. Ausgeprägter als bei den beiden 21-Aminosteroiden U-74500A und U-74389G war die Wirkung des wasserlöslichen Vitamin E-Derivates U-83836E mit einem Trolox- und einem Aminosteroidanteil. U-74389G ähnelt einem sich in der klinische Forschung befindenden 21-Aminosteroid. Von beiden Substanzklassen wird angenommen, daß sie Proteine über einen direkten antioxidativen Mechanismus schützen und die Lipidperoxidation hemmen können (*Braughler et al. 1987*). Dabei scheint der Mechanismus für die Lipidperoxidationshemmung bei U-74500A, im Gegensatz zu Carvedilol, nicht über Scavengereigenschaften für freie Radikale zu laufen (*Yue et al. 1992a*). *Yue et al. (1992a)* fanden außerdem für U-74500A einen geringeren Einfluß auf Fe^{2+} /Vitamin C-induzierte Lipidperoxidation als für Carvedilol. Dies steht im Gegensatz zu dem hier gefundenen stärkeren Effekt von U-74500A auf die Cu^{2+} -induzierte Oxidation von LDL.

5.1.2.2 Pflanzliche Wirkstoffe

Neben den allopathischen Therapeutika wurden Wirkstoffe pflanzlicher Herkunft in der *in vitro* Oxidation von LDL getestet. Weißdorn, besonders als Extrakt, wird bei beginnender Herzinsuffizienz, insbesondere Koronarinsuffizienz, bei leichten Formen der Herzmuskelinsuffizienz (Stadium I-II nach New York Heart Association), beim noch nicht herzoglykosidbedürftigen Altersherz, bei Druck- und Beklemmungsgefühl in der Herzgegend und bei leichten Formen von bradykarden Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Auf Grund zahlreicher pharmakologischer und klinischer Prüfungen ist sichergestellt, daß die oligomeren Procyanidine und Flavonoide die maßgeblichen

Wirkstoffe darstellen. Standardisierte Crataegus-Extrakte verbessern die Durchblutung des Myokards und der Koronargefäße, die an der Toleranzsteigerung des Myokards gegen Sauerstoffmangel meßbar ist (*Wichtel 1989*).

Es zeigte sich, daß der Crataegus-Extrakt als Flavonoidmischung eine wesentlich stärkere Wirkung auf die lag-Phase der LDL-Oxidation hatte als die getesteten Einzelsubstanzen. Die Oxidation von isoliertem LDL wurde deutlich hinausgezögert. Dies spricht für eine Potenzierung der Einzeleffekte. Die Verteilung der Inhaltsstoffe von Crataegus ist sehr artspezifisch. Man findet neben Hyperosid und Vitexin die hier untersuchten Substanzen Rutin, Luteolin-7-glucosid und Vitexinrhamnosid, außerdem Vicenin-1 mit dem Aglykon Apigenin und Orientin mit dem Aglykon Luteolin (*Teuscher 1997*).

Flavonoide fangen freie Radikale wie Superoxidanionen und Lipidperoxidradikale ab, beenden die radikalische Kettenreaktion und schützen damit die endogenen Antioxidantien in LDL wie Vitamin E vor Oxidation. Für die antioxidative Aktivität der polyphenolischen Flavonoide lassen sich gewisse Struktur-Wirkungsbeziehungen feststellen (*Rice-Evans 1996, Cook und Samman 1996*; Strukturformeln im Anhang). Von den beiden untersuchten Flavonolen Quercetin und Rutin ist Quercetin der potentere Hemmstoff der LDL-Oxidation. Quercetin hat keinen Zuckerrest an Position 3 und je mehr Hydroxylgruppen vorhanden sind, desto stärker scheint die Hemmung der Lipidperoxidation zu sein (*Ratty und Das 1988*). Außerdem kann es in Quercetin durch die Carbonylgruppe an Position 4 und den beiden freien Hydroxylgruppen an C3 und C5 zur Komplexbildung mit Metallionen kommen. In der *in vitro*-Bestimmung der LDL-Oxidation mit Cu^{2+} könnte dies eine Rolle spielen. Für *in vivo* kann aber angenommen werden, daß bei der Aufnahme der hydrophileren Flavonoidglykoside in den Körper und bei deren Metabolisierung die Zuckerreste abgespalten werden und dann beide Substanzen zur Chelatbildung fähig sind. Allerdings gibt es hierfür noch wenige und zum Teil widersprüchliche Daten (*Hertog et al. 1993*).

Von den untersuchten Flavonen zeigte Luteolin mit den meisten Hydroxylgruppen ebenfalls den größten Hemmeffekt auf die LDL-Oxidation. Eine Hydroxyl-Substitution an Ring B in Position 3' verstärkt nach *Ratty und Das (1988)* den antiperoxidativen Effekt zusätzlich.

Der Vergleich zwischen Flavonolen und Flavonen ist bei dieser Auswahl der Substanzen durch überschneidende Strukturen nicht möglich. Alle untersuchten Substanzen weisen eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 auf, die ebenfalls einen Einfluß auf den antiperoxidativen Effekt haben soll (*Cook und Sammann 1996*).

In der Zutphen Elderly Studie (*Hertog et al. 1993*) wurde der Gehalt von Flavonoiden in der Nahrung u. a. von Quercetin, Apigenin und Luteolin bestimmt und die Flavonoidaufnahme von älteren Männern in Beziehung zu Myokardinfarkt und Koronarer Herzkrankheit gebracht, unter Berücksichtigung verschiedener Lebensgewohnheiten und der Vitaminaufnahme. Quercetin stellte mit 63% den Hauptteil der aufgenommenen Flavonoidmenge dar. Die Flavonoidaufnahme zeigte eine signifikante negative Korrelation zu den Sterbefällen durch Koronare Herzkrankheit. Die Signifikanz in Bezug auf Myokardinfarkt war dagegen grenzwertig. Die stärkere Verbindung zur Koronaren Herzkrankheit deutet auf eine Wirkung der Flavonoide in der Progression der Atherosklerose hin und auf ihren Einfluß auf das antioxidative Geschehen in der Gefäßwand.

5.1.3 Einfluß von Antioxidantien und Carvedilol auf die *in vitro* Oxidation von LDL in WHHL-Kaninchen

Nachdem antioxidativ wirkende Therapeutika, u. a. Carvedilol, direkt der *in vitro* Oxidation von LDL zugesetzt worden waren und zum Teil einen hemmenden Effekt auf die LDL-Oxidation gezeigt hatten, wurde Carvedilol und weitere antioxidative Therapeutika in pharmakologischen Dosen systemisch hyperlipidämischen WHHL-Kaninchen verabreicht. Nach Versuchsende wurde LDL aus dem Plasma dieser Tiere isoliert und die lag-Phase in der Oxidation bestimmt.

Da die *in vitro* Oxidation von LDL starke individuelle Streuungen aufweisen kann und auch die Vergleichbarkeit der Testmethode zwischen den verschiedenen Laboratorien Grenzen hat, wurden ProbucoI und Tocopherol als Vergleich für die hier durchgeführten Untersuchungen herangezogen. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, daß diese beiden Substanzen nach *in vivo* Applikation die *in vitro* Oxidation von LDL stark verzögern können (*O'Leary et al. 1996*). Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse bestätigt. Die systemische Gabe von ProbucoI, aber auch von Tocopherol, führte zu einer dreimal bzw. doppelt so langen lag-Phase bei der

durchgeführten LDL-Oxidation. Bei den beiden Carvedilol-Konzentrationen war die Hemmung bereits nicht mehr signifikant, aber immer noch geringfügig stärker ausgeprägt als bei den mit Ubichinon-10 gefütterten Tieren. Die Reihenfolge der Antioxidantienaktivität entspricht dem Ergebnis der direkten Oxidation von Plasma, die von *Kontush et al. (1997)* durchgeführt wurde.

Auf eine Analyse unter Berücksichtigung der Geschlechter wurde auf Grund geringer Unterschiede in den Ergebnissen und kleiner Gruppengröße verzichtet, auch wenn bei Kaninchen durch hormonale Schwankungen Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel nicht ausgeschlossen werden können.

Die Bestimmung wurde deshalb mit einer einzigen Konzentration Carvedilol an 20 männlichen Tieren zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Die hier gefundene Verlängerung der LDL-Oxidation um 12 % durch die systemische Gabe von Carvedilol war zwar nicht signifikant, bestätigte aber die reinen *in vitro* Daten, bei denen für Carvedilol in einer Konzentration von 10 μM eine Hemmung der LDL-Oxidation um 26 % gefunden wurde, und für den Carvedilol-Metaboliten BM91.0228 in einer Konzentration von 1 μM eine Hemmung von 30 % zu messen war. Allerdings sind die Plasmaspiegel, die bei den Kaninchen erzielt wurden, nicht bekannt. Die in der Bluthochdruck-Therapie eingesetzte Dosierung liegt in der Daueranwendung bei täglich 25 mg, die Tageshöchstmenge beträgt 50 mg. *Yue et al. (1992a)* gibt eine maximale Plasmakonzentration von 0,3 μM nach einmaliger, oraler Gabe von 50 mg Carvedilol bei Freiwilligen an. Damit bleibt die klinische Relevanz der antioxidativen Wirkung von Carvedilol weiterhin offen.

5.2 Untersuchungen zum Einfluß von Antioxidantien und Plasma auf die AAPH-Reaktion

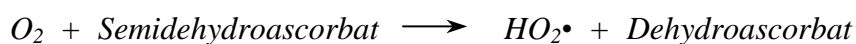
In der sogenannten AAPH-Reaktion entstehen durch dessen spontanen Zerfall Radikale, die durch Zugabe von antioxidativ wirkenden Substanzen abgefangen werden können, wodurch eine Chemilumineszenz-Reaktion der Radikale mit Luminol verhindert wird. Dieses Reaktionsprinzip wurde ursprünglich verwendet um die Antioxidative Kapazität des Plasmas zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit diente diese Methode aber außerdem auch dazu, die Potenz von Antioxidantien in wäßrigem Milieu zu testen.

Alle fünf untersuchten Substanzen, Nordihydroguarsäure (NDHGA), das Vitamin E-Derivat Trolox[®], Vitamin C, Homocystein und Glutathion, zeigten die Fähigkeit Radikale im Testsystem abfangen zu können. Dabei waren allerdings große Unterschiede festzustellen: So hemmte eine 2 µmolare NDHGA-Lösung die Photonenemission der Chemilumineszenz genauso stark wie eine 40 µmolare Lösung von Vitamin C oder Glutathion. Die im Plasma vorhandene Vitamin C-Konzentration wird mit 30 bis 40 µM angegeben (*Wissenschaftliche Tabellen Geigy 1979*), Vitamin E mit 20 bis 25 µM, wobei bei Vitamin E die Aktivität von Derivaten zu berücksichtigen ist. Trolox[®] wurde in einer Konzentration von 1 bis 20 µM in der AAPH-Reaktion eingesetzt.

Auffällig war, daß im Anschluß an die lichtauslöschende Phase unterschiedliche Kurvenverläufe bei den verschiedenen Substanzen festgestellt wurden. Die beiden antioxidativ potentesten untersuchten Substanzen waren Trolox[®] und NDHGA, deren Kurven nach der Auslöschungsphase wieder auf das Ausgangsniveau kamen und dort blieben. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß in diesen beiden Substanzen ein freies Elektron durch Mesomeriestabilisierung für eine radikalische Reaktion mit Luminol nicht mehr zur Verfügung steht und die Chemilumineszenz unterbrochen wird. Für Vitamin C und Homocystein als mittelstarke Antioxidantien ließ sich im Gegensatz dazu ein konzentrationsabhängiger Anstieg über das Ausgangsniveau hinaus beobachten, der Kurvenverlauf von Glutathion zeigte ein transientes Maximum mit anschließenden niedrigeren Plateau, dessen Intensität ebenfalls konzentrationsabhängig war.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß in diesem abgeschlossenen System nach einer Phase der Radikalunterdrückung verstärkt solche gebildet werden. Solche Beobachtungen sind bisher in der Literatur nicht beschrieben. *Lissi et al. (1991)* untersuchten zwar verschiedene Zusätze, u. a. Trolox, Glutathion, Vitamin C und Cystein, in Gegenwart von AAPH, stellten aber die radikalabfangende Wirkung durch die verminderte Inaktivierung von Lysozym durch Radikale fest. Auch hier zeigten sich bei der Veränderung der Lysozymaktivität über die Zeit unterschiedliche Profile für verschiedene Zusätze.

Allgemein kann gesagt werden, daß Vitamin C ein sehr guter „Fänger“ für wasserlösliche Peroxylradikale darstellt. Eine Erklärung für den Anstieg der Radikalproduktion liefert möglicherweise ein zweiter Prozess, bei dem peroxidiertes Semidehydroascorbat und/oder $\text{HO}_2\cdot$ ($\text{O}_2^-\cdot$) Radikale nach der Reaktion



beteiligt sind. Die Beobachtung, daß Vitamin C verstärkt Radikale bildet, unterstreicht die Bedeutung des Zusammenspiels verschiedener antioxidativer Systeme beim Schutz des Körpers vor oxidativem Angriff.

Erhöhte Plasmakonzentrationen von Homocystein gelten als unabhängiger Risikofaktor für vaskuläre Ereignisse. Das könnte damit zusammenhängen, daß Homocystein bei der Entstehung von freien Radikalen beteiligt ist (*Currie et al. 1996*) und damit unter bestimmten Bedingungen Lipidperoxidation auslösen kann (*Toborek et al. 1995*). Andererseits kann Homocystein auf Grund der Thiolgruppe auch antioxidativ wirken (*Lynch und Frei 1997*). *Halvorsen et al. (1996)* fanden z. B. für niedrige Homocystein-Konzentrationen eine verstärkte Lipidperoxidation von LDL, wohingegen eine höhere Konzentration dieser thiolhaltigen Substanz LDL vor oxidativer Modifizierung schützte. Diese Befunde könnten durch die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen gestützt werden, daß Homocystein einerseits Radikale abfangen kann, aber andererseits verstärkt auch solche bildet.

Glutathion kann noch weniger von den Verhältnissen *in vivo* getrennt werden als die anderen, im Körper vorkommenden und hier untersuchten Antioxidantien, da es zusammen mit den Enzymen Glutathion-Reduktase und Glutathion-Peroxidase eng in Redoxreaktionen des Körpers eingebunden ist. *Lynch und Frei 1997* fanden sowohl

pro- als auch antioxidative Eigenschaften bei der LDL-Oxidation, wobei sowohl Homocystein als auch Glutathion die kupferinduzierte Oxidation Thiolgruppen-unabhängig hemmte, eine durch Eisen katalysierte Oxidation aber durch freie SH-Gruppen erleichtert war.

Für die Tatsache, daß es noch Schwierigkeiten bei der Beurteilung des Verhaltens der Antioxidantien gibt, sprechen auch die unterschiedlichen Ergebnisse aus der Berechnung des stöchiometrischen Faktors, d. h. des Faktors, der angibt, wieviele Radikalmoleküle durch ein Molekül Antioxidans inaktiviert werden. Grundlage für solche Berechnungen sind zum einen direkte Einzelbestimmungen und zum anderen Kalkulationen bezogen auf Serum. Der Wert für Vitamin C zum Beispiel variiert dabei zwischen 0,55 (*Lissi et al. 1991*), 0,7 (*Wayner et al. 1985*) und 1,7 (*Whitehead 1992*). Für Trolox[®] als Bezugssubstanz wird in allen Fällen 2 angegeben. Im wäßrigen Milieu der AAPH-Reaktion erscheint Trolox[®] als Substanz, die die Chemilumineszenz und damit die Radikalreaktion nicht in dem Maße fördert wie es z. B. für Vitamin C erscheint. Anders sieht die Betrachtung für lipophile LDL-Partikel aus: sowohl für Vitamin C als auch für α -Tocopherol werden pro- und antioxidative Effekte beschrieben (*Stait und Leake 1994, Bowry und Stocker 1993*).

Durch Zugabe von Plasma zur AAPH-Reaktion kann ebenso wie bei den einzeln gemessenen Antioxidantien eine Auslöschung des Lichtsignals erreicht werden. Über die Zeitdauer dieser Lichtauslöschung wird im Vergleich mit Trolox[®] als Eichsubstanz die Antioxidative Kapazität des Plasmas berechnet (*Wayner et al. 1985*).

Hier soll zunächst nur kurz auf allgemeine Beobachtungen bei der Bestimmung der Antioxidativen Kapazität des Plasmas und auf Einflußnahmemöglichkeiten durch Antioxidantien, sowie auf LDL als Plasmabestandteil eingegangen werden. Die Beurteilung von TRAP bei den untersuchten Gruppen erfolgt dann gesondert im jeweiligen Kapitel (5.3 und 5.4).

Der Anstieg der Radikalproduktion nach der Auslöschungsphase war auch bei Plasma zu beobachten. Dabei führten auch geringere Konzentrationen als die gezeigten zu einem Anstieg, wobei die Phase der Lichtauslöschung dann konzentrationsabhängig kürzer wurde bzw. ganz ausfiel. Diese Befunde sind bisher in der Literatur nicht beschrieben. Nur bei *Metsä-Ketelä 1991* findet sich ein Schaubild, das für

Plasmaproben einen zum Ausgangswert knapp doppelt so hohen Anstieg zeigt. Dieses Verhalten wurde aber nicht kommentiert.

Die Einnahme von Vitamin E erhöhte die Antioxidative Kapazität des Plasmas um 44%. Vitamin E als lipophile Substanz schützt nach den vorliegenden Befunden im Plasma vor Peroxidation, obwohl es nur einen geringen Beitrag zur Antioxidativen Kapazität leistet (Wayner *et al.* 1985, Whitehead 1992). Die entstehenden Tocopheroxyl-Radikale werden demnach über Wechselwirkungen mit sekundären Antioxidantien regeneriert und stehen dann einer weiteren Abwehr zur Verfügung.

Auffällig war, daß das Plasma nach 6wöchiger Vitamin E-Gabe ein geringeres Maximum aufwies als die anderen Plasmaproben. Dies spricht dafür, daß durch eine Anreicherung des Plasmas mit Vitamin E die verstärkte Radikalproduktion im Anschluß an die Auslöschungsphase abgeschwächt wird, ähnlich wie Trolox[®], das keine weitere Radikalproduktion zeigte.

Ob diese Beobachtungen eine Bedeutung *in vivo* haben, ist noch nicht geklärt. Die Einnahme von Vitamin E als Schutz vor vaskulären Ereignissen wird nach wie vor kontrovers diskutiert.

Für LDL wird in der Literatur ein ähnlicher Kurvenverlauf wie für Vitamin E angegeben (Whitehead 1992), das das Hauptantioxidans von LDL darstellt. Bei der verwendeten Konzentration von nativem LDL kam es zu einer kurzzeitigen Auslöschung der Lichtemission. Oxidiertes LDL zeigte keine Auslöschung mehr, sondern bewirkte einen sofortigen Anstieg der Chemilumineszenz-Intensität auf ungefähr das Doppelte. Dies spricht dafür, daß kein antioxidativer Schutz mehr vorhanden war und darüber hinaus die Lichtemission durch zusätzliche Radikale gesteigert wurde.

Die Bestimmung der Antioxidativen Kapazität stellt eine unspezifische Methode dar, die aber ein breites Spektrum an Einflußmöglichkeiten und Plasmabestandteilen wie z. B. Proteine, wasserlösliche Antioxidantien und die stark antioxidativ wirkende Harnsäure mit einbezieht. In zahlreichen Studien konnte beispielsweise eine Zunahme der TRAP-Aktivität bei körperlich trainierten Probanden festgestellt werden (Vasankari *et al.* 1997), wohin gegen die Aktivität bei Rauchern (Sharpe *et al.* 1996) und Diabetespatienten (Ceriello *et al.* 1997, Tsai *et al.* 1994) beeinträchtigt war.

5.3 Untersuchungen zu fütterungsinduzierter Hypercholesterinämie in Kaninchen

An Weißen Neuseeland-Kaninchen wurde während sechs Wochen eine Hypercholesterinämie über die Fütterung induziert. Daran schloß sich eine Regressionsphase an, in der die Tiere Normalfutter bekamen. Die Ergebnisse zur Antioxidativen Kapazität des Plasmas bei diesen Tieren wurden im Zusammenhang zur Entwicklung des Cholesterinspiegels, der LDL-Oxidierbarkeit und der Plaqueflächen gesehen, auf die deshalb kurz eingegangen wird (*Schneider et al. 1999*).

Bei der vorliegenden Untersuchung war der initiale, signifikante Anstieg der Antioxidativen Kapazität parallel zum Plasmacholesterinspiegel, der erwartungsgemäß am Ende der Cholesterinfütterung (6. Woche) seinen höchsten Wert erreichte, auffällig. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß auch Cholesterin von AAPH attackiert werden kann und Cholesterylester-Hydroperoxide gebildet werden (*Noguchi 1994*). Dennoch fand unter den erhöhten Cholesterinwerten ab der 14. Woche ein Rückgang der Antioxidativen Kapazität unter das Ausgangsniveau statt, der auch nicht durch eine Abnahme des Plasmaproteinspiegel erklärt werden kann. Dieser war eher erhöht, so daß sich daraus ein verbesserter antioxidativer Schutz ergeben hätte. Es stellt sich die Frage, ob die verminderte Antioxidative Kapazität aus erhöhter Radikalproduktion gemäß einer chronisch-inflammatorischen Reaktion resultierte, oder ob dafür primär eine Abnahme antioxidativ wirkender Substanzen im Plasma verantwortlich war, die nicht ausgeglichen werden konnte.

Die lag-Phase der LDL-Oxidation stieg ebenfalls in der 6. Woche signifikant an, verlängerte sich aber im Gegensatz zur Antioxidativen Kapazität im Verlauf der Untersuchungen weiter, wobei der höchste Wert in der 21. Woche erreicht wurde. Erst am Ende des Beobachtungszeitraumes wies das LDL wieder die ursprüngliche Oxidierbarkeit auf. Die Verlängerung der lag-Phase der LDL-Oxidation *in vitro* zeigte, daß in diesem Modell offensichtlich trotz erhöhter LDL/VLDL-Spiegel eine Verbesserung des Oxidationsschutzes von LDL erreicht wurde. Vermutlich ist dafür die Vitamin E-Supplementierung des Kaninchenfutters verantwortlich, die standardmäßig erfolgte, und auf die kein Einfluß genommen wurde. Auch in anderen Modellen war unter Hypercholesterinämie eine Verlängerung der LDL-Oxidation gefunden worden (*persönliche Mitteilung von Prof. Leonhardt, Dresden*).

Ungeachtet der Tatsache, daß sich das LDL der Kaninchen *in vitro* schwerer oxidieren ließ, kam es zu einer, bis zur 6. Woche geringen, dann aber bis zur 21. Woche verstärkten Zunahme der Plaqueflächen, mit nur geringer Regression in den nachfolgenden Wochen (Abb. 5-1). Auffällig war dabei, daß bei Rückgang der Antioxidativen Kapazität ab der 6. Woche, die Plaque-Entwicklung noch 15 Wochen lang zunimmt, obwohl sich der Cholesterinspiegel weitgehend normalisierte und die LDL-Oxidation immer noch verlängert war.

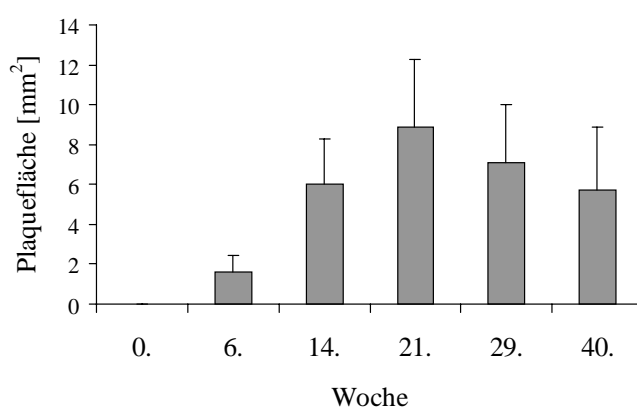


Abb. 5-1: Plaqueflächen bei den bis zur 6. Woche cholesterinreich und danach normal gefütterten Kaninchen (Mittelwerte + S.D.)

Auf die zugrunde liegenden Mechanismen und Zusammenhänge zwischen Hypercholesterinämie, Verlauf der Antioxidativen Kapazität, LDL-Oxidation und Plaque-Entwicklung kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. Doch kann von einem verminderten antioxidativen Schutz des LDL in der Gefäßwand ausgegangen werden und es könnten sich weitere wertvolle Hinweise zum atherosklerotischem Risiko bei Hypercholesterinämie ergeben. Die Betrachtung der Oxidation des isolierten LDL scheint alleine nicht auszureichen, um Rückschlüsse auf die Plaque-Entwicklung ziehen zu können.

5.4 Untersuchungen am Menschen zur LDL-Oxidierbarkeit und Antioxidativen Kapazität

5.4.1 Beeinflussung der LDL-Oxidierbarkeit und Antioxidativen Kapazität durch Akutbelastung und Ausdauertraining

Regelmäßige sportliche Betätigung hat gesicherte positive Auswirkungen auf Plasmalipide und Plasmalipoproteine (*Berg et al. 1994*). Während körperlicher Belastung können jedoch reaktive Sauerstoffradikale entstehen (*Alessio 1993*), die bei ungenügendem antioxidativem Schutz Zellbestandteile schädigen können. Auf der anderen Seite kann es zu einer Anpassung des antioxidativen Systems an belastungsinduzierte Sauerstoffradikalanstiege kommen (*Robertson et al. 1991*). Deshalb wurde angenommen, daß es bei regelmäßigen Ausdauerbelastungen zu einer Veränderung im Schutz der LDL-Partikel vor Oxidation und im gesamten antioxidativen Potential des Plasmas kommen würde. Es wurde sowohl der Einfluß einer einmaligen als auch einer regelmäßigen körperlichen Belastung bei Untrainierten auf die Oxidierbarkeit von LDL untersucht.

Alle gemessenen körperlichen Leistungsparameter zum Trainingseffekt veränderten sich signifikant. Damit erzielten alle Teilnehmer durch das Ausdauertraining eine verbesserte Ausdauerleistungsfähigkeit.

Als Maß für die Lipidperoxidation im Plasma wurde der Gehalt an TBARS gemessen. Dieser stieg bei den weiblichen Probanden jeweils unmittelbar nach der Laufbandbelastung signifikant an. Bei den männlichen Probanden nahm die MDA-Konzentration zunächst direkt nach der Ausbelastung ab, um erst 15 Minuten später über den Ruhewert hinaus anzusteigen.

Die Bestimmung der Lipidperoxidation über die TBARS-Methode ist eine weitverbreitete, aber vor allem im niedrigen Konzentrationsbereich relativ ungenaue Methode. Abhängig von Methodik, Trainingsintensität und Ernährungsstatus zeigt sich in der Literatur ein uneinheitliches Bild der Ergebnisse zur Lipidperoxidation während sportlicher Betätigung (*Alessio 1993*). Beim Vergleich von Sportlern mit Nicht-

Sportlern zum Beispiel stellten *Shern-Brewer et al. (1998)* keinen Unterschied bei den TBARS-Werten fest.

Körperliche Akutbelastung hatte in der vorliegenden Untersuchung keine Auswirkungen auf die Oxidierbarkeit von LDL-Partikeln *in vitro*. Damit war entweder der Anstieg der Sauerstoffradikale im Plasma zu gering um weitreichendere Veränderungen an LDL zu bewirken, oder aber die Antioxidative Kapazität im Plasma bzw. der Vitamin E-Gehalt des LDL war groß genug um die LDL-Partikel vor oxidativem Angriff zu schützen. Andere Gruppen berichteten von angeblich „signifikanter“ Verkürzung der lag-Phase durch körperliche Belastung: *Wetzstein et al. (1998)* stellten bei 23 Probanden (11 Trainierte und 12 Untrainierte) eine Abnahme der lag-Phase von $96,1 \pm 23,5$ min auf $92,1 \pm 23,3$ min durch 30minütige moderate Laufbandbelastung fest. Die Arbeitsgruppe um Sanchez-Quesada untersuchte gut trainierte Läufer vor und nach einem vierstündigem Lauf, wobei sie einmal bei sechs Läufern eine Verkürzung der lag-Phase um 13 % (*Sanchez-Quesada et al. 1995*) und ein anderes Mal bei sieben Läufern eine Verkürzung um 9 % (*Sanchez-Quesada et al. 1998*) zeigen konnten. Bei Marathon-Läufern wurde von *Liu et al. (1999)* eine deutliche Zunahme der LDL-Oxidierbarkeit festgestellt. Damit wird deutlich, daß die Auswirkungen der oxidativen Belastung auf die LDL-Oxidation *in vitro* stark von der jeweiligen Belastung abhängt, die in unserem Fall wohl zu gering war.

Das Ausdauertraining hatte ebenfalls keine direkten Auswirkungen auf die Oxidierbarkeit der LDL-Partikel. Die Veränderungen bei den Ruhewerten der lag-Phase vor und nach dem Ausdauertraining waren bei den einzelnen Probanden sehr unterschiedlich: Bei sieben Probanden wurde die lag-Phase kürzer, bei zwei Teilnehmern blieb sie unverändert und bei sechs verlängerte sie sich. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung lagen keine anderen Untersuchungen vor, die die Auswirkungen eines Ausdauertrainings auf die Oxidierbarkeit von LDL *in vitro* gemessen haben. In einer 1998 veröffentlichten Untersuchung (*Vasankari et al. 1998*) gehen die Autoren von einer Abnahme an oxidativ veränderten LDL-Partikeln nach einem zehn Monate dauernden Bewegungsprogramm aus, an dem insgesamt 105 untrainierte Frauen und Männern teilnahmen: gemessen wurde neben dem Grundgehalt an konjugierten Dienen in LDL das antioxidative Potential von LDL. Ein Vergleich von Sportlern mit unsportlichen Probanden zeigte, daß das LDL von Sportlern

möglicherweise eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Oxidation aufweist (*Sanchez-Quesada et al. 1997*).

Bei der vorliegenden Untersuchung waren die Teilnehmer gebeten worden ihre Ernährungsgewohnheiten für die Dauer des Ausdauertrainings beizubehalten, dennoch kann dieser Aspekt bei der Betrachtung der recht unterschiedlichen Ergebnisse nicht ganz vernachlässigt werden, da der endogene Gehalt an Antioxidantien in LDL, vor allem der Gehalt an Vitamin E, direkt proportional zur Länge der lag-Phase der LDL-Oxidation sein soll (*Esterbauer und Jürgens 1993*). Andere Autoren fanden allerdings keine Korrelation zwischen dem Vitamin E-Gehalt in LDL und der lag-Phase (*Kleinveld et al. 1992*) bzw. sie fanden unterschiedliche Längen der lag-Phase bei gleichem Vitamin E-Gehalt für verschiedene LDL-Dichteklassen (*de Graaf et al. 1991*). Auch andere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß nicht nur der Antioxidantiengehalt in LDL für die *in vitro* Oxidation eine Rolle spielt, sondern auch die Zusammensetzung der LDL-Fraktion: Kleinere, dichtere LDL-Partikel reagieren gegenüber Oxidation empfindlicher als größere LDL-Partikel mit geringerer Dichte.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die maximal erreichten Extinktionen während der LDL-Oxidation mit Kupfer verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Konzentration an konjugierten Dienen zum einen durch akute körperliche Belastung anstieg, aber auf der anderen Seite an allen drei gemessenen Zeitpunkten nach dem Ausdauertraining eine niedrigere maximale Extinktion im Vergleich zu den entsprechenden Zeitpunkten vor dem Training festzustellen war. Dabei war der Ruhewert nach dem Ausdauertraining signifikant erniedrigt.

Durch die akute Belastung stieg die Konzentration konjugierter Diene direkt nach Belastungsabbruch an und fiel dann 15 Minuten später wieder ab. Für die weiblichen Teilnehmern war der Anstieg nach dem Ausdauertraining signifikant. Möglicherweise führte die Belastung auf dem Laufband zu einem strukturell modifizierten LDL, in dem sich eine Radikalkettenreaktion schneller ausbreiten konnte als in einem intakten Partikel. Oder aber die kurzzeitige Erhöhung der Dien-Konzentration während der LDL-Oxidation kam durch einen Anstieg an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den LDL-Partikeln zustande, bedingt durch die veränderte Stoffwechsellage zur Bereitstellung von Energie. Nach *Baumstark et al. (1993)* beeinflußt sportliche

Aktivität über den Triglycerid- und Fettsäurestoffwechsel die Regulation der LDL-Subfraktion-Konzentrationen.

Auch wenn die durchgeführte Ausbelastung bzw. das Ausdauertraining keinen direkten Einfluß auf die LDL-Oxidierbarkeit hatte, so ist die Zu- bzw. Abnahme der maximalen Extinktion doch ein Hinweis darauf, daß es zu Veränderungen in der Zusammensetzung der LDL-Partikel kam, die eventuell Größenänderungen nach sich zogen. Ein niedrigerer Gehalt an mehrfach ungesättigte Fettsäuren in großen, weniger dichten LDL-Partikeln führte bei *de Graaf et al. (1991)* zu einem geringeren Anstieg an konjugierten Diene als dies bei kleineren, dichteren Partikeln der Fall war. Zahlreiche mit Sportlern durchgeführte Studien deuten auf eine Veränderung in der LDL-Zusammensetzung und im Partikeldurchmesser hin: Zum einen konnte mittels Protonen-NMR-Spektroskopie festgestellt werden, daß nach einem extremen Triathlon-Wettkampf die Konzentration an kleinen, dichten LDL-Partikeln abnahmen (*Yu et al. 1999*). Zum anderen wurde bei Ausdauersportlern größere, leichtere LDL-Partikel gefunden (*Williams et al. 1986*) bzw. es änderte sich die chemische Zusammensetzung der LDL-Partikel bereits nach einem zweiwöchigen Ausdauertraining durch Erhöhung des Gehalts an freiem Cholesterin, Cholesterinestern und Phospholipiden, wodurch auch das Verhältnis von Lipid- zum Proteinanteil anstieg (*Houmard et al. 1994*).

Da in der vorliegenden Arbeit keine Unterteilung der LDL-Fraktion vorgenommen wurde, kann nur auf Grund des Rückgangs an konjugierten Dienen während der LDL-Oxidation auf solche Veränderungen geschlossen werden. Diese Veränderungen aber waren wiederum zu gering um Auswirkungen auf die LDL-Oxidierbarkeit selbst zu haben. Dabei kann auch eine Rolle gespielt haben, daß elf der 16 Teilnehmer weiblich waren. Der hohe weibliche Anteil könnte das Ergebnis in bestimmter Weise beeinflußt haben (*Shern-Brewer et al. 1998*). Prämenopausale Frauen zeigen einen estrogen-abhängigen kardiovaskulären Schutz, der unter anderem auf veränderten Lipidstoffwechsel und antioxidative Eigenschaften des 17 β -Estradiols zurückzuführen ist. Bei Frauen liegt genetisch bedingt bereits eine Veranlagung zu großen, weniger dichten LDL-Partikeln vor (*Campos et al. 1992*). Dafür spricht auch, daß bei den weiblichen Probanden niedrigere Konzentrationen konjugierter Diene gemessen wurden als bei den männlichen Teilnehmern (durchschnittliche maximale Extinktion bei den Frauen 0,613 und bei den Männern 0,546).

Um die Auswirkung des Ausdauertrainings auf das antioxidativen Systems zu erfassen, wurde die Antioxidative Kapazität des Ruhewertes im Plasma nach der TRAP-Methode bestimmt. Die Mehrzahl der Probanden zeigte vor dem Ausdauertraining eine höhere Antioxidative Kapazität als nach dem Training. Ein Zusammenhang zwischen lag-Phase der LDL-Oxidation und der Antioxidativen Kapazität konnte nicht hergestellt werden. Beide Werte hängen offensichtlich von unterschiedlichen physiologischen Parametern ab (*Tsai et al. 1994*).

Obwohl zahlreiche Untersuchungen vorliegen, die eine Adaption des antioxidativen Systems an regelmäßige Ausdauerbelastungen zeigen, fand sich keine Arbeit, die Ausdauertraining und die gesamte peroxyradikalabfangende antioxidative Kapazität im Plasma (TRAP) untersucht hat. Akuter physiologischer oxidativer Stress, erzeugt durch Langstreckenlauf (31 km) bzw. Marathon-Lauf, führte bei zwei Arbeitsgruppen zu einer Erhöhung der Antioxidativen Kapazität, wobei bei einer Untersuchung ein Zusammenhang zum Vitamin E-Anstieg bestand (*Vasankari et al. 1997*), in der anderen aber kein Anstieg von Vitamin E oder anderen antioxidativ wirkenden Vitaminen zu beobachten war (*Liu et al. 1999*). Beide Untersuchungen wurden an gut trainierten Läufern und trainierten Freizeitsportlern durchgeführt, die damit eine Aktivierung ihres antioxidativen Systems als Reaktion auf oxidative Belastung zeigten. Da wir die Antioxidative Kapazität nur als Ruhewerte untersucht haben, kann eine veränderte Aktivierung des antioxidativen Systems nach dem Ausdauertraining unter Belastung nicht gezeigt werden. Ein Grund für den niedrigeren Ruhewert der Antioxidativen Kapazität nach dem Ausdauertraining könnte möglicherweise der erhöhte Verbrauch an Antioxidantien durch die regelmäßigen Trainingseinheiten sein, der durch unveränderte Nahrungszusammensetzung nicht ausgeglichen werden konnte. Dies hatte aber noch keine Konsequenzen für die Oxidierbarkeit von LDL *in vitro*. Trotzdem würde diese Tatsache für eine Substitution mit Antioxidantien auch bei moderat trainierenden Sportlern sprechen.

5.4.2 Bestimmung der Antioxidativen Kapazität des Plasma bei Koronarer Herzkrankheit

Da sich durch die Versuchsreihe mit den cholesteringefütterten Kaninchen (5.3) der Verdacht ergab, daß möglicherweise ein Zusammenhang zwischen Antioxidativer Kapazität im Plasma und Plaqueprogression besteht, wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob sich auch bei verschiedenen kardiologischen Patientengruppen Hinweise auf Veränderungen zur Antioxidativen Kapazität feststellen und in Zusammenhang zu Koronarer Herzkrankheit bringen lassen. Ausgangspunkt war wiederum die LDL-Oxidationshypothese zur Atherogenese und die Fragestellung, ob diese in einem schlechten antioxidativen Milieu verstärkt zum Tragen kommen könnte. Es wurden sowohl Patienten mit nachgewiesener KHK untersucht, als auch Patienten, bei denen KHK ausgeschlossen worden ist bzw. kein Verdacht für diese Krankheit vorlag. Eine Gruppe, nach eigenen Angaben Gesunder, diente als Kontrollgruppe.

Betrachtet man zunächst die einzelnen Patientengruppen, so ist festzustellen, daß nur die Gruppe der Patienten ohne KHK Verdacht (Gruppe III) eine erhöhte Antioxidative Kapazität aufwies. Die Kontrollgruppe war weder von der Patientengruppe mit nachgewiesener KHK noch von der Patientengruppen mit ausgeschlossener KHK zu unterscheiden. Dies liegt sicherlich am geringeren Altersdurchschnitt der Kontrollgruppe, und daß hier der Zustand der Gefäße, wie bei den Patienten ohne KHK Verdacht, nicht erfaßt worden ist. Pauschal kann somit keine Aussage zur Kontrollgruppe getroffen werden. Interessant wäre vielmehr, einzelne Versuchspersonen über einen längeren Zeitraum zu beobachten, um dann im nachhinein Rückschlüsse darauf ziehen zu können, ob eine verringerte Antioxidative Kapazität an der Atherogenese mitbeteiligt sein könnte. Denn auch der Vergleich von Patienten mit nachgewiesener KHK mit den Patienten mit ausgeschlossener KHK legt die Vermutung nahe, daß die Antioxidative Kapazität des Plasmas, auf diese Art und Weise betrachtet, keine Aussagen über das Ausmaß der Gefäßveränderungen zuläßt.

Bezieht man aber die Harnsäure-Konzentrationen und die Tatsache, daß Harnsäure einen nicht unerheblichen Beitrag zur Antioxidativen Kapazität des Plasma leistet, in die Überlegungen mit ein, könnte sich der gemessene Wert für die Antioxidative Kapazität für die Gruppen I (Patienten mit nachgewiesener KHK) und III (ohne KHK-Verdacht) reduzieren. Der „verbleibende Rest“ der Antioxidativen Kapazität von

Gruppe I würde dann niedriger ausfallen als bei den anderen Gruppen und könnte so für die Vermutung sprechen, daß, ebenso wie bei den cholesteringefütterten NZW-Kaninchen, das antioxidative Milieu Einfluß auf Veränderungen an den Blutgefäßen haben könnte. Allerdings ist damit noch nicht geklärt, ob erhöhte Harnsäurewerte ursächlich an Gefäßveränderungen, z. B. durch verstärkte Plättchenaggregation beteiligt sind, oder ob sie eine Folge der Gefäßerkrankung sind.

In einer kürzlich erschienenen Publikation (*Nieto et al. 2000*) wird ebenfalls die Hypothese aufgestellt, daß erhöhte Harnsäurekonzentrationen für unerwartet hohe Antioxidative Kapazitäten im Serum von Patienten mit Carotis-Atherosklerose verantwortlich sein könnten. Außerdem bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Harnsäurewerten und dem Auftreten von Carotisveränderungen, die 13 Jahre später gemessen wurden. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß die Antioxidative Kapazität durch Harnsäure nur scheinbar erhöht wird. Eine Erklärung für das Auftreten von Hyperurikämie bei Patienten mit atherosklerotischen Veränderungen könnten experimentelle Beweise liefern, die belegen, daß erhöhte Harnsäurewerte beim Menschen den Versuch einer kompensatorischen Antwort auf oxidativen Stress darstellen, der bekanntermaßen zu Alterung und Lipidperoxidation führt.

5.4.3 Bestimmung von Aminogruppen in LDL durch Fluorescamin-Titration im Plasma bei Koronarer Herzkrankheit

Nachdem bei der *in vitro* Oxidation von LDL eine Abnahme an freien Aminogruppen mit Fluorescamin gefunden worden war, stellte sich die Frage, ob sich mit diesem Reagenz auch Veränderungen an LDL direkt aus dem Plasma nachweisen lassen. Veränderungen am Proteinanteil des LDL sind mit einer Verschiebung der Gesamtladung zum negativem hin verbunden und konnten in der vorliegenden Arbeit auch elektrophoretisch dargestellt werden. *In vivo* sollen 1-10% des gesamten LDL auf negativ geladenes LDL entfallen (*Jankowski et al. 1998*). Um dieses *in vivo* modifizierte LDL erfassen zu können, wurde Fluorescamin direkt dem Plasma zugesetzt und anschließend LDL isoliert. Die dann gemessene Fluoreszenz des isolierten LDL wurde als Maß für die freien Aminogruppen verwendet, das zur Standardisierung auf den Cholesteringehalt der jeweiligen LDL-Probe bezogen wurde.

Überraschenderweise wurden bei allen Patientengruppen höhere Fluoreszenzintensitäten bezogen auf den LDL-Cholesteringehalt gefunden als bei den Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen. Es war davon ausgegangen worden, daß bei Patienten mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko LDL zumindest schon zum Teil im Plasma modifiziert vorliegen könnte, und deshalb weniger freie Aminogruppen zur Verfügung stehen würden, die mit Fluorescamin zu einem fluoreszierendem Produkt reagieren könnten.

Allerdings deckt sich das vorliegende Ergebnis mit den von *Schreier et al. 1996* gemachten Beobachtungen. Sie untersuchten sowohl normo- als auch dyslipidämische Patienten mit krankhaften atherosklerotischen kardiovaskulären Veränderungen im Vergleich zu Gesunden. Das LDL der Patientengruppe war zum einen triglyceridreicher als das der Kontrollgruppe und zum anderen waren die LDL-ApoB Konzentration im Plasma und der ApoB/Cholesterin-Quotient, unabhängig ob normo- oder dyslipidämisch, signifikant höher. Dies legt die Vermutung nahe, daß das Plasma von Individuen mit kardiovaskulären Veränderungen vermehrt LDL-Partikel mit einer anderen chemischen Zusammensetzung enthält, und daß diese Veränderung zu einer relativen Zunahme von ApoB bezogen auf den Cholesteringehalt führt. Auch andere Autoren haben solch einen Zusammenhang bei Patienten mit fortgeschrittener Koronaratherosklerose (*Sniderman et al. 1982*) und bei Koronarer Herzkrankheit (*Vega und Grundy 1984*) gefunden. Letztere kommen zu dem Schluß, daß Alter, Körpergewicht und Triglyceridkonzentration zu einem veränderten LDL-ApoB/LDL-Cholesterin-Quotienten beitragen könnten. Dies wurde von *Swinkels et al. 1989* weiter untersucht. Diese Arbeitsgruppe kommt zu dem Schluß, daß das Vorhandensein eines proteinreichen LDL nicht als eindeutiger Hinweis für ein KHK-Risiko gewertet werden kann, da ein deutlicher Zusammenhang zwischen LDL-Cholesterin/LDL ApoB und Alter bzw. Serumtriglyceriden bzw. HDL-Cholesterin bestand. In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen in der zweiten, größeren und genauer untersuchten Gruppe des Hauptversuches kein Zusammenhang zwischen Alter und dem Fluoreszenz/LDL-Cholesterin-Quotienten festgestellt werden, was auf Grund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Patienten- und Kontrollgruppe durchaus eine Erklärung für das Ergebnis hätte sein können. Auch die Triglyceridkonzentrationen zeigten keine eindeutige Korrelation mit dem Fluoreszenz/LDL-Cholesterin-Quotienten, womit der hohe Wert der Gruppe II mit ausgeschlossener KHK ebenfalls eine Erklärung hätte

finden können. Diese Gruppe unterschied sich allerdings wegen der geringen Anzahl auch nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Auch diese Beobachtungen stehen im Zusammenhang mit der Tatsache, daß LDL eine sehr uneinheitliche Gruppe von Partikeln darstellt, die sich in Größe, Dichte, elektrischer Ladung und chemischer Zusammensetzung unterscheiden. Nimmt die Triglyceridkonzentration in LDL zu, was im Austausch mit Cholesterinestern geschieht (*Ikeda et al. 1998*), wird das LDL-Partikel kleiner und das Verhältnis von LDL-Cholesterin zu ApolipoproteinB nimmt ab (*Swinkels et al. 1989*). Das heißt, der von uns untersuchte LDL-Protein/Cholesterin-Quotient wird mit abnehmendem LDL-Partikeldurchmesser größer. Das LDL-Cholesterin/LDL-ApoB-Verhältnis soll deshalb den Gehalt an kleinem dichten LDL widerspiegeln (*Hattori et al. 1998*), das leichter oxidiert werden kann als größeres LDL mit geringerer Dichte. Dies wird einerseits auf eine labilere Oberfläche der LDL-Partikel (*Tribble et al. 1995*) zurückgeführt, andererseits auf das Vorhandensein von negativ geladenem LDL in den dichteren Fraktionen von LDL, das durch einen hohen Gehalt an Lipidperoxidationsprodukten als Pro-Oxidans auf unverändertes LDL wirken soll (*Sevanian et al. 1996*). Deshalb ist anzunehmen, daß Personen mit einem höheren Anteil an kleinem dichterem LDL einem größerem Risiko für atherosklerotische Ereignisse unterliegen (*Austin et al. 1988; Hattori et al. 1998*). Dabei spielt möglicherweise auch ein verminderter Gehalt an Sialinsäure in kleinen, dichten LDL-Partikeln eine Rolle (*Jaakkola et al. 1993, Campos et al. 1992*). Interessant ist auch, daß durch ein ausdauerorientiertes Training das LDL-Lipid / Protein-Verhältnis um 7 % anstieg, was als kardioprotektiver Effekt gewertet wurde (*Houmard et al. 1994*).

Inwieweit der ApoB/Cholesterin-Quotient des LDL und die hier verwendete, relativ einfache Bestimmungsmethode mit Fluorescamin wirklich als Indikator für atypische LDL-Partikel verwendet werden können, müßte weiter untersucht werden. Die gefundenen Ergebnisse zeigen aber auch, daß die Lipidkonzentrationen im Plasma nicht zwangsläufig den LDL-Charakter widerspiegeln, der aber für die Oxidationshypothese der Atherosklerose eine Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit konnte an den 21 Männern und Frauen der Kontrollgruppe gezeigt werden, daß ein gewisser Zusammenhang zwischen dem ermittelten Fluorescaminquotienten und der Dauer der lag-Phase bestand: Je kürzer die lag-Phase der LDL-Oxidation war, desto mehr

Fluorescamin bezogen auf Cholesterin konnte in der LDL-Bande gebunden werden. Auch dieses Ergebnis deckte sich nicht mit den Erwartungen. Bei einer kürzeren lag-Phase war von einem LDL ausgegangen worden, bei dem eventuell Aminogruppen schon modifiziert vorliegen könnten und deshalb weniger Fluorescamin an freie aminogruppen binden würde. Das Gegenteil scheint allerdings der Fall zu sein. Ob aber die Partikelgröße primär der Grund für diese Beobachtung ist, müßte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. In der Framingham Offspring Studie (*Campos et al. 1992*) wurde deutlich, daß auch die LDL-Partikelgröße in einer Populationsstudie allein nicht für die Bewertung des KHK-Risikos ausreicht. Zwar bestand ein Zusammenhang zwischen Größe des LDL und dem Triglycerid- und ApoB-Gehalt, und die höchsten LDL-Cholesterin/ApoB-Quotienten waren bei Personen mit hohem LDL-Cholesterin und großen LDL-Partikeln zu finden, aber interessanterweise hatten Personen mit LDL-Cholesterin ≥ 160 mg/dl 11 % höhere LDL-Cholesterin /ApoB-Werte als die Personen mit LDL-Cholesterin < 130 mg/dl. Diese Beobachtung könnten eine weitere Erklärung dafür liefern, warum es bei erhöhtem Cholesterinspiegel große Unterschiede im Ausmaß von KHK gibt. Auch familiäre Hypercholesterinämie und ein lebenslang erhöhter LDL-Plasmaspiegel zeigen signifikante Unterschiede in der Ausprägung der Atherosklerose (*Witztum 1993*) bzw. in der *in vitro* LDL-Oxidierbarkeit (*Raal et al. 1995*), wodurch der multifaktoriellen Charakter der Atherogenese ebenfalls widergespiegelt wird.

5.5 Einflüsse von LDL und Angiotensin II auf glatte Muskelzellen

Zahlreiche zelluläre Prozesse, die bei der Atherosklerose auftreten, wie z. B. Zellproliferation, Zellmigration und veränderte Kontraktilität glatter Muskelzellen, werden durch Änderungen der intrazellulären Calciumionenkonzentration hervorgerufen. Calciumionen sind wichtige Bestandteile von rezeptorvermittelten, intrazellulären Signalübertragungswegen. Damit üben freie Calciumionen eine Schlüsselstellung bei der Kontrolle der Zellreaktivität aus. Interessant ist deshalb die Wirkung von gefäßaktiven Substanzen wie atherogenem oxidiertem LDL und Angiotensin II auf die Calciumhomöostase von vaskulären glatten Muskelzellen und die Beeinflussung des Einstroms und der Freisetzung von Calciumionen in diesem Zusammenhang. Als geeignetes Modell für Untersuchungen der Ca^{2+} -Homöostase gelten die hier verwendeten glatten Muskelzellen A7r5 aus Rattenaorta (*Lapidot et al. 1996*).

5.5.1 Akute Wirkung von LDL auf glatte Muskelzellen

In der vorliegenden Arbeit löste oxidiertes LDL eine insgesamt stärkere Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration aus als das verwendete native LDL. OxLDL zeigte einen gewissen Plateau-Effekt und damit eine länger andauernde Erhöhung der intrazellulären freien Calciumionen, wodurch die Fläche unter der Kurve hier 1,5mal größer war als bei nativem LDL. Dies könnte für eine größere Gesamtwirkung des oxidierten LDL auf die Freisetzung von Calcium sprechen. Im Gegensatz dazu führte natives LDL zu einer kurzzeitig stärkeren Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Sowohl die Arbeitsgruppe um *Weisser et al. (1992)* als auch die um *Wells et al. (1996)* konnten für oxidiertes LDL ebenfalls einen größeren Effekt auf das intrazelluläre Calcium nachweisen als für natives LDL. Vorhandene Unterschiede in der Ausprägung der Ergebnissen könnten sich mit dem Oxidationsstatus des verwendeten LDL erklären lassen. Beide zitierte Arbeitsgruppen verwendeten LDL, das 24 Stunden mit 5 bzw. 10 μM CuSO_4 oxidiert wurde, anschließend dialysiert wurde und das zumindest im zweiten Fall innerhalb 14 Tagen aufgebraucht wurde. Das für die hier beschriebenen Versuche verwendete LDL wurde entsprechend dem LDL oxidiert,

das für die Aminogruppenbestimmung während des Oxidationsprozesses verwendet wurde. Die Oxidationsdauer betrug 3-4 Stunden. Das LDL zeigte danach eine deutliche Entfärbung und der Extinktionsanstieg bei 234 nm lag zwischen 0,5 und 0,7, wodurch auf oxidative Veränderungen geschlossen wurde. Auf eine Dialyse im Anschluß an die Oxidation wurde verzichtet, da *Lange (1997)* keinen Effekt mit dialysiertem, oxidiertem LDL auf die NO-Synthese in Endothelzellen fand, wohingegen mit nicht dialysiertem LDL ein Einfluß festzustellen war.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse legt die Vermutung nahe, daß länger oxidiertes LDL einen stärkeren Einfluß auf den Calciumanstieg hat als weniger lang oxidiertes LDL, bei dem trotzdem von oxidativen, sich vermutlich auch auf den Proteinanteil des LDL erstreckende, Veränderungen auszugehen ist.

Ein weiterer Einfluß auf das Ausmaß des Calciumsignals könnte vom Grad der Zelldifferenzierung kommen. OxLDL soll unter anderem den L-Typ Ca^{2+} -Kanal von A7r5 Zellen aktivieren, unabhängig von der cAMP/PKA-Signalübertragung. Der L-Typ Kanal stellt ein Merkmal für die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen dar. Über den molekularen Mechanismus der intrazellulären Calciumerhöhung durch LDL ist noch wenig bekannt. Es ist aber davon auszugehen, daß verschiedene Wege daran beteiligt sind, also sowohl ein kanalabhängiger Calciumeinstrom als auch rezeptorvermittelte Effekte. Darüber hinaus sollen Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentration an der Oxidation von nativem LDL beteiligt sein (*Wells et al. 1997*). Dies soll zu einem autogenen Verlauf des LDL-Oxidationsprozesses führen, in dem schon oxidiertes LDL eine intrazelluläre Calciumerhöhung bewirken soll, was wiederum die weitere Oxidation von nativem LDL voran bringen würde.

5.5.2 Wirkung von LDL auf den zellulären Angiotensin II -Effekt

Da die kurzzeitige Applikation von LDL auf glatte Muskelzellen A7r5 nicht den erwarteten Effekt hatte, wurde länger oxidiertes LDL in Inkubationsversuchen über 20 Stunden verwendet. Um eine Änderung in der Calciumhomoöostase messen zu können, wurde Angiotensin II als stark gefäßaktive, endogene Substanz verwendet.

Angiotensin II erhöht u. a. in glatten Muskelzellen die intrazelluläre Calciumkonzentration (*Smith 1986*) und induziert vaskuläre Kontraktionen. Darüber hinaus erhöht Angiotensin II in kultivierten Rattengefäßmuskelzellen über eine

NADH/NADPH-abhängige Oxidase die Produktion von Superoxidanionen, die als wichtige second messenger der AT II-Wirkung z. B. auf Zellhyperthrophie bzw. Hyperplasie, angesehen werden (*Maytin et al. 1999*). Außerdem kommt es durch AT II in Makrophagen zu einer Erhöhung der Lipoxygenase, was die Oxidation von LDL fördert.

Angiotensin II führte in allen vorbehandelten Zellen zu einem Calciumsignal. In den Zellen, die mit der höheren Konzentration an oxidiertem LDL inkubiert worden waren, lag dieses Signal deutlich über dem der unbehandelten Kontrollzellen. Dies legt die Vermutung nahe, daß die chronische Gegenwart von oxidiertem LDL eine durch Angiotensin II ausgelöste Calciumerhöhung verstärkt.

Diese Vermutung könnte auch durch die Ergebnisse der kurzzeitigen LDL-Applikation mit anschließender Angiotensin II-Stimulation gestützt werden. Bezieht man das Angiotensin II-Signal auf das vorangegangene LDL-Signal, so ist auch hier der Effekt von Angiotensin II auf die Calciumkonzentration bei Zellen, die mit der höheren Konzentration an oxidiertem LDL behandelt wurden, am höchsten.

Mit Angiotensin II konnten in A7r5-Zellen wiederholbare Veränderungen der Calciumkonzentration ausgelöst werden. Die Höhe der Änderungen war dabei ungefähr gleich. Bei der Inkubation der Zellen mit oxidiertem LDL und anschließender Applikation von Angiotensin II war in der Regel nur eine Stimulation möglich, bei der Inkubation mit nativem LDL konnte bei einigen Experimenten eine zweite schwache Stimulation erzielt werden. Dieses LDL liegt vermutlich nach 20 Stunden bei 37°C trotz antioxidativer Pufferung nicht mehr im „nativen“ Zustand vor. Im Vergleich dazu kann bei *in vitro* Gefäßkontraktionen an Rattenaorten und Kaninchencarotiden ebenfalls nur eine Kontraktion mit Angiotensin II trotz wiederholter Anwendung ausgelöst werden. Dies wird Tachyphylaxie genannt. Durch Zugabe von Reduktionsmitteln konnte in unserem Labor diese Reaktion abgeschwächt werden, was möglicherweise für die Beteiligung von Oxidation an Tachyphylaxie spricht.

5.5.3 Wirkung von Angiotensin II und AT 1-Rezeptorblockade auf glatte Muskelzellen

Durch eine AT 1-Rezeptorblockade mit Valsartan konnte die intrazelluläre Calciumerhöhung, die durch Angiotensin II ausgelöst wurde, abgeschwächt werden.

AT-1-Rezeptoren vermitteln die bekannten biologischen Wirkungen von Angiotensin II über eine Vielzahl von Übertragungswegen, z. B. die Aktivierung der Phospholipasen C und A₂, die Hemmung der Adenylatcyclase, die Öffnung von Calcium-Kanälen und die Aktivierung von Tyrosinkinasen (*Ardaillou 1999*). Allgemein blockiert Valsartan die von Angiotensin II über diesen Rezeptor vermittelte Wirkung. Angiotensin II ist das primär aktive Hormon des Renin-Angiotensin-Systems und ein potenter Vasokonstriktor. Außerdem setzt Angiotensin Aldosteron frei und stimuliert die Proliferation glatter Muskelzellen. AT 1-Rezeptorblocker werden zur Blutdrucksenkung bei Patienten mit Hypertonie eingesetzt. Da diese Patienten auch ein erhöhtes Risiko zu vaskulären Ereignissen aufweisen und Angiotensin II die LDL Oxidation durch Makrophagen erhöhen soll, könnten diese Patienten durch die Blockade des Rezeptors durch zusätzliche Wirkungen auf die Atherogenese profitieren. Bei *Heller et al. (1998)* und in eigenen Befunden fanden sich allerdings keine Anhaltspunkte für eine Veränderung der LDL-Oxidierbarkeit durch Losartan, ein weiterer AT 1-Rezeptorblocker. Die Wirkung von Angiotensin II-Rezeptor-Blockern auf den second messenger Calcium ist auch sicherlich nicht vergleichbar mit dem Einfluß, den gefäßselektiven Inhibitoren wie Nifedipin u. a. haben. Solche spezifische Substanzen sind im Gespräch als weiterer Ansatz in der Prävention / Therapie der Atherosklerose (*Howes et al. 1997, Wells et al. 1997*).

6 Zusammenfassung

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß oxidativ verändertes LDL in der Pathogenese der Atherosklerose eine bedeutende Rolle spielt. Grundlage für diese Hypothese sind Studien, die belegen, daß modifiziertes LDL u. a. chemotaktisch für Monozyten, zytotoxisch für Endothelzellen, immunogen und plättchenaggregierend wirkt, sowie in humanen und experimentellen Plaques gefunden wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst den chemischen Veränderungen in LDL während kupferkatalysierter Oxidation nachgegangen. Dabei stand neben dem Lipidanteil vor allem der Proteinanteil im Vordergrund. Es konnte mit zwei Methoden, Fluorescamin und TNBS, gezeigt werden, daß neben Reaktionen am Lipidteil, die durch Dien- und TBARS-Bildung nachgewiesen wurden, bereits zu einem frühen Zeitpunkt Aminogruppen des Proteins modifiziert werden. Eine quantitative Betrachtung legt nahe, daß der Hauptteil der nachgewiesenen Carbonylgruppen aus den Aminogruppen des Apolipoproteins entstanden sind.

Im Zusammenhang mit der kupferkatalysierten LDL-Oxidation wurde auch die Wirkung verschiedener Antioxidantien bzw. Herz-Kreislauf-Therapeutika sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf die Oxidierbarkeit von LDL getestet.

In den *in vitro* Versuchen zeigten sich vor allem in Bezug auf pharmakologische Dosen nur geringe antioxidative Effekte bei den eingesetzten CSE-Hemmern Lovastatin, Simvastatin und Fluvastatin und dem β -Blocker Carvedilol, wobei dessen Metabolit BM91.0228 eine stärkere Wirkung hatte. Ein weiterer β -Blocker, Metoprolol, und der AT 1-Rezeptorblocker Losartan wiesen eher prooxidative Tendenzen auf. Die stärkste verzögernde Wirkung auf die LDL-Oxidation war bei dem Vitamin E-Derivat U-83836E und den 21-Aminosteroiden U-74500A und U-74389G festzustellen. Im Vergleich zu den allopathischen Therapeutika führten die Untersuchungen mit Substanzen pflanzlichen Ursprungs zu einer deutlich stärkeren Verlängerung der lag-Phase, z. B. war Luteolin ein stärkeres Antioxidans als das Vitamin E-Derivat U-83836E. Aber auch Quercetin, Luteolin-7-glucosid und Rutin hemmten die LDL-Oxidation besser als die untersuchten CSE-Hemmer und β -Blocker. Bei Apigenin-7-glucosid war der Effekt nicht mehr ganz so ausgeprägt und bei

Apigenin und Vitexin-2-O-rhamnosid zeigte sich kaum noch eine antioxidative Wirkung. Am Beispiel eines Crataegus-Extraktes wurde außerdem die Potenzierung dieser antioxidativen Einzeleffekte der Flavonoide deutlich gemacht, da dieser Extrakt in der Lage war, die LDL-Oxidation bereits in einer geringeren Konzentration stärker zu hemmen.

Die *in vivo* Versuche wurden an hypercholesterinämischen WHHL-Kaninchen durchgeführt, wobei das isolierte LDL auf seine Oxidierbarkeit hin untersucht wurde. Probucol zeigte eine dreimal längere und Tocopherol eine doppelt so lange lag-Phase im Vergleich mit den Kontrolltieren. Mit Ubichinon Q10 und Carvedilol (zwei Konzentrationen) waren nur marginale Effekte auf die LDL-Oxidierbarkeit zu verzeichnen.

Als Weiterführung der Reaktion von Fluorescamin zum Nachweis der Aminogruppenänderungen in isoliertem LDL wurde eine Fluorescamin-Titration im Plasma entwickelt, aus dem anschließend LDL isoliert und fluorimetrisch untersucht wurde. Der Wert dieser Fluoreszenzmessung wurde als Ergebnis auf den Cholesteringehalt des isolierten LDL bezogen. Die Testung dieser Methode erfolgte an kardiologischen Patienten und an gesunden Kontrollpersonen. In zwei Studien zeigte sich, daß sich für Patienten höhere Werte ergaben als für die Kontrollpersonen, wobei vor allem bei Patienten mit nachgewiesenen Gefäßveränderungen der Unterschied signifikant war. Die Ursache für dieses Ergebnis konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Vieles spricht dafür, daß mit dieser neuen Methode Unterschiede in der Zusammensetzung von LDL nachgewiesen werden können, die möglicherweise auf ein verändertes vaskuläres Risiko hindeuten.

In einer weiteren Probandenstudie wurde der Frage nachgegangen, inwieweit oxidativer Stress, induziert durch sportliche Aktivität, Auswirkungen auf die LDL-Oxidierbarkeit und die Antioxidative Kapazität des Plasmas hat. Zwar beeinflussten auf der einen Seite weder das durchgeführte Ausdauertraining noch die Akutbelastungen die *in vitro* Oxidierbarkeit von LDL selbst nicht, auf der anderen Seite führte das Ausdauertraining aber zu einer Abnahme bzw. die Akutbelastung zu einer leichten Zunahme an konjugierten Dienen, die während der *in vitro* Oxidation von LDL entstehen. Diese Beobachtungen legen die Vermutung auf Veränderungen in der LDL-Zusammensetzung nahe, deren Ursachen und Auswirkungen aber ebenfalls noch einer

Klärung bedürfen. Die Antioxidative Kapazität des Plasmas nahm zwar durch das Ausdauertraining geringfügig ab, hatte aber offensichtlich keine Auswirkungen auf die LDL-Oxidierbarkeit *in vitro*.

Neben den chemischen und strukturellen Veränderungen des LDL stellt sich im Zusammenhang mit der Oxidationshypothese der Atherogenese als weitere Frage, welche Rolle nicht-LDL-assoziierte Antioxidantien, d. h. Antioxidantien des Plasmas bzw. extrazellulärer Flüssigkeiten spielen. Dazu wurde am Tiermodell der Versuch unternommen, durch Bestimmung der Antioxidativen Kapazität im Plasma ein Zusammenhang zu vaskulären Veränderungen herzustellen. An Kaninchen, die sechs Wochen lang cholesterinreich ernährt wurden und anschließend wieder Normalfutter bekamen, konnten die Beobachtungen zur Plaqueprogression besser mit der verminderten Antioxidativen Kapazität des Plasmas erklärt werden als mit der LDL-Oxidierbarkeit *in vitro*, die durch eine verlängerte lag-Phase charakterisiert war.

Im Gegensatz dazu ließ sich allein auf Grund der Daten zur Antioxidativen Kapazität bei kardiologischen Patienten mit teilweiser Koronarer Herzkrankheit nicht auf vaskuläre Veränderungen schließen, da sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollpersonen und Patienten zeigte. Bezieht man allerdings die gemessenen Harnsäurekonzentrationen, die zur Antioxidativen Kapazität beitragen, und die bei den Patienten mit KHK im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich höher lagen, mit ein, so ergibt sich tatsächlich ein geringerer Wert für die Antioxidative Kapazität bei Patienten mit koronaren Gefäßveränderungen. Möglicherweise steht die Zunahme an Harnsäure im Plasma von Patienten mit atherosklerotischen Veränderungen im Zusammenhang damit, daß dadurch ein Mangel an Antioxidantien kompensiert werden soll, der entweder primär vorhanden ist, oder der als Folge einer erhöhten Radikalproduktion, z. B. im Verlauf einer chronischen Entzündung, auftritt.

In der für die Bestimmung der Antioxidativen Kapazität verwendeten AAPH-Reaktion konnte außerdem die unterschiedliche Wirkung verschiedener Antioxidantien dargestellt werden. Es ließ sich in allen Fällen ein konzentrationsabhängiger, radikalabfangender Effekt feststellen, wobei Nordihydroguarsäure vor dem Vitamin E-Derivat Trolox[®] die größte Wirkung zeigte. Geringeres antioxidative Potential in dieser Reaktion wiesen Homocystein, Vitamin C und Glutathion auf. Die Problematik der Pro- und Antioxidation in einem abgeschlossenen System wurde dadurch deutlich, daß

im Anschluß an die radikalabfangende Reaktion eine verstärkte Radikalproduktion bei Vitamin C, Homocystein, Glutathion und Plasma auftrat.

Zur näheren Betrachtung der zellulären Wirkungen von LDL wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Calciumhomöostase an kultivierten glatten Muskelzellen durchgeführt. LDL führte akut appliziert zu einem intrazellulären Calciumanstieg, der bei oxidiertem LDL verstärkt auftrat. Bei mit oxidiertem LDL vorbehandelten Zellen bewirkte Angiotensin II eine stärkere Erhöhung der zellulären Calciumkonzentration im Vergleich zu nativem LDL. Unabhängig davon schwächte eine AT 1-Rezeptorblockade mit Valsartan den Angiotensin-Effekt ab. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß das Zusammenspiel von oxidiertem LDL und gefäßaktivem Angiotensin II zu deutlichen Änderungen im zellulären Calciumhaushalt führt, und daß dadurch die Wirkung von oxidiertem LDL auf Zellen verstärkt zum Tragen kommt. Eventuell könnte dieser Prozeß durch AT 1-Rezeptorblocker vermindert werden.

7 Literaturverzeichnis

- ALESSIO, H. M. (1993):
Exercise-induced oxidative stress.
Med Sci Sports Exerc 25, S. 218-224
- AMICI, A.; LEVINE, R. L.; TSAI, L.; STADTMAN, E. R. (1989):
Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by meta-catalyzed oxidation reactions.
J Biol Chem 264, S. 3341-3346
- ARDAILLOU, R. (1999):
Angiotensin II receptors.
J Am Soc Nephrol 10 Suppl 11, S. S30-39
- ARNOLD, K.; ARNHOLD, J.; ZSCHÖRNIG, O.; WIEGEL, D.; KRUMBIEGEL, M. (1989):
Characterization of chemical modifications of surface properties of low density lipoprotein.
Biomed Biochim Acta 48, S. 735-742
- AUSTIN, M. A.; BRESLOW, J. L.; HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E.; WILLETT, W. C.; KRAUSS, R. M. (1988):
Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction.
JAMA 260, S. 1917-1921
- AVIRAM, M.; DANKNER, G.; COGAN, U.; HOCHGRAF, E.; BROOK, J. G. (1992):
Lovastatin inhibits low-density lipoprotein oxidation and alters its fluidity and uptake by macrophages: in vitro and in vivo studies.
Metabolism 41, S. 229-235
- BAUMSTARK, M. W.; FREY, I.; BERG, A. (1993):
Acute and delayed effects of prolonged exercise on serum lipoproteins
II. Concentration and composition of low-density lipoprotein subfractions and very low-density lipoproteins.
Eur J Appl Physiol 66, S. 526-530
- BERG, A.; FREY, I.; BAUMSTARK, M. W.; HALLE, M.; KEUL, J. (1994):
Physical activity and lipoprotein lipid disorders.
Sports Med 17, S. 6-21
- BÖHLEN, P.; STEIN, S.; DAIRMAN, W.; UDENFRIEND, S. (1973):
Fluorometric assay of proteins in the nanogram range.
Arch Biochem Biophys 155, S. 213-220

- BOWRY, V. W.; STOCKER, R. (1993):
Tocopherol-mediated peroxidation. The pro-oxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein.
J Am Chem Soc 115, S. 6029-6044
- BRAUGHLER, J. M.; PREGENZER, J. F.; CHASE, R. L.; DUNCAN, R. L.; JACOBSEN, E. J.; MCCALL, J. M. (1987):
Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation.
J Biol Chem 262, S. 10438-10440
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. (1986):
A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.
Science 232, S. 34-47
- CAMPOS, H.; BLIJLEVENS, E.; MCNAMARA, J. R.; ORDOVAS, J. M.; POSNER, B. M.; WILSON, P. W. F.; CASTELLI, W. P.; SCHAEFER, E. (1992):
LDL particle size distribution. Results from the Framingham offspring Study.
Arterioscler Thromb 12, S. 1410-1419
- CERIELLO, A.; BORTOLOTTI, N.; FALLETI, E.; TABOGA, C.; TONUTTI, L.; CRESCENTINI, A.; MOTZ, E.; LIZZIO, S.; RUSSO, A.; BARTOLI, E. (1997):
Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients.
Diabetes Care 20, S. 194-197
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. (1996):
Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources.
J Nutr Biochem 7, S. 66-76
- CREMER, P.; NAGEL, D.; LABROT, B.; MUCHE, R.; ELSTER, H.; MANN, H.; SEIDEL, D. (1991):
*Göttinger Risiko-, Inzidenz- und Prävalenzstudie (GRIPS):
Entwicklung einer diagnostischen Strategie zur Früherkennung und präventiven
Behandlung Koronargefährdeter; 5-Jahres-Ergebnisse einer prospektiven
Inzidenzstudie*
Springer-Verlag, 1991, Berlin Heidelberg
- CURRIE, I. C.; WILSON, Y. G.; SCOTT, J.; DAY, A.; STANSBIE, D.; BAIRD, R. N.; LAMONT, P. M.; TENNANT, W. G. (1996):
Homocysteine: an independent risk factor for the failure of vascular intervention.
Br J Surg 83, S. 1238-1241
- DE GRAAF, J.; HAK-LEMMERS, H. L. M.; HECTORS, M. P. C.; DEMACKER, P. N. M.; HENDRIKS, J. C. M.; STALENHOEF, A. F. H. (1991):
Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects.
Arterioscler Thromb 11, S. 298-306

- DIEBER-ROTHENEDER, M.; PUHL, H.; WAEG, G.; STRIEGL, G.; ESTERBAUER, H. (1991):
Effect of oral supplementation with D-a-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation.
J Lipid Res 32, S. 1325-1332
- ESTERBAUER, H.; RAMOS, P. (1995):
Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL.
In: *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127, S. 31-63
- ESTERBAUER, H.; JÜRGENS, G. (1993):
Mechanistic and genetic aspects of susceptibility of LDL to oxidation.
Curr Opin Lipidol 4, S. 114-124
- ESTERBAUER, H.; STRIEGL, G.; PUHL, H.; ROTHENEDER, M. (1989):
Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein.
Free Radic Res Comms 6, S. 67-75
- GIROUX, L. M.; DAVIGNON, J.; NARUSZEWICZ, M. (1993):
Simvastatin inhibits the oxidation of low-density lipoproteins by activated human monocyte-derived macrophages.
Biochim Biophys Acta 1165, S. 335-338
- GRUNDY, S. M. (1995):
Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease.
Clin Chem 41, S. 139-146
- GRYNKIEWIEZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. (1985):
A new generation of Ca²⁺ Indicators with greatly improved fluorescence properties.
J Biol Chem 260, S. 2440-2450
- GUGELER, N. (1997):
Peroxidationsreaktionen bei der Atherogenese: Modulatoren der LDL-Oxidation und der Radikalbildung von Makrophagen.
Dissertation der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.
- HABEEB, A. F. S. A. (1966):
Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene sulphonic acid.
Anal Biochem 14, S. 328-336
- HABERLAND, M. E.; OLCHE, C. L.; FOLGELMAN, A. M. (1984):
Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages.
J Biol Chem 259, S. 11305-11311
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. (1990):
The antioxidants of human extracellular fluids.
Arch Biochem Biophys 280, S. 1-8

- HALVORSEN, B.; BRUDE, I.; DREVON, C. A.; NYSOM, J.; OSE, L.; CHRISTIANSEN, E. N.; NENSETER, M. S. (1996):
Effect of homocysteine on copper ion-catalyzed, azo compound-initiated, and mononuclear cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein.
J Lipid Res 37, S. 1591-1600
- HATTORI, Y.; SUZUKI, M.; TSUSHIMA, M.; YOSHIDA, M.; TOKUNAGA, Y.; WANG, Y.; ZHAO, D.; TAKEUCHI, M.; HARA, Y.; RYOMOTO, K. I.; IKEBUCHI, M.; KISHIOKA, H.; MANNAMI, T.; BABA, S.; HARANO, Y. (1998):
Development of approximate formula for LDL-chol, LDL-apo B and LDL-chol/LDL-apo B as indices of hyperapobetalipoproteinemia and small dense LDL.
Atherosclerosis 138, S. 289-299
- HAZELL, L. J.; VAN DEN BERG, J. J. M.; STOCKER, R. (1994):
Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation.
Biochem J 302, S. 297-304
- HEINLE, H.; LIEBICH, H. (1980):
The influence of diet-induced hypercholesterolemia on the degree of oxidation of glutathione in rabbit aorta.
Atherosclerosis 37, S. 637-640
- HELLER, F. R.; DESCAMPS, O.; HONDEKIJN, J.-C. (1998):
LDL oxidation: therapeutic perspectives.
Atherosclerosis 137 (Suppl.), S. S25-S31
- HENRIKSEN, T.; MAHONEY, E. M.; STEINBERG, D. (1981):
Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins.
Proc Natl Acad Sci USA 78, S. 6499-6503
- HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. (1993):
Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study.
Lancet 342, S. 1007-1011
- HILTUNEN, T. P.; YLÄ-HERTTUALA, S. (1998):
Expression of lipoprotein receptors in atherosclerotic lesions.
Atherosclerosis 137 (Suppl.), S. S81-S88
- HOUMARD, J. A.; BRUNO, N. J.; BRUNER, R. K.; MCCAMMON, M. R.; ISRAEL, R. G.; BARAKAT, H. A. (1994):
Effects of exercise training on the chemical composition of plasma LDL.
Arterioscler Thromb 14, S. 325-330

- HOWES, L. G.; ABBOTT, D.; STRAZNICKY, N. E. (1997):
Lipoproteins and cardiovascular reactivity.
Br J Clin Pharmacol 44, S. 319-324
- IKEDA, Y.; ASHIDA, Y.; TAKAGI, A.; FUKUOKA, T.; TSURU, A.; TSUSHIMA, M.;
YAMAMOTO, A. (1998):
Mechanism of the production of small dense LDL (sLDL) in hypertriglyceridemia.
In: JACOTOT, B.; MATHÉ, D. und FRUCHART, J.-C.: Atherosclerosis XI. Elsevier
Science, Singapore 1998, S. 777-788
- JAANKOLA, O.; SOLAKIVI, T.; TERTOV, V. V.; OREKHOV, A. N.; MIETTINEN, T. A.;
NIKKARI, T. (1993):
Characteristics of low-density lipoprotein subfractions from patients with coronary
artery disease.
Coron Artery Dis 4, S. 379-385
- JAKÓBISIAK, M.; BRUNO, S.; SKIERSKI, J. S.; DARZYNKIEWICZ, Z. (1991):
Cell cycle-specific effects of lovastatin.
Proc Natl Acad Sci USA 88, S. 3628-3632
- JANKOWSKI, J.; NOFER, J.-R.; TEPEL, M.; GRIEWEL, B.; SCHLÜTER, H.; ASSMANN, G.;
ZIDEK, W. (1998):
Identification of oxidized low density lipoprotein in human serum by NMR
spectroscopy.
Clin Sci 95, S. 489-495
- JÜRGENS, G.; HOFF, H. F.; CHISOLM III, G. M.; ESTERBAUER, H. (1987):
Modifications of human serum low density lipoprotein by oxidation-
Characterization and pathophysiological implications.
Chem Phys Lipids 45, S. 315-336
- KLEINVELD, H. A.; HAK-LEMMERS, H. L. M.; STALENHOEF, A. F. H.;
DEMACKER, P. N. M. (1992):
Improved measurement of low-density lipoprotein susceptibility to copper-induced
oxidation: Application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein.
Clin Chem 38, S. 2066-2072
- KNOTT, T. J.; PEASE, R. J.; POWELL, L. M.; WALLIS, S. C.; RALL JR., S. C.;
INNERARITY, T. L.; BLACKHART, B.; TAYLOR, W. H.; MARCEL, Y.; MILNE, R.;
JOHNSON, D.; FULLER, M.; LUSIS, A. J.; MCCARTHY, B. J.; MAHLEY, R. W.; LEVY-
WILSON, B.; SCOTT, J. (1986):
Complete protein sequence and identification of structural domains of human
apoprotein B.
Nature 323, S. 734-742

- KOKSCH, M.; RÜHLMANN, C.; ARNHOLD, J.; WIEGEL, D. (1992):
In-vitro-Effekte von niedermolekularem Dextran auf die Oberflächeneigenschaften von LDL.
Z Gesamte Inn Med 47, S. 535-537
- KONTUSH, A.; DJAHANSOUZI, S.; BRAESEN, J. H.; KOHLSCHÜTTER, A.; BEISIEGEL, U. (1997):
Physiological doses of chemically different antioxidants decrease the oxidizability of blood plasma in hyperlipidaemic rabbits.
Atherosclerosis 134, S. 204
- KREUZER, J.; WHITE, A. L.; KNOTT, T. J.; JIEN, M.-L.; MEHRABIAN, M.; SCOTT, J.; YOUNG, S. G.; HABERLAND, M. E. (1997):
Amino terminus of apolipoprotein B suffices to produce recognition of malondialdehyde-modified low density lipoprotein by the scavenger receptor of human monocyte-macrophages.
J Lipid Res 38, S. 324-342
- KUZUYA, M.; YAMADA, K.; HAYASHI, T.; FUNAKI, C.; NAITO, M.; ASAI, K.; KUZUYA F. (1992):
Role of lipoprotein-copper complex in copper catalyzed-peroxidation of low-density lipoprotein.
Biochim Biophys Acta 1123, S. 334-341
- LANGE, M. (1997):
Zellbiologische Untersuchungen zur Wirkung von Antioxidantien bei der Atherogenese.
Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- LAPIDOT, S. A.; HUANG, B. K.; FAYAZI, A.; RUSSEK, L. N.; STRICKBERGER, S. A.; BROOKS, A. E.; PHAIR, R. D. (1996):
Mechanisms for Ca signaling in vascular smooth muscle: Resolved from Ca-45 uptake and efflux experiments.
Cell Calcium 19, S. 167-184
- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.-G.; AHN, B.-W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. (1990):
Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.
Methods Enzymol 186, S. 464-478
- LISSI, E.; PASCUAL, C.; CASTILLO DEL, M. D. (1992):
Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolyse.
Free Radic Res Comms 17, S. 299-311
- LISSI, E. A.; FAURE, M.; CLAVERO, N. (1991):
Effect of additives on the inactivation of lysosyme mediated by free radicals produced in the thermolysis of 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane).
Free Radic Res Comms 14, S. 373-384

- LIU, M.-L.; BERGHOLM, R.; MÄKIMATTILA, S.; LAHDENPERÄ, S.; VALKONEN, M.; HILDEN, H.; YKI-JÄRVINEN, H.; TASKINEN M. R. (1999):
A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants.
Am J Physiol (Endocrinol Metab 39) 276, S. E1083-E1091
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J Biol Chem 193, S. 265-275
- LYNCH, S. M.; FREI, B. (1997):
Physiological thiol compounds exert pro- and anti-oxidant effects, respectively, on iron- and copper-dependent oxidation of human low-density lipoprotein.
Biochim Biophys Acta 1345, S. 215-221
- MARKWELL, M. A. K.; HAAS, S. M.; TOLBERT, N. E.; BIEBER, L. L. (1981):
Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures.
Methods Enzymol 72, S. 296-303
- MAYTIN, M.; LEOPOLD, L.; LOSCALZO, J. (1999):
Oxidant stress in the vasculature.
Curr Atherosclerosis Reports 1, S. 156-164
- MCMILLAN, G. C. (1995):
Historical review of research on atherosclerosis.
Adv Exp Med Biol 369, S. 1-6
- METSÄ-KETELÄ, T. (1991):
Luminescent assay for total peroxy radical-trapping capability of plasma.
In: STANLEY, P. E.: Bioluminescence and chemiluminescence current status.
Chichester 1991, S. 389-392
- NIETO, F. J.; IRIBARREN, C.; GROSS, M. D.; COMSTOCK, G. W.; CUTLER, R. G. (2000):
Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis?.
Atherosclerosis 148, S. 131-139
- NOGUCHI, N.; GOTOH, N.; NIKI, E. (1994):
Effects of ebselen and probucol on oxidative modifications of lipid and protein of low density lipoprotein induced by free radicals.
Biochim Biophys Acta 1213, S. 176-182
- O'LEARY, V. J.; TILLING, L.; FLEETWOOD, G.; STONE, D.; DARLEY-USMAR, V. (1996):
The resistance of low density lipoprotein to oxidation promoted by copper and its use as an index of antioxidant therapy.
Atherosclerosis 119, S. 169-179

- PARTHASARATHY, S.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. (1992):
The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis.
Annu Rev Med 43, S. 219-225
- PENN, M. S.; CHISOLM, G. M. (1994):
Oxidized lipoproteins, altered cell function and atherosclerosis.
Atherosclerosis 108 (Suppl.), S. S21-S29
- PUHL, H.; WAEG, G.; ESTERBAUER, H. (1994):
Methods to determine oxidation of low-density lipoprotein.
Methods Enzymol 223, S. 425-441
- RAAL, F. J.; AREIAS, A. J.; WAISBERG, R.; ARB VON, M. (1995):
Susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in familial hypercholesterolaemia.
Atherosclerosis 115, S. 9-15
- RAMOS, P.; GIESEG, S. P.; SCHUSTER, B.; ESTERBAUER, H. (1995):
Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein.
J Lipid Res 36, S. 2113-2128
- RATTY, A. K.; DAS, N. P. (1988):
Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship.
Biochem Med Metabol Biol 39, S. 69-79
- REAVEN, P. D. (1994):
Mechanisms of atherosclerosis: role of LDL oxidation.
Adv Exp Med Biol 366, S. 113-128
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. (1996):
Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.
Free Radic Biol Med 20, S. 933-956
- ROBERTSON, J. D.; MAUGHAN, R. J.; DUTHIE, G. G.; MORRICE, P. C. (1991):
Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load.
Clin Sci 80, S. 611-618
- ROSS, R. (1998):
New insights into the mechanisms of atherosclerosis.
In: JACOTOT, B.; MATHÉ, D. und FRUCHART, J.-C.: *Atherosclerosis XI*. Elsevier Science, Singapore 1998, S. 201-204
- ROSS, R. (1986):
The pathogenesis of atherosclerosis: an update.
N Engl J Med 314, S. 488-500

- SANCHEZ-QUESADA, J. L.; JORBA, O.; PAYES, A.; OTAL, C.; SERRA-GRIMA, R.; GONZALEZ-SASTRE, F.; ORDONEZ-LLANOS, J. (1998):
Ascorbic acid inhibits the increase in low-density lipoprotein (LDL) susceptibility to oxidation and the proportion of electronegative LDL induced by intense aerobic exercise.
Coron Artery Dis 9, S. 249-255
- SANCHEZ-QUESADA, J. L.; ORTEGA, H.; PAYES-ROMERO, A.; SERRAT-SERRAT, J.; GONZALEZ-SASTRE, F.; LASUNCION, M. A.; ORDONEZ-LLANOS, J. (1997):
LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects.
Atherosclerosis 132, S. 207-213
- SANCHEZ-QUESADA, J. L.; HOMS-SERRADESANFERM, R.; SERRAT-SERRAT, J.; SERRA-GRIMA, J. R.; GONZALEZ-SASTRE, F.; ORDONEZ-LLANOS, J. (1995):
Increase of LDL susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise.
Atherosclerosis 118, S. 297-305
- SAWAMURA, T.; KUME, N.; AOYAMA, T.; MORIWAKI, H.; HOSHIKAWA, H.; AIBA, Y.; TANAKA, T.; MIWA, S.; KATSURA, Y.; KITA, T.; MASAKI, T. (1997):
An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein.
Nature 386, S. 73-77
- SCHNEIDER, W.; DALFERTH, P.; KELBER, O.; FRIEDEMANN, G.; HAASIS, R.; HEINLE, H. (1999):
Oxidizability of low density lipoprotein and total antioxidative capacity of plasma are differently altered during induction and regression of hypercholesterolemia in rabbits.
Atherosclerosis 144, S. 69-72
- SCHREIER, L. E.; SANGUINETTI, S.; MOSSO, H.; LOPEZ, G. I.; SIRI, L.; WIKINSKI, R. L. W. (1996):
Low-density lipoprotein composition and oxidability in atherosclerotic cardiovascular disease.
Clin Biochem 29, S. 479-487
- SEVANI, A.; HWANG, J.; HODIS, H.; CAZZOLATO, G.; AVOGARO, P.; BITTOLO-BON, G. (1996):
Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 16, S. 784-793
- SHARPE, P. C.; DULY, E. B.; MACAULEY, D.; MCCRUM, E. E.; MULHOLLAND, C.; STOTT, G.; BOREHAM, C. A. G.; KENNEDY, G.; EVANS, A. E.; TRINICK, T. R. (1996):
Total radical trapping antioxidant potential (TRAP) and exercise.
Q J Med 89, S. 223-228

- SHERN-BREWER, R.; SANTANAM, N.; WETZSTEIN, C.; WHITE-WELKLEY, J.; PARTHASARATHY, S. (1998):
Exercise and cardiovascular disease. A new perspective.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 18, S. 1181-1187
- SIES, H. (1986):
Biochemie des oxidativen Stress.
Angew Chem 98, S. 1061-1075
- SMITH, J. B. (1986):
Angiotensin-receptor signaling in cultured vascular smooth muscle cells.
Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol 19) 250, S. F759-F769
- SNIDERMAN, A. D.; WOLFSON, C.; TENG, B.; FRANKLIN, F. A.; BACHORIK, P. S.; KWITEROVICH, P. O. (1982):
Association of hyperapobetalipoproteinemia with endogenous hypertriglyceridemia and atherosclerosis.
Ann Intern Med 97, S. 833-839
- STADTMAN, E. R.; OLIVER, C. N. (1991):
Metal-catalyzed oxidation of proteins.
J Biol Chem 266, S. 2005-2008
- STAIT, S., E.; LEAKE, D. S. (1994):
Ascorbic acid can either increase or decrease low density lipoprotein modification.
FEBS Lett 341, S. 263-267
- STEINBERG, D. (1997):
Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis.
Circulation 95, S. 1062-1071
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. (1989):
Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.
N Engl J Med 320, S. 915-924
- STEINBRECHER, U. P. (1987):
Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products.
J Biol Chem 262, S. 3603-3608
- STEINBRECHER, U. P.; WITZTUM, J. L.; PARTHASARATHY, S.; STEINBERG, D. (1987):
Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL.
Arteriosclerosis 7, S. 135-143

- STOCKER, R.; UPSTON, J. M.; NIU, X.; TERENTIS, A. C.; ZAMMIT, V.; HAZELL, L. J.; FU, S.; DEAN, R. T. (1998):
Lipoprotein oxidation in human atherosclerosis.
In: JACOTOT, B.; MATHÉ, D. und FRUCHART, J.-C.: Atherosclerosis XI. Elsevier Science, Singapore 1998, S. 475-482
- STRYER, L. (1990):
Biochemie
Spektrum der Wissenschaft Verl.-Ges., Heidelberg 1990, S. 586 ff.
- SWINKELS, D. W.; DEMACKER, P. N. M.; HENDRIKS, J. C. M.; VAN'T LAAR, A. (1989):
Low density lipoprotein subfractions and relationship to other risk factors for coronary artery disease in healthy individuals.
Arteriosclerosis 9, S. 604-613
- TEUSCHER, E. (1997):
Biogene Arzneimittel
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 5. Auflage 1998, S. 188 ff.
- TOBOREK, M.; KOPIECZNA-GRZEBIENIAK, E.; DROZDZ, M.; WIECZOREK, M. (1995):
Increased lipid peroxidation as a mechanism of methionine-induced atherosclerosis in rabbits.
Atherosclerosis 115, S. 217-224
- TRIBBLE, D. L.; KRAUSS, R. M.; LANDSBERG, M. G.; THIEL, P. M.; VAN DEN BERG, J. J. M. (1995):
Greater oxidative susceptibility of the surface monolayer in small dense LDL may contribute to differences in copper-induced oxidation among LDL density subfractions.
J Lipid Res 36, S. 662-671
- TSAI, E. C.; HIRSCH, I. B.; BRUNZELL, J. D.; CHAIT, A. (1994):
Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM.
Diabetes 43, S. 1010-1014
- VANDERYSE, L.; DEVREESE, A. M.; BAERT, J.; VANLOO, B.; LINS, L.; RUYSSCHAERT, J. M.; ROSSENEU, M. (1992):
Structural and functional properties of apoprotein B in chemically modified low density lipoproteins.
Atherosclerosis 97, S. 187-199
- VASANKARI, T. J.; KUJALA, U. M.; VASANKARI, T. M.; VUORIMAA, T.; AHOTUPA, M. (1997):
Effects of acute prolonged exercise on-serum and LDL oxidation and antioxidant defences.
Free Radic Biol Med 22, S. 509-513

- VASANKARI, T. J.; KUJALA, U. M.; VASANKARI, T. M.; AHOTUPA, M. (1998):
Reduced oxidized LDL levels after a 10 month exercise program.
Med Sci Sports Exerc 30, S. 1496-1501
- VEGA, G. L.; GRUNDY, S. M. (1984):
Comparison of apolipoprotein B to cholesterol in low density lipoproteins of patients with coronary heart disease.
J Lipid Res 25, S. 580-592
- WAGNER, P.; HEINECKE, J. W. (1997):
Copper ions promote peroxidation of low density lipoprotein lipid by binding to histidine residues of apolipoprotein B100, but they are reduced at other sites on LDL.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 17, S. 3338-3346
- WAYNER, D. D. M.; BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.; LOCKE, S. (1985):
Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation.
FEBS Lett 187, S. 33-37
- WEISSER, B.; LOCHER, R.; MENGDEN, T.; VETTER, W. (1992):
Oxidation of low density lipoprotein enhances its potential to increase intracellular free calcium concentration in vascular smooth muscle cells.
Arterioscler Thromb 12, S. 231-236
- WELLS, K. E.; MIGUEL, R.; ALEXANDER, J. J. (1997):
Transmembrane calcium flux regulates LDL oxidation by arterial smooth muscle cells.
J Surg Res 67, S. 126-131
- WELLS, K. E.; MIGUEL, R.; ALEXANDER, J. J. (1996):
Sex hormones affect the calcium signaling response of human arterial cells to LDL.
J Surg Res 63, S. 64-72
- WETZSTEIN, C. J.; SHERN-BREWER, R. A.; SANTANAM, N.; GREEN, N. R.; WHITE-WELKLEY, J. E.; PARTHASARATHY, S. (1998):
Does acute exercise affect the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation?.
Free Radic Biol Med 24, S. 679-682
- WHITEHEAD, T. P.; THORPE, G. H. G.; MAXWELL, S. R. J. (1992):
Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids.
Anal Chim Acta 266, S. 265-277
- WICHTL, M. (1989):
Teedrogen
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2. Auflage 1989, S. 522-525

- WILLIAMS, P. T.; KRAUSS, R. M.; WOOD, P. D.; LINDGREN, F. T.; GIOTAS, C.; VRANIZAN, K. M. (1986):
Lipoprotein subfractions of runners and sedentary men.
Metablism 351, S. 45-52
- WISSENSCHAFTLICHE TABELLEN GEIGY (1985):
Teilband Hämatologie und Humangenetik
Basel 8. Aufl. 1979, 4. Nachdruck 1985
- WITZTUM, J. L. (1993):
Susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification.
Am J Med 94, S. 347-349
- YAN, L.-J.; LODGE, J. K.; TRABER, M. G.; PACKER, L. (1997):
Apolipoprotein B carbonyl formation is enhanced by lipid peroxidation during copper-mediated oxidation of human low-density lipoproteins.
Arch Biochem Biophys 339, S. 165-171
- YLÄ-HERTTUALA, S. (1998):
Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo?.
Curr Opin Lipidol 9, S. 337-344
- YU, H. H.; GINSBURG, G. S.; O'TOOLE, M. L.; OTVOS, J. D.; DUOGLAS, P. S.; RIFAI, N. (1999):
Acute changes in serum lipids and lipoprotein subclasses in triathletes as assessed by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, S. 1945-1949
- YUE, T.-L.; CHENG, H.-Y.; LYSKO, P. G.; MCKENNA, P. J.; FEUERSTEIN, R.; GU, J.-L.; LYSKO, K. A.; DAVIS, L. L.; FEUERSTEIN, G. (1992a):
Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger.
J Pharmacol Exp Ther 263, S. 92-98
- YUE, T.-L.; MCKENNA, P. J.; LYSKO, P. G.; RUFFOLO JR, R. R.; FEUERSTEIN, G. Z. (1992b):
Carvedilol, a new antihypertensive, prevents oxidation of human low density lipoprotein by macrophages and copper.
Atherosclerosis 97, S. 209-216

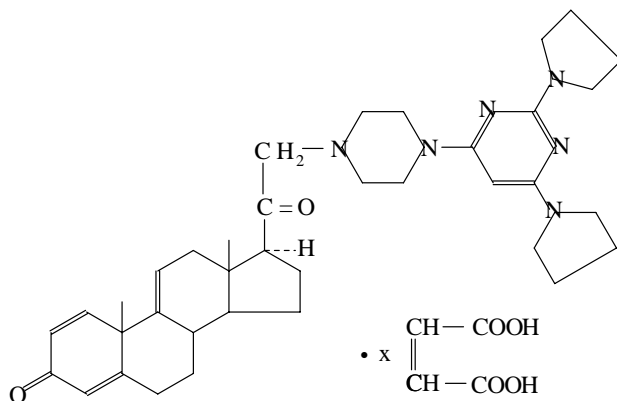
Anhang

Abkürzungen

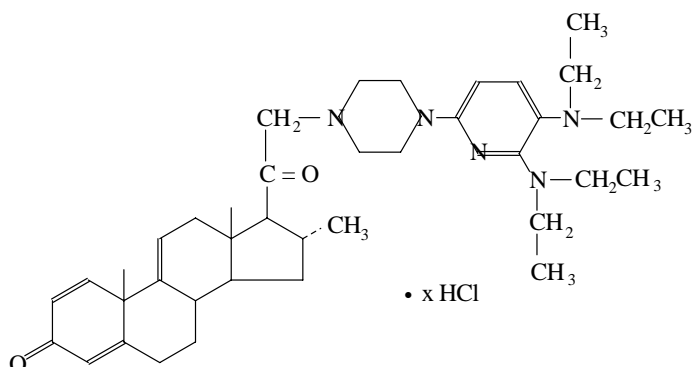
<i>AAPH</i>	2,2'-azo-bis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid
<i>ApoB</i>	Apolipoprotein B100
<i>AT I</i>	Angiotensin I
<i>AT II</i>	Angiotensin II
<i>BHT</i>	Butylhydroxytoluol
<i>BSA</i>	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
<i>cAMP</i>	Zyklisches Adenosinmonophosphat
<i>CSE-Hemmer</i>	Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer bzw. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase-Hemmer
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>DNP</i>	2,4-Dinitrophenylhydrazin
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGTA</i>	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure
<i>Fura-2AM</i>	Fura-2-Acetoxy-methylester
<i>GSH, GSSG</i>	Glutathion, oxidiertes Glutathion
<i>HAc</i>	Essigsäure
<i>HDL</i>	High Density Lipoproteins
<i>HMG-CoA-Reduktase</i>	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase
<i>kd</i>	Kilodalton, 10 ³ Dalton
<i>KHK</i>	Koronare Herzkrankheit
<i>LDL</i>	Low Density Lipoproteins
<i>Lp(a)</i>	Lipoprotein (a)
<i>m</i>	männlich
<i>MDA</i>	Malondialdehyd
<i>natLDL</i>	Native, nicht modifizierte Low Density Lipoproteins
<i>NDHGA</i>	Nordihydroguarsäure
<i>NZW</i>	Weißes Neuseeland-Kaninchen
<i>oxLDL</i>	Oxidativ modifizierte Low Density Lipoproteins
<i>PBS</i>	Phosphat Buffered Saline
<i>PKA</i>	Proteinkinase A
<i>PUFA</i>	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
<i>S. D.</i>	Standardabweichung
<i>TBA</i>	Thiobarbitursäure
<i>TBARS</i>	mit Thiobarbitursäure reagierende Substanzen
<i>TNBS</i>	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonsäure
<i>TRAP</i>	Total peroxyl radical-trapping capability of plasma
<i>TRIS</i>	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
<i>VLDL</i>	Very Low Density Lipoproteins
<i>w</i>	weiblich
<i>WHHL</i>	Watanabe Heritable Hyperlipidemic-Kaninchen

Strukturformeln

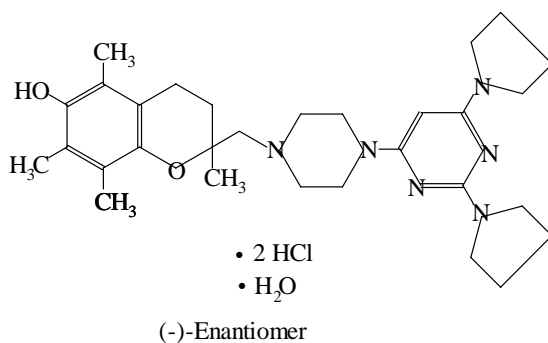
1. U-74389G (The Upjohn Company). $C_{37}H_{50}N_6O_2 \cdot C_4H_4O_4$
 21-[4-(2,6-di-1-pyrrolidinyl-4-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]-pregna-1,4,9(11)-triene-3,20-dione (Z)-2-butenedioate



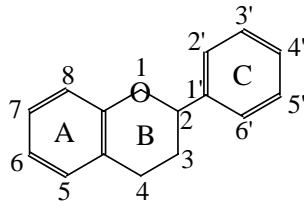
2. U-74500A (The Upjohn Company). $C_{39}H_{57}N_5O_2 \cdot x \text{HCl}$
 21-[4-[5,6-bis(diethylamino)-2-pyridinyl]-1-piperazinyl]-16-methylpregna-1,4,9(11)-triene-3,20-dione, hydrochloride



3. U-83836E [(-) Enantiomer von U-78517F], (The Upjohn Company).
 $C_{30}H_{44}N_6O_2 \cdot 2 \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$
 (-)-2-[[4-(2,6-di-1-pyrrolidinyl-4-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]methyl]-3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2H-1-benzopyran-6-ol, dihydrochlorid

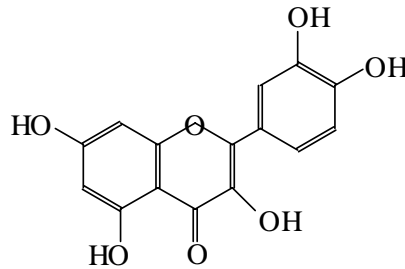


10. Flavonoide – allgemeine Struktur

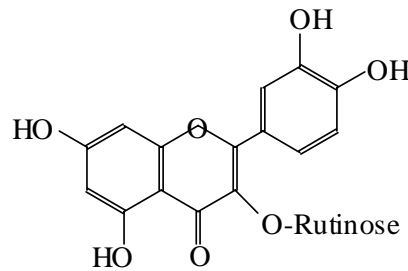


– Flavonole:

a) Quercetin (= Aglykon von Rutin)

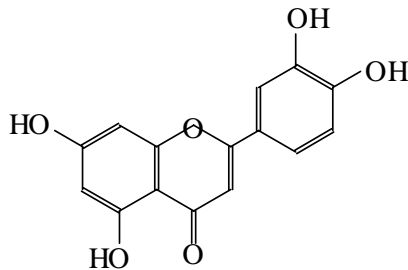


b) Rutin (= Quercetin-3-O-(6-O-rhamnosyl)glucosid)

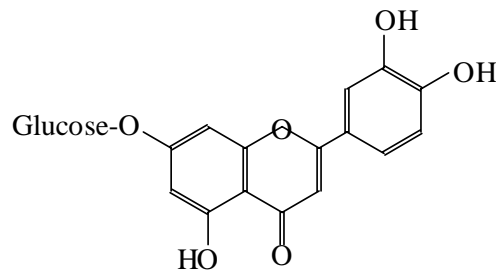


– Flavone:

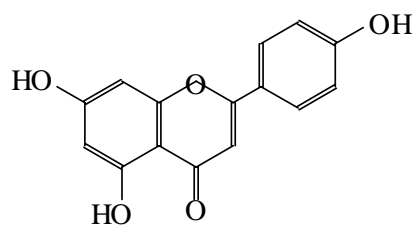
a) Luteolin



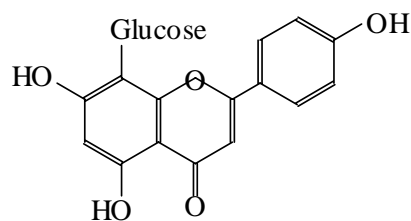
b) Luteolin-7-glucosid



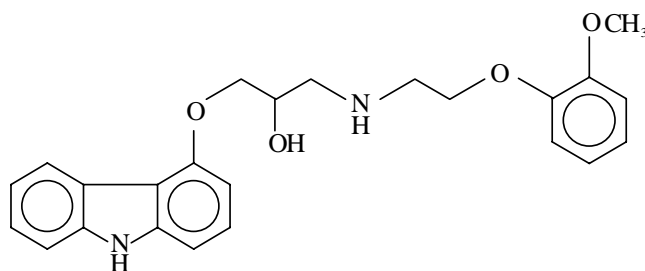
c) Apigenin



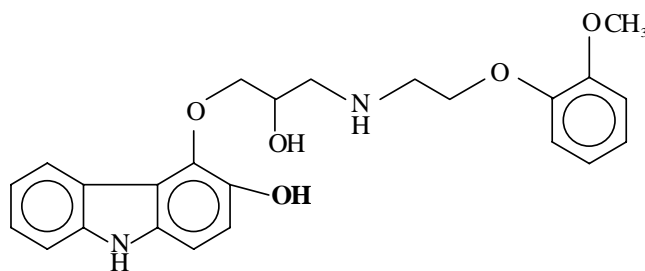
d) Vitexin (= 8-C-Glucosyl-apigenin)



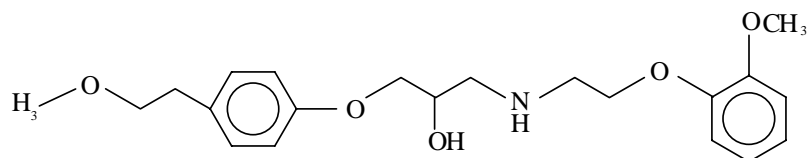
11. Carvedilol



12. BM 91.0228



13. Metoprolol



Danksagung

Ich möchte allen Menschen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichsten Dank aussprechen!

- Herrn Prof. Dr. Helmut Heinle dafür, daß er mir dieses interessante Thema überlassen hat, für die fachliche Unterstützung, die günstigen Arbeitsbedingungen und die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen
- Herrn Prof. Dr. Haasis für die Betreuung im klinischen Bereich und die finanzielle Unterstützung
- Frau Prof. Dr. Drews für die Übernahme des Referates der Dissertation
- Herrn PD. Dr. Heitkamp, Frau Susanne Kempfer, den Mitarbeiterinnen und Läufern im sportmedizinischen Institut der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen für die gute Zusammenarbeit und für die Überlassung der Blutproben
- Frau Dr. Ute Brehme, Frau Dr. Bruck und Frau Meggi Heilig aus der „Arbeitsmedizin“ für anregende Diskussionen zur LDL-Isolierung und LDL-Oxidation
- Frau Dr. Elke Berger, Frau Dr. Birgit Bader und Herrn Dr. Brehm für die „klinische Betreuung“ und Herrn Dr. Besenthal für die Durchführung der laborchemischen Untersuchungen
- Herrn Dr. Schneider und Herrn Dr. Kelber, Darmstadt, für die Bereitstellung des Plasmas von cholesteringefütterten Kaninchen
- Herrn Dr. Bräsen, Hamburg, für die Überlassung des Plasmas von Kaninchen, denen Antioxidantien appliziert worden waren
- Dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Beyer, Institut für Organische Chemie, namentlich Frau Natalie Götting für die Bereitstellung des Azoradikalbildners AAPH
- Frau Uta Hamacher für das Aussäen der Zellkulturen nach meinen Vorstellungen
- Der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Albrecht Lepple-Wienhues für die Unterstützung bei den Fura-Messungen
- Allen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes, besonders Brigitta, Petra, Siegfried, Uwe und Herrn Dürr für die stete Hilfsbereitschaft und Aufmunterung
- Meinen zahlreichen Blutspendern für ihre Bereitschaft mir oft mehrfach Blut zu spenden und denjenigen, die mir beim Blutabnehmen geholfen haben

Danksagung

- Nici, Gabi und Nadja für die angenehme und unterhaltsame Atmosphäre im Labor, außerdem Didi, dem regelmäßigen, aufheiternden Laborbesucher
- Allen meinen Freunden für ihre Geduld und Nachsicht, meinen Kolleginnen und meinem Chef in der Neuen Apotheke, Bernhausen, für die stete Anteilnahme am Fortgang der Arbeit
- Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich darüber hinaus finanziell und moralisch unterstützt haben

Mein besonderer Dank gilt allerdings Hans-Peter, der mich immer wieder an Tiefpunkten aufgebaut hat und durch hartnäckige Geduld zum Fortgang der Arbeit beigetragen hat. Und „last but not least“ K., der während der gesamten Zeit der Niederschrift mir treu zur Seite lag, regen Anteil am Computer nahm und nahezu jedes Blatt irgendwann einmal pfotensigniert hat.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Ammon, Beyer, Eger, Heinle, Kissling, Klumpp, Kovar, Müller, Reinhard, Roth, Safayhi, Schmidt, Schubert, Schultz, Wahl, Wankmüller, Zimmermann

Lebenslauf

Persönliche Daten

Patricia Friederike Dalferth
06.06.1970 geboren in Esslingen a. N.,
Tochter von Jürgen Dalferth und Waltraud Dalferth geb. Schmid
21.05.1999 Heirat mit Dr. med Hans-Peter Medwed

Schulbildung

1976 – 1980 Schillerschule in Esslingen-Berkheim
1980 – 1989 Theodor-Heuss-Gymnasium Esslingen a. N.
09/89 – 12/89 au-pair-Aufenthalt in Salisbury / England

Hochschulausbildung

1990 – 1994 Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

Praktisches Jahr

1. Halbjahr Ciba-Geigy GmbH, Wehr / Baden
2. Halbjahr Hölderlin-Apotheke, Tübingen
18.12.1995 Approbation als Apothekerin

Berufliche Tätigkeit

02/96 – 03/00 Neuen Apotheke, Filderstadt
Seit 04/00 Post-Apotheke, Tübingen
01/96 Beginn der Dissertation mit dem Titel „Oxidativ modifiziertes
LDL: Untersuchungen zu seiner Bildung und seinen zellulären
Effekten“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Heinle am
Physiologischen Institut I der Universität Tübingen