

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universität Ulm
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

**Effekt von Östrogen auf vorbestehende
atherosklerotische Läsionen:
Stellenwert des Endothels**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin, Dr. med.
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Jochen Spieß
Biberach an der Riß

2005

| | |
|----------------------|---------------------------------|
| Amtierender Dekan: | Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. Hartmut Hanke |
| 2. Berichterstatter: | PD Dr. Wolfgang Weidemann |
| Tag der Promotion: | 20. Oktober 2005 |

Meinen Eltern

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 6 |
| 1. EINLEITUNG | 8 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN..... | 10 |
| 2.1 VERSUCHSMODELL | 10 |
| 2.1.1 Versuchstiere | 10 |
| 2.1.2 Cholesterinzufütterung | 10 |
| 2.1.3 Blutentnahmen | 10 |
| 2.2 OVAREKTOMIE..... | 11 |
| 2.3 VERSUCHSAUFBAU | 12 |
| 2.4 NACHWEIS DER ZELLPROLIFERATION MIT DER 5'-BROM-2'-DESOXYURIDIN (BRDU)-BIOTIN-AVIDIN-METHODE..... | 13 |
| 2.4.1 Grundlagen des Proliferationsnachweises mit 5'-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU)..... | 13 |
| 2.4.2 Verabreichung von 5'-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) und 2'-Desoxycytidin (d-cyt) | 13 |
| 2.5 GEFÄßENTNAHME | 14 |
| 2.6 PRÄPARATION UND FIXIERUNG DER GEFÄßSEGMENTE..... | 15 |
| 2.7 HISTOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE AUFARBEITUNG..... | 15 |
| 2.7.1 Einbettung und Anfertigung von Semidünnschnitten | 15 |
| 2.7.2 Hämalaun-Eosin-Färbung (H.E.)..... | 16 |
| 2.7.3 Elastika-van Gieson-Färbung..... | 16 |
| 2.7.4 Immunhistologische Färbungen mit der Avidin-Biotin-Komplexmethode am Paraffinschnitt..... | 16 |
| 2.8 AUSWERTUNG DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTE | 18 |
| 2.8.1 Bestimmung der Intimafläche..... | 18 |
| 2.8.2 Ermitteln der Proliferationsaktivität..... | 19 |
| 2.8.3 Beurteilung des Endothels | 19 |
| 2.9 BESTIMMUNG DER BLUTWERTE | 19 |
| 2.9.1 Gesamtcholesterin | 19 |
| 2.9.2 Östradiol..... | 20 |
| 2.10 STATISTISCHE AUSWERTUNG..... | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 3. ERGEBNISSE | 21 |
| 3.1 MORPHOLOGISCHE ERGEBNISSE..... | 21 |
| 3.1.1 <i>Gruppe IV</i> | 21 |
| 3.1.2 <i>Gruppe I</i> | 21 |
| 3.1.3 <i>Gruppe II</i> | 22 |
| 3.1.4 <i>Gruppe III</i> | 22 |
| 3.2 PROLIFERATIVE AKTIVITÄT IN DEN LÄSIONEN | 24 |
| 3.2.1 <i>Gruppe I</i> | 24 |
| 3.2.2 <i>Gruppe II</i> | 24 |
| 3.2.3 <i>Gruppe III</i> | 24 |
| 3.3 vWF-EXPRESSION DES ENDOTHELIS | 26 |
| 3.3.1 <i>Gruppe IV</i> | 26 |
| 3.3.2 <i>Gruppe I</i> | 26 |
| 3.3.3 <i>Gruppe II</i> | 26 |
| 3.3.4 <i>Gruppe III</i> | 26 |
| 3.4 LABORPARAMETER | 29 |
| 3.4.1 <i>Gesamtcholesterin</i> | 29 |
| 3.4.2 <i>Östradiolspiegel</i> | 30 |
| 3.5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE | 31 |
| 3.5.1 <i>Morphologische Ergebnisse</i> | 31 |
| 3.5.2 <i>Proliferation</i> | 32 |
| 3.5.3 <i>vWF-Expression</i> | 33 |
| 4. DISKUSSION..... | 34 |
| 4.1 WAHL DES TIERMODELLS..... | 34 |
| 4.2 EIGENE ERGEBNISSE..... | 35 |
| 4.2.1 <i>Morphometrie</i> | 35 |
| 4.2.2 <i>Östradiolspiegel</i> | 35 |
| 4.2.3 <i>Proliferationsaktivität</i> | 35 |
| 4.2.4 <i>Rolle des Endothels</i> | 36 |
| 4.3 KONTEXT ZU KLINISCHEN STUDIEN..... | 39 |
| 4.4 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK | 42 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG..... | 43 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 45 |
| DANKSAGUNG | 54 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µm | Mikrometer |
| A | Arteria |
| A.abd | Aorta abdominalis |
| ABC | Avidin-Biotin-Komplex |
| AEC | 3-Amino-9-Ethylcarbazole |
| AoBo | Aortenbogen |
| A.thor | Aorta thorakalis |
| BrdU | 5'-Brom-2'-Desoxyuridin |
| Car.-re | Arteria carotis rechts |
| Car.-li | Arteria carotis links |
| cm | Zentimeter |
| CRP | C-reaktives-Protein |
| d | Tag(e) |
| d-cyt | 2'-Desoxycytidin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDRF | endothelial derived relaxing factor |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ER-α | Östrogenrezeptor-α |
| ER-β | Östrogenrezeptor-β |
| ET1 | Endothelin 1 |
| h | Stunde(n) |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HCl | Salzsäure |
| HDL | high density lipoproteins |
| H.E. | Hämalaun-Eosin-Färbung |
| HPLC | Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie |
| HRT | Hormon-Substitutionstherapie |
| i.m. | intramuskulär |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| KHK | koronare Herzerkrankung |
| LDL | low density lipoproteins |

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mm ² | Quadratmillimeter |
| mg | Milligramm |
| n | Normalität |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NZW | weiße Neuseeland Kaninchen |
| PBS | phosphate buffered saline |
| pg | Picogramm |
| pH | pH-Wert |
| SMC | glatte Muskelzelle(n) |
| S-Phase | Synthesephase der DANN |
| VLDL | very low density lipoproteins |
| vWF | von Willebrand Faktor |
| WHI | Womens Health Initiative |

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in den Industrienationen die häufigste Todesursache dar. Den weitaus größten Anteil haben hierbei die atherosklerotisch bedingten Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit (KHK) oder die cerebrale Ischämie.

Im Laufe der Jahre ist es gelungen eine Reihe von Risikofaktoren zu identifizieren, deren Vorliegen die Entwicklung einer Atherosklerose begünstigt. Hierzu gehören in erster Linie eine genetische Disposition, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus und Hyperlipoproteinämie (37, 74).

Die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen liegt bei Frauen vor der Menopause deutlich niedriger als bei Männern vergleichbaren Alters. Erst nach der Menopause steigt ihre Inzidenz auf eine, den Männern vergleichbare Höhe an, und übertrifft diese sogar im höheren Lebensalter. Prämenopausale Frauen sind also gegen die Ausbildung einer Atherosklerose relativ geschützt (8, 58).

Bei der Suche nach der Ursache dieser Protektion zeigten Frauen mit einer ovariellen Dysfunktion schon in jungen Jahren ein den Männern ähnlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Der beobachtete Effekt scheint also auf die Wirkung der weiblichen Geschlechtshormone begründet zu sein (43, 69).

In der Tat hatten Ludden et al. schon 1942 eine Reduktion des Cholesteringehaltes in der Aorta von Kaninchen unter Östrogen-Substitution nachgewiesen (69). Anfang der 50er Jahre konnte in einer tierexperimentellen Studie ein protektiver Einfluß des Östrogens auf die Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen nachgewiesen werden (75).

Seither wurde die atheroprotektive Wirkung des Östrogens in zahlreichen experimentellen Studien an verschiedenen Tiermodellen belegt (13, 28, 39, 41, 105).

Trotz intensiver Bemühungen ist es bis heute jedoch noch nicht gelungen die genauen Wirkmechanismen vollständig aufzuklären.

Eine Reihe direkter und indirekter Effekte von Östrogen auf die Gefäßwand sind bekannt. So beeinflusst Östrogen das Serum-Lipid-Profil günstig, im Sinne einer Erhöhung des HDL-Cholesterins und einer Senkung der LDL-Cholesterin Fraktion (38, 101, 106).

Die LDL-Oxidation wird gehemmt, und an verschiedenen Modellen wurde eine Hemmung der LDL-Cholesterinaufnahme in die arterielle Gefäßwand nachgewiesen (51).

Ein weiterer direkter Effekt liegt in der Hemmung der Kollagensynthese in der Gefäßwand (29). An glatten Muskelzellen wurde unter dem Einfluß von Östradiol eine antiproliferative Wirkung in vitro und in vivo gezeigt (3, 80, 104).

Außerdem beeinflusst Östrogen den Gefäßtonus und führt zu einer Vasodilatation. Dies geschieht zum einen durch einen kalziumantagonistischen Effekt auf die glatte Muskulatur der Gefäßwand (19, 56, 57), zum anderen steigert Östrogen geschlechtsspezifisch die endotheliale Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) (45).

Neuere Studien weisen auf eine Beteiligung gefäßwandständiger Östrogenrezeptoren bei der atheroprotektiven Wirkungsvermittlung des Östrogens hin (59, 60, 68).

Als Konsequenz dieser Erkenntnis wird Frauen in der Menopause seit den späten 60er Jahren eine Östrogen-Substitutionstherapie angeboten. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten klinischen Studien ergaben kein einheitliches Bild.

Während mehrere große Kohortenstudien eine signifikant erniedrigte Zahl kardiovaskulärer Ereignisse (tödlicher und nicht tödlicher Myokardinfarkt) zeigte (46, 48, 82, 83, 94, 95), fanden andere Autoren ein erhöhtes Risiko, bzw. keinen Effekt einer Östrogensubstitution (66, 109).

Von Sullivan et al. wurde der protektive Effekt einer Östrogen-Substitutionstherapie differenziert im Rahmen der Primär- oder Sekundärprophylaxe untersucht (99). Es zeigte sich, daß Frauen mit einer vorbestehenden koronaren Herzerkrankung von einer postmenopausalen Therapie profitierten, wohingegen ohne angiographisch nachgewiesene KHK eine Primärprophylaxe keine Veränderung der Sterblichkeit zur Folge hatte.

Die tierexperimentellen Arbeiten zur Östrogenwirkung beschäftigten sich lediglich mit dem Einfluß auf die primäre Atherogenese. Zur Wirkung des Östrogens auf vorbestehende atherosklerotische Läsionen gibt es nur sehr wenige Daten.

In der vorliegenden Studie wurden atherosklerotische Plaques bei weiblichen Kaninchen durch das Füttern einer Cholesterindiät erzeugt. Dann wurde an verschiedenen arteriellen Gefäßsegmenten die Wirkung von Östrogen auf die weitere Plaqueentwicklung untersucht. Zusätzlich wurde die Expression des "von Willebrand Faktors" immunhistochemisch als Marker für intakte Endothelzellen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsmodell

2.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 32 weibliche weiße Neuseeland Kaninchen (NZW) verwendet (Fa. Savo, Kissleg, Deutschland). Zu Versuchsbeginn waren die Tiere ca. zwölf Wochen alt und hatten ein Ausgangsgewicht zwischen 1,8 und 2,4 kg. Sie wurden zu vier Gruppen mit jeweils acht Tieren randomisiert. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe (Gruppe IV), die Tiere der drei anderen Gruppen wurden ovariectomiert.

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Kaninchen in Einzelkäfigen gehalten, in denen der Tag/Nachtzyklus bei künstlicher Beleuchtung jeweils zwölf Stunden betrug.

2.1.2 Cholesterinzufütterung

Mit Ausnahme der Kontrollgruppe (Gruppe IV) erhielten die Kaninchen von Versuchsbeginn an eine kommerziell erhältliche Cholesterindiät (40 g/kg KG Standardfutter mit einem 0,5 Massenprozent Cholesterinzusatz/Firma Altromin, Lage, Deutschland). Die Tiere der Gruppe IV erhielten lediglich eine Standarddiät ohne Cholesterin (Firma Altromin).

2.1.3 Blutentnahmen

Den Kaninchen wurde unmittelbar vor der Ovariectomie, sowie am Tag 84 und zu Versuchsende ca. 6 – 8 ml Blut in EDTA-Röhrchen entnommen. Die Blutentnahme erfolgte aus der Ohrarterie.

Aus dem Plasma erfolgte die Bestimmung des Gesamtcholesterins und der Östradiolwerte.

Bei den Tieren der Gruppe IV wurde auf die Entnahme von Blut verzichtet.

2.2 Ovariektomie

Die Tiere wurden zu Beginn gewogen und dann mit einer subcutanen Atropinsulfat-Injektion (2 mg/kg KG - Firma Braun AG, Melsungen, Deutschland) prämediziert um die Salivation zu unterdrücken.

Im Anschluß wurde eine periphere Venenverweilkanüle an einer Ohrvene plziert Über die die Injektionsnarkose mit einer Kombination aus einem Narkotikum und einem Sedativum geführt wurde.

Zu diesem Zweck wurde eine Mischung aus Ketaminhydrochlorid (Ketanest 50, entsprechend 50 mg Ketamin-Base/ml, Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland) und Xylazin-Hydrochlorid (Rompun, entsprechend 20 mg Xylazin/ml, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), in der Dosierung von 20 mg/kg KG Ketanest und 0,4 - 1,8 mg/kg KG Rompun verabreicht.

So ließ sich eine effiziente Vollnarkose bei gleichzeitiger Analgesie und Muskelrelaxation erreichen. Die Narkose wurde während der gesamten Operation intravenös, durch mehrfache Nachinjektionen, geführt.

Die Tiere wurden auf einer stabilen Unterlage gelagert und an den Extremitäten fixiert. Das Operationsfeld vom Rippenbogen bis zur Leiste wurde sorgfältig rasiert und desinfiziert.

Danach wurde unter sterilen Bedingungen mit dem Skalpell ein ca. 5 cm langer Hautschnitt entlang der Linea alba durchgeführt. Im Anschluß wurden die darunterliegenden Muskelschichten und das Peritoneum mittels einer Schere ebenfalls im Bereich der Linea alba durchtrennt.

Nach der Orientierung im Bauchraum wurde der Dünndarm in sterile Tücher eingeschlagen und zur Seite geklappt. Dann wurde der Uterus mit den Tuben und den Ovarien aufgesucht.

Die A. ovarica wurde ebenso wie die A. uterina samt Tuba uterina mit einem resorbierbaren Faden ligiert, um anschließend die Ovarien und den größten Teil der Eileiter abtrennen zu können.

Nach der Entfernung dieser Organe wurde der Dünndarm wieder in die Bauchhöhle verlagert und das Peritoneum zusammen mit den darüberliegenden Muskelschichten als Ganzes mit einem resorbierbaren Faden in einer fortlaufenden Naht verbunden.

Die Hautnaht erfolgte in der Rückstichtechnik nach Donati um ein Aufkratzen oder -beißen durch die Tiere zu verhindern.

2.3 Versuchsaufbau

Wie schon beschrieben erhielten die Tiere der Gruppe IV ohne weitere Intervention eine cholesterinfreie Diät für die Dauer von vierundzwanzig Wochen (168 Tage).

Die Tiere der Gruppen I bis III wurden ovariectomiert und erhielten unmittelbar nach dem Eingriff für die Dauer des Versuchs eine 0,5%ige Cholesterindiät zur Erzeugung von atheromatösen Plaques.

Die Tiere der Gruppe I erhielten die Cholesterindiät über einen Zeitraum von zwölf Wochen (84 Tage), danach wurden sie abgetötet. Die Gruppe II erhielt ebenfalls lediglich die Cholesterindiät, jedoch über den doppelten Zeitraum, also vierundzwanzig Wochen (168 Tage). Auch die Gruppe III bekam die Cholesterindiät über vierundzwanzig Wochen (168 Tage), zusätzlich erhielten die Tiere jedoch in der zweiten Versuchshälfte, also ab dem 85. Tag, in wöchentlichen Abständen eine Hormongabe. Ihnen wurden 1 mg Estradiolvalerat/kg KG/Woche (17- β -Östradiol, Progynon-Depot-10, Schering AG, Berlin, Deutschland) intramuskulär verabreicht.

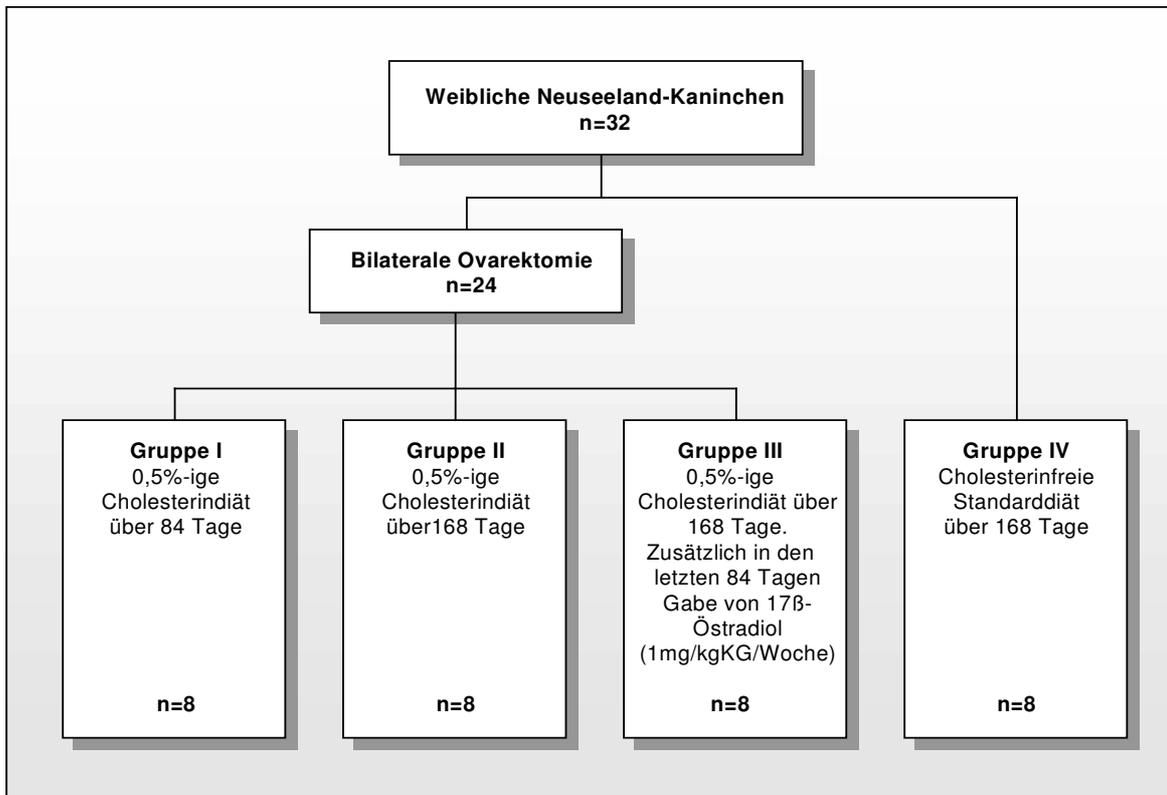


Abb. 1: Versuchsaufbau

2.4 Nachweis der Zellproliferation mit der 5'-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU)-Biotin-Avidin-Methode

2.4.1 Grundlagen des Proliferationsnachweises mit 5'-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU)

Die Verabreichung vom BrdU gehört zu den Standardverfahren für den histomorphologischen Nachweis von proliferierenden Zellen. BrdU stellt ein Thymidinanalogon dar. Aus diesem Grund wird es, sofern im Überschuss vorhanden, von den teilungsaktiven Zellen während der S-Phase der Mitose anstatt von Thymidin in die DNA eingebaut. Auf diese Weise lassen sich in der Teilung befindliche Zellen, die sich mindestens eine Stunde in der S-Phase des Zellzyklus befinden, sicher erfassen. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU (Bio Cell Consulting, Grellingen, CH), der mit einer Farbreaktion (Avidin-Biotin-Methode) gekoppelt ist, lassen sich die BrdU-markierten Zellen sichtbar machen. Die Kerne dieser Zellen erscheinen im mikroskopischen Bild rot.

Um mögliche Resorptionsstörungen zu erfassen wurde bei allen Tieren die Zellteilungsaktivität der Dünndarmmukosa bestimmt. Hier zeigt die physiologische Schleimhautregeneration eine Mitoserate von ca. 30%.

Die Gabe von BrdU vermindert über einen Rückkopplungsmechanismus die Biosyntheserate der Pyrimidinbasen. Ein so entstehender Mangel an Pyrimidinbasen könnte die DNA-Replikation beeinträchtigen. Um dies zu verhindern wurde zusätzlich 2'-Desoxycytidin appliziert.

Bei der hier angewandten Methode der fraktionierten intramuskulären und subcutanen Applikation von BrdU über 18 Stunden konnte mit der HPLC-Technik an Serumproben von Kaninchen ein ausreichender BrdU-Spiegel über den gesamten Zeitraum bis zur Gefäßentnahme nachgewiesen werden. Die Beeinträchtigung der DNA-Replikation durch die toxischen Effekte von BrdU kann bei der kurzen Applikationsdauer von 18 Stunden vernachlässigt werden.

2.4.2 Verabreichung von 5'-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) und 2'-Desoxycytidin (d-cyt)

Die Tiere erhielten 18 Stunden vor der Gefäßentnahme eine Narkose bestehend aus einer Mischung von Ketaminhydrochlorid (Ketanest 50, entsprechend 50 mg Ketamin-Base/ml, Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland) und Xylazin-Hydrochlorid (Rompun, entsprechend 20 mg Xylazin/ml, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland).

Die Dosis bestand aus einer Mischung von 1,4 ml Ketanest und 0,6 ml Rompun. Die Injektion erfolgte intramuskulär in die Glutealmuskulatur. In Narkose wurde den Tieren die dorsale Halsseite rasiert und eine subkutane Nackentasche durch einen 5 cm langen Schnitt angelegt. In diese Tasche wurde dann ein Gemisch von 100 mg BrdU/kg KG und 75 mg d-cyt/kg KG (beides Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland) in Form eines Pulvers appliziert.

Um die Serumkonzentration von BrdU konstant zu halten wurden zusätzlich 18 und 12 Stunden vor Gefäßentnahme 30 mg BrdU/kg KG und 25 mg d-cyt/kg KG als wässrige Lösung in die Oberschenkelmuskulatur injiziert.

2.5 Gefäßentnahme

Die Tiere erhielten eine wie oben beschriebenen intramuskulären Ketanest®/Rompun® Narkose und wurden dann in einer Kammer durch Einleitung von CO₂ abgetötet. Sofort nach dem Eintritt des Todes wurde die ventrale Körperhälfte vom Schambein bis zum Hals eröffnet und der proximale Aortenbogen freipräpariert. Im folgenden wurde die Aorta in ihrem Verlauf bis zum Abgang der Nierenarterien dargestellt. Am Aortenbogen wurden die linke und die rechte A. carotis communis bis zur Verzweigung in die A. carotis interna et externa freipräpariert. Der präparierte Gefäßstamm wurde proximal am linken Ventrikel sowie distal am Abgang der Nierenarterien und am Sinus caroticus abgesetzt. Für die Kontrolle der BrdU-Resorption wurde außerdem ein etwa 1 cm großes Dünndarmsegment entnommen.

Der entnommene Gefäßstamm wurde, entsprechend dem Schema in Abbildung 2, in die verschiedenen Gefäßsegmente mittels einer scharfen Präparierschere geteilt. Der Aortenbogen (AoBo) wurde in drei Segmente, der thorakale (A.thor) und abdominale (A.abd) Aortenabschnitt in jeweils vier Segmente aufgeteilt. Die A. carotis communis (Car.-re bzw. Car.-li) ergab zwei Segmente. Die einzelnen Gefäßabschnitte wurden entsprechend ihrer Lage von proximal nach distal mit römischen Ziffern numeriert (AoBo I,II,III; A.thor I,II,III,IV; A.abd I,II,III,IV; Car.-re I,II; Car.-li I,II).

Ausgewertet wurden von jedem Tier der Aortenbogenabschnitt I (AoBo I), der thorakale Aortenabschnitt III (A.thor III), der abdominale Aortenabschnitt IV (A.abd IV) und das zweite Segment der rechten Halsschlagader (Car.-re II).

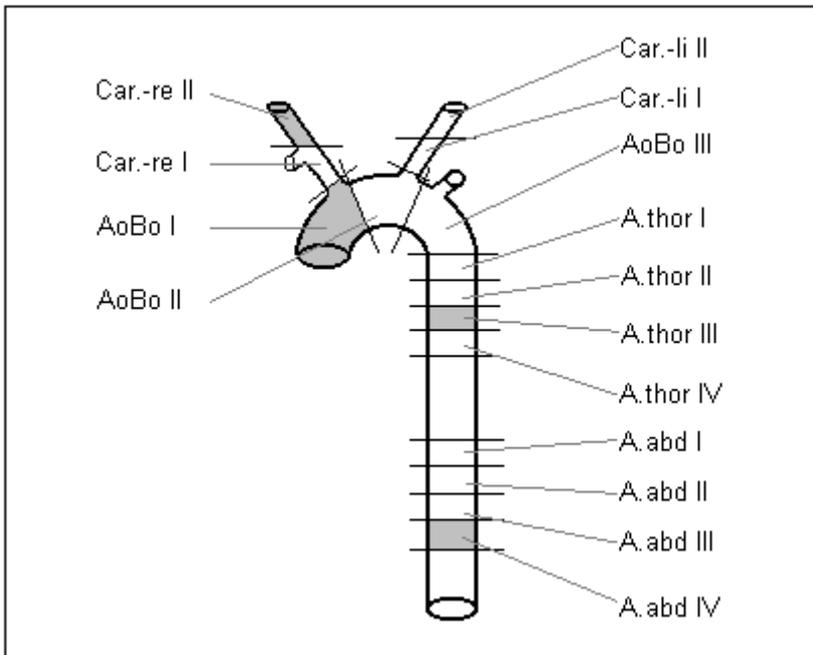


Abb. 2: Einteilung des Gefäßstamms (schematisch).
Die Bedeutung der Abkürzungen ist dem Text zu entnehmen, die ausgewerteten Abschnitte sind grau unterlegt.

2.6 Präparation und Fixierung der Gefäßsegmente

Direkt nach der Entnahme wurden die Gefäßabschnitte und das Dünndarmsegment immersionsfixiert. Hierzu diente eine 4%ige neutral gepufferte Formalinlösung in der die Gefäße für mindestens 24 Stunden verblieben.

Danach wurden die Gefäße sorgfältig vom umgebenden Bindegewebe befreit und in Biopsiekassetten eingeschlossen. Anschließend erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% - 100%), und über eine Xylol-Lösung schließlich die Einbettung in Paraffin. Dieser Arbeitsschritt wurde maschinell mit einem Vakuum-infiltrationsprozessor (Fa. Bayer, Tissue-Tek II) durchgeführt.

2.7 Histologische und histochemische Aufarbeitung

2.7.1 Einbettung und Anfertigung von Semidünnschnitten

Die Gefäßsegmente wurden in Paraffinblöcke eingegossen, von denen sich dann mit Hilfe eines Mikrotoms (Fa. Leica, Jung RM 2045) Semidünnschnitte mit einer Schnittdicke von 4 µm angefertigt ließen. Die Schnitte wurden auf adhäsiv-beschichtete Objektträger aufgezogen.

2.7.2 Hämalaun-Eosin-Färbung (H.E.)

Um die Schnitte morphologisch beurteilen zu können, erfolgte zuerst eine Standardfärbung mit Hämalaun und Eosin (beides Croma Gesellschaft, Köngen, Deutschland).

Hierbei wird das Chromatin durch Hämalaun blau angefärbt, das Zytoplasma und die Interzellularsubstanz färbt sich durch Eosin rot.

2.7.3 Elastika-van Gieson-Färbung

Um die Membrana elastica interna deutlich identifizieren zu können wurde eine Elastika-van Gieson-Färbung durchgeführt. Hierbei wird nach Vorfärbung mit Weigertschem Eisenhämatoxylin (Chroma Gesellschaft, Köngen, Deutschland) das Bindegewebe mit Resorcinfuchsin-Lösung nach Weigert (Croma Gesellschaft, Köngen, Deutschland) und Pikrinsäure (Croma Gesellschaft, van Gieson-Lösung, Köngen, Deutschland) angefärbt. Es ergibt sich eine dunkelviolette Färbung der Zellkerne, das Zytoplasma und Muskelzellen färben sich gelb und Kollagenfasern rot.

2.7.4 Immunhistologische Färbungen mit der Avidin-Biotin-Komplexmethode am Paraffinschnitt

Bei der Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC) handelt es sich um eine indirekte immunhistologische Färbung. Die Antigene werden in einem ersten Schritt mit einem spezifischen Antikörper markiert. Danach wird an diesen Primärantikörper ein zweiter, biotinylierter Antikörper gekoppelt (Sekundärantikörper). Über einen Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex wird dieser schließlich mit dem 3-amino-9-Ethylcarbazole-Farbkomplex (AEC-Substrat) in einer enzymatischen Reaktion angefärbt. Die angefärbten Strukturen erscheinen im Lichtmikroskop rotbraun.

2.7.4.1 Immunhistologische Anfärbung von BrdU mit der Avidin-Biotin-Komplexmethode

Die Färbung wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

- 1.** Schrittweise Entparaffinierung im Wärmeschrank bei 60°C für 2-6h, dann mit Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96% und 70% Vol. Ethanol).
- 2.** Inkubation in 0,1 %iger Protease für 10 min bei Raumtemperatur.
- 3.** Um die endogene Peroxidase zu blockieren wurde ein sogenannter Acid-Block für 10 min zwischengeschaltet, bestehend aus 5 ml 30 %iges H₂O₂ und 200 ml Methanol.
- 4.** Die Schnitte wurden für 20 min in 1 n HCl bei Raumtemperatur eingetaucht.

5. Um die unspezifische Anlagerung des Primärantikörpers an stark geladene Bindegewebselemente der Präparate zu verhindern wurde auf die Schnitte Pferdeserum (Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland) aufgebracht, 1:2 mit PBS-Puffer verdünnt, für 20 min bei 37°C. Als blockierende Proteinlösung wird hier Pferdeserum verwendet, da der Sekundärantikörper vom Pferd stammt.
 6. Aufbringen des monoklonalen Primärantikörpers Anti-BrdU (Bio Cell Consulting, Grellingen, Schweiz) in der Verdünnung 1:100 in 0,5 %igem Tween 80 und Inkubation für 40 min bei 37 °C.
 7. Aufbringen des Sekundärantikörpers Pferd-anti-Maus-biotinyliert (Fa. Camon, Hamburg, Deutschland) in einer Konzentration von 1:100 in PBS-Puffer für 10 min bei 37 °C.
 8. Aufpipetieren des Avidin(A)-Biotin(B)-Komplexes (A:B = 1:1/Fa. Camon,Hamburg) in der Verdünnung 1:100 in PBS für 10 min bei 37 °C.
 9. Auftragen des AEC (3-amino-9-Ethylcarbazole) Färbekomplexes und warten bis eine Anfärbung der Schnitte sichtbar wird, in der Regel etwa 10 min.
 10. Gegenfärben der BrdU-negativen Zellkerne mit Hämalaun für 10 s.
 11. Einbetten der Schnitte auf den Objektträgern in Kaisers Glyceringelatine.
- Zwischen allen Schritten, außer zwischen 5. und 6., wurde ein 5-minütiges Spülen der Schnitte in PBS⁻-Puffer (pH 7,4) durchgeführt.
- In 5 l PBS⁻-Puffer sind enthalten: 40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH₂PO₄, 7,2 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O.

2.7.4.2 Immunhistologische Anfärbung von Endothelzellen mit der Avidin-Biotin-Komplexmethode

Zur Darstellung des Endothels wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den "von Willebrand Faktor" (vWF, anti-human factor VIII related antigen) verwendet (Pharma International, Mainz, Deutschland).

Die Produktion, Speicherung und Expression dieses Glykoproteins ist ausgesprochen gewebsspezifisch, und dem Endothel, sowie Megakaryozyten vorbehalten.

Die Färbung entspricht im wesentlichen der unter 2.7.4.1 aufgeführten Vorgehensweise für BrdU. Entscheidender Unterschied ist die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen vWF in der Verdünnung von 1:100 in PBS anstelle des Antikörpers gegen BrdU. Außerdem wurde auf den dort beschriebenen Schritt 4 verzichtet.

2.8 Auswertung der histologischen Schnitte

Alle Präparate wurden unter einem Lichtmikroskop beurteilt und ausgewertet (Nikon Alphaphot 2, Düsseldorf, Deutschland).

2.8.1 Bestimmung der Intimafläche

Zur Ermittlung der Intimafläche wurden die H.E.-gefärbten Schnitte mit einem computergestützten Morphometriesystem (Bioquant[®] Software der Fa. Bilaney Consulting, Düsseldorf) vermessen.

Die Intima wurde als Fläche zwischen dem luminalen Endothelabschluß und der Lamina elastica interna definiert und in [mm²] gemessen.

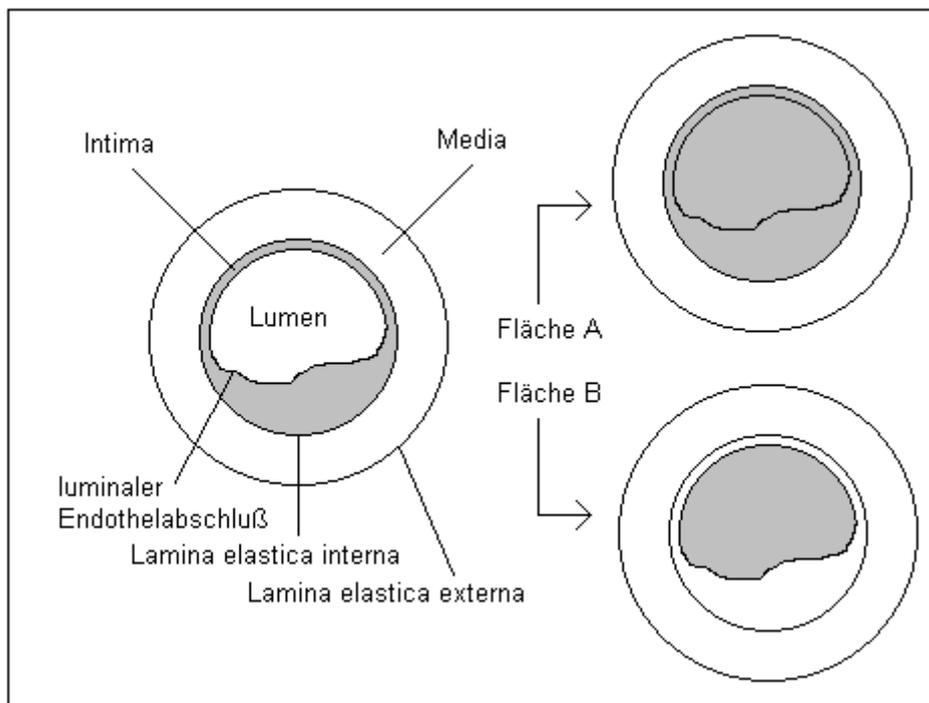


Abb. 3: Schematische Darstellung der Bestimmung der Intimafläche. Mit einem Morphometriesystem werden die Flächen A und B bestimmt. Die Intimafläche ergibt sich wenn von der Fläche A die Fläche B subtrahiert wird.

2.8.2 Ermitteln der Proliferationsaktivität

An den BrdU-gefärbten Schnitten wurde die Anzahl an positiven Zellen im Bereich der gesamten Intima eines Schnittes ausgezählt.

Die proliferative Aktivität konnte dann als Zahl BrdU-positiver Zellen pro intimaler Flächeneinheit in [mm²] angegeben werden:

$$\text{Proliferative Aktivität} = \frac{\text{Intimale BrdU-Zellen [1/mm}^2\text{]}}{\text{Intimafläche [mm}^2\text{]}}$$

2.8.3 Beurteilung des Endothels

Zur Beurteilung des Endothels wurde die Anzahl der vWF-exprimierenden Endothelzellen, sowie aller luminaler Zellen bestimmt.

Eine Endothelzelle wurde als positiv eingeschätzt, wenn sie im mikroskopischen Bild bei großer Vergrößerung eine homogene Verteilung an vWF-positiver Granula über das gesamte Zytosol zeigte.

Der Prozentsatz an vWF-positiven Endothelzellen ergab sich aus der Anzahl positiver Zellen im Verhältnis zur Zahl aller luminaler Zellen pro Schnitt.

2.9 Bestimmung der Blutwerte

Die entnommenen Blutproben wurden auf Eis gekühlt. Das Abtrennen der zellulären Bestandteile erfolgte durch zentrifugieren in einer Kühlzentrifuge bei 3000 Umdrehungen/min über 10 Minuten.

2.9.1 Gesamtcholesterin

Die Messung des Gesamtcholesterins wurde im EDTA-Plasma mit einem enzymatischen Verfahren bestimmt ("Testkombination Monotest Cholesterin, CHOD-PAP-Methode", Boehringer, Mannheim, Deutschland). Hierbei wird, nach enzymatischer Spaltung der Cholesterinester, freies Cholesterin in Anwesenheit von Sauerstoff zu δ -4-Cholesteron oxidiert. Dabei entstehendes Wasserstoffperoxid reagiert mit 4-Aminophenazon unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase zu einem roten Farbstoff, dem 4-(p-Benzochinon-monoamino)-phenazon. Dessen Extinktion ist zur vorhandenen Cholesterinmenge proportional und wird bei einer Wellenlänge von 546 nm photometrisch gemessen.

2.9.2 Östradiol

Die Bestimmung der Östradiolspiegel erfolgte mit einem kommerziellen Radioimmunoassay (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Dieser bedient sich dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindung. Plasma-Östradiol konkurriert mit einem ¹²⁵I-markierten Östradiol um die Bindungsstellen an einem hochspezifischen Antikörper. Die mit einem Gammacounter gemessene Radioaktivität ist der Menge des Plasma-Östradiols proportional. Die Nachweisgrenze liegt bei 20 pg/ml.

2.10 Statistische Auswertung

Die Daten der einzelnen Versuchsgruppen wurden als Median mit dem jeweiligen minimalen und maximalen Wert angegeben, da eine Normalverteilung nicht vorlag.

Um die statistische Signifikanz der Differenzen zu ermitteln wurde der Rangsummentest für unverbundenen Stichproben (Wilcoxon-Test) durchgeführt.

Eine statistische Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologische Ergebnisse

3.1.1 Gruppe IV

Die Tiere der Gruppe IV hatten über 168 Tage eine cholesterinfreie Diät erhalten und stellen die Kontrollgruppe dar.

Bei der Auswertung der Hämalaun-Eosin sowie der Elastika-Van Gieson-gefärbten Schnitte zeigten in dieser Gruppe der Aortenbogen, die rechte A. carotis, die thorakale und die abdominale Aorta eine intaktes endotheliales Zellband ohne die Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion. Aus diesem Grund wurde in dieser Gruppe keine morphometrische Bestimmung der Intimafläche durchgeführt.

3.1.2 Gruppe I

Die Tiere der Gruppe I hatten über 84 Tage hinweg eine 0,5%-ige Cholesterindiät erhalten.

Bei der morphologischen Auswertung zeigten die einzelnen Gefäßsegmente unterschiedlich Stadien der Atherosklerose.

Im Bereich des Aortenbogens hatten alle Tiere dieser Gruppe eine deutliche, größtenteils exzentrisch lokalisierte atherosklerotische Läsion entwickelt. Der Median der Intimafläche lag in den Schnitten bei 5,09 mm², die Spanne reichte von 0,94 mm² bis 6,42 mm².

In den Schnittpräparaten der rechten A. carotis ließen sich nur bei zwei Tieren der Gruppe sehr kleine, exzentrische Läsionen nachweisen, wohingegen die restlichen fünf Tiere keine atherosklerotischen Plaques zeigten. Die beiden Plaques zeigten eine Größe von 0,023 bzw. 0,0015 mm², der Median der Intimafläche lag für die A. carotis bei 0 mm².

Im Bereich der Aorta thoracalis und der Aorta abdominalis fanden sich dagegen wieder bei allen Tieren exzentrisch lokalisierte atherosklerotische Plaques. Im Vergleich zum Aortenbogen waren diese jedoch nur moderat ausgeprägt. Die morphometrische Bestimmung der Intimafläche ergab für die Aorta thoracalis im Median 0,18 mm² (0,06 – 0,59 mm²), und für die Aorta abdominalis 0,13 mm² (0,02 – 0,34 mm²).

3.1.3 Gruppe II

Die Tiere der Gruppe II erhielten über einen Zeitraum von 168 Tagen eine 0,5%-ige Cholesterindiät.

Nach diesem Zeitraum fanden sich bei allen vier untersuchten Gefäßabschnitten schwere atherosklerotische Läsionen.

Im Bereich des Aortenbogens zeigten sich ausgedehnte, konzentrische Plaques. Der Median der Intimafläche lag bei 11,44 mm² (7,03 – 15,58 mm²).

In den Schnitten der rechten A. carotis fanden sich, mit einer Ausnahme, durchgehend exzentrische Plaques moderateren Ausmaßes. Der Median der Intimafläche ergab 0,63 mm² (0 – 1,11 mm²).

Das thorakale Segment der Aorta zeigte wieder schwere, weitestgehend konzentrisch lokalisierte atherosklerotische Läsionen. Die Morphometrie ergab 3,91 mm² (0,56 – 6,13 mm²).

Bei der Untersuchung der Aorta abdominalis fielen ebenfalls deutlich ausgeprägte, aber exzentrisch lokalisierte Läsionen auf, der Median der Intimafläche betrug hier 1,95 mm² (0,33 – 3,45 mm²).

3.1.4 Gruppe III

Die Tiere der Gruppe III erhielten über einen Zeitraum von 168 Tagen eine 0,5%-ige Cholesterindiät, die ersten 84 Tage ohne weitere Maßnahmen. In der zweiten Versuchshälfte wurde ihnen über 84 Tage zusätzlich 17 β -Östradiol intramuskulär verabreicht (1mg/kg KG/Woche).

Bei allen Tieren dieser Gruppe zeigten sich im Aortenbogen schwere, konzentrische atherosklerotische Plaques. Das Ausmaß der Läsionen war mit den Plaques im Bereich des Aortenbogens der Gruppe II vergleichbar. Der Median der Intimafläche betrug 10,11 mm² (6,22 – 10,32 mm²).

In den Schnittpräparaten der rechten A. carotis ließ sich lediglich bei einem Tier eine atherosklerotische Läsion nachweisen, die restlichen Tiere zeigten ein durchgehend einschichtiges Endothel. Die erwähnte Läsion zeigte eine Intimafläche von 0,4 mm².

Die untersuchten Abschnitte der Aorta thoracalis waren größtenteils mit kleineren, exzentrischen Plaques versehen. Die Intimafläche betrug im Median 0,25 mm² (0 – 1,96 mm²).

Der abdominale Abschnitt der Aorta zeigte ebenfalls durchgehend kleine, exzentrische Plaques mit einer Intimafläche von 0,07 mm² (0,02 – 1,48 mm²).

Tabelle 1: Morphometrische Ergebnisse der Intimafläche

| Arteriensegment (Intimafläche in mm ²) | | Studiengruppen | | | |
|---|---------|-----------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| | | Gruppe I (n=7) ^a | Gruppe II (n=8) | Gruppe III (n=5) ^b | Gruppe IV (n=8) |
| Aortenbogen | MW ± SD | 4.18 ± 2.01 | 11.64 ± 3.29 | 9.42 ± 1.79 | Kein Plaque |
| | Median | 5.09 | 11.44 | 10.11 | - |
| | Range | 0.94 – 6.42 | 7.03 – 15.58 | 6.22 – 10.32 | - |
| Arteria carotis | MW ± SD | 0.004 ± 0.009 | 0.60 ± 0.39 | 0.08 ± 0.18 | Kein Plaque |
| | Median | 0 | 0.63 | 0 | - |
| | Range | 0 – 0.023 | 0 – 1.11 | 0 – 0.40 | - |
| Aorta thoracalis | MW ± SD | 0.23 ± 0.18 | 3.63 ± 2.06 | 0.56 ± 0.94 | Kein Plaque |
| | Median | 0.18 | 3.91 | 0.25 | - |
| | Range | 0.06 – 0.59 | 0.56 – 6.13 | 0 – 1.96 | - |
| Aorta abdominalis | MW ± SD | 0.16 ± 0.10 | 1.71 ± 1.05 | 0.55 ± 0.70 | Kein Plaque |
| | Median | 0.13 | 1.95 | 0.07 | - |
| | Range | 0.02 – 0.34 | 0.33 – 3.45 | 0.03 – 1.48 | - |

MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung

^a Ein Tier in Gruppe I wurde vorzeitig abgetötet.

^b Drei Tiere in Gruppe III wurden vorzeitig abgetötet.

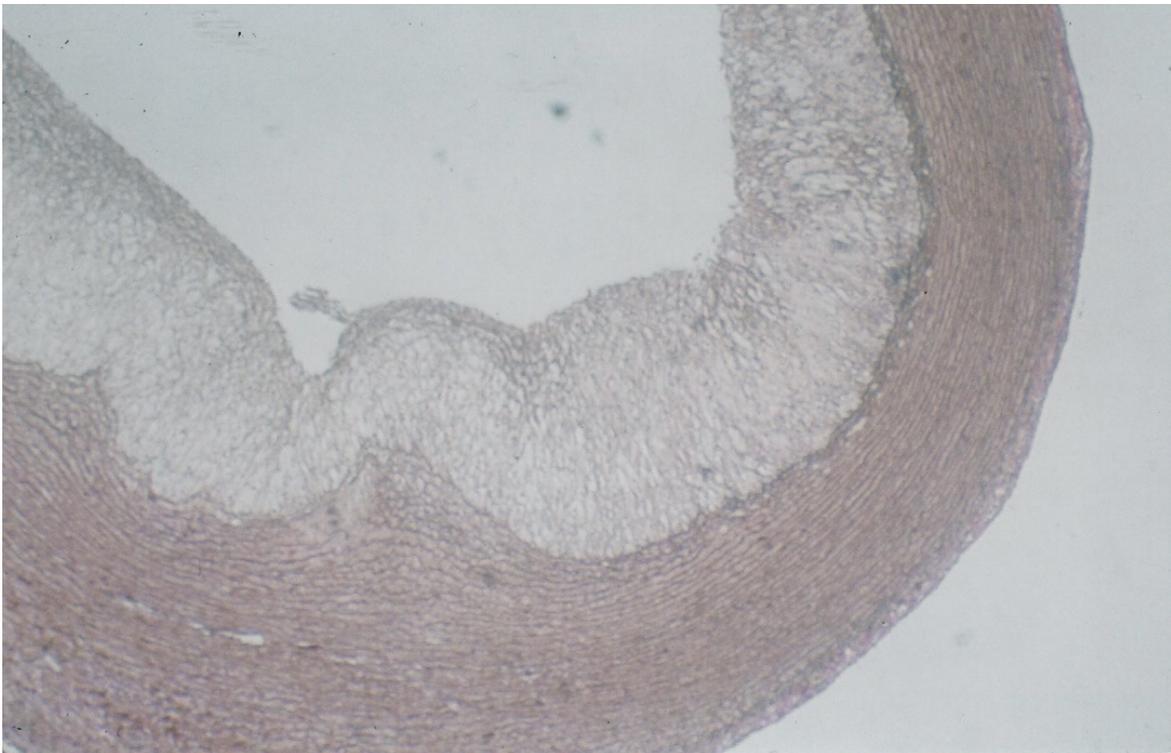


Abb. 4: Histologischer Querschnitt aus dem Aortenbogen eines Kaninchens der Gruppe II (Cholesterinfütterung über 168 Tage). Ausgeprägte atherosklerotische Plaque mit reichlich Schaumzellen. Durch die Darstellung der Lamina elastica interna wird eine exakte Abgrenzung der Media von der Neointima möglich (Elastika-van Gieson-Färbung, Original x 75).

3.2 Proliferative Aktivität in den Läsionen

3.2.1 Gruppe I

Insgesamt ließen sich in allen atheromatösen Läsionen dieser Gruppe proliferierende Zellen nachweisen.

Im Bereich des Aortenbogens zeigte sich eine deutliche proliferative Aktivität, im Median 152,4 Zellen/mm² (105,4 – 246,0 Zellen/mm²).

In den Dünnschnitten der rechten A. carotis fanden sich nur bei zwei Tieren kleine Plaques, in denen aber eine relativ hohe Anzahl an BrdU-positiven Zellen vorhanden war. Dies führt zu einer hohen Proliferationsrate mit 565,2 und 2666,7 Zellen/mm².

Die Aorta thoracalis zeigt eine Zellteilungsrate, die mit dem Aortenbogen vergleichbar war. Es fanden sich im Median 164,3 Zellen/mm² (66 – 357,1 Zellen/mm²).

In den Plaques der abdominalen Aorta lag die proliferative Aktivität mit 46,4 Zellen/mm² (0 – 255,9 Zellen/mm²) auf einem niedrigeren Niveau, einzelne Schnitte zeigten aber eine dem Aortenbogen und der thorakalen Aorta vergleichbare Aktivität.

3.2.2 Gruppe II

Die Gefäßabschnitte der Gruppe II zeigten ebenfalls in allen atherosklerotischen Läsionen proliferierende Zellen. Mit Ausnahme der A. carotis jedoch im Vergleich zu Gruppe I in geringerem Maße.

Im Aortenbogen fanden sich im Bereich der Intima im Median 31,7 BrdU-positive Zellen/mm² (18,5 – 49,8 Zellen/mm²). Die Proliferationsrate in den Plaques der A. carotis lag bei 94,9 Zellen/mm² (0 – 166,1 Zellen/mm²), in der Aorta thoracalis bei 60,6 Zellen/mm² (26,1 – 400,3 Zellen/mm²) und im Bereich der Aorta abdominalis bei 34,3 Zellen/mm² (9,4 – 958,5 Zellen/mm²).

3.2.3 Gruppe III

In den untersuchten Gefäßsegmenten der Gruppe III lag die Zahl der proliferierenden Zellen deutlich unter den korrespondierenden Abschnitten der Gruppe I, und tendenziell etwas niedriger als in Gruppe II.

Im Bereich des Aortenbogens fanden sich im Median 21,1 BrdU-positive Zellen/mm² (12,9 – 25,4 Zellen/mm²). In den Schnitten der A. carotis zeigte nur ein Tier eine atheromatöse Läsion. Hier fanden sich 41 positive Zellen, was eine proliferative Aktivität von 102,2 Zellen/mm² ergab. In den Plaques der Aorta thoracalis ergab sich im Median eine Proliferationsrate von 36,5 Zellen/mm² (0 – 150,7 Zellen/mm²), in der Aorta abdominalis lag sie bei 15,3 Zellen/mm² (0 – 39,4 Zellen/mm²).

Tabelle 2: Proliferative Aktivität in den atherosklerotischen Läsionen

| Arteriensegment (proliferierende Zellen/ mm ²) | | Studiengruppen | | | |
|--|---------|-----------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| | | Gruppe I (n=7) ^a | Gruppe II (n=8) | Gruppe III (n=5) ^b | Gruppe IV (n=8) |
| Aortenbogen | MW ± SD | 154.4 ± 46.1 | 32.9 ± 10.8 | 19.9 ± 5.0 | Nicht gelabelt |
| | Median | 152.4 | 31.7 | 21.1 | - |
| | Range | 105.4 – 246.0 | 18.5 – 49.8 | 12.9 – 25.4 | - |
| Arteria carotis | MW ± SD | 461.7 ± 994.9 | 88.5 ± 49.3 | 20.4 ± 45.7 | Nicht gelabelt |
| | Median | 0 | 94.9 | 0 | - |
| | Range | 0 – 2666,7 | 0 – 166.1 | 0 – 102.2 | - |
| Aorta thoracalis | MW ± SD | 193.2 ± 109.2 | 107.8 ± 124.5 | 46.4 ± 61.8 | Nicht gelabelt |
| | Median | 164.3 | 60.6 | 36.5 | - |
| | Range | 66.0 – 357.1 | 26.1 – 400.3 | 0 – 150.7 | - |
| Aorta abdominalis | MW ± SD | 87.3 ± 99.5 | 151.1 ± 327.1 | 19.3 ± 16.1 | Nicht gelabelt |
| | Median | 46.4 | 34.3 | 15.3 | - |
| | Range | 0 – 255.9 | 9.4 – 958.5 | 0 – 39.4 | - |

MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung

^a Ein Tier in Gruppe I wurde vorzeitig abgetötet.

^b Drei Tiere in Gruppe III wurden vorzeitig abgetötet.

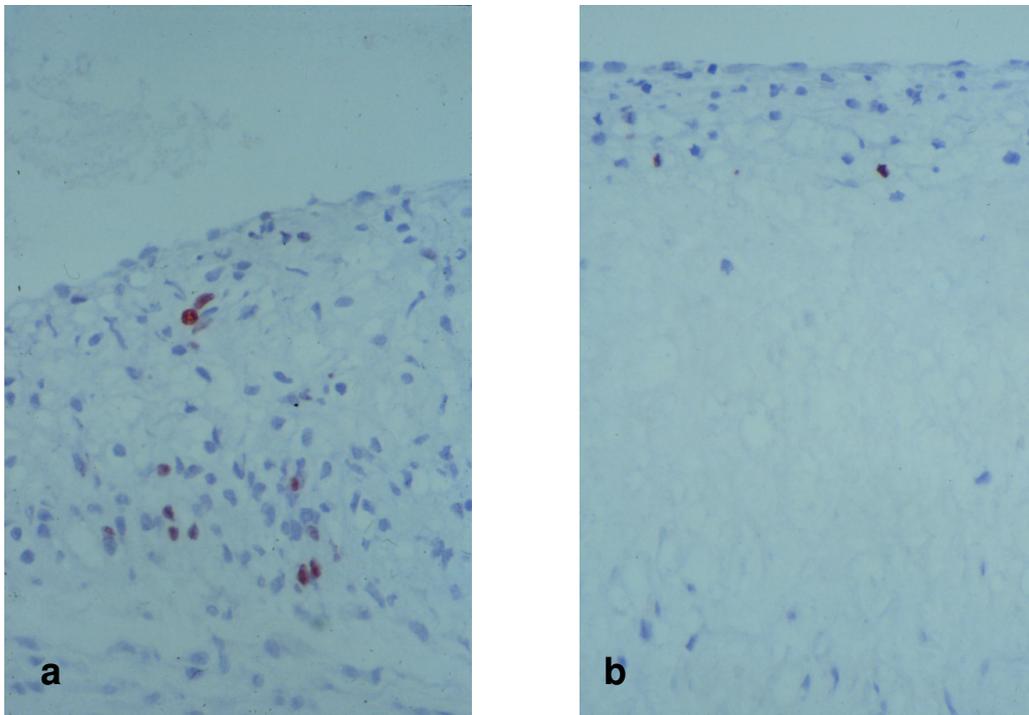


Abb. 5 : Histologischer Querschnitt des Aortenbogens nach immunhistochemischem Nachweis von BrdU (Original x 40). Teilungsaktive Zellen sind rot gefärbt.

a) Tier der Gruppe I (84d Cholesterindiät). Zellreiche Neointima mit hoher proliferativer Aktivität.

b) Tier der Gruppe II (168d Cholesterindiät). Im Zentrum des Plaques vorwiegend Schaumzellen. In der luminalen, zellreichen Schicht zeigen sich nur wenige BrdU-positive Zellen

3.3 vWF-Expression des Endothels

3.3.1 Gruppe IV

In den Semidünnschnitten der rechten A. carotis, der Aorta thoracalis und der Aorta abdominalis fand sich ein fast durchgehendes lumbales Band vWF-positiver Zellen.

In der A.carotis exprimierten im Median 100 % der Zellen den von-Willebrand-Faktor (97,9 – 100 %).

Fast identische Verhältnisse zeigten sich im Bereich der Aorta abdominalis, auch hier lag der Median bei 100% (97,4 – 100 %).

In der thorakalen Aorta lag die Zahl vWF-positiver Zellen bei 98 % (90,8 – 100 %).

Im Gegensatz dazu zeigten im proximalen Aortenbogen im Median nur 80,5 % der luminalen Zellen eine homogene vWF-Expression (77,3 – 94,2 %).

3.3.2 Gruppe I

Nach einer 0,5 %-igen Cholesterindiät über 84 Tage fanden sich im proximalen Aortenbogen nur noch 63 % (51,1 – 83,9 %) vWF-positive, lumbale Zellen.

Auch in den Schnitten der Aorta abdominalis zeigte sich kein durchgehendes, vWF-positives Zellband. Hier waren im Median 84,5 % der Zellen positiv (80 – 100 %).

Das Endothel in den untersuchten Abschnitten der A. carotis und der Aorta thoracalis stellte sich hingegen als größtenteils vollständig intakt dar. In der A.carotis exprimierten ausnahmslos alle luminalen Zellen vWF, und in der thorakalen Aorta zeigte sich im Median ebenfalls ein vWF-positiver Anteil von 100 % (72,9 – 100 %).

3.3.3 Gruppe II

Bei den Tieren, die eine 0,5 %-ige Cholesterindiät über 168 Tage erhalten hatten zeigte sich in allen Gefäßabschnitten eine, der Normalgruppe (Gruppe IV) vergleichbare Zahl an vWF exprimierenden Endothelzellen.

Im Bereich des Aortenbogens waren es im Median 83,5 % (74,6 – 95 %), in der Aorta thoracalis 91% (83,2 – 96,2 %) und in der Aorta abdominalis 92,3 % (85 – 100 %).

Die luminalen Zellen in den Schnitten der A. carotis waren ausnahmslos homogen angefärbt.

3.3.4 Gruppe III

Auch in der Gruppe die zusätzlich zur Cholesterinfütterung in der zweiten Versuchshälfte mit Östradiol behandelt wurde, zeigte sich ein ähnliches Bild wie in den Gruppen II und IV.

Im proximalen Aortenbogen waren 82 % (74,8 – 91 %) der luminalen Zellen positiv.

In der A. carotis exprimierten im Median 100 % (90 – 100 %) den VWF.

In der thorakalen Aorta waren es 93,5 % (90,3 – 100 %) und in der Aorta abdominalis 89,7 % (85,7 – 93,4 %).

Tabelle 3: Anzahl der „von Willebrand Faktor“ exprimierenden Endothelzellen

| Arteriensegment (vWF-positive Zellen, %) | | Studiengruppen | | | |
|---|---------|-----------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| | | Gruppe I (n=7) ^a | Gruppe II (n=8) | Gruppe III (n=5) ^b | Gruppe IV (n=8) |
| Aortenbogen | MW ± SD | 65.9 ± 12.4 | 85.7 ± 7.3 | 82.0 ± 6.6 | 83.1 ± 6.2 |
| | Median | 63.0 | 83.5 | 82.0 | 80.5 |
| | Range | 51.1 – 83.9 | 74.6 – 95.0 | 74.8 – 91.0 | 77.3 – 94.2 |
| Arteria carotis | MW ± SD | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 97.1 ± 4.4 | 99.7 ± 0.74 |
| | Median | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Range | 100 – 100 | 100 – 100 | 90 – 100 | 97.9 – 100 |
| Aorta thoracalis | MW ± SD | 95.0 ± 9.9 | 90.8 ± 4.5 | 94.3 ± 4.2 | 96.8 ± 3.8 |
| | Median | 100 | 91.0 | 93.5 | 98.0 |
| | Range | 72.9 – 100 | 83.2 – 96.2 | 90.3 – 100 | 90.8 - 100 |
| Aorta abdominalis | MW ± SD | 89.0 ± 8.0 | 93.3 ± 5.6 | 89.7 ± 3.2 | 99.4 ± 1.2 |
| | Median | 84.5 | 92.3 | 89.7 | 100 |
| | Range | 80.0 – 100 | 85.0 – 100 | 85.7 – 93.4 | 97.4 - 100 |

MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung

^a Ein Tier in Gruppe I wurde vorzeitig abgetötet.

^b Drei Tiere in Gruppe III wurden vorzeitig abgetötet.

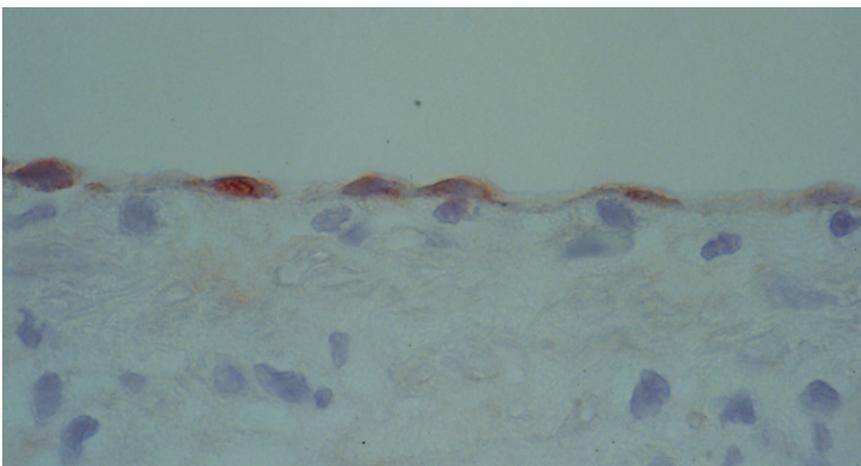
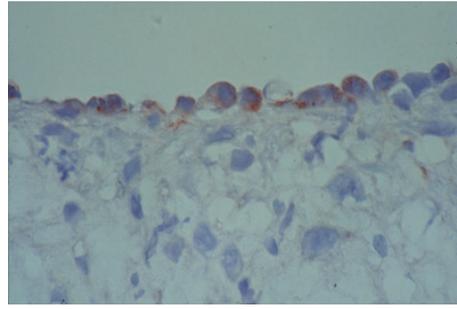
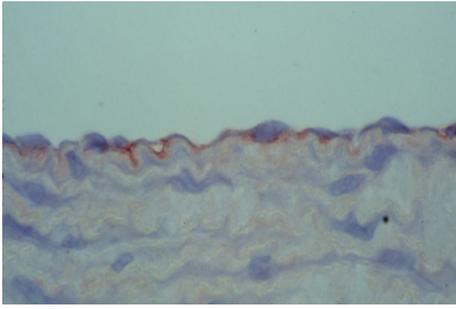


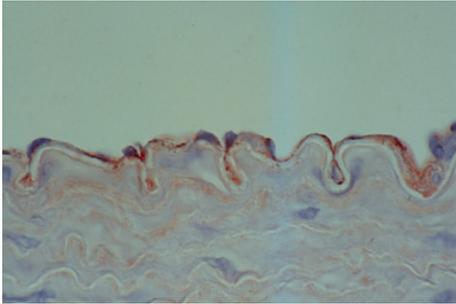
Abb. 6: Histologischer Querschnitt des Aortenbogens eines Kaninchens der Gruppe I (84d Cholesterindiät). Die immunhistochemische Färbung zeigt eine homogene Expression des vWF in den luminalen Endothelzellen (Original x 100)

Gruppe IV

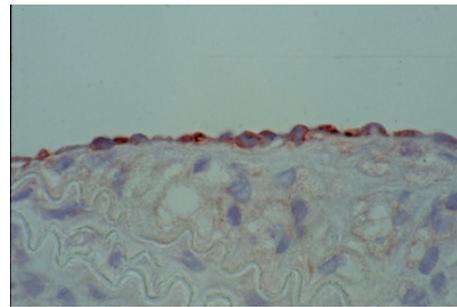
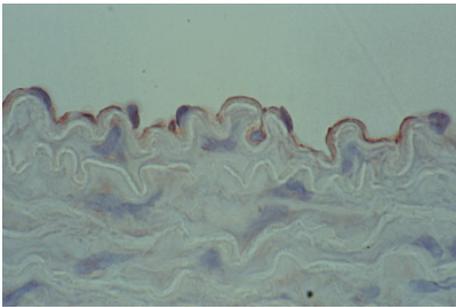
Gruppe I



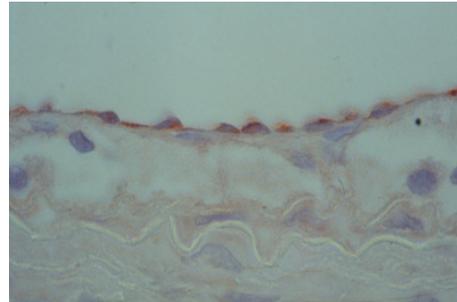
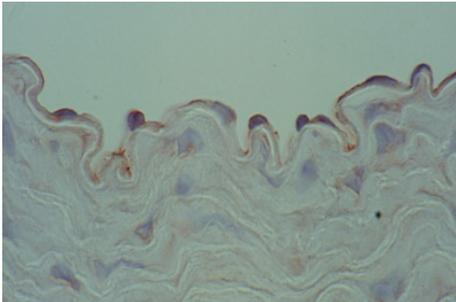
Aortenbogen



Arteria carotis



Aorta thoracalis



Aorta abdominalis

Abb. 7: Histologische Querschnitte der untersuchten Arteriensegmente nach immunhistochemischer Färbung des vWF (Original x 100).

In der Gruppe IV (cholesterinfreie Diät über 168 Tage) zeigt sich in allen Gefäßsegmenten eine homogene rote Färbung der Endothelzellen.

In der Gruppe I (0,5%-ige Cholesterindiät über 84 Tage) trifft diese Beobachtung auf den Aortenbogen nicht zu. Hier sind einige luminalen Zellen nicht vWF-positiv.

3.4 Laborparameter

3.4.1 Gesamtcholesterin

Die bei Studienbeginn erhobenen Gesamtcholesterinwerte im Plasma zeigten für alle Gruppen ein vergleichbar niedriges Niveau.

In den Gruppen, die eine 0,5 %-ige Cholesterindiät erhalten hatten, fanden sich nach 84 Tagen deutlich höhere Werte. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen I, II und III bestand aber nicht.

Die Messungen bei Versuchsende der Gruppen II und III, also bei Tag 168 ergaben Gesamtcholesterinwerte, die im Bereich der Messung vom Tag 84 lagen. Die Werte der Östrogen behandelten Tiere (Gruppe III) lagen tendenziell etwas niedriger als in der Gruppe mit ausschließlicher Cholesterindiät (Gruppe II). Dieser Unterschied erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant.

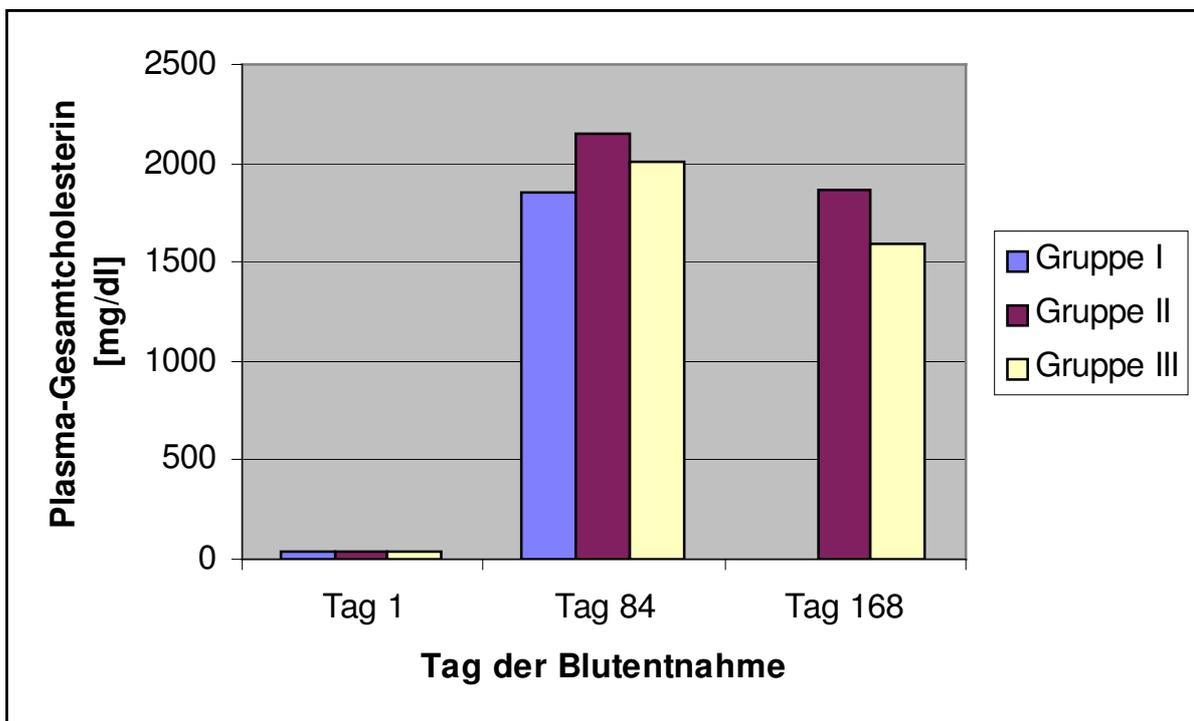


Abb. 8: Schematische Übersicht über das Gesamtcholesterin im Plasma

Tabelle 4: Mittelwert und Standardabweichung der Plasmacholesterinwerte bei Versuchsbeginn, nach 84 Tagen und nach 168 Tagen (n=8)

| Gesamtcholesterin in mg/dl | | | |
|-----------------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| | 0 Tage | 84 Tage | 168 Tage |
| Gruppe I | 37 ± 11 | 1858 ± 299 | |
| Gruppe II | 39 ± 9 | 2144 ± 335 | 1868 ± 554 |
| Gruppe III | 35 ± 14 | 2009 ± 614 | 1591 ± 315 |

3.4.2 Östradiolspiegel

Die Bestimmung der Östradiolspiegel im Plasma erbrachte bei allen Gruppen zu Versuchsbeginn und am Tag 84 sehr niedrige Werte, zwischen < 20 bis 31 pg/ml.

Bei den Tieren der Gruppe II zeigten sich auch nach 168 Tagen derart niedrige Werte.

In der Gruppe III lagen die Plasma-Östradiolspiegel am Tag 168, unter Östradiol-Therapie, im Mittel bei 418 ± 245 pg/ml.

Tabelle 5: Mittelwert und Standardabweichung der 17-β-Östradiol-Werte bei Versuchsbeginn, nach 84 Tagen und nach 168 Tagen (n=8)

| Östradiolwerte in pg/ml | | | |
|--------------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| | 0 Tage | 84 Tage | 168 Tage |
| Gruppe I | alle < 20 | alle < 20 | |
| Gruppe II | alle < 20 | alle < 20 | < 20 – 21,9 |
| Gruppe III | alle < 20 | < 20 – 30,2 | 417,8 ± 245,0 |

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.5.1 Morphologische Ergebnisse

Die Fütterung einer 0,5 %-igen Cholesterindiät führte nach 84 Tagen (Gruppe I) im Bereich des proximalen Aortenbogens, der thorakalen und der abdominalen Aorta zur Entwicklung deutlicher atheromatöser Läsionen. In der rechten A. carotis ließen sich zu diesem Zeitpunkt nur bei zwei von sieben Tieren beginnende Plaqueformationen nachweisen.

Wurde den Tieren über den doppelten Zeitraum diese Diät verabreicht (Gruppe II) so waren in allen untersuchten Gefäßabschnitten schwere atherosklerotische Läsionen nachweisbar.

Im Vergleich hierzu zeigten sich bei den Tieren der Gruppe III, die vom 85. bis 168. Versuchstag zusätzlich eine Östradioltherapie erhalten hatten, signifikant ($p < 0.05$) kleinere Plaques im Bereich der A. carotis und der Aorta thoracalis als in Gruppe II.

Offensichtlich hatte die Gabe von Östradiol hier einen antiatherosklerotischen Effekt auf die weitere Plaque-Entwicklung.

Im Bereich der abdominalen Aorta war im Vergleich zu Gruppe II ebenfalls eine deutliche Plaquereduktion festzustellen, die aber keine statistische Signifikanz erreichte.

Die atherosklerotischen Läsionen des proximalen Aortenbogens der Gruppe III zeigten aber das selbe Ausmaß wie die vergleichbaren Segmente der Gruppe II. Die Gabe von Östradiol hatte im Bereich des proximalen Aortenbogens keinen atheroprotektiven Effekt gezeigt.

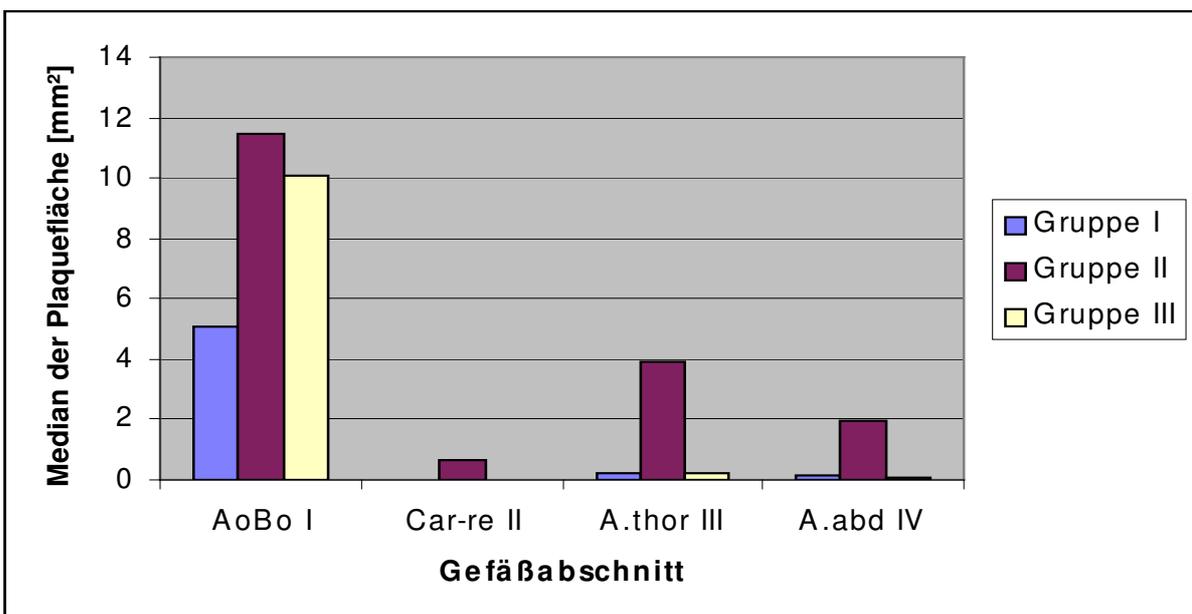


Abb. 9: Schematische Übersicht über die Plaquefläche

3.5.2 Proliferation

Nach dem Füttern einer 0,5 %-igen Cholesterindiät über 84 Tage (Gruppe I) zeigte sich in den atherosklerotischen Plaques aller Gefäßabschnitte eine beträchtliche Zahl an proliferierenden Zellen.

Auf das Weiterführen der Diät über 168 Tage (Gruppe II) waren ebenfalls in allen untersuchten Segmenten proliferierende Zellen nachzuweisen, jedoch in niedriger Zahl als in Gruppe I.

Die Gabe von Östradiol während der zweiten Versuchshälfte (Gruppe III) ergab, im Vergleich zu Gruppe II eine tendenziell weiter reduzierte Proliferationsrate. Eine statistische Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied aufgrund des großen Verteilungsbereichs der Daten, der auch für die hohe Standardabweichung verantwortlich ist.

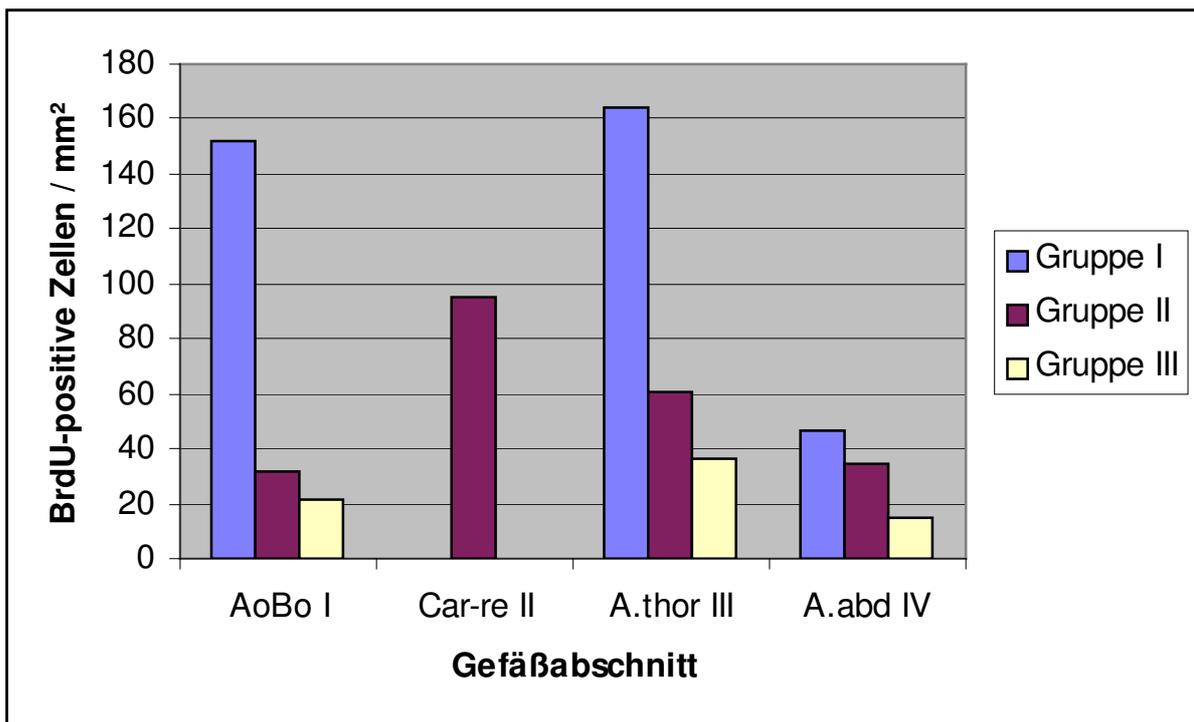


Abb. 10: Schematische Übersicht über die proliferative Aktivität im Bereich der Intima

3.5.3 vWF-Expression

Bei den Tieren der normocholesterolemischen Kontrollgruppe (Gruppe IV) fand sich in der rechten A. carotis, in der thorakalen und der abdominalen Aorta ein nahezu durchgehendes, luminales Band an vWF-positiven Zellen. Im Bereich des proximalen Aortenbogens exprimierten 80,4 % der Zellen den vWF.

Nach einer 84 Tage dauernden Cholesterindiät (Gruppe I) zeigten sich für die A. carotis und die Aorta thoracalis vergleichbare Ergebnisse wie in Gruppe IV.

Im Gegensatz dazu exprimierten lediglich 63 % der luminalen Zellen des proximalen Aortenbogens den VWF, was einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zur Gruppe IV darstellt. Auch für die Aorta abdominalis zeigte die statistische Analyse einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Anteil der VWF-positiven Endothelzellen zwischen Gruppe I und Gruppe IV.

Die Zahl der vWF-positiven, luminalen Zellen der Gruppen II und III war in allen untersuchten Segmenten mit der Gruppe IV vergleichbar.

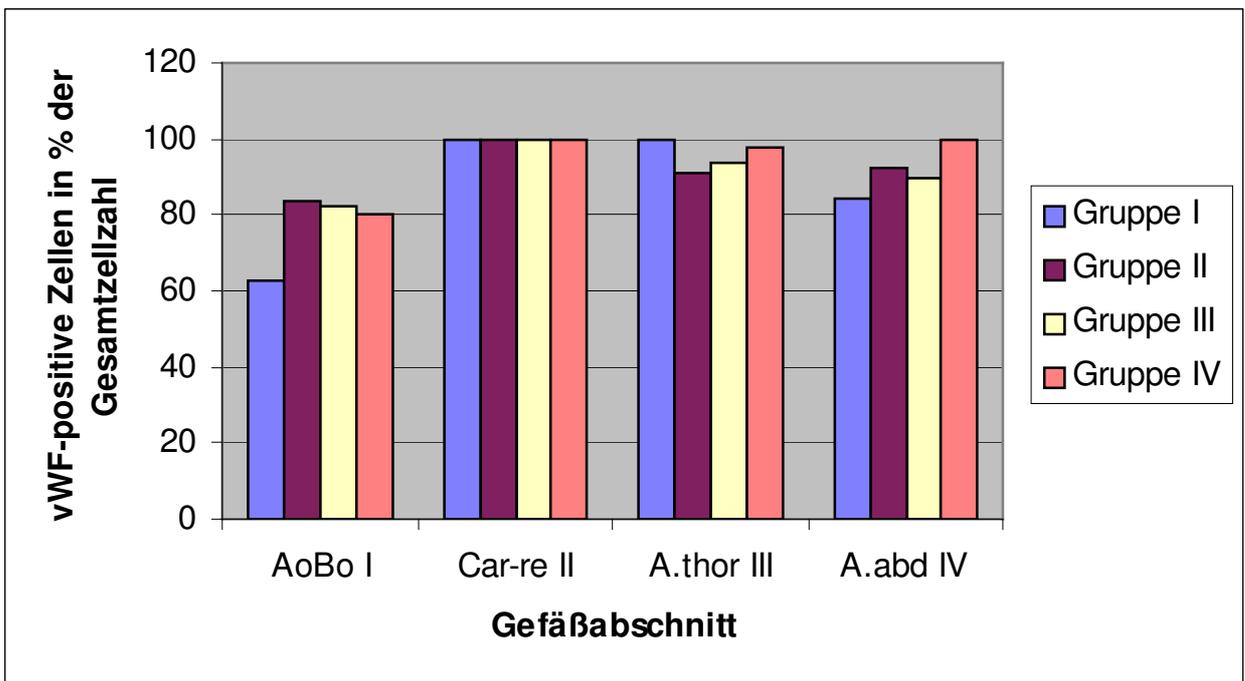


Abb. 11: Schematische Übersicht über die Expression des von-Willebrand-Faktors

4. Diskussion

4.1 Wahl des Tiermodells

Bereits 1913 beschrieben Anitschkow und Chalutow die Entstehung atheromatöser Plaques in der Aorta von Kaninchen durch Cholesterinzusatz zum Futter (6). Seither diente das hypercholesterinämische Kaninchen in zahlreichen experimentellen Untersuchungen zur Pathogenese der Atherosklerose als etabliertes Modell (17, 25, 42, 55).

Vorteile des NZW-Kaninchens sind die schnelle Erzeugbarkeit von Hyperlipidämie und Atherosklerose durch Cholesterinfütterung, die geringen Kosten und die Verfügbarkeit historischer Daten (26).

Die erzeugten Läsionen sind denen des Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit (14, 85) und der beschleunigten Atherosklerose beim Menschen mit familiärer Hypercholesterinämie Typ IIa sehr ähnlich (84).

Einschränkungen in der Vergleichbarkeit mit der menschlichen Form der Atherosklerose ergeben sich jedoch schon durch die Verwendung eines spezifischen Induktionsfaktors (Cholesterin) und dem dadurch erzeugten Spezialfall einer Atheromentstehung (27). So wird bei der diätetisch erzeugten Plaque am Kaninchen eine besonders hohe Schaumzellproduktion beobachtet (110). Auch ist das Verteilungsmuster der Veränderungen in verschiedenen Gefäßabschnitten anders als beim Menschen (110, 111). Ein weiterer Unterschied besteht im Lipidmetabolismus. Hier ist beim Cholesterin-gefütterten Kaninchen der Anteil des VLDL- und des LDL-Cholesterins überproportional hoch (10, 40).

Der Cynomolgus-Affe stellt das derzeit am besten geeignete Tiermodell zur Erforschung der Atherosklerose dar. Diese Primaten bieten Gefäßveränderungen, die in der Morphologie und der Verteilung im Gefäßbaum den Bedingungen beim Menschen am nächsten kommen. Jedoch ist dieses Modell mit einer Laufzeit von 30 Monaten sehr zeit- und kostenaufwendig, und auch hier wird in Abhängigkeit des Induktionsstimulus ein Spezialfall der Atherosklerose erzeugt (2, 3, 18).

4.2 Eigene Ergebnisse

4.2.1 Morphometrie

Ziel der vorliegenden Studie war die Wirkung von Östrogen auf vorbestehende atheromatöse Plaques zu untersuchen, nachdem vorausgegangene Studien einen positiven Östrogeneffekt bei der de novo Plaque-Entstehung gezeigt hatten (28, 41, 75, 105).

Bei der hierzu durchgeführten morphometrischen Bestimmung der Intimafläche im Bereich der atherosklerotischen Läsionen zeigte sich kein positiver Effekt auf die weitere Plaque-Entwicklung im Aortenbogen. In den sonst untersuchten Gefäßabschnitten trat hingegen eine verminderte Plaqueprogredienz unter Östrogengabe auf.

Die letzteren Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Arbeit von Haarbo und Christiansen (40). Die Autoren fanden nach Vorfütterung und Plaque-Erzeugung mit Cholesterin und anschließender Östrogengabe eine reduzierte Cholesterinanreicherung in der thorakalen Aorta. Weitere Gefäßabschnitte wurden jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht.

4.2.2 Östradiolspiegel

Das gewählte Versuchsdesign erlaubt den direkten Vergleich mit vorausgegangenen Experimenten (41, 42, 44). Die Dosierung und die Art der Applikation des Östradiols führten in vorausgegangenen Studien zu einer signifikant erniedrigten intimalen Dickenzunahme im proximalen Aortenbogen. Auch die bestimmten Plasma-Östradiolspiegel der Gruppe III sind mit denen in früheren Untersuchungen vergleichbar (13, 42). Dadurch wird der Schluß nahe gelegt, daß die Östradiolspiegel in der vorliegenden Studie ausreichend waren, um einen antiatherosklerotischen Effekt zu erreichen. Dies wird durch die verminderte Plaque-Entwicklung im Bereich der A. carotis, der thorakalen und abdominalen Aorta bestätigt.

4.2.3 Proliferationsaktivität

Beim Kaninchen entwickeln sich unter Cholesterinfütterung am Gefäßbaum unterschiedlich große atherosklerotische Läsionen im gleichen Zeitraum am identischen Tier. Die größten Plaques finden sich im Bereich des Aortenbogens, während im Bereich der A. carotis, der thorakalen und abdominalen Aorta deutlich geringere Läsionen entstehen (10, 32, 102).

Dies entspricht auch den Beobachtungen bei den Tieren der Gruppe I, die im Bereich der A. carotis nur bei 2 Tieren überhaupt eine Läsion entwickelt haben. Diese Gruppe zeigt nach 84-tägiger Cholesterinfütterung das Ausmaß an Plaque-Entstehung an, das mit einer weiterführenden Cholesterindiät, bzw. einer kombinierten Östradiolgabe verglichen werden soll.

Rosenfeld und Ross (85) erkannten eine inverse Beziehung zwischen dem Proliferationsindex und der Größe einer Plaque, d.h. je größer eine Läsion desto geringer ist ihre proliferative Aktivität. Die Atheroprotektion unter Östrogen wird teilweise mit einer antiproliferativen Wirkung, besonders auf glatte Muskelzellen erklärt (16, 29, 107).

Das Fehlen einer atheroprotektiven Wirkung im Bereich des Aortenbogens ließe sich also über eine zu geringe proliferative Aktivität, zu Beginn der Östrogengabe, in den am weitesten fortgeschrittenen Läsionen erklären. Gegen diese Hypothese spricht die ermittelte Proliferationsaktivität. Hier zeigt sich gerade am Tag 84 im Aortenbogen eine beträchtliche Zahl proliferierender neointimaler Zellen. Nach einer Cholesterindiät über 168 Tage findet sich in Gruppe II ein fast siebenfacher Rückgang der Proliferationsaktivität, was der natürlichen Wachstumsdynamik während der Plaque-Entwicklung entspricht. In der Gruppe III liegt die Proliferationsaktivität nach Östrogentherapie tendenziell noch niedriger.

Der atheroprotektive Effekt von Östrogen blieb in einem Gefäßbereich aus, der zu Therapiebeginn eine besonders hohe Zellteilungsaktivität zeigte. Möglicherweise ist gerade die exzessive Dynamik des Plaqueswachstums am 84. Tag der Cholesterindiät hierfür verantwortlich, die durch eine Östrogentherapie nicht mehr zu kontrollieren war. Diese Erklärung reicht alleine jedoch bei weitem nicht aus, da im Bereich der thorakalen Aorta nach 84 Tagen eine noch höhere proliferative Aktivität bestand, ohne den Östrogeneffekt zu schmälern.

4.2.4 Rolle des Endothels

Zur Pathogenese der Atherosklerose entwickelte Ross die "Response-to-Injury"-Hypothese. Diese besagt, daß die Atherosklerose als eine Antwort auf verschiedenste Belastungen und Verletzungen der Gefäßwand aufzufassen ist (86-88).

Insbesondere die Störung der normalen Funktion des Gefäßendothels stellt einen initialen und zentralen Schritt dar. Das früheste nachweisbare Zeichen einer atheromatösen Umwandlung des Gefäßes ist die reduzierte Produktion des vasodilatorisch wirkenden Stickstoffmonoxids (NO) durch das Endothel nach pharmakologischer Stimulation. NO ist mit dem "Endothelial Derived Relaxing Factor (EDRF)" identisch und reguliert den Gefäßtonus unmittelbar.

Eine solche Funktionsstörung des Endothels entsteht in erster Linie durch hohe Konzentrationen an atherogenen Lipoproteinen im zirkulierenden Blut (15, 93, 96, 112), aber auch durch direkte Gefäßwandverletzungen und lokale Besonderheiten der Strömungsdynamik und daraus resultierenden Scherkräften (11, 12). Folge ist eine vermehrte Durchlässigkeit des Endothels für Lipide und Entzündungszellen, teilweise über eigens hierfür exprimierte Oberflächenproteine, welche die Adhäsion und Migration erleichtern. Zusätzlich erfolgt eine Anlagerung von Thrombozyten (88).

Es entsteht eine lokale Entzündungsreaktion, die über die Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu einer Aktivierung der beteiligten Zellpopulationen und einer Ausweitung der Reaktion auf z.B. glatte Muskelzellen (SMC) führt (87, 89).

Die atheroprotektive Wirkung von Östrogen wurde initial durch eine Verbesserung des Lipidprofils im Sinne einer Senkung der LDL- und Erhöhung der HDL-Fraktion erklärt (47, 52, 64, 65, 75, 101). Eine Reihe von Untersuchungen in den letzten Jahren relativierte diesen indirekten Effekt jedoch, so daß heute lediglich ca. 25 % des Östrogeneffekts auf eine Veränderung der Plasmalipide zurückgeführt wird (4).

Ein weitaus größerer Anteil an der Östrogenwirkung wird direkten Effekten an der Gefäßwand zugeschrieben. An verschiedenen Modellen wurde eine Hemmung der LDL-Cholesterinaufnahme in die arterielle Gefäßwand beschrieben (39, 51, 105).

Im Tierexperiment wurde eine Hemmung der Kollagensynthese unter dem Einfluß von Östrogen gezeigt (29). Ein weiterer bedeutender Effekt ist die sowohl in vitro, als auch in vivo nachgewiesene antiproliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen (3, 70, 80, 104, 107). Diese Proliferation ist in Verbindung mit der Migration und Matrixbildung ein Schlüsselprozeß der Atherosklerose (31, 88).

Günstig wird durch Östrogen auch die Hämodynamik beeinflusst. So kommt es in verschiedenen Gefäßbereichen einschließlich der Koronararterien zu einer Vasodilatation. Dem liegt zum einen ein kalziumantagonistischer Effekt an der glatten Muskelzelle, zum anderen eine vermehrte NO-Freisetzung des Endothels zugrunde (19, 21, 45, 56, 57, 72). Außerdem werden noch antioxidative Eigenschaften des Östrogens diskutiert (73, 92). Dieser Mechanismus ist interessant, da dem oxidierten LDL-Cholesterin eine besondere Bedeutung bei der Atherogenese beigemessen wird (96, 97, 112). In wie weit dieser antioxidative Effekt jedoch in der Gefäßwand selbst eine Rolle spielt bleibt noch zu klären.

Vermittelt werden die genannten Wirkungen über Östrogenrezeptoren, die mittlerweile in Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen nachgewiesen wurden (59, 68). Man kennt heute zwei verschiedene Rezeptortypen. Den Östrogenrezeptor α (ER- α), der sowohl kernständig als auch in der Zellmembran nachgewiesen wurde, und den Östrogenrezeptor β (ER- β), der bisher nur im Zellkern bekannt ist (60, 63).

Der Großteil der oben beschriebenen, direkten Östrogenwirkungen wird über das Gefäßendothel vermittelt. An kultivierten Endothelzellen ließ sich eine Stabilisierung unter dem Einfluß von Östrogen nachweisen. Es stellte sich eine direkte zellprotektive Wirkung gegenüber zytotoxischen Effekten, z.B. des oxidierten LDL ein (73).

Im Mittelpunkt der Wirkungsvermittlung durch das Endothel steht jedoch die Produktion von NO (50, 61). Acetylcholin stimuliert die Freisetzung von NO im intakten Endothel und wirkt so auf das gesunde Gefäß vasodilatatorisch. In atherosklerotisch veränderten Arterien kommt es unter Acetylcholin zu einer paradoxen Vasokonstriktion, die sich durch die zusätzliche Gabe von Östradiol jedoch wieder aufheben lässt (20, 33, 34, 108, 114). Die endotheliale NO-Freisetzung steht in direktem Zusammenhang mit der zirkulierenden Östrogenmenge (45). Eine Relaxation der Gefäßwand wird unter Östrogenen aber nicht nur durch eine erhöhte NO-Synthese vermittelt, gleichzeitig wird die Produktion von vasodilatatorischem Prostacyclin gesteigert, und die des vasokonstriktorisch wirksamen Endothelin 1 (ET-1) gehemmt (71, 113).

Die atheroprotektiven Wirkungen des Stickstoffmonoxids (NO) gehen über eine reine Beeinflussung der Hämodynamik weit hinaus. Es hemmt zusätzlich die Proliferation glatter Muskelzellen direkt, und verhindert die Adhäsion von Monozyten und Thrombozyten an das Endothel (9, 22, 76).

Wie bei der Pathogenese der Atherosklerose scheint das Endothel also auch bei der Atheroprotektion durch Östrogen eine zentrale Rolle einzunehmen (19, 33).

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob im vorliegenden Experiment die im Rahmen der Vorfütterung erzeugte Schädigung der Gefäßwand für den Verlust der atheroprotektiven Östrogenwirkung verantwortlich sein könnte.

Aus diesem Grund stellten wir die Hypothese auf, daß eine Schädigung des Endothels verantwortlich sein könnte für die unterschiedliche Östrogenwirkung in verschiedenen Gefäßabschnitten am selben Tier.

Zur Klärung wurden weitere immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um die Expression des "von Willebrand Faktors" (vWF) darzustellen. Beim vWF handelt es sich um ein Glycoprotein, das durch die Vermittlung der Thrombozytenaggregation an exponierte subendotheliale Matrix wesentlich zur Hämostase beiträgt (91).

Die Expression des vWF ist hochgradig spezifisch für Endothelzellen und Megakaryozyten (7, 77). Daher wurde sie an den Gefäßschnitten in der vorliegenden Studie als morphologischer Marker für Endothelzellen verwendet.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Gruppe IV) zeigte sich eine signifikant reduzierte Zahl an VWF-positiven Zellen im Bereich des Aortenbogens nach 84-tägiger Cholesterindiät bei den Tieren der Gruppe I. Wie schon oben erwähnt gibt diese Gruppe die Ausgangslage für eine weiterführende Cholesterindiät in Gruppe II, oder eine zusätzliche Östrogentherapie in Gruppe II wieder. Auch im Bereich der abdominalen Aorta lag die Zahl der vWF-positiven Zellen deutlich niedriger als in der Kontrolle, jedoch noch auf einem höheren Niveau als im Aortenbogen.

Eine mögliche Erklärung für die geringe vWF Expression im Aortenbogen könnte in den besonderen Stömungsverhältnissen des Blutes in diesem Bereich liegen. Hier wirken neben den atherogenen Risikofaktoren (z.B. hoher Lipidspiegel) zusätzlich starke Scherkräfte auf das Endothel ein.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie läßt sich also folgern, daß die Gefäßwandschädigung im Aortenbogen am Tag 84 möglicherweise bereits so weit fortgeschritten war, daß Östrogen nicht mehr in der Lage war einen anti-atherosklerotischen Effekt in diesem Bereich aufzubauen. In diesem Zusammenhang weisen die vorliegenden Daten über die Expression des vWF in der luminalen Zellschicht darauf hin, daß ein intaktes Endothel eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der positiven Östrogenwirkung auf die Gefäßwand spielen könnte.

4.3 Kontext zu klinischen Studien

Seit den späten 60er Jahren wird Frauen in der Menopause eine Hormon-Substitutionstherapie (HRT) angeboten. Diese besteht aus einer oralen oder transdermalen Östrogen-, bzw. kombinierten Östrogen/Gestagen Gabe. Ziel ist neben der Behandlung klimakterischer Beschwerden, der Osteo- und Neuroprotektion insbesondere das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse wie Myokardinfarkte, Angina Pectoris oder Schlaganfälle zu senken.

Tatsächlich zeigte eine Metaanalyse von ca. 30 Kohorten- und Fall-Kontroll-Studien, daß eine HRT bei postmenopausalen Frauen das Risiko an einer KHK zu erkranken um ca. 35 – 45% senken kann (1, 38, 46, 48, 67, 94, 95, 99, 100).

Bei der Nurses' Health Study, einer prospektive Kohortenstudie an 59337 Frauen, wurde die Wirksamkeit von Östrogen allein, sowie einer Kombination aus Östrogen und Progesteron während einer Nachbeobachtungsphase von 16 Jahren untersucht.

Die Kombination mit einem Gestagen verhindert einen 2 bis 3-fachen Anstieg der Inzidenz des Endometriumkarzinoms, wie er unter einer reinen Östrogen-Therapie beobachtet wird. Die Studie ergab ein relatives KHK-Risiko von 0,6 bei alleiniger Östrogenbehandlung, und 0,39 unter Kombinationstherapie. Das Hinzufügen von Progesteron schwächte den kardioprotektiven Östrogeneffekt nicht ab (36, 95).

Die erwähnten Studien beschäftigten sich mit der Effektivität von Östrogenen in der Primärprävention kardiovaskulärer Ereignisse. Gegen die Ergebnisse dieser nicht randomisierten Beobachtungsstudien wenden Kritiker ein, daß die Frauen in der HRT-Gruppe generell ein höheres Gesundheitsbewußtsein hatten als die Vergleichsgruppen (8, 81, 98). Ein großer Teil der Risikoreduktion könnte daher z.B. auf einen geringeren Nikotinkonsum oder eine fettärmere Ernährung in den Östrogen-Gruppen zurückgehen (53).

Hinsichtlich der Wirksamkeit einer HRT in der Sekundärprävention der KHK liegen weitaus weniger Daten vor. Die 1998 publizierte HERS-Studie war die erste große, randomisierte, Plazebo-kontrollierte und doppelblind angelegte Studie zu diesem Thema. Insgesamt erhielten 2763 postmenopausale Frauen mit bekannter KHK eine Kombinationstherapie aus konjugiertem equinem Östrogen und Medroxyprogesteronacetat im Vergleich zu Placebo. Nach einer mittleren Nachbeobachtungsdauer von 4,1 Jahren zeigte sich bezüglich der primären (nichttödlicher Myokardinfarkt, kardialer Tod) und sekundären Endpunkte (Revaskularisation, instabile Angina, Herzinsuffizienz, Herzstillstand, Schlaganfall, TIA, periphere Verschlusskrankheit) kein signifikanter Unterschied. Im ersten Behandlungsjahr traten in der Verumgruppe sogar vermehrt KHK-bedingte Ereignisse auf. Darüber hinaus war das Auftreten von thromboembolischen Ereignissen und Erkrankungen der Gallenblase unter Östrogen deutlich erhöht (30, 54).

Unlängst wurden unter dem Titel „HERS II“ weitere Daten aus dieser Studie mit einer Nachbeobachtungszeit von mittlerweile fast 7 Jahren veröffentlicht, die ebenfalls keinen Vorteil einer HRT auf die oben erwähnten Endpunkte zeigten (35).

Als Erklärung für dieses überraschende Ergebnis wurde insbesondere das Studiendesign kritisiert. So wurde als Gestagenkomponente Progesteron kontinuierlich verabreicht. Aus tierexperimentellen Arbeiten ist bekannt, daß gerade Progesteron in der Lage ist die protektive Östrogenwirkung komplett zu hemmen, entscheidend ist hierbei eine kontinuierliche Progesteronpräsenz (5, 13). Weiterhin wurde konjugiertes Östrogen, und nicht das natürliche 17 β -Östradiol verwendet, welches das Risiko venöser thromboembolischer Ereignisse nicht erhöht.

Die Ergebnisse der HERS-Studie wurden aber durch eine weitere randomisierte, doppelblinde Studie bestätigt. Herrington et al. (49) untersuchten angiographisch das Fortschreiten einer vorbestehenden KHK bei postmenopausalen Frauen unter Östrogensubstitution, kombinierter Östrogen/Gestagen-Gabe und Placebo. Keine der Therapien beeinflusste die Progression der Erkrankung. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen betreffend kardialen Tod, Myokardinfarkt, Revaskularisation, instabiler Angina und Schlaganfall.

Wie kann bei den etablierten Effekten von Östrogen auf das Lipidprofil, die Endothelfunktion und andere, die Atherogenese beeinflussenden Faktoren, das Ausbleiben einer Atheroprotektion in den genannten Studien erklärt werden ?

Da Herrington nicht nur die kombinierte Östrogen/Gestagen Gabe, sondern auch die alleinige Östrogensubstitution untersuchte ist die oben bereits genannte Hemmung des atheroprotektiven Effekts durch Progesteron kein hinreichendes Argument.

Eine mögliche Erklärung sowohl des mangelnden protektiven Effekts, als auch der erhöhten Anzahl KHK-bedingter Ereignisse wäre eine proinflammatorische Östrogenwirkung. Mehrere epidemiologische und klinische Studien haben erhöhte Spiegel des C-reaktiven-Proteins (CRP) bei Frauen unter Östrogen bzw. kombinierter Östrogen/Gestagen Einnahme gezeigt (23, 24, 78, 103). Erhöhte Spiegel dieses Entzündungsmarkers sind mit einem erhöhten Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert (62, 79, 89). Unklar ist derzeit aber ob es sich lediglich um einen Surrogatparameter handelt, oder ob CRP selbst, und damit auch eine Behandlung die zu einem erhöhten CRP-Spiegel führt, das Fortschreiten der Atherosklerose begünstigt.

Eine weitere Erklärung für das Ausbleiben eines Östrogeneffekts in der Sekundärprävention der KHK legen die Ergebnisse der vorliegenden experimentellen Arbeit nahe. Offensichtlich erfordert Östrogen zur Ausbildung einer Atheroprotektion im Tierversuch ein intaktes Gefäßendothel. Eine Hypothese die durch die Ergebnisse einer weiteren tierexperimentellen Arbeit untermauert werden. Hier konnte Östrogen die Ansammlung von Cholesterin in der Gefäßwand nur bei intaktem Endothel verhindern (51).

Da sowohl eine vorbestehende Atherosklerose, als auch der natürliche Alterungsprozeß zu einer Einschränkung der Endothelfunktion führen profitieren postmenopausale Frauen mit manifester KHK möglicherweise aus diesem Grund nicht von einer Hormonersatztherapie.

Auch auf dem Gebiet der Primärprävention atherosklerotischer Erkrankungen wurden mittlerweile Daten aus der ersten randomisierten, doppelblinden Studie zur HRT veröffentlicht. In der Women's Health Initiative (WHI) wird an 16608 Frauen unter anderem eine alleinige Östrogen-Gabe und eine Östrogen/Progesteron Kombination mit

Placebo verglichen. Der Östrogen/Progesteron Arm der Studie wurde im Mai 2002 aufgrund von Sicherheitsbedenken vorzeitig beendet. Nach einer Laufzeit von 5 Jahren zeigte sich in dieser Gruppe ein vermehrtes Auftreten von KHK-bedingten Ereignissen (z.B. Herzinfarkt), invasivem Brustkrebs, Schlaganfällen und Lungenembolien (90).

Eine Hormonersatztherapie mit einer kombinierten Östrogen/Progesteron Gabe scheint also auch bei Frauen ohne vorbestehende KHK keinen Schutz vor atherosklerotischen Erkrankungen zu bedingen, schlimmer noch, das Risiko für diese und andere Erkrankungen steigt sogar.

Die hier aufgeführten Ergebnisse klinischer Studien haben zu folgenden Empfehlungen bezüglich einer Hormon-Substitutionstherapie geführt.

Weder zur primären, noch zur sekundären Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen sollte eine HRT begonnen werden. Bei Patientinnen mit schon bestehender HRT sollte eine genaue Risiko/Nutzen Analyse bedacht werden. Nach den oben genannten Ergebnissen stehen dem Nutzen der Osteoprotektion und der Therapie von Menopausenbeschwerden teilweise schwerwiegende Risiken gegenüber. Die Ergebnisse der WHI-Studie mit vermehrtem Auftreten von Brustkrebs, Schlaganfall und Lungenembolien legen gegebenenfalls den Abbruch einer bestehenden HRT und die Suche nach Therapiealternativen nahe.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Studie unterstreicht die mögliche Rolle des Endothels bei der atheroprotektiven Wirkungsvermittlung von Östrogen. Es scheint eine Korrelation zum Ausmaß einer vorbestehenden Gefäßwandschädigung zu bestehen.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den oben genannten klinischen Studien zur Hormon-Substitutionstherapie bei postmenopausalen Frauen.

Weiterhin unbekannt sind aber die genauen Wirkmechanismen der Östrogenprotektion, sowie das Ausmaß und die Art einer Endothelschädigung, die zum Verlust dieses Effekts führt. Weiterführende experimentelle Studien sind daher notwendig, um die Voraussetzungen einer östrogenvermittelten Atheroprotektion genau zu definieren.

Möglicherweise ergeben sich daraus Ansatzpunkte, die es aus klinischer Sicht ermöglichen unter den postmenopausalen Frauen Subkollektive zu bilden, die von einer Hormon-Substitutionstherapie profitieren könnten.

5. Zusammenfassung

Der relative Schutz, den prämenopausale Frauen vor atherosklerotischen Erkrankungen genießen wird durch die Effekte von Östrogen erklärt. Eine Reihe von direkten und indirekten Wirkungen auf die Gefäßwand sind bekannt, die genauen Wirkmechanismen bleiben jedoch noch ungeklärt.

In zahlreichen experimentellen Studien an verschiedenen Tiermodellen wurde die atheroprotektive Wirkung von Östrogen bei der Atherogenese belegt. Zur Wirkung auf vorbestehende atherosklerotische Läsionen liegen aber nur wenige Erkenntnisse vor.

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es die Auswirkungen einer Vorfütterung mit Cholesterin auf den atheroprotektiven Effekt von Östrogen am Kaninchenmodell zu überprüfen.

Insgesamt wurden 32 weibliche weiße Neuseeland Kaninchen (NZW) verwendet. Bei 24 Kaninchen folgte auf eine Ovariectomie die Aufteilung in 3 Gruppen zu je 8 Tieren. Folgende Versuche wurden durchgeführt: 84 Tage Cholesterinfütterung (Gruppe I), 168 Tage Cholesterinfütterung (Gruppe II), 168 Tage Cholesterinfütterung, davon die letzten 84 Tage Gabe von Östrogen (1 mg/kg KG/Woche i.m.). Eine weitere 8-köpfige Gruppe erhielt eine Normaldiät über 84 Tage.

Nachdem zu Versuchsende verschiedene Gefäßsegmente entnommen wurden erfolgte eine morphometrische Bestimmung der Intimafläche. Proliferierende Zellen wurden mit dem Thymidin-Analogon 5'-Brom-2'-Desoxyuridin immunhistologisch nachgewiesen.

Die morphometrische Bestimmung der Intimafläche ergab, dass in der mit Östrogen behandelten Gruppe III die atherosklerotischen Plaques im Bereich der A. carotis, Aorta thoracalis und abdominalis deutlich kleiner waren als in der korrespondierenden Gruppe ohne Östrogengabe (Gruppe II). Im Aortenbogen konnte die Gabe von Östrogen das Plaquewachstum in der zweiten Versuchshälfte in Gruppe III jedoch nicht mehr günstig beeinflussen.

Der Nachweis proliferierender Zellen ergab zu Beginn des Plaquewachstums eine hohe proliferative Aktivität, die mit zunehmendem Plaquealter wieder deutlich rückläufig war. Die Gabe von Östrogen in der zweiten Versuchshälfte ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Die Tatsache, dass es in Abhängigkeit der Gefäßlokalisierung innerhalb eines Individuums zu unterschiedlichen Östrogenwirkungen kommt legt den Schluss nahe, dass hierfür lokale Faktoren verantwortlich sind. Vor diesem Hintergrund stellten wir die Hypothese einer Endothelschädigung als ursächliches Moment.

In zusätzlichen immunhistochemischen Färbungen wurde die Expression des von Willebrand Faktors (vWF) als endothelspezifischem Marker bestimmt. Korrespondierend zu den morphometrischen Befunden zeigte sich im Aortenbogen nach 84-tägiger Cholesterinfütterung (Gruppe I) eine signifikant reduzierte Expression des vWF's im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe IV). In den übrigen Gefäßabschnitten konnte kein Unterschied in der vWF-Expression nachgewiesen werden.

Eine vorbestehende schwerwiegende Schädigung des Endothels scheint also mit einem Verlust der atheroprotektiven Wirkung von Östrogen einherzugehen. Diese Befunde weisen auf die wichtige Rolle einer intakten endothelialen Funktion, bzw. eines intakten Endothelverbands bei der Vermittlung der atheroprotektiven Östrogenwirkung hin.

6. Literaturverzeichnis

- 1 *AMB* **35**: 17-21 (2001)
- 2 Adams M. R., Kaplan J. R., Clarkson T. B., Koritnik D. R.: Ovariectomy, social status, and atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *Arteriosclerosis* **5**: 192-200 (1985)
- 3 Adams M. R., Kaplan J. R., Manuck S. B., Koritnik D. R., Parks J. S., Wolfe M. S., Clarkson T. B.: Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis* **10**: 1051-1057 (1990)
- 4 Adams M. R., Williams J. K., Clarkson T. B., Jayo M. J.: Effects of oestrogens and progestogens on coronary atherosclerosis and osteoporosis of monkeys. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* **5**: 915-934 (1991)
- 5 Adams M. R., Register T. C., Golden D. L., Wagner J. D., Williams J. K.: Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 217-221 (1997)
- 6 Anitschkow N., Chalатов S.: Über die experimentelle Cholesteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentralbl Allg Pathol* **24**: 1-9 (1913)
- 7 Badimon L., Badimon J. J., Chesebro J. H., Fuster V.: von Willebrand factor and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* **70**: 111-118 (1993)
- 8 Barrett-Connor E., Bush T. L.: Estrogen and coronary heart disease in women. *Jama* **265**: 1861-1867 (1991)
- 9 Bath P. M., Hassall D. G., Gladwin A. M., Palmer R. M., Martin J. F.: Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb* **11**: 254-260 (1991)
- 10 Bocan T. M., Mueller S. B., Mazur M. J., Uhlendorf P. D., Brown E. Q., Kieft K. A.: The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis* **102**: 9-22 (1993)
- 11 Bondjers G., Bjorkerud S.: Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. 4. Uptake and composition of cholesteryl ester in morphologically defined regions of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **15**: 273-284 (1972)
- 12 Bondjers G., Bjorkerud S.: Cholesterol accumulation and content in regions with defined endothelial integrity in the normal rabbit aorta. *Atherosclerosis* **17**: 71-83 (1973)
- 13 Bruck B., Brehme U., Gugel N., Hanke S., Finking G., Lutz C., Benda N., Schmahl F. W., Haasis R., Hanke H.: Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2192-2199 (1997)

- 14 Buja L. M., T. K., Goldstein J. L., Watanabe Y., Brown M. S.: Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL-rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* **3**: 87-101 (1983)
- 15 Carpenter K. L., Taylor S. E., van der Veen C., Williamson B. K., Ballantine J. A., Mitchinson M. J.: Lipids and oxidised lipids in human atherosclerotic lesions at different stages of development. *Biochim Biophys Acta* **1256**: 141-150 (1995)
- 16 Chen S. J., Li H., Durand J., Oparil S., Chen Y. F.: Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery. *Circulation* **93**: 577-584 (1996)
- 17 Clarkson T. B.: Animal models of atherosclerosis. *Adv Vet Sci* **16**: 151-173 (1972)
- 18 Clarkson T. B., Adams M. R., Kaplan J. R., Shively C. A., Koritnik D. R.: From menarche to menopause: coronary artery atherosclerosis and protection in cynomolgus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* **160**: 1280-1285 (1989)
- 19 Collins P., Rosano G. M., Jiang C., Lindsay D., Sarrel P. M., Poole-Wilson P. A.: Cardiovascular protection by oestrogen--a calcium antagonist effect? *Lancet* **341**: 1264-1265 (1993)
- 20 Collins P., Rosano G. M., Sarrel P. M., Ulrich L., Adamopoulos S., Beale C. M., McNeill J. G., Poole-Wilson P. A.: 17 beta-Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation* **92**: 24-30 (1995)
- 21 Collins P., Beale C. M., Rosano G. M.: Oestrogen as a calcium channel blocker. *Eur Heart J* **17 Suppl D**: 27-31 (1996)
- 22 Cornwell T. L., Arnold E., Boerth N. J., Lincoln T. M.: Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol* **267**: C1405-1413 (1994)
- 23 Cushman M., Legault C., Barrett-Connor E., Stefanick M. L., Kessler C., Judd H. L., Sakkinen P. A., Tracy R. P.: Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation* **100**: 717-722 (1999)
- 24 Cushman M., Meilahn E. N., Psaty B. M., Kuller L. H., Dobs A. S., Tracy R. P.: Hormone replacement therapy, inflammation, and hemostasis in elderly women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 893-899 (1999)
- 25 Duff G.: Experimental cholesterol arteriosclerosis and it's relationship to human atherosclerosis. *Arch Pathol* **20**: 81-123 (1935)
- 26 Esper E., Chan E. K., Buchwald H.: Natural history of atherosclerosis and hyperlipidemia in heterozygous WHHL (WHHL-Hh) rabbits. I. The effects of aging and gender on plasma lipids and lipoproteins. *J Lab Clin Med* **121**: 97-102 (1993)
- 27 Finking G., Hanke H.: Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* **135**: 1-7 (1997)
- 28 Fischer G. M., Bashey R. I., Rosenbaum H., Lyttle C. R.: A possible mechanism in arterial wall for mediation of sex difference in atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* **43**: 288-296 (1985)

- 29 Fischer G. M., Swain M. L.: Effects of estradiol and progesterone on the increased synthesis of collagen in atherosclerotic rabbit aortas. *Atherosclerosis* **54**: 177-185 (1985)
- 30 Furberg C. D., Vittinghoff E., Davidson M., Herrington D. M., Simon J. A., Wenger N. K., Hulley S.: Subgroup interactions in the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study: lessons learned. *Circulation* **105**: 917-922 (2002)
- 31 Fuster V., Badimon L., Badimon J. J., Chesebro J. H.: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* **326**: 242-250 und 801-809 (1992)
- 32 Garbarsch C., Matthiessen M. E., Helin P., Lorenzen I.: Spontaneous aortic arteriosclerosis in rabbits of the Danish Country strain. *Atherosclerosis* **12**: 291-300 (1970)
- 33 Gilligan D. M., Badar D. M., Panza J. A., Quyyumi A. A., Cannon R. O., 3rd: Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* **90**: 786-791 (1994)
- 34 Gilligan D. M., Quyyumi A. A., Cannon R. O., 3rd: Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation* **89**: 2545-2551 (1994)
- 35 Grady D., Herrington D., Bittner V., Blumenthal R., Davidson M., Hlatky M., Hsia J., Hulley S., Herd A., Khan S., Newby L. K., Waters D., Vittinghoff E., Wenger N.: Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama* **288**: 49-57 (2002)
- 36 Grodstein F., Stampfer M. J., Manson J. E., Colditz G. A., Willett W. C., Rosner B., Speizer F. E., Hennekens C. H.: Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* **335**: 453-461 (1996)
- 37 Grünwald J.: Testsysteme für antiatherogene Substanzen. In: Vorträge der Arbeitstagung des Tübinger Arbeitskreises für Gefäßerkrankungen e.V.. H.-E. Hoffmeister, E. Betz. Attempo Vlg., Tübingen, 1-15 (1989)
- 38 Haarbo J., Hassager C., Jensen S. B., Riis B. J., Christiansen C.: Serum lipids, lipoproteins, and apolipoproteins during postmenopausal estrogen replacement therapy combined with either 19-nortestosterone derivatives or 17-hydroxyprogesterone derivatives. *Am J Med* **90**: 584-589 (1991)
- 39 Haarbo J., Leth-Espensen P., Stender S., Christiansen C.: Estrogen monotherapy and combined estrogen-progestogen replacement therapy attenuate aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest* **87**: 1274-1279 (1991)
- 40 Haarbo J., Christiansen C.: The impact of female sex hormones on secondary prevention of atherosclerosis in ovariectomized cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* **123**: 139-144 (1996)
- 41 Hanke H., Hanke S., Bruck B., Brehme U., Gugel N., Finking G., Muck A. O., Schmahl F. W., Hombach V., Haasis R.: Inhibition of the protective effect of estrogen by progesterone in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* **121**: 129-138 (1996)

- 42 Hanke H., Hanke S., Finking G., Muhic-Lohrer A., Muck A. O., Schmahl F. W., Haasis R., Hombach V.: Different effects of estrogen and progesterone on experimental atherosclerosis in female versus male rabbits. Quantification of cellular proliferation by bromodeoxyuridine. *Circulation* **94**: 175-181 (1996)
- 43 Hanke H., Hanke S., Ickrath O., Lange K., Bruck B., Muck A. O., Seeger H., Zwirner M., Voisard R., Haasis R., Hombach V.: Estradiol concentrations in premenopausal women with coronary heart disease. *Coron Artery Dis* **8**: 511-515 (1997)
- 44 Hanke S., Finking G., Brehme U., Bruck B., Gugel N., Däuble C., Haasis R., Hombach V., Hanke H.: Wirkung von Progesteron auf den atheroprotektiven Effekt von Östrogen an einem experimentellen Atherosklerosemodell. *Perfusion* **9**: 433-438 (1996)
- 45 Hayashi T., Fukuto J. M., Ignarro L. J., Chaudhuri G.: Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11259-11263 (1992)
- 46 Henderson B. E., Paganini-Hill A., Ross R. K.: Estrogen replacement therapy and protection from acute myocardial infarction. *Am J Obstet Gynecol* **159**: 312-317 (1988)
- 47 Henriksson P., Stamberger M., Eriksson M., Rudling M., Diczfalusy U., Berglund L., Angelin B.: Oestrogen-induced changes in lipoprotein metabolism: role in prevention of atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit. *Eur J Clin Invest* **19**: 395-403 (1989)
- 48 Hernandez Avila M., Walker A. M., Jick H.: Use of replacement estrogens and the risk of myocardial infarction. *Epidemiology* **1**: 128-133 (1990)
- 49 Herrington D. M., Reboussin D. M., Brosnihan K. B., Sharp P. C., Shumaker S. A., Snyder T. E., Furberg C. D., Kowalchuk G. J., Stuckey T. D., Rogers W. J., Givens D. H., Waters D.: Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N Engl J Med* **343**: 522-529 (2000)
- 50 Holm P., Korsgaard N., Shalmi M., Andersen H. L., Hougaard P., Skouby S. O., Stender S.: Significant reduction of the antiatherogenic effect of estrogen by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in cholesterol-clamped rabbits. *J Clin Invest* **100**: 821-828 (1997)
- 51 Holm P., Andersen H. L., Andersen M. R., Erhardtson E., Stender S.: The direct antiatherogenic effect of estrogen is present, absent, or reversed, depending on the state of the arterial endothelium. A time course study in cholesterol-clamped rabbits. *Circulation* **100**: 1727-1733 (1999)
- 52 Hough J. L., Zilversmit D. B.: Effect of 17 beta estradiol on aortic cholesterol content and metabolism in cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis* **6**: 57-63 (1986)
- 53 Hu F. B., Stampfer M. J., Manson J. E., Grodstein F., Colditz G. A., Speizer F. E., Willett W. C.: Trends in the incidence of coronary heart disease and changes in diet and lifestyle in women. *N Engl J Med* **343**: 530-537 (2000)

- 54 Hulley S., Grady D., Bush T., Furberg C., Herrington D., Riggs B., Vittinghoff E.: Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama* **280**: 605-613 (1998)
- 55 Hunt C., Duncan L.: Hyperlipoproteinaemia and atherosclerosis in rabbits fed low level cholesterol and lecithin. *Brit J Exp Path* **66**: 35-46 (1985)
- 56 Jiang C., Poole-Wilson P. A., Sarrel P. M., Mochizuki S., Collins P., MacLeod K. T.: Effect of 17 beta-oestradiol on contraction, Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* **106**: 739-745 (1992)
- 57 Jiang C. W., Sarrel P. M., Lindsay D. C., Poole-Wilson P. A., Collins P.: Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol* **104**: 1033-1037 (1991)
- 58 Kannel W. B., Hjortland M. C., McNamara P. M., Gordon T.: Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* **85**: 447-452 (1976)
- 59 Karas R. H., Patterson B. L., Mendelsohn M. E.: Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* **89**: 1943-1950 (1994)
- 60 Karas R. H., Hodgin J. B., Kwoun M., Krege J. H., Aronovitz M., Mackey W., Gustafsson J. A., Korach K. S., Smithies O., Mendelsohn M. E.: Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15133-15136 (1999)
- 61 Kauser K., Sonnenberg D., Tse J., Rubanyi G. M.: 17 beta-Estradiol attenuates endotoxin-induced excessive nitric oxide production in ovariectomized rats in vivo. *Am J Physiol* **273**: H506-509 (1997)
- 62 Koenig W.: Haemostatic risk factors for cardiovascular diseases. *Eur Heart J* **19 Suppl C**: C39-43 (1998)
- 63 Kuiper G. G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J. A.: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5925-5930 (1996)
- 64 Kushwaha R. S., Hazzard W. R.: Exogenous estrogens attenuate dietary hypercholesterolemia and atherosclerosis in the rabbit. *Metabolism* **30**: 359-366 (1981)
- 65 Kushwaha R. S., Lewis D. S., Carey K. D., McGill H. C., Jr.: Effects of estrogen and progesterone on plasma lipoproteins and experimental atherosclerosis in the baboon (*Papio sp.*). *Arterioscler Thromb* **11**: 23-31 (1991)
- 66 La Vecchia C., Franceschi S., Decarli A., Pampallona S., Tognoni G.: Risk factors for myocardial infarction in young women. *Am J Epidemiol* **125**: 832-843 (1987)
- 67 Lafferty F. W., Fiske M. E.: Postmenopausal estrogen replacement: a long-term cohort study. *Am J Med* **97**: 66-77 (1994)

- 68 Losordo D. W., Kearney M., Kim E. A., Jekanowski J., Isner J. M.: Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* **89**: 1501-1510 (1994)
- 69 Ludden J. B., Bruger M., Wright I. S.: Experimental atherosclerosis IV. Effect of testosterone propionate and estradiol dipropionate on experimental atherosclerosis in rabbits. *Arch Pathol* **33**: 58-62 (1942)
- 70 Manson J. E.: Postmenopausal hormone therapy and atherosclerotic disease. *Am Heart J* **128**: 1337-1343 (1994)
- 71 Mueck A. O., Seeger H., Korte K., Lippert T. H.: The effect of 17 beta-estradiol and endothelin 1 on prostacyclin and thromboxane production in human endothelial cell cultures. *Clin Exp Obstet Gynecol* **20**: 203-206 (1993)
- 72 Mueck A. O., Seeger H., Lippert T. H.: Calciumantagonistic effect of natural and synthetic estrogens--investigations on a nongenomic mechanism of direct vascular action. *Int J Clin Pharmacol Ther* **34**: 424-426 (1996)
- 73 Negre-Salvayre A., Pieraggi M. T., Mabile L., Salvayre R.: Protective effect of 17 beta-estradiol against the cytotoxicity of minimally oxidized LDL to cultured bovine aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* **99**: 207-217 (1993)
- 74 Peberdy M. A., Ornato J. P.: Coronary artery disease in women. *Heart Dis Stroke* **1**: 315-319 (1992)
- 75 Pick R., Stamler J., Rodbard S., Katz I. N.: The inhibition of coronary atherosclerosis by estrogens in cholesterol-fed chicks. *Circulation* **6**: 276-281 (1952)
- 76 Radomski M. W., Palmer R. M., Moncada S.: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **2**: 1057-1058 (1987)
- 77 Raghunath P. N., Tomaszewski J. E., Brady S. T., Caron R. J., Okada S. S., Barnathan E. S.: Plasminogen activator system in human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**: 1432-1443 (1995)
- 78 Ridker P. M., Hennekens C. H., Rifai N., Buring J. E., Manson J. E.: Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* **100**: 713-716 (1999)
- 79 Ridker P. M., Hennekens C. H., Buring J. E., Rifai N.: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* **342**: 836-843 (2000)
- 80 Riedel M., Rafflenbeul W., Lichtlen P.: Ovarian sex steroids and atherosclerosis. *Clin Investig* **71**: 406-412 (1993)
- 81 Rodstrom K., Bengtsson C., Lissner L., Bjorkelund C.: Pre-existing risk factor profiles in users and non-users of hormone replacement therapy: prospective cohort study in Gothenburg, Sweden. *BMJ* **319**: 890-893 (1999)
- 82 Rosenberg L., Armstrong B., Jick H.: Myocardial infarction and estrogen therapy in post-menopausal women. *N Engl J Med* **294**: 1256-1259 (1976)

- 83 Rosenberg L., Palmer J. R., Shapiro S.: A case-control study of myocardial infarction in relation to use of estrogen supplements. *Am J Epidemiol* **137**: 54-63 (1993)
- 84 Rosenfeld M. E., Tsukada T., Chait A., Bierman E. L., Gown A. M., Ross R.: Fatty streak expansion and maturation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* **7**: 24-34 (1987)
- 85 Rosenfeld M. E., Ross R.: Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* **10**: 680-687 (1990)
- 86 Ross R., Glomset J. A.: The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* **295**: 369-77 und 420-425 (1976)
- 87 Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* **314**: 488-500 (1986)
- 88 Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**: 801-809 (1993)
- 89 Ross R.: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**: 115-126 (1999)
- 90 Rossouw J. E., Anderson G. L., Prentice R. L., LaCroix A. Z., Kooperberg C., Stefanick M. L., Jackson R. D., Beresford S. A., Howard B. V., Johnson K. C., Kotchen J. M., Ockene J.: Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* **288**: 321-333 (2002)
- 91 Ruggeri Z. M., Ware J.: von Willebrand factor. *Faseb J* **7**: 308-316 (1993)
- 92 Sack M. N., Rader D. J., Cannon R. O., 3rd: Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* **343**: 269-270 (1994)
- 93 Sanders M.: Molecular and cellular concepts in atherosclerosis. *Pharmacol Ther* **61**: 109-153 (1994)
- 94 Stampfer M. J., Willett W. C., Colditz G. A., Rosner B., Speizer F. E., Hennekens C. H.: A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease. *N Engl J Med* **313**: 1044-1049 (1985)
- 95 Stampfer M. J., Colditz G. A., Willett W. C., Manson J. E., Rosner B., Speizer F. E., Hennekens C. H.: Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med* **325**: 756-762 (1991)
- 96 Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C., Witztum J. L.: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* **320**: 915-924 (1989)
- 97 Steinbrecher U. P., Zhang H. F., Loughheed M.: Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* **9**: 155-168 (1990)
- 98 Sturgeon S. R., Schairer C., Brinton L. A., Pearson T., Hoover R. N.: Evidence of a healthy estrogen user survivor effect. *Epidemiology* **6**: 227-231 (1995)

- 99 Sullivan J. M., Vander Zwaag R., Hughes J. P., Maddock V., Kroetz F. W., Ramanathan K. B., Mirvis D. M.: Estrogen replacement and coronary artery disease. Effect on survival in postmenopausal women. *Arch Intern Med* **150**: 2557-2562 (1990)
- 100 Sullivan J. M.: Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: the human model. *Br J Obstet Gynaecol* **103 Suppl 13**: 59-65; discussion 66-67 (1996)
- 101 Tikkanen M. J.: Role of plasma lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerotic disease, with special reference to sex hormone effects. *Am J Obstet Gynecol* **163**: 296-304 (1990)
- 102 Tsukada T., Rosenfeld M., Ross R., Gown A. M.: Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis* **6**: 601-613 (1986)
- 103 van Baal W. M., Kenemans P., van der Mooren M. J., Kessel H., Emeis J. J., Stehouwer C. D.: Increased C-reactive protein levels during short-term hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. *Thromb Haemost* **81**: 925-928 (1999)
- 104 Vargas R., Wroblewska B., Rego A., Hatch J., Ramwell P. W.: Oestradiol inhibits smooth muscle cell proliferation of pig coronary artery. *Br J Pharmacol* **109**: 612-617 (1993)
- 105 Wagner J. D., Clarkson T. B., St Clair R. W., Schwenke D. C., Shively C. A., Adams M. R.: Estrogen and progesterone replacement therapy reduces low density lipoprotein accumulation in the coronary arteries of surgically postmenopausal cynomolgus monkeys. *J Clin Invest* **88**: 1995-2002 (1991)
- 106 Walsh B. W., Schiff I., Rosner B., Greenberg L., Ravnika V., Sacks F. M.: Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* **325**: 1196-1204 (1991)
- 107 Weigensberg B. I., Lough J., More R. H., Katz E., Pugash E., Peniston C.: Effects of estradiol on myointimal thickenings from catheter injury and on organizing white mural non-occlusive thrombi. *Atherosclerosis* **52**: 253-265 (1984)
- 108 Williams J. K., Honore E. K., Washburn S. A., Clarkson T. B.: Effects of hormone replacement therapy on reactivity of atherosclerotic coronary arteries in cynomolgus monkeys. *J Am Coll Cardiol* **24**: 1757-1761 (1994)
- 109 Wilson P. W., Garrison R. J., Castelli W. P.: Postmenopausal estrogen use, cigarette smoking, and cardiovascular morbidity in women over 50. The Framingham Study. *N Engl J Med* **313**: 1038-1043 (1985)
- 110 Wissler R. W., Vesselinovitch D.: Differences Between Human and Animal Atherosclerosis. In: Atherosclerosis. G. Schettler, A. Weizel. Springer, New York, 319-325 (1974)
- 111 Wissler R. W., Vesselinovitch D.: Regression of atherosclerosis in experimental animals and man. *Verh Dtsch Ges Inn Med* **81**: 857-865 (1975)
- 112 Witztum J. L.: The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* **344**: 793-795 (1994)

- 113 Ylikorkala O., Orpana A., Puolakka J., Pyorala T., Viinikka L.: Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1. *J Clin Endocrinol Metab* **80**: 3384-3387 (1995)
- 114 Zeiher A. M., Drexler H., Wollschlager H., Just H.: Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* **83**: 391-401 (1991)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hartmut Hanke für die freundliche Überlassung des Themas danken. Die wissenschaftliche Arbeit ist mir in der angenehmen Atmosphäre seiner Arbeitsgruppe und dank seiner engagierten und geduldigen Betreuung nie schwer gefallen.

In den Anfangsjahren meiner klinischen Tätigkeit stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite und ich freue mich auch weiterhin mit ihm zusammenarbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. V. Hombach danke ich für die Möglichkeit das Projekt in der Abteilung Innere Medizin II durchführen zu können und für die uneingeschränkte Unterstützung.

Bei Frau Christina Lenz bedanke ich mich für die hervorragende praktische Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken.

Frau Dr. Sybille Hanke, Herrn Dr. Horst Kahn und Herrn Dr. Gerald Finking danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der tierexperimentellen Versuche.

Bei Herrn Dr. Sascha Stiller bedanke ich mich für den Erfahrungsaustausch in der gemeinsamen Zeit als Doktorand.

Meinen Eltern gebührt mein tiefer Dank für die Ermöglichung des Studiums und die unermüdliche Unterstützung in jeder Phase meiner Ausbildung.