

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité-
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthese-
vermittelte Effekte von HMG-CoA-
Reduktase-Inhibitoren und körperlicher
Aktivität im experimentellen
Schlaganfallmodell**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Karen Gertz
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. PD Dr. med. Matthias Endres
 2. Prof. Dr. med. Otto Witte
 3. Prof. Dr. med. Roman Haberl

Datum der Promotion: 25. April 2005

Abstract

HMG-CoA-Reduktasehemmer, sogenannte Statine, und regelmäßige körperliche Aktivität sind mit vermindertem Auftreten zerebrovaskulärer Ereignisse und Zunahme der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) assoziiert. Die Erhöhung der eNOS-mRNA ist mit verbessertem zerebralen Blutfluß und Neuroprotektion bei einer zerebralen Ischämie verbunden. Vor dem Hintergrund, daß Thrombosen und Thrombembolien die häufigste Ursache zerebro- und kardiovaskulärer Ereignisse darstellen, sind NO-vermittelte antithrombotische Effekte jedoch kaum untersucht. Ebenso wenig ist über mögliche Absetzeffekte nach Beendigung einer Statintherapie bekannt.

Daher untersuchten wir, ob die Statine Atorva- und Rosuvastatin eNOS-abhängig zu Neuroprotektion führen und verglichen die Effekte mit einem zweiten eNOS-regulierenden Mechanismus: der regelmäßigen körperlichen Aktivität. Dazu quantifizierten wir nach entsprechender Vorbehandlung eNOS auf mRNA- und Proteinebene aus Aorten, Hirngewebe sowie Thrombozyten und bestimmten die Läsionsvolumina im experimentellen Schlaganfallmodell. Außerdem untersuchten wir nach Statingabe Thrombozytenfunktionsparameter sowie Blutungszeit und Thrombusformation *in vivo*. Zwei bzw. vier Tage nach Absetzen der Statinbehandlung wiederholten wir die eNOS-Messungen, Schlaganfallexperimente und Gerinnungsanalysen.

Wir fanden nach Statinvorbehandlung cholesterinunabhängig eine Zunahme der eNOS, was mit Neuroprotektion im Schlaganfallmodell und verminderter Gerinnungsaktivität verbunden war. Nach Absetzen der Behandlung kam es jedoch zu einer drastischen Abnahme der eNOS, was mit deutlichem Anstieg der Thrombozytenmarker im Plasma und schnellem Verlust der beobachteten positiven Effekte auf Läsionsgröße und Gerinnungssystem einherging. Regelmäßige körperliche Aktivität führt ebenfalls eNOS-abhängig zu verbessertem zerebralen Blutfluß und kleineren Läsionsvolumina bei zerebraler Ischämie. Diese Ergebnisse sind mit den Daten nach Statingabe vergleichbar. Wir demonstrieren einen Klasseneffekt der Statine für eNOS-vermittelte Neuroprotektion im zerebralen Ischämiemodell. Durch die zusätzliche gerinnungshemmende Wirkung könnte diese Wirkstoffklasse neue Ansätze zur prophylaktischen Schlaganfallbehandlung unabhängig vom Cholesterinspiegel eröffnen. Ein Absetzen der Statinbehandlung kann jedoch zu einer Zunahme der Schlaganfallgröße führen und sollte möglicherweise bei

Risikopatienten vermieden werden. Regelmäßiges körperliches Training führt zu vergleichbarer Erhöhung der eNOS sowie Neuroprotektion und bietet damit eine sinnvolle Verknüpfung aus prophylaktischer Schlaganfallbehandlung und Rehabilitation.

Schlaganfall

endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase

HMG-CoA-Reduktasehemmer

körperliche Aktivität

Abstract

HMG-CoA-reductase inhibitors, so called statins and regular physical activity are associated with less cerebrovascular events and increase of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Raise of eNOS-mRNA results in cerebral blood flow (CBF) augmentation which refers neuroprotection after ischemic stroke. It is known that thromboses cause the most cerebrovascular events, but nitric oxide (NO) dependent antithrombotic effects are poor examined. In addition there are little information about effects after withdrawal of statin treatment. That is why we investigated Atorva- and Rosuvastatin regarding eNOS dependent neuroprotection and compared the effects with regular physical activity, the second eNOS enhancing mechanism. Therefore after corresponding pretreatment we quantified eNOS-mRNA and protein from aortas, brain tissue and thrombocytes and determined lesion volume after experimental middle cerebral artery occlusion (MCAo). Furthermore after statin treatment we measured marker of thrombocyte activation, as well as bleeding time and thrombus formation *in vivo*. Two and four days after withdrawal of statin treatment we repeated eNOS measurements, neuroprotection studies and coagulation analyses.

We found eNOS upregulation independent from serum cholesterol level after statin pretreatment and this was associated with neuroprotection after ischemic stroke and decreased platelet activation. But after withdrawal of statin treatment eNOS expression was downregulated, which went along with clear upregulation of platelet activation and a rapid loss of the observed positive effects on lesion volume and hemostasis. Regular physical activity leads to an increase of eNOS, which we could correlate with CBF

augmentation and improved outcome after MCAo. These results were comparable to the data after statin treatment.

We demonstrate a class effect of statins for eNOS-dependent neuroprotection in our ischemia model. Because of the additional antithrombotic effects statins may present a new approach to prophylactic stroke treatment independent from cholesterol level. Withdrawal of statin treatment may refer increased cerebral lesion volume and should be avoided in patients with risk for cerebrovascular events. Regular physical activity results in comparable eNOS dependent neuroprotection and offers a useful combination between prophylactic stroke treatment and rehabilitation.

stroke

endothelial nitric oxide synthase

HMG-CoA-reductase inhibitors

physical activity

Abkürzungsverzeichnis

aCBF	absoluter zerebraler Blutfluß
Beta-TG	beta-Thromboglobulin
ELISA	„enzyme-linked immuno sorbent assay“
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1
mRNA	“messenger“-Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
PF 4	Plättchenfaktor 4
rCBF	regionaler zerebraler Blutfluß
RT-PCR	reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
Rho-GTPase	Rho-Guanosin-Triphosphatase

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielstellung	4
3. Methodik	5
4. Ergebnisse	8
5. Diskussion	11
6. Literaturverzeichnis	16
7. Verwendete Publikationen	21

Anhang

-Danksagung

-Eidesstattliche Erklärung

-Lebenslauf und Publikationsliste

1 Einleitung

Der ischämische Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache nach Herzinfarkt und Tumorerkrankungen in der westlichen Welt (Berlit, 2000). Pathophysiologische Grundlage einer zerebralen Ischämie stellt der thrombotische oder thrombembolische Verschluss eines hirnversorgenden Gefäßes mit nachfolgender Verminderung des zerebralen Blutflusses dar. Die daraus resultierende Hypoxie und der Verlust der ATP-Reserven führt über die Aktivierung sekundärer Schadenskaskaden zum Gewebeschaden. Mangels suffizienter direkt neuroprotektiver Wirkstoffe beruht derzeit die Akuttherapie und Sekundärprävention auf der Wiederherstellung bzw. dem Erhalt des zerebralen Blutflusses durch die Anwendung thrombolytischer oder thrombozytenaggregationshemmender Medikamente (Endres et al., 2004).

NO, ursprünglich als „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) entdeckt, ist ein wichtiger Vasodilatator und gilt als gefäßprotektive Substanz im Säugetierorganismus (Furchgott et al., 1980). NO, das durch das Enzym eNOS bei der Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin freigesetzt wird, erhöht den regionalen Blutfluß (Loscalzo, 1995 und Iadecola, 1997). Dagegen wurden bei Mäusen, denen das Gen zur Kodierung der eNOS fehlt, Hypertonus und größere Infarkt volumina nach zerebraler Ischämie nachgewiesen (Huang PL et al., 1995 und Huang Z et al., 1996). Die Zunahme der eNOS-mRNA mit nachfolgend erhöhter NO-Freisetzung führte jedoch bei experimentell induziertem Schlaganfall zu einer Verbesserung des zerebralen Blutflusses mit resultierender Neuroprotektion (Morikawa et al., 1994). Darüberhinaus wird durch Applikation von L-Arginin NO-abhängig die Thrombozytenaggregation vermindert (Radomski et al., 1990). Außerdem zeigen eNOS-defiziente Mäuse eine verstärkte Hämostase (Freedman et al., 1999).

Hypercholesterinämie spielt bei der Entwicklung von Arteriosklerose eine wichtige Rolle, wobei Arteriosklerose wiederum als Risikofaktor für das Auftreten zerebraler Ischämien gilt (Haberl und Dembowski, 1999). Dagegen wird die Bedeutung des Cholesterins als eigenständiger Risikofaktor kontrovers diskutiert, zumal Studien mit anderen Lipidsenkern wie Fibraten keine Inzidenzsenkung für das Auftreten eines Schlaganfalls zeigen konnten (Hachinski et al., 1996; Hebert et al., 1997). Statine sind Medikamente, die zuverlässig bei Patienten mit Hypercholesterinämie eingesetzt werden. Statine bewirken über eine

kompetitive Hemmung des Schrittmacherenzym HMG-CoA-Reduktase die Inhibition des Mevalonat-Syntheseweges mit nachfolgend verminderter Cholesterinproduktion in Hepatozyten (Abbildung 1), (Goldstein et al., 1990).

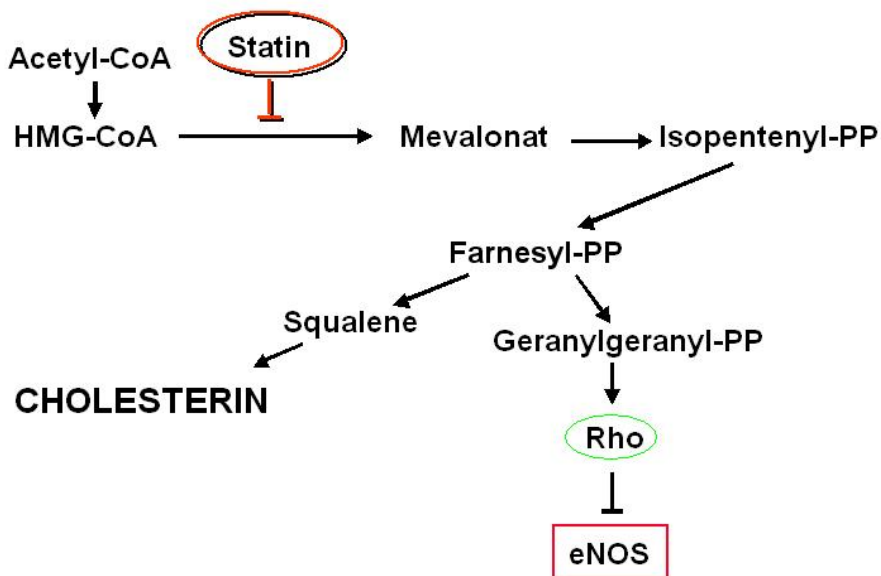


Abbildung 1. Cholesterinsyntheseweg

Darüberhinaus konnten aber auch cholesterinunabhängige, sogenannte pleiotrope Effekte der Statine, wie z.B. die Induktion der endothelialen NO-Synthase, nachgewiesen werden (Vaughan et al, 1996; Laufs et al., 1998a). Ursächlich konnte eine verminderte Isoprenylierung mit daraus resultierender erniedrigter Membrantranslokation der Rho-GTPase, einem negativen Regulatorenzym der eNOS-mRNA-Stabilität, *in vitro* identifiziert werden (Laufs et al., 1998b). Isoprenoide sind Intermediate des Mevalonat-Syntheseweges, deren Bildung durch Statingabe ebenfalls gehemmt wird.

Statinbehandlung führt eNOS-abhängig zu zerebraler Blutflußsteigerung mit nachfolgender Neuroprotektion während eines experimentell induzierten Schlaganfalls (Endres et al., 1998). Ob jedoch NO-abhängige, antithrombotische Effekte durch Statinbehandlung im Zusammenhang zur eNOS-Regulation stehen, ist bis dato nicht untersucht.

Desweiteren gibt es in klinischen Untersuchungen Hinweise auf mögliche negative Effekte

nach Absetzen einer Statinbehandlung. So zeigten Patienten einen dreifachen Anstieg an thrombovaskulären Ereignissen nach Umstellung von einem hoch- auf ein niedrigpotentes Statin (Thomas und Mann, 2000). In *in vitro* Experimenten wurde eine verminderte NO-Verfügbarkeit nach akutem Absetzen einer Statinbehandlung nachgewiesen. Kausal konnte hierzu ein negativer Regulationsmechanismus der Transkription des für die Rho-GTPase kodierenden Gens gefunden werden (Laufs et al., 2000). Untersuchungen zu möglichen negativen Auswirkungen auf eNOS-abhängige Endothelfunktion und Thrombozytenaggregation *in vivo* fehlen jedoch.

Auf der Suche nach Maßnahmen zur Prävention des ischämischen Schlaganfalls konnte körperliche Inaktivität als ein weiterer Risikofaktor identifiziert werden (Bronner et al., 1995). So führt körperliches Training ebenfalls zu einer verringerten Inzidenz kardio- und zerebrovaskulärer Ereignisse (Lee et al., 1999 und Sacco et al., 1998). Der mechanistische Hintergrund ist jedoch unklar. Darüberhinaus wurde nach regelmäßigem körperlichen Training eine verbesserte Endothelfunktion bei Patienten mit kardialer Vorbelastung wie koronarer Herzkrankheit (KHK) und chronischer Herzinsuffizienz gezeigt (Hornig et al., 1996). Außerdem konnte eine vermehrte eNOS-Expression nach regelmäßigem Training nachgewiesen werden (Sessa et al., 1994). Ob es jedoch neben der Inzidenzreduktion nach regelmäßiger körperlicher Aktivität eNOS-abhängig zur Erhöhung des zerebralen Blutflusses und Neuroprotektion bei einer zerebralen Ischämie kommt, ist derzeit ebenfalls unbekannt.

2 Zielstellung

Klinische Studien zeigen, daß sowohl eine Behandlung mit Statinen als auch körperliche Aktivität die Inzidenz von Schlaganfällen reduzieren. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jeweils aber nur unzureichend verstanden. Interessanterweise verbessern sowohl Statine als auch körperliches Training die Endothelfunktion und führen zu einer Zunahme der eNOS.

1.) Das Ziel dieser Dissertation war herauszufinden, ob es durch a) Statingabe als auch durch b) körperliche Aktivität eNOS-abhängig zu Schadensreduktion und Verbesserung des funktionellen Defizits im experimentellen Schlaganfallmodell kommt.

2.) In einem zweiten Schritt sollten die Mechanismen der nachgewiesenen Protektion näher bestimmt werden. In einer vorangegangenen Studie wurde bereits gezeigt, daß Statingabe eNOS-vermittelt zu einer zerebralen Blutflußerhöhung führt. Daher interessierte es uns, a) die NO-abhängige Thrombozytenfunktion nach Statinbehandlung und b) die Blutflußregulation nach körperlicher Aktivität zu untersuchen.

3.) Zuletzt wurden Absetzeffekte nach Statingabe betrachtet, um auf der Basis klinischer Beobachtungen eine mögliche Verschlechterung der vaskulären Funktion durch erniedrigte NO-Freisetzung herauszufinden.

3 Methodik

Tiere und Behandlung

Die Tierexperimente sind in strenger Einhaltung der Tierschutzrichtlinien durchgeführt und im Tierschutzvorhaben G 0113/2000 Endres vom Berliner Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi) genehmigt worden. Für die Versuche wurden SVJ/129 Wildtypmäuse des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) Berlin und eNOS-defiziente (eNOS-„knockout“) Mäuse des Mausstammes B6 129/P2-NOS3 der Firma Charles River, Wilmington, USA verwendet. Für die Experimente zu regelmäßigem körperlichen Training sind Mäuse in Käfigen gehalten worden, die mit einem Laufrad ausgestattet waren, um freiwillige körperliche Aktivität zu ermöglichen. Die Kontrolltiere wurden in normalen Haltungskäfigen belassen. Andere Tiere wurden täglich auf einem Laufband trainiert, um forciertes Training zu simulieren. Die Untersuchungen zu HMG-CoA-Reduktase-Hemmern wurden mit Atorvastatin, der Firma Pfizer und Rosuvastatin, der Firma AstraZeneca durchgeführt. Beide Statine wurden dosisabhängig über 14 bzw. 10 Tage täglich subkutan im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle appliziert.

Ischämiemodell und neurologisches Defizit

In Halothannarkose und bei konstanter Körpertemperatur erfolgte die Ischämieinduktion im Versorgungsbereich der linken A. cerebri media. Dazu wird ein silikonbeschichtetes Monofilament in die linke A. carotis communis eingebracht und in die A. carotis interna weiter fortgeführt, um den Abgang der A. cerebri media zu verlegen. Nach ein- bzw. zweistündiger Ischämie wurde das jeweilige Filament wieder entfernt, um die Reperfusion zu ermöglichen. In einigen Tieren pro Gruppe sind während der Ischämie der regionale zerebrale Blutfluß (rCBF) mittels Laserdoppler und physiologische Parameter wie mittlerer arterieller Blutdruck und die Blutgasparameter pH, pO₂, pCO₂ gemessen worden (Endres et al., 1998). Die Einschätzung des neurologischen Defizits wurde nach den Bederson-Kriterien von einem verblindeten Untersucher 30 Minuten bzw. 24 Stunden nach Ischämieinduktion vorgenommen (Bederson et al., 1986).

Infarktauswertung

Für die Neuroprotektionsstudien wurden die Tiere 24 Stunden nach Ischämieinduktion in

tiefer Narkose dekapitiert und die Hirne entnommen. Nach Gewebeaufbereitung und Durchführung von histologischen Standardfärbungen erfolgte die Infarkt volumetrie computergestützt mit einem Bildverarbeitungsprogramm. Das Gesamtinfraktvolumen wird entweder durch direkte Aufsummierung der Infarkt areale oder aus der Differenz zwischen kontralateraler und nichtinfarzierter ipsilateraler Hemisphäre bestimmt. Die Differenz zwischen direktem und indirektem Infarkt volumen entspricht dem Hirnödem im Infarkt gebiet (Endres et al., 1998).

Absolute zerebrale Blutflußmessung

Die Bestimmung des absoluten zerebralen Blutflusses (aCBF) erfolgte während der Ischämie mittels ^{14}C -Jodantipyrine-Autoradiographie. Dazu wurde nach der Ischämieinduktion und Umstellung der Inhalations- auf intravenöse Etomidate-Narkose ^{14}C -Jodantipyrine innerhalb einer Minute in ansteigender Rate infundiert. Während der Infusion wurden kontinuierlich arterielle Blutproben gesammelt. Nach anschließender Dekapitierung und Hirnentnahme sind koronare Gefrierschnitte angefertigt und zusammen mit entsprechenden ^{14}C -Standards auf Röntgenfilme gebracht worden. Die ^{14}C -Jodantipyrine-Konzentration der gesammelten arteriellen Blutproben wurde 24 Stunden nach Versuchsende bestimmt. Die computergestützte Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems. Dabei wird die optische Dichte der belichteten Röntgenfilme mit Hilfe der Kalibrierungsstandards und der arteriellen ^{14}C -Jodantipyrine-Konzentrationskurve in das zerebrale Blutflußergebnis umgerechnet (Jay et al., 1988). Die Bestimmung des aCBF wurde standardisiert in ausgewählten Hirnregionen ipsi- und kontralateral durchgeführt.

Endothelfunktion im Modell der isolierten Arterie

In Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. vet. Ute Lindauer (Experimentelle Neurologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin) wurde an isolierten Femoralarterien die acetylcholinabhängige Vasodilatation nach freiwilliger körperlicher Aktivität gemessen (Lindauer et al., 2001).

Blutungszeit und experimentelles Thrombosemodell

Die Blutungszeit ist zweimal in jedem Tier nach Punktion der dorsalen Schwanzvene mittels einer Lanzette gemessen worden (Freedman et al., 1999).

Die Thrombusbildung wurde unter Inhalationsnarkose durch Ligation der V. cava inferior unterhalb der Abgänge der Nierenarterien induziert. Zwei Stunden später erfolgte die Thrombusentnahme und nach 24 Stunden die Gewichtsbestimmung der Thromben (Wollny et al., 1999).

Blutplasmapräparation und Bestimmung der Thrombozytenaktivitätsmarker

Zur Thrombozytengewinnung und zur Bestimmung der Thrombozytenaktivitätsparameter Plättchenfaktor 4 (PF 4) und beta-Thromboglobulin (beta-TG) wurde durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus in tiefer Chloralhydratnarkose Blut entnommen (Kaplan et al., 1981). Nach Aufbereitung und Gewinnung plättchenreichen bzw. plättchenarmen Plasmas erfolgte die weitere Bestimmung von PF4 und beta-TG im ELISA sowie der Thrombozyten-eNOS-mRNA in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Ulrich Laufs (Klinik für Innere Medizin, Universität des Saarlandes, Homburg).

***In vitro* Methoden**

Die Erhebung der weiteren *in vitro* Analysen wie die Durchführung der reversen Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zur Quantifizierung der eNOS-„messenger“-Ribonukleinsäure (mRNA), die Bestimmung der NOS-Aktivität im Arginin-Citrullin-Konversionsassay und die Aktivitätsanalyse der Rho-GTPase mittels Immunoprecipitation erfolgte ebenfalls nach Bereitstellung der *in vivo* Proben wie Aorten, Hirngewebe und Thrombozytenkonzentrat in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Laufs. Dort wurden desweiteren die „Western Blot“-Untersuchungen zur eNOS und Rho-GTPase-Proteinbestimmung und die „Northern Blot“-Experimente zur eNOS-mRNA-Analyse sowie die Zellkulturarbeiten durchgeführt.

Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler erhoben. Die statistischen Vergleiche sind mittels Student's t-test oder ANOVA gefolgt vom Tukey post hoc Test erstellt worden. Für die Auswertung der Thrombusinduktion kam der Chi-Quadrat-Test und für die Vergleiche zum neurologischen Defizit der Mann-Whitney-Test zur Anwendung. Als statistisch signifikant wurde ein Wert für $P < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeit werden in den unter 7. der Dissertationsschrift genannten Publikationen wie folgt aufgeführt und entsprechend zitiert:

Referenz #1: Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schrock H, Nickenig G, Kuschinsky W, Dirnagl U, Laufs U (2003) Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol* 54 (5): 582-590

Referenz #2: Gertz K, Laufs U, Lindauer U, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2003) Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 34 (2): 551-557

Referenz #3: Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M (2002) Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 942 (1-2): 23-30

Referenz #4: Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31 (10): 2442-2449

Referenz #5: Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Bohm M (2000) Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation* 102: 3104-3110

eNOS Hochregulation durch körperliche Aktivität sowie Atorva- und Rosuvastatin

Mittels RT-PCR konnte nach chronischer Vorbehandlung mit Atorvastatin und Rosuvastatin eine dosisabhängige Induktion der eNOS-mRNA in Aorten und Hirngewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhoben werden.

In den NOS-Aktivitätsassays aus Mauseaorten ergab sich nach chronischer Vorbehandlung mit Rosuvastatin eine gesteigerte Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin. Durch „Western Blot“-Analysen wurde eine erhöhte eNOS-Proteinsynthese in Endothelzellen nach Rosuvastatinvorbehandlung ermittelt, was in den „Northern Blot“-Experimenten mit einer Zunahme der eNOS-mRNA korreliert werden konnte (Referenz #2, #4).

Ähnliche Ergebnisse ließen sich nach regelmäßiger körperlicher Aktivität erheben. So führte sowohl freiwilliges als auch forciertes Laufen zu einer in der RT-PCR gefundenen Erhöhung der eNOS-mRNA bzw. zu einer im „Western-Blot“ gezeigten vermehrten eNOS-Proteinsynthese sowie zu einer im NOS-Aktivitätsassay ermittelten gesteigerten Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin in Aorten (Referenz #1).

Neuroprotektion durch körperliche Aktivität sowie Atorva- und Rosuvastatin

Sowohl chronische Statinvorbehandlung mit Atorva- und Rosuvastatin als auch körperliches Training führten zu verminderten Schlaganfallvolumina *in vivo* (Referenz #1, #3, #4). Freiwilliges Laufen zeigte eine signifikante Verbesserung des aCBF während einer zerebralen Ischämie. Ebenso verbesserte regelmäßiges Training die endothelabhängige Vasodilatation auf Acetylcholin. Dieser Effekt war nach NOS-Inhibition aufgehoben. Außerdem ließ sich in eNOS-defizienten Mäusen kein neuroprotektiver Effekt nach freiwilligem Laufen nachweisen (Referenz #1).

Effekte nach Absetzen der Atorvastatinbehandlung

Zwei Tage nach Absetzen der chronischen Atorvastatinvorbehandlung fand sich dagegen eine in der RT-PCR detektierte drastische Repression der eNOS-mRNA aus Aorten und Hirngewebe. Vier Tage nach Absetzen zeigte sich die eNOS-mRNA Expression im Kontrollniveau. Kongruent dazu kam es nach akutem Absetzen zu einem schnellen Verlust der neuroprotektiven Wirkung. Zwei Tage nach Absetzen ließ sich keine Protektion mehr erheben. Vier Tage nach Absetzen waren keine Unterschiede mehr in den Schlaganfallvolumina zu verzeichnen (Referenz #2).

Die „Western Blot“-Analysen zytosolischer und membranständiger Proteinfractionen ergaben für die Rho-GTPase, einem negativen Regulatorenzym der eNOS-mRNA-Stabilität, eine Anreicherung im Zytosol und erniedrigten Anteil in der Zellmembran nach chronischer Statinvorbehandlung. Akutes Absetzen der Behandlung führte dagegen nach zwei Tagen zu überschießender Akkumulation des Rho-Proteins in der Zellmembran und zu einer massiven Abnahme des Rho-Proteins im Zytosol. Vier Tage nach Absetzen fand sich sowohl die zytosolische als auch die membranständige Rho-Proteinkonzentration wieder im Kontrollbereich (Referenz #2, #4, #5).

Effekte auf Thrombozytenfunktion nach Atorvastatinbehandlung

Chronische Vorbehandlung mit Atorvastatin führt dosisabhängig zu einer in der RT-PCR gemessenen Zunahme der thrombozytären eNOS-mRNA und zu verringerten Plasmaspiegeln der Thrombozytenaktivitätsparameter PF4 und beta-TG im ELISA-Experiment. Zusätzlich findet sich eine verminderte Thrombusbildung und verlängerte Blutungszeit *in vivo*. In eNOS-defizienten Mäusen waren die Plasmaspiegel von PF4 und beta-TG nach Atorvastatinvorbehandlung dagegen nicht verändert (Referenz #4).

Zwei Tage nach Absetzen der Statinbehandlung kam es jedoch zu einer signifikanten Erhöhung von PF4 und beta-TG. Vier Tage nach Absetzen zeigten sich die gemessenen Thrombozytenaktivitätsparameter wieder im Kontrollbereich. Nach Absetzen der Statinbehandlung lag die experimentell induzierte Thrombusbildung bereits nach vier Tagen wieder im Kontrollniveau (Referenz #2).

5 Diskussion

Endotheliales NO ist ein potenter Vasodilatator und inhibiert die Thrombozytenaggregation (Furchgott et al., 1980; Freedman et al., 1999). Vermehrte NO-Freisetzung durch Induktion der endothelialen NO-Synthase oder Infusion des eNOS-Substrates L-Arginin bedingt einen verbesserten zerebralen Blutfluß, was zu Neuroprotektion bei zerebraler Ischämie führt (Morikawa et al., 1994; Endres et al., 1998).

Statine weisen protektive vaskuläre Effekte unabhängig ihrer cholesterinsenkenden Eigenschaften auf (Vaughan et al., 1996; Crouse et al., 1998). So verringerte eine Statineinnahme das Schlaganfallrisiko bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und führte zu vermindertem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse auch bei Patienten mit normalen Cholesterinspiegeln (Kearney et al., 1999; LIPID 1998; Sacks et al., 1996). Es wurde vermutet, daß die beobachteten positiven klinischen Effekte der Statine durch eine verbesserte Endothelfunktion und antithrombotische Wirkungen bedingt sind (Delanty et al., 1997; Vaughan et al., 1999). So konnte im Experiment gezeigt werden, daß Simvastatin über einen NO-abhängigen Mechanismus eine zerebrale Blutflußverbesserung und verkleinerte Schlaganfallvolumina bei zerebraler Ischämie bedingt (Endres et al., 1998).

Auf der Suche nach weiteren Risikofaktoren und primären Präventionsmaßnahmen ergab sich, daß auch körperliches Training zu verringerten kardio- und zerebrovaskulären Ereignissen führt (Lee et al. 1999; Sacco et al., 1998). Zusätzlich fanden sich Hinweise auf verbesserte Endothelfunktion und Zunahme der eNOS nach körperlicher Aktivität (Hornig et al., 1996; Sessa et al., 1994).

Auf dieser Grundlage war das Ziel der Dissertation, zwei verschiedene eNOS-regulierende Paradigmen näher zu charakterisieren: zum einen regelmäßige körperliche Aktivität und zum anderen die beiden neueren HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Atorva- und Rosuvastatin.

Unsere Untersuchungen zeigen erstmals, daß regelmäßige körperliche Aktivität nicht nur die Inzidenz vermindert, sondern auch einen direkt neuroprotektiven Effekt im Schlaganfallexperiment bedingt, der mit verbessertem absoluten CBF und verkleinerten zerebralen Läsionsvolumina einhergeht. Diese Daten lassen sich mit einer Zunahme der

eNOS-mRNA und –Proteinsynthese sowohl für freiwilliges als auch forciertes Training und verbesserter endothelabhängiger Vasodilatation nach freiwilliger körperlicher Aktivität korrelieren. Regelmäßige körperliche Aktivität beeinflusst weitere molekulare, zelluläre und systemische Vorgänge, die bei einem Schlaganfall schützen könnten (Neeper et al., 1995; Tong et al., 2001). So wurde ein durch den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) vermittelter neuroprotektiver Effekt nach körperlichem Training gefunden (Carro et al., 2000). Möglicherweise ergänzen sich hier eNOS- und IGF-1-abhängige Wirkungen, da IGF-1 selbst neuroprotektiv wirkt, aber auch die endotheliale NO-Freisetzung erhöht (Haylor et al., 1991). Ebenso sind positive Effekte von Training auf Neurogenese mit nachfolgend verbessertem Lernen beschrieben (Van Praag et al., 1999). Wenngleich direkt protektive Effekte von Progenitorzellen auf eine zerebrale Ischämie eher unwahrscheinlich sind, erscheinen Einflüsse auf regenerative Prozesse sicher denkbar. Zu bemerken bleibt, daß die verkleinerten Läsionsvolumina sich jedoch nicht in eNOS-defizienten Mäusen nachweisen ließen, so daß wir hauptsächlich von einem endothel- bzw. NO-vermittelten Protektionsmechanismus ausgehen.

Vergleichbar mit Statinen bewirkt auch regelmäßiges körperliches Training eNOS-abhängig zerebrale Blutflußsteigerung und Neuroprotektion bei zerebraler Ischämie (Endres et al., 1998). Unsere Daten empfehlen körperliche Aktivität als Schlaganfallprophylaxe bei Risikopatienten und stützen einen Kombinationsansatz hinsichtlich Protektion während einer zerebralen Ischämie und geeigneter Rehabilitation nach einem Schlaganfall (Stummer et al., 1995).

Unsere Untersuchungen zu den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Atorva- und Rosuvastatin zeigen eNOS-vermittelte Neuroprotektion bei zerebraler Ischämie unter normalen Cholesterinspiegeln und bestätigen damit frühere Untersuchungen mit Simvastatin hinsichtlich eines Klasseneffektes dieser Substanzen (Endres et al., 1998). Die in klinischen Studien beobachtete Inzidenzminderung könnte dadurch erklärbar werden, weil ischämische Ereignisse durch den neuroprotektiven Effekt nach Statinbehandlung klinisch stumm bleiben. Weiterhin bleibt zu diskutieren, daß möglicherweise andere cholesterinunabhängige Wirkungen der Statine das Protektionsergebnis beeinflussen. Diese als sogenannte pleiotrope Effekte bezeichneten Eigenschaften sind neben der verbesserten Endothelfunktion unter anderem auch für eine verbesserte Stabilität arteriosklerotischer

Plaques und verminderte Inflammation beschrieben (Werner et al., 2002).

Im Unterschied zum lipophilen und Blut-Hirn-Schranken-gängigen Simvastatin besitzt das weniger lipophile, synthetische Atorvastatin und das hydrophile Rosuvastatin nur eingeschränkt bzw. kaum die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Knopp et al., 1999; Nezasa et al., 2002). Auf dieser Grundlage scheinen direkt parenchymatöse Effekte letzterer Statine als neuroprotektiver Mechanismus unwahrscheinlich. Nur in einem kurzen Zeitfenster nach Einsetzen der Ischämie bricht die Blut-Hirn-Schranke zusammen, so daß ein Übertritt von Atorva- und Rosuvastatin in das Hirnparenchym möglich wird. Diese Eigenschaften stützen die These der rein endothelabhängigen und eNOS-vermittelten Neuroprotektion nach chronischer Statinvorbehandlung.

Statine bewirken eine Zunahme der eNOS über die Inhibition des Isoprenoids Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), einem Zwischenprodukt des Cholesterinsyntheseweges (Goldstein und Brown, 1990). GGPP ist zur posttranslationalen Modifizierung der Rho-GTPase nötig (Hall, 1998). Rho gilt als negativer Regulator der eNOS-mRNA-Stabilität (Laufs et al., 1998b). In seiner isoprenylierten bzw. geranylgeranylierten Form ist Rho zellmembranständig und aktiv. Wird die Isoprenylierung, z.B. durch chronische Statinbehandlung inhibiert, reichert sich Rho im Zytoplasma als inaktive Form an. Wir können zeigen, daß nach 14 Tagen Atorvastatinbehandlung Rho im Zytoplasma aortaler Endothelzellen akkumuliert. Dagegen findet sich zwei Tage nach Absetzen von Atorvastatin Rho fast vollständig membrangebunden und damit in aktivem Zustand.

Die eNOS-mRNA-Expression zeigt hier ein kongruentes Bild. Während die eNOS-mRNA nach 14 Tagen Atorvastatinbehandlung signifikant erhöht ist, findet sich zwei Tage nach Absetzen von Atorvastatin eine deutliche Repression der eNOS-mRNA (Abbildung 2). In früheren Untersuchungen konnte hierzu *in vitro* eine drastische negative Regulation der Transkription des für die Rho-GTPase kodierenden Gens in Endothelzellen als molekularer Mechanismus für eine massiv erniedrigte NO-Freisetzung nach Absetzen der Statinbehandlung gezeigt werden (Laufs et al., 2000).

Die endotheliale NO-Synthase ist ein ubiquitär im Organismus vorhandenes Enzym und wurde auch in Thrombozyten und Megakaryozyten nachgewiesen (Sase und Michel,

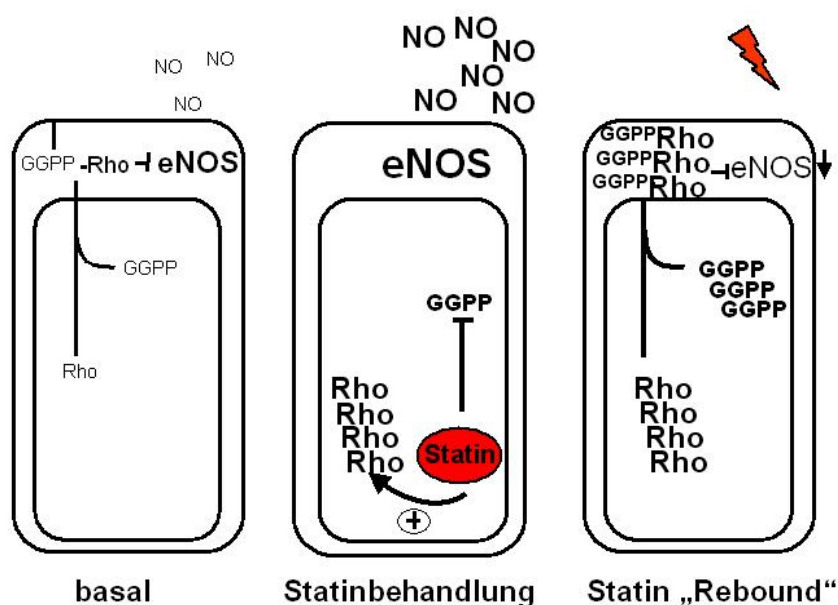


Abbildung 2. Absetzeffekte

1995). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß von Thrombozyten freigesetztes NO die Thrombozytenaggregation hemmt, eine Inhibition der NO-Synthase jedoch zu vermehrter Thrombozytenaktivität führt (Freedman et al., 1990; Simon et al., 1995). Während durch Endothel freigesetztes Stickstoffmonoxid häufiger untersucht wurde, ist über die Regulation des thrombozytären NO verhältnismäßig wenig bekannt. Wir können zeigen, daß es nach chronischer Vorbehandlung mit Atorvastatin unabhängig vom Cholesterinspiegel zu einer Zunahme der thrombozytären eNOS-mRNA und zu einer verminderten Freisetzung der Thrombozytenaktivitätsparameter PF4 und beta TG *in vitro* und zu verminderter Thrombusbildung und verlängerter Blutungszeit *in vivo* kommt. Diese Daten sind von klinischer Relevanz, da die Hauptursache für das Entstehen eines ischämischen Schlaganfalls oder für das Auftreten akuter Koronarsyndrome auf thrombotische oder thrombembolische Ereignisse, oft auf der Grundlage arteriosklerotisch vorgeschädigter Gefäßwände, zurückgeht (Haberl und Dembowski, 1999; Libby et al., 1997). Da Patienten mit Risiko für das Auftreten kardio- und zerebrovaskulärer Ereignisse von einer Thrombozytenfunktionshemmung profitieren, kann die verringerte Thrombozytenaggregation durch erhöhte NO-Freisetzung einen neuen Ansatz für Therapieinterventionen bieten (Patrino, 1994).

Unsere Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der Schlaganfallschutz durch eNOS-abhängige Effekte auf Gerinnungssystem und CBF vermittelt wird. Es sind aber weitere klinische Studien nötig, die einen Zusammenhang zwischen der Inzidenzverringerung und dem Schlaganfallschutz nach Statinbehandlung mit der verringerter Thrombozytenaktivität und dem verbessertem zerebralen Blutfluß untersuchen.

Vor dem Hintergrund der deutlich veränderten Rho-Aktivität nach akutem Absetzen der Statinbehandlung *in vitro* und *in vivo* konnten wir eine drastische Abnahme der eNOS-mRNA mit einem massiven Anstieg der noch kurz zuvor signifikant erniedrigten Thrombozytenaktivitätsmarker PF4 und beta-TG korrelieren. Zusätzlich fanden wir einen schnellen Verlust der neuroprotektiven und gerinnungshemmenden Wirkung *in vivo*. Diese Erkenntnisse scheinen ebenfalls in klinischer Hinsicht relevant. So ergaben Subgruppenanalysen der PRISM Studie, daß das ursprünglich nach Statinbehandlung verbesserte klinische Ergebnis bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom nach Beendigung der Medikation innerhalb von 72h komplett aufgehoben war (Heeschen et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse fanden sich an Patienten, bei denen Statingabe cholesterinunabhängig zu verbesserter Endothelfunktion, akutes Absetzen der Behandlung jedoch zu akut verschlechterter vaskulärer Funktion führte (Laufs et al., 2001).

Während wir Absetzeffekte im Sinne eines echten „Rebounds“ für die eNOS- und Rho-GTPase-Regulation sowie die Thrombozytenfunktionsparameter *in vitro* beobachteten, lassen sich diese Befunde jedoch nicht direkt auf die vaskulären Schadensmodelle *in vivo* übertragen. So fanden wir keine größeren Schlaganfallvolumina oder vermehrte Thrombusbildung im Vergleich zur Kontrolle nach Absetzen der Statinbehandlung, sondern vielmehr einen schnellen Verlust der protektiven Wirkung. Möglicherweise kompensieren andere länger wirkende pleiotrope Effekte der Statine oder durch NO selbst induzierte längeranhaltende protektive Wirkungen die negativen Absetzeffekte *in vivo* (Werner et al., 2002; Kröncke et al., 2001). Um eine mögliche Verschlechterung der Endothelfunktion zu vermeiden, sollte bei Risikopatienten für kardio- und zerebrovaskuläre Ereignisse gegebenenfalls von akutem Absetzen einer bestehenden Statinmedikation abgesehen werden. Hierzu sind aber weitere klinische Beobachtungen nötig.

6 Literaturverzeichnis

- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17: 472-476
- Berlit P (2000) Schlaganfall. *Nervenarzt* 71: 231-237
- Bronner LL, Kanter DS, Manson JE (1995) Primary prevention of stroke. *N Engl J Med* 333: 1392-1400
- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neuroscience* 20: 2926-2933
- Crouse JR III, Byington RP, Furberg CD (1998) HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data. *Atherosclerosis* 138: 11-24
- Delanty N, Vaughan CJ (1997) Vascular effects of statins in stroke. *Stroke* 28: 2315-2320
- Endres M, Laufs U, Liao KL, Moskowitz MA (2004) Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci* 27: 283-289
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang PL, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *PNAS* 95: 8880-8885
- Freedman JE, Sauter R, Battinelli EK, Ault K, Knowles C, Huang PL, Loscalzo J (1999) Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOS III gene. *Circ Res* 84: 1416-1421
- Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF Jr, Michelson AD (1997) Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 100: 350-356
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
- Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430

- Haberl RL, Dembowski K (1999) Atherothrombosis: common factor in stroke, myocardial infarction and peripheral vascular disease. *Eur Heart J* 1: A41-A44
- Hachinski V, Graffagnino C, Beaudry M, Bernier G, Buck C, Donner A, Spence D, Doig G, Wolfe BM (1996) Lipids and stroke: a paradox resolved. *Arch Neurol* 53: 303-308
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514
- Haylor J, Singh I, el Nahas AM (1991) Nitric oxide synthesis inhibitor prevents vasodilation by insulin-like growth factor I. *Kidney Int* 39: 333-335
- Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH (1997) Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomised trials. *JAMA* 278: 313-321
- Heeschen C, Hamm CW, Laufs U, Snapinn S, Bohm M, White HD; Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Investigators. (2002) Withdrawal of statins increases event rates in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 105: 1446-1452
- Hornig B, Maier V, Drexler H (1996) Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 93: 210-214
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242
- Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA (1996) Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 981-987
- Iadecola C (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischaemic brain injury. *Trends Neurosci* 20: 132-139
- Jay TM, Lucignani G, Crane AM, Jehle J, Sokoloff L (1988) Measurement of local cerebral blood flow with [¹⁴C]iodoantipyrine in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 121-129

- Kaplan KL, Owen J (1981) Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood* 57: 199-202
- Kearney D, Fitzgerald D (1999) The anti-thrombotic effects of statins. *J Am Coll Cardiol* 33: 1305-1307
- Knopp RH (1999) Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med* 341: 498-511
- Kröncke KD, Fehsel K, Suschek C, Kolb-Bachofen V (2001) Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int Immunopharmacol* 1: 1407-1420
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998a) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97: 1129-1135
- Laufs U, Liao JK (1998b) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273: 24266-24271
- Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Bohm M (2000) Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation* 102: 3104-3110
- Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaldo N, Bohm M, Nickenig G (2001) Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *Am J Cardiol* 88: 1306-1307
- Lee IM, Hennekens CH, Berger K, Buring JE, Manson JE (1999) Exercise and Risk of Stroke in Male Physicians. *Stroke* 30: 1-6
- Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK (1997) Molecular biology of atherosclerosis. *Int J Cardiol* 62: S23-S29
- Lindauer U, Kunz A, Schuh-Hofer S, Vogt J, Dreier JP, Dirnagl U (2001) Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arterial pH reactivity. *Am J Physiol* 281: H1353-H1363
- Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. (1998) *The Long Term*

- Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med* 339: 1349-1357
- Loscalzo J (1995) Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med* 333: 251-253
- Morikawa E, Moskowitz MA, Huang Z, Yoshida T, Irikura K, Dalkara T (1994) L-Arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke* 25: 429-435
- Neeper SA, Gomez-Pinilla G, Choi J, Cotman C (1995) Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373: 109
- Nezasa K, Higaki K, Matsumura T, Inazawa K, Hasegawa H, Nakano M, Koike M (2002) Liver-specific distribution of rosuvastatin in rats: comparison with pravastatin and simvastatin. *Drug Metab Dispos* 30: 1158-1163
- Patrono C (1994) Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 330: 1287-1294
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *PNAS* 87: 5193-5197
- Sacco RL, Gan R, Boden-Albala B, Lin IF, Kargman DE, Hauser WA, Shea S, Paik MC (1998) Leisure-Time physical activity and ischemic stroke risk: the Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* 29: 380-387
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E (1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators. *N Engl J med* 335: 1001-1009
- Sase K, Michel T (1995) Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 57: 2049-2055
- Sessa WC, Pritchard K, Seyedi M, Wang J, Hintze TH (1994) Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 74: 349-353
- Simon DI, Stamler JS, Loh E, Loscalzo J, Francis SA, Creager MA (1995) Effect of nitric

oxide synthase inhibition on bleeding time in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 26: 339-342

Stummer W, Baethmann A, Murr R, Schurer L, Kempski OS (1995) Cerebral protection against ischemia by locomotor activity in gerbils. *Stroke* 26: 1423-1430

Thomas M, Mann J (1998) Increased thrombotic vascular events after change of statin. *Lancet* 352: 1830-1831

Tong L, Shen H, Perreau VM, Balazs R, Cotman CW (2001) Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Diss* 8: 1046-1056

Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM (1996) Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 348: 1079-1082

Vaughan CJ, Delanty N (1999) Neuroprotective properties of statins in cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 30: 1969-1973

Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *PNAS* 96: 13427-13431

Werner N, Nickenig G, Laufs U (2002) Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 97: 105-116

Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L (1999) Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *Br J Pharmacol* 127: 747-755

7 Verwendete Publikationen

Referenz #1: Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schrock H, Nickenig G, Kuschinsky W, Dirnagl U, Laufs U (2003) Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol* 54 (5): 582-590

Referenz #2: Gertz K, Laufs U, Lindauer U, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2003) Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 34 (2): 551-557

Referenz #3: Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M (2002) Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 942 (1-2): 23-30

Referenz #4: Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31 (10): 2442-2449

Referenz #5: Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Bohm M (2000) Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation* 102: 3104-3110

Selbständigkeitserklärung

Medizinische Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin
An den Promotionsausschuß

Berlin, 21. September 2004

Sehr geehrte Damen und Herren,
der selbständige Anteil, den ich, Karen Gertz, geb. am 24.05.76, an der Erstellung der unter Punkt 7 der Dissertationsschrift genannten Publikationen habe, setzt sich prozentual ca. wie folgt zusammen: Referenz #1: 40%, Referenz #2: 60%, Referenz #3: 40%, Referenz #4: 40%, Referenz #5: 10%.

Mit freundlichen Grüßen

Karen Gertz

PD Dr. med. Matthias Endres

Anhang

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl für die Möglichkeit zur Durchführung der Promotionsarbeit im Labor der Experimentellen Neurologie.

Herrn PD Dr. med. Matthias Endres gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Promotionsthemas und die ausgezeichnete Betreuung.

Herrn PD Dr. med. Ulrich Laufs (Klinik für Innere Medizin, Universität des Saarlandes, Homburg) möchte ich für die Erhebung der *in vitro* Daten und Frau PD Dr. med. vet. Ute Lindauer (Experimentelle Neurologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin) für die Durchführung der Experimente im Modell der isolierten Arterie danken.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Kuschinsky und Herrn Dr. rer. nat. Helmut Schröck (Institut für Physiologie, Universität Heidelberg) danke ich für die Ermöglichung der Experimente zur absoluten zerebralen Blutflussmessung, die ich in Heidelberg durchführen durfte.

Ich danke Herrn Dr. med. Juri Katchanov und Herrn Dr. med. Krisztian Kapinya für die Anteilnahme und Hilfe.

Nicht zuletzt gilt mein aufrichtiger Dank meiner Familie für die allseits unermüdliche Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Karen Gertz, geboren am 24. Mai 1976 in Berlin, erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unerlaubte Hilfe Dritter selbständig angefertigt habe und die benutzte Literatur und Hilfsmittel vollständig angegeben sind. Die Dissertationsschrift stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar und wurde an keiner anderen Fakultät eingereicht.

Karen Gertz

Berlin, 21. September 2004

Lebenslauf und Publikationsliste

Name	Karen Gertz
Geburtsdatum und –ort	24.05.1976 in Berlin
Familienstand	ledig
Ausbildung	
1982 bis 1990	11. Oberschule „Gerhart Eisler“, Berlin
1990 bis 1995	Friedrich-List-Oberschule, Berlin
1995 bis 2002	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin
Beruflicher Werdegang	
2002 bis 2004	Ärztin im Praktikum an der Klinik für Neurologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte
seit 2004	Assistenzärztin an der Klinik für Neurologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte
Promotion	
1999 bis dato	„Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase-abhängige Effekte von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und körperlicher Aktivität im experimentellen Schlaganfallmodell“. Abteilung Experimentelle Neurologie, Leiter Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl, Doktorvater PD Dr. med. Matthias Endres

Publikationen (kumulativer Impactfaktor, Stand 2003: 48,3)

Katchanov J, Waeber C, **Gertz K**, Gietz A, Winter B, Bruck W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M (2003) Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol* 13 (4): 452-464 [3,8]

Endres M, **Gertz K**, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schrock H, Nickenig G, Kuschinsky W, Dirnagl U, Laufs U (2003) Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol* 54 (5): 582-590 [7,7]

Gertz K, Laufs U, Lindauer U, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2003) Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 34 (2): 551-557 [5,2]

Laufs U, **Gertz K**, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M (2002) Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 942 (1-2): 23-30 [2,5]

Katchanov J, Harms C, **Gertz K**, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Bruck W, Hortnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M (2001) Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* 21 (14): 5045-5053 [8,3]

Abdelkarim GE, **Gertz K**, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabo C, Endres M (2001) Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro and in vivo models of stroke. *Int J Mol Med* 7 (3): 255-260 [1,9]

Laufs U, **Gertz K**, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31 (10): 2442-2449 [5,2]

Prass K, Wiegand F, Schumann P, Ahrens M, Kapinya K, Harms C, Liao W, Trendelenburg G, **Gertz K**, Moskowitz MA, Knapp F, Victorov IV, Megow D, Dirnagl U (2000) Hyperbaric oxygenation induced tolerance against focal cerebral ischemia in mice is strain dependent. *Brain Res* 871 (1): 146-150 [2,5]

Laufs U, Endres M, Custodis F, **Gertz K**, Nickenig G, Liao JK, Bohm M (2000) Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation* 102 (25): 3104-3110 [11,2]

Karen Gertz

Berlin, 21. September 2004