

Aus der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. O. Elert

**Estrogene verzögern die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie nach  
Herztransplantation**

**Experimentelle Untersuchungen im Kleintiermodell**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Sonja Schrepfer

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2002

Referent: Professor Dr. med. O. Elert

Korreferent: Professor Dr. med. B. Allolio

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Mai 2003

Die Promovendin ist Ärztin

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>11</b>
2.1 Versuchstiere und deren Haltung.....	11
2.2 Heterotope Herztransplantation.....	12
2.3 Medikation der Tiere.....	16
2.3.1 Cyclosporin A.....	17
2.3.2 17- $\beta$ -Estradiol.....	17
2.3.3 Estrogenantagonist ICI 182.780.....	18
2.3.4 Coumestrol (= Phytoestrogen).....	18
2.3.5 Erdnussöl.....	18
2.3.6 Ethanol.....	19
2.4 Explantation.....	19
2.5 Auswertung.....	20
2.5.1 Auswertung der histologischen Färbungen.....	20
2.5.2 Immunhistochemische Färbungen.....	21
2.5.3 Estradiolbestimmung.....	21
2.5.4 Serumlipidspiegel.....	22
2.5.5 Statistische Tests.....	22
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>23</b>
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>42</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>54</b>

## 1. EINLEITUNG

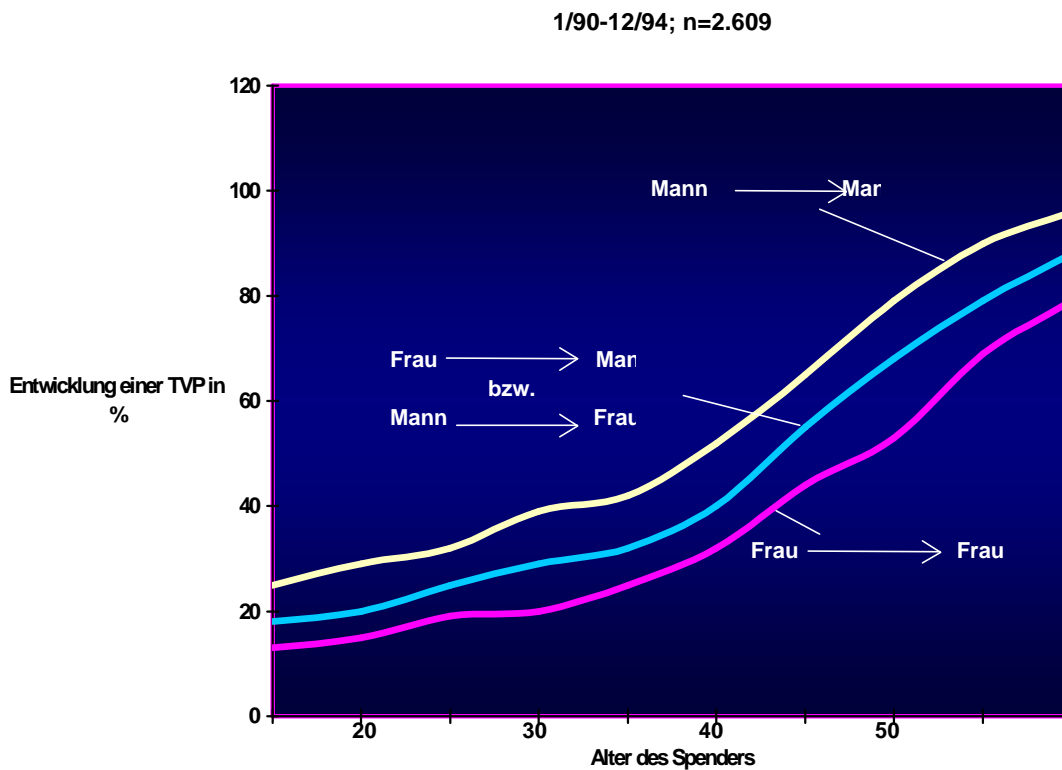
Die Herztransplantation ist die letzte Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit terminaler Herzerkrankung (Meiser et al., 1997). Die erste Herztransplantation beim Menschen führte Barnard am 3. Dezember 1967 durch (Barnard et al., 1967). Der erste Patient, Louis Washkansky (55 Jahre), verstarb 18 Tage später an einer Lungenentzündung.

Aufgrund dieser sehr begrenzten Überlebenszeit galt der Herztransplantation in den 70er Jahren nur experimentelles Interesse. Neben Problemen der Operationstechnik standen dabei von Anfang an immunologische Komplikationen der Organabstoßung im Vordergrund. Dies änderte sich Anfang der 80er Jahre nach Einführung von Cyclosporin A (*CsA*), einem Medikament, das die Abstoßungsreaktion durch Hemmung des Immunsystems verhindern kann. Der routinemäßige Einsatz dieses Immunsuppressivums, die Standardisierung der Abstoßungsdiagnostik durch feingewebliche Untersuchung von Herzmuskelproben des gespendeten Herzens, die Verbesserung der Konservierung der Spenderorgane und die Lösung logistischer Probleme bei der Organgewinnung machten ab Mitte der 80er Jahre die Herztransplantation zunehmend zu einem etablierten Verfahren zur Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz. Heute ist der operative Ersatz eines geschädigten Herzens durch das Herz eines verstorbenen Spenders mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 80 % ein etabliertes Therapieverfahren (Miniati et al., 2002).

Trotz umfangreicher Kenntnisse der Immunologie und verbesserter Immunsuppression sind im ersten postoperativen Jahr vorwiegend akute Abstoßungsreaktionen und Infektionen die prognostisch wichtigsten Faktoren nach einer Herztransplantation. Im späteren Verlauf tritt dann vor allem das Problem pathologischer Veränderungen am Gefäßbett des Transplantats, auch chronische Transplantatvaskulopathie (*TVP*) genannt, in den Vordergrund (Worrall et al., 1997). Eine chronische TVP kann sich bereits nach 3 Monaten, in manchen Fällen aber auch erst nach über 20 Jahren manifestieren und ist ein gleichermaßen prognostisch ungünstiges wie ungelöstes Langzeitproblem nach Herztransplantationen (Adams et al., 1992; Billingham et al., 1994; Haverich et al., 1994; Knight et al., 1997). Zu den schwerwiegenden klinischen Folgen der TVP zählen stumme Infarkte, plötzlicher Herztod und in seltenen Fällen eine ischämische Kardiomyopathie (von Scheidt et al., 1996). Bei bestehender Transplantatvaskulopathie sind Koronarinterventionen oder operative Revaskularisationen selten möglich, da die TVP (im Gegensatz zur Atherosklerose) vor allem kleine, intramyokardial gelegene Arterienäste diffus befällt und sich somit selten adäquate Anschlussgefäße für eine operative Revaskularisation finden (Billingham et al., 1994; Libby et al., 1989). Bei fortgeschrittener Erkrankung bleibt als letzte Möglichkeit nur die

Retransplantation. Herztransplantierte Patienten mit pathologischen angiographischen Befunden haben ein 2.4fach erhöhtes Risiko eines plötzlichen Herztodes und ein 4.6fach erhöhtes Risiko eines kardial bedingten Todes (Uretsky et al., 1992).

In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass das Transplantat von einem männlichen Spender für einen männlichen Empfänger eine deutlich schlechtere Überlebenszeit hat, als vergleichbare andere Geschlechter-Konstellationen.



**Abb. 1**

1998 wurden in einer amerikanischen Multicenter-Studie 2609 Patienten, die zwischen 1990 und 1994 herztransplantiert wurden, jeweils zwei Jahre nach der Transplantation angiographisch nachuntersucht (Costanzo et al., 1998). In Abb.1 zeigt die Ordinate die Häufigkeit an, mit der nach zwei Jahren obstruktive Koronargefäßveränderungen nachgewiesen wurden. Die Konstellation „Mann auf Mann“ zeigte wesentlich häufiger Veränderungen der Koronargefäße im Sinne einer Obstruktion als z.B. „Frau auf Frau“. Somit ist ein vasoprotektiver Effekt der weiblichen Sexualhormone anzunehmen.

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab einen vasoprotektiven Effekt von Estrogenen im Tiermodell nachzuweisen. Diese Hypothese stützt sich auf den Nachweis von Estrogenrezeptoren in kardialen Fibroblasten und Myozyten in männlichen und weiblichen Ratten, der erstmals 1995 erbracht wurde (Neyses et al., 1995). Die Demonstration der

Anwesenheit des Estrogenrezeptors im Herzgewebe ist aber alleine nicht ausreichend für den Beweis, dass der Rezeptor auch funktionell intakt ist. 1997 wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass der Estrogenrezeptor am Herzen auch funktionstüchtig ist und es bei Estrogengabe zu einer vermehrten Expression von Estrogenrezeptoren in Fibroblasten und Myozyten kommt (positive Rückkopplung) (Grohe et al., 1997).

Während die Rezeptoren der Peptidhormone in der Zellmembran lokalisiert sind, befinden sich die Rezeptoren der Steroidhormone im Zytoplasma der Zelle (= zytoplasmatischer Rezeptor). Mehr als 90% des Estradiols werden im Ovar gebildet, der Rest peripher durch Aromatisierung von Androgenen. Ein wichtiger extragenitaler Synthesort von Estrogenen ist das Fettgewebe und die Nebennierenrinde. Nach heutiger Vorstellung gelangt das lipophile Steroid durch passive Diffusion in das Zytoplasma und wird dort vom zytoplasmatischen Rezeptor gebunden; dieser Vorgang bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors und wird als Aktivierung bezeichnet. Als Folge der Aktivierung wird der Steroid-Rezeptor-Komplex zum Zellkern transportiert, wo er an bestimmte Stellen des Chromatins gebunden wird (Pelzer et al., 1996) und eine erhöhte Genexpression zur Folge hat (Kato et al., 1995). Die geschilderten Vorgänge (die unter anderem die Synthese von Proteinen enthalten), beanspruchen ca. 15 – 30 Minuten. Aus diesem Grund kann die Estrogenwirkung, die auf diesem Wirkungsmechanismus beruht, erst nach diesem Zeitraum erwartet werden. Außerdem können bestimmte Estrogenrezeptor-Antagonisten (z.B. ICI oder Tamoxifen) die Bindung von Estrogenen am Rezeptor verhindern. Effekte, die nicht durch Rezeptorantagonisten blockiert werden, können also nicht über diesen „klassischen“ Hormon-Rezeptor-Komplex vermittelt worden sein.

1997 zeigten Kuiper et al. dass zwei Subtypen des Estrogenrezeptors (**ER**) existieren, ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  (Kuiper et al., 1997).

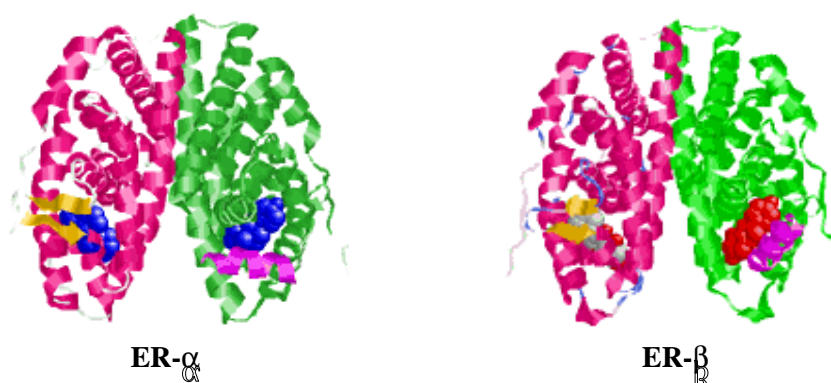


Abb. 2

Chemisch unterscheiden sich die beiden Subtypen in der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne und in der, für die intrazelluläre Signalverarbeitung zuständigen, N-terminalen Domäne. In ihrer Studie wiesen Kuiper et al. die Expression des jeweiligen Rezeptortyps im Rattengewebe mittels RT-PCR nach und verglichen außerdem die Spezifität der Ligandenbindung von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ . In unserer Arbeit wurden zwei Hormone der Estrogenfamilie ausgewählt, die unterschiedliche Affinitäten zum ER- $\alpha$  bzw. ER- $\beta$  aufweisen: 17- $\beta$ -Estradiol (ein physiologisch im Körper vorkommendes Estrogen) und Coumestrol (ein pflanzliches Estrogen (sog. Phytoestrogen), das in Hopfen und Sojaprodukten vorkommt). Außerdem wurde ICI 182.780, ein kompetitiver ER-Antagonist, verwendet.

Kuiper et al. war es möglich für die getesteten Substanzen eine „Rangliste“ relativer Affinitäten zu den ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  zu erstellen:

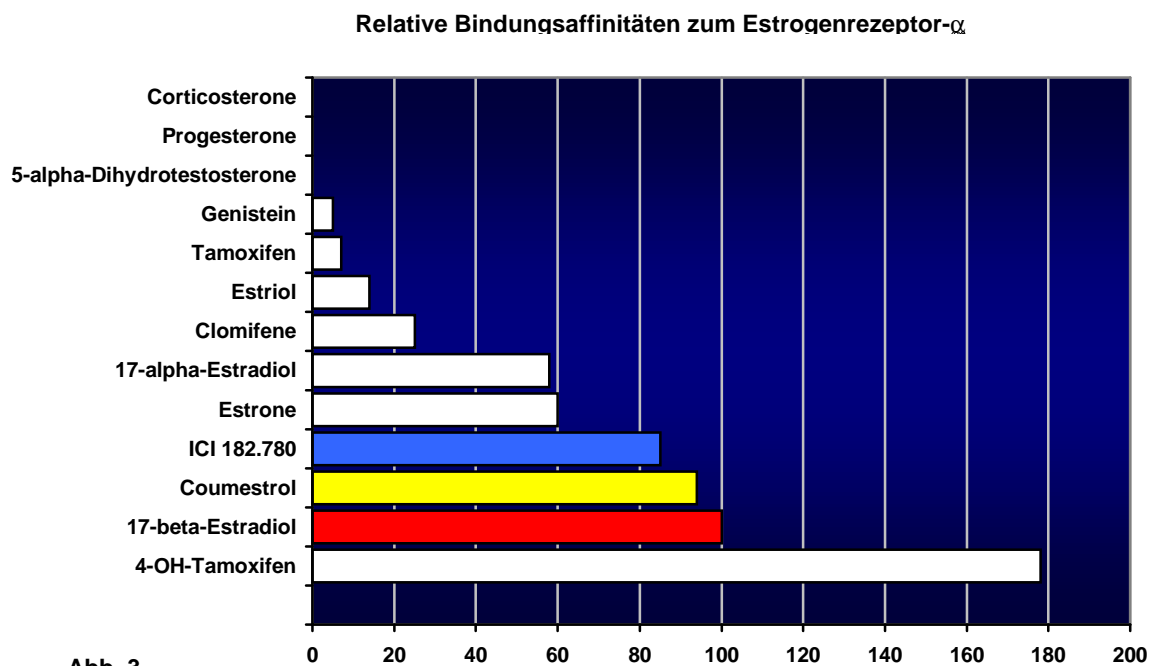


Abb. 3

Diese Auflistung zeigt, dass die für unsere Versuche relevanten Substanzen 17- $\beta$ -Estradiol, ICI und Coumestrol sich in ihrer Affinität zum  $\alpha$ -Rezeptor nur wenig unterscheiden: 17- $\beta$ -Estradiol weist von den drei Substanzen die größte Affinität auf, während Coumestrol eine geringere Affinität zeigt. Dies stellt sich beim  $\beta$ -Rezeptor anders dar:

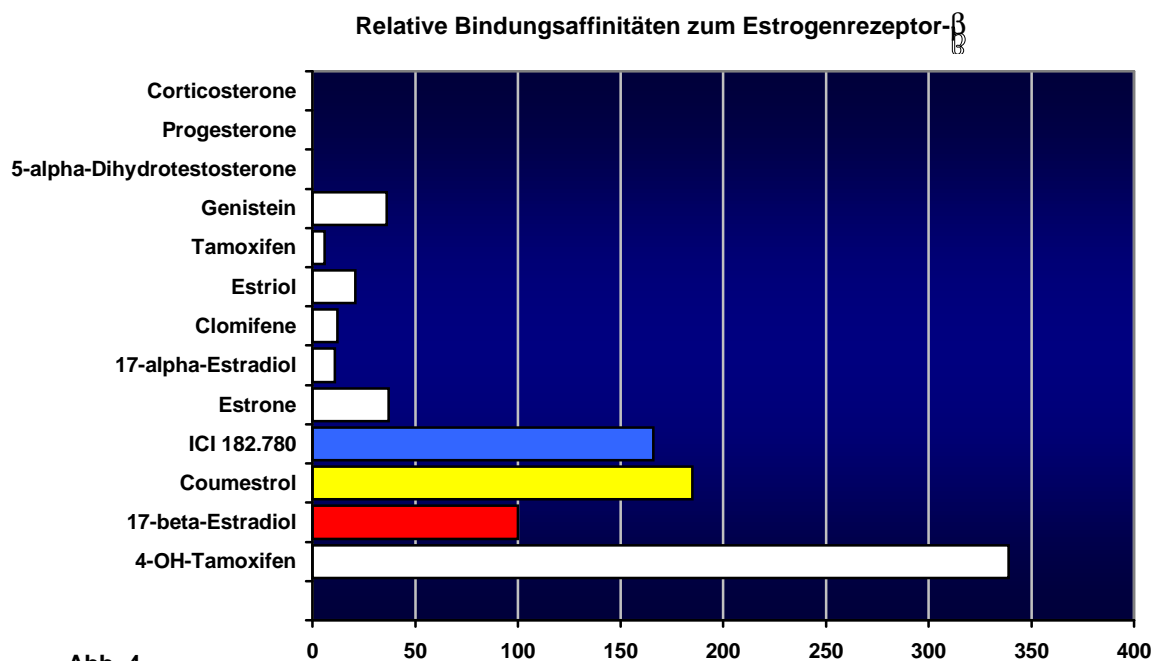


Abb. 4

17- $\beta$ -Estradiol hat von den drei Substanzen zum ER- $\beta$  die geringste Affinität und nicht mehr die höchste, wie es beim Rezeptortyp  $\alpha$  der Fall war. Coumestrol zeigt hier die höchste Affinität.

Kuiper et al. zeigten in ihrer Studie außerdem, dass es Unterschiede in der ER- $\alpha$ - und ER- $\beta$ -Expression im Gewebe von Ratten und Menschen gibt:

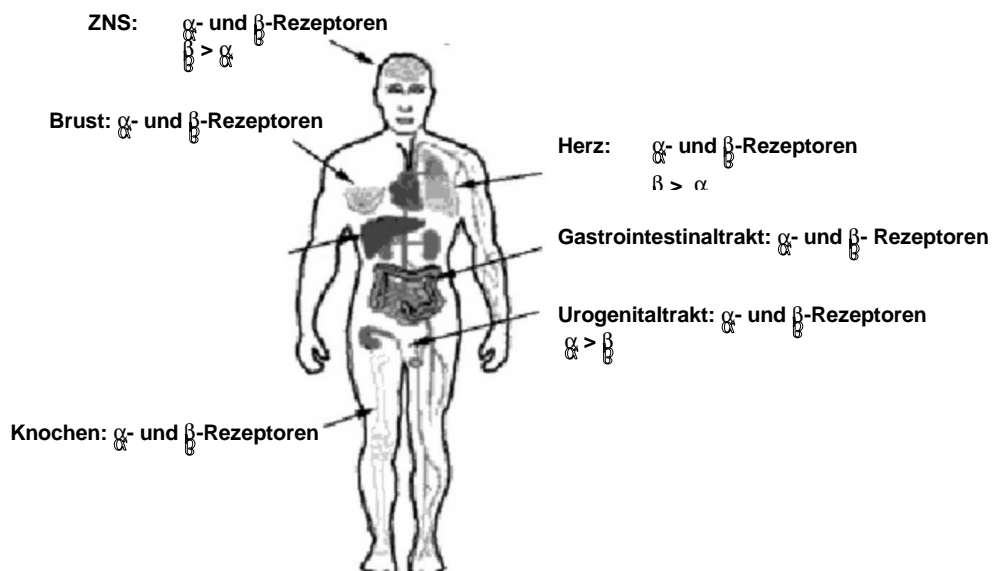


Abb. 5: Verteilung der Estrogenrezeptoren in Organen des Menschen

Wie in Abb. 5 zu sehen ist, werden in den meisten Organsystemen beide Subtypen exprimiert, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Die Estrogensubtypen  $\alpha$  und  $\beta$  am Herzen wurden erst 2001 von Savolainen et al. näher untersucht. Sie zeigten, dass im Herzen von Menschen und Ratten die Expression des ER- $\beta$  überwiegt (Savolainen et al., 2001).

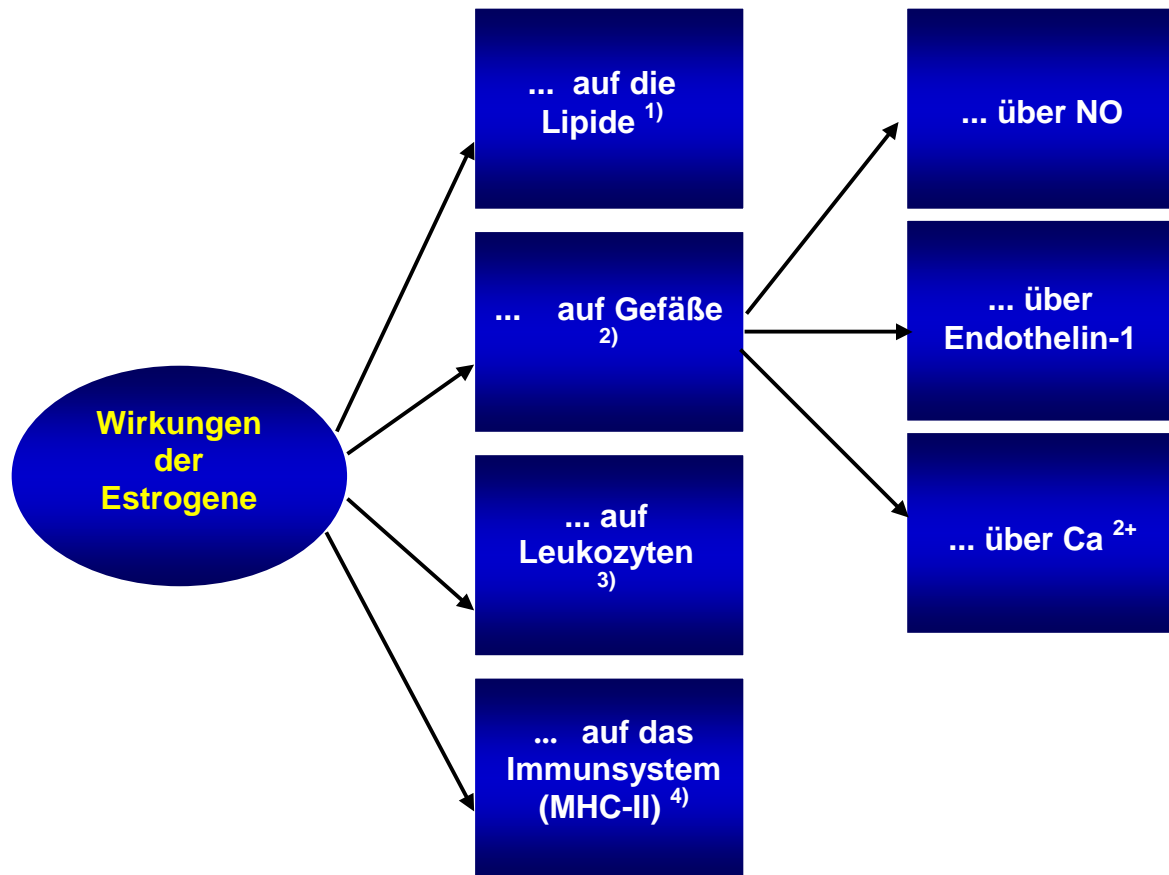


Die von Kuiper et al. beschriebenen Unterschiede zwischen den beiden ER-Subtypen hinsichtlich ihrer relativen Liganden-Bindungsaffinität und ihrer unterschiedlichen Verteilung im Gewebe könnten ein wichtiger Grund für die selektive Wirkung von Estrogen-Agonisten und -Antagonisten in verschiedenen Geweben sein. Allerdings ist die biologische Bedeutung der Existenz von zwei Estrogenrezeptor-Subtypen derzeit noch unklar.

Die Pathogenese der TVP ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Lowry et al., 1993). Diskutiert werden sowohl antigenabhängige als auch antigenunabhängige Faktoren (Schmid et al., 1996). Antigenabhängige Immunreaktionen werden durch Unterschiede im MHC- oder non-MHC-Komplex ausgelöst und manifestieren sich durch T-Zell-bedingte Abstoßungsphasen (zellulär) und durch Produktion von Antikörpern gegen das Transplantat (humoral). Es wurde gezeigt, dass zwischen dem Auftreten einer TVP und der Anwesenheit von antiendothelialen Antikörpern eine positive Korrelation besteht (Crisp et al., 1994). Diese Immunreaktionen des Empfängers spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der TVP, da sich entsprechende Gefäßveränderungen bei syngenen Transplantaten nicht finden (Forbes et al., 1997). Durch Veränderung dieser Immunmechanismen könnte die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie möglicherweise gehemmt werden. Es ist gezeigt worden, dass Estrogene die humorale Immunantwort steigern und die zell-vermittelte Immunantwort abschwächen (Lou et al., 1997). Saito et al. haben 1998 eine Studie veröffentlicht, die den Effekt von 17- $\beta$ -Estradiol auf die MHC-II-Expression nach Transplantation untersucht. MHC-II sind Moleküle mit denen die Zelle Antigene auf ihrer Oberfläche exprimiert, die von CD4-positiven Zellen erkannt werden. Die MHC-II-Expression ist das wichtigste Signal für die CD4-T-Lymphozyten das Blutgefäß des Spenderorgans als fremd zu erkennen (Saito et al., 1998). Normalerweise wird MHC-II nur auf antigenpräsentierenden Zellen (B-Zellen, Makrophagen, Langerhanszellen) exprimiert, nicht jedoch auf Endothelzellen. Nur durch Abstoßungsprozesse aktivierte Endothelzellen exprimieren MHC-II-Moleküle. Durch Estrogenbehandlung wurde die MHC-II-Expression des Transplantats vermindert und die Entwicklung einer TVP gehemmt (Saito et al., 1998). Die estrogenvermittelte Protektion gegen eine TVP scheint über die Unterdrückung einer MHC-II-Expression vermittelt zu werden (Lou et al., 1996).

Es existieren noch zahlreiche weitere Wirkungsweisen von Estrogenen, die ebenfalls einen Einfluss auf die Entstehung der TVP haben könnten. Schon seit vielen Jahren werden die verschiedensten Wirkungen der Estrogene auf den Organismus diskutiert. Estrogene bewirken zahlreiche sowohl genitale als auch extragenitale Veränderungen. So beeinflussen sie außer

Uterus, Mammae, Haut, Knochensystem, etc. auch das Gefäßsystem, den Lipidstoffwechsel und das Immunsystem (siehe Abb. 6).



**Abb. 6:** 1) Bush et al., Eur Heart J 1996; Gardner et al., Prev Med 2000; Schurz et al., Wien Klin Wochenschr 1997; Szafran et al., Przegł Lek 1998  
 2) Lieberman et al., Circulation 1993; Oparil et al., Hypertension 1999; Spencer et al., Pharmacotherapy 2000  
 3) Squadrito et al., Eur J Pharmacol. 1997; Ito et al., Clin Immunol. 2002  
 4) Saito et al., Transplantation 1998; Lou et al. Circulation 1996

Mit Lipidsenkern werden bei herztransplantierten Patienten niedrige LDL- und Triglyceridwerte angestrebt. Die Estrogenwirkung auf das Lipidprofil ist ausführlich studiert worden (Gardner et al., 2000; Goldschmid et al., 1994; Westerveld et al., 1998): Estrogene bewirken eine Abnahme der Triglyceride und des LDL-Cholesterins (Brezinka et al., 1994; Schurz et al., 1997) und erhöhen HDL-Cholesterinwerte bis um 15% (Bush et al., 1996; Brezinka et al., 1994), indem sie auf zellulärer Ebene die mRNA-Produktion von Proteinen, die in den Lipidmetabolismus involviert sind, regulieren und in der Leber die Syntheserate für LDL und HDL beeinflussen (Szafran et al., 1998). Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie zählen zu den antigenunabhängigen Risikofaktoren bei der Entwicklung einer TVP. Ein gemeinsames Auftreten von Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie kann eine verstärkende Wirkung bei der Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen des

Transplantatgefäßes haben, indem sie eine Proliferation von glatten Muskelzellen (*SMC*) und eine Synthese von Wachstumsfaktoren induzieren (Adams et al., 1993; Dong et al., 1996; Mennander et al., 1993).

In einigen Studien wurde gezeigt, dass Estrogene Frauen in der Postmenopause vor einer fortschreitenden KHK und dem damit verbundenen erhöhten Myokardinfarkt-Risiko schützen können. Calaf et al. berichteten 1997 von über 30 epidemiologischen Studien, die zeigen, dass Estrogene das Risiko einer KHK-Entwicklung in der Postmenopause bis zu 50 % reduzieren können (Calaf et al., 1997). Der Wirkungsmechanismus ist bis heute ungeklärt. Verschiedene Studien lassen vermuten, dass die Estrogenwirkung auf das Lipidprofil nicht alleine für die kardioprotektive Wirkung verantwortlich ist (Bush et al., 1996; Grodstein et al., 1998; Losordo et al., 1994; Manolio et al., 1992; Oparil et al., 1999; Ribot et al., 1997; Spencer et al., 2000). Es wird diskutiert, ob NO bei der vasoprotektiven Wirkung von Estrogenen eine Rolle spielt. In einigen Studien wird Estrogenen eine endothelabhängige, vasodilatierende Wirkung über den NO/cGMP-Weg nachgesagt (Drexler et al., 1994; Muck et al., 1994): Drexler et al. vertreten die Hypothese, dass niedrige Estrogenspiegel mit einer verminderten NO-Produktion verbunden sind, der Estrogenspiegel also positiv mit der NO-Produktion korreliert. Die vasoprotektive Estrogenwirkung könnte also über das antiatherogen wirkende NO vermittelt werden (Russell et al., 1995). Auch Weiner et al. kamen bereits 1994 zu dem Ergebnis, dass eine Langzeitgabe von Estrogenen die Transkription der NO-Synthase hochreguliert und so die Produktion von NO gesteigert wird (Weiner et al., 1994). In den ersten Tagen nach mechanischer Intimaverletzung übt die vermehrte NO-Produktion einen antithrombotischen Effekt aus, der eine Plättchenaggregation und eine nachfolgende Thrombosierung des Gefäßlumens verhindert. Durch zusätzliche Vasodilatation wird der Blutfluss durch das geschädigte Gefäß verbessert. Die schnell einsetzende NO-Produktion durch SMC geschädigter Gefäßabschnitte hat hier die wichtige protektive Aufgabe einen ungestörten Blutfluss im Gefäß trotz des Intimaschadens aufrechtzuerhalten (Yan et al., 1994). Eine weitere Schutzfunktion für das Gewebe könnte NO über die Hemmung von zytotoxischen T-Zellen ausüben, welche in vitro nachgewiesen wurde (Lewis et al., 1996).

Viele Studien vertreten jedoch andererseits die Hypothese, dass Estrogene ihre Wirkung auf das Gefäßsystem NO-unabhängig entfalten (Gilligan et al., 1994; Liebermann et al., 1993; Reis et al., 1994; Williams et al., 1992). Es wurden Rezeptor-unabhängige Mechanismen postuliert, wie z.B. die Möglichkeit, dass Estrogene direkt als Antioxidanzien wirken (Keaney et al., 1994). In atherosklerotischen Gefäßabschnitten können eine Reihe von Antioxidanzien die endothel-abhängige Vasodilatation wieder herstellen, da deren Beeinträchtigung Folge

einer gesteigerten Produktion von freien Radikalen ist (Harrison et al., 1995). Diese freien Radikale können nun NO in der Gefäßwand direkt inaktivieren. Zusätzlich vermindern oxidierte LDL-Partikel über eine Schädigung des Endothels die Produktion von NO (Liao et al., 1995; Steinberg et al., 1992; Witztum et al., 1991). Estrogene zeigen eine antioxidative Wirkung, die durch ihren Phenolring in 17- $\beta$ -Estradiol zustande kommt (Sugioka et al., 1987). Die LDL-Oxidation bei postmenopausalen Frauen wird reduziert, wenn sie eine Estrogensubstitution erhalten (Sack et al., 1994). Es wird vermutet, dass Estrogene die Anzahl der freien Radikale direkt in der Arterienwand reduzieren (Gerhard et al., 1995). Von White et al. wurde ein durch Estrogene induzierter Abfall des Redoxpotentials der Gefäßwand beobachtet. Dieser Abfall kommt durch eine Hemmung der LDL-Oxidation zustande. White et al. fragten 1997: "No Role for NO in Estrogen-mediated Vasoprotection?" und zeigten, dass Estrogene NO-unabhängig vor atherogenetischen Läsionen schützen (White et al., 1997). Nach White et al. kommt die vasoprotektive Wirkung von Estrogenen zusätzlich durch ihre Fähigkeit zustande, die Gefäßpermeabilität zu reduzieren und somit eine zelluläre Infiltration zu limitieren. Hinzu kommt, dass Estrogene die strukturelle Integrität von Endothelien verstärken (White et al., 1997).

White et al. sehen den größten Vorteil einer Estrogenbehandlung einerseits in der Regulation der Zellproliferation und andererseits in der verminderten Infiltration von Monozyten/Makrophagen in die Gefäßwand (White et al., 1997). Diese Zelltypen spielen bei der Entwicklung der chronischen TVP eine entscheidende Rolle.

Die vielen zum Teil kontroversen Ergebnisse zeigen, dass Untersuchungen nötig sind, um das Zusammenspiel jener fördernder und hemmender Faktoren der Reaktionsabläufe, die letztendlich zur TVP führen, besser zu verstehen. Bisherige präventive und therapeutische Maßnahmen nach Herztransplantation beinhalten eine potente Immunsuppression mit CsA, FK506 oder Rapamycin, kombiniert mit MMF oder antiproliferativen Substanzen (Azathioprin, 6-Mercaptopurin), außerdem konventionell medikamentöse Ansätze (Kalziumantagonisten, Lipidsenker) und als letzte Möglichkeit die Retransplantation. Sollten Estrogene einen Einfluss auf die Entwicklung der chronischen TVP haben, würden sich hieraus eventuell neue Therapie- bzw. Präventionsansätze ergeben.

Diese Arbeit beschäftigt sich genauer mit der Beeinflussung der TVP durch Gabe estrogener Substanzen. Zur Untersuchung der chronischen Abstoßung wird hier das Modell heterotoper Herztransplantationen in der etablierten Rattenstammkombination Lew $\rightarrow$ F344 verwendet. Da diese nur eine geringe Histoinkompatibilität aufweisen, kann durch kurzfristige Gabe von Cyclosporin A die akute Abstoßung verhindert werden, so dass die Transplantate 150 Tage

überleben (Cramer et al., 1992). Es entwickeln sich diffuse arteriosklerotische Läsionen wie sie bei menschlichen Transplantaten gefunden werden. Immunhistochemische und histologische Studien belegen, dass sich die Gefäßveränderungen beim Menschen und beim Lew→F344-Tiermodell sowohl in der Zusammensetzung der zellulären Infiltrate als auch im Auftreten myointimaler Proliferationen mit Lumenobstruktion gleichen (Adams et al., 1993).

Zusammenfassend beschäftigt sich diese Arbeit mit der Klärung folgender Fragen:

1. Haben Estrogene im Rattenmodell einen Einfluss auf die Entwicklung der chronischen Transplantatvaskulopathie?
2. Entfalten sie ihre Wirkungen rezeptorvermittelt?
3. Über welchen Mechanismus wirken Estrogene gefäßprotektiv (können sie z.B. das Lipidprofil oder das Immunsystem beeinflussen)?
4. Existieren Unterschiede bei der Gabe des physiologischen 17- $\beta$ -Estradiol (mit höherer Affinität zum ER- $\alpha$ ) bzw. des pflanzlichen Coumestrol (mit höherer ER- $\beta$ -Affinität)?

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Versuchstiere und deren Haltung**

Als Versuchstiere wurden Ratten der Stämme Lew (RTavl) und F344 (RT1lv1) verwendet, die sich in einem MHC Klasse II-Locus, in zwei Klasse I-Loci sowie einigen non-MHC-Loci unterscheiden (Schmid et al., 1997). In dieser Stamm-Kombination ist die Entwicklung der chronischen TVP sowohl histologisch als auch in der Zusammensetzung der Infiltrate mit den herztransplantierten Patienten vergleichbar.

Als Versuchstiere wurden ausschließlich weibliche Ratten verwendet, weil im weiblichen Versuchstier eine Ovariectomie die physiologische Estrogenproduktion weitestgehend unterbindet, andererseits die therapeutische Substitution problemlos durchführbar ist. Somit konnte in einer Gruppe ein Ratten-Estrogenspiegel aufgebaut werden, in anderen Gruppen war der Estrogenspiegel durch Nicht-Gabe unbedeutend gering.

In den Versuchs- und Kontrollgruppen dienten Lew-Ratten als Spender und ovariectomierte F344-Ratten als Transplantatempfänger (= allogene Stammkombination).

In der syngenen Kontrollgruppe dienten F344-Ratten als Transplantatspender und ovariectomierte F344-Ratten als Transplantatempfänger.

Die ovariectomierten F344-Ratten wurden von „IFFA CREDO“ aus Frankreich bezogen, wo sie im Alter von 9 Wochen ovariectomiert wurden. Sie trafen im Alter von 10 Wochen und einem Gewicht von 120-160 g in der experimentellen Chirurgie der Universitätsklinik Würzburg ein. 14 Tage vor der heterotopen Herztransplantation erhielten sie die gruppenspezifische Medikation. Die Tiere waren zum OP-Zeitpunkt 12 Wochen alt und wogen zwischen 150 und 180 g.

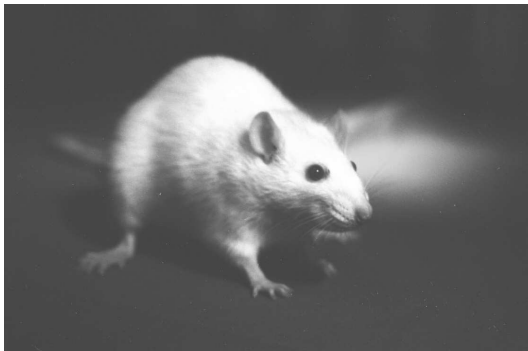
Die nicht Lew-Ratten und die nicht ovariectomierten Tiere vom F344-Stamm (die in der syngenen Gruppe als Spender dienten) wurden von Charles River Laboratories, Sulzfeld (Deutschland) bezogen und waren am OP-Tag ca. 12 Wochen alt und wogen zwischen 150 und 180 g.

Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen im Tierstall der Abteilung für Experimentelle Chirurgie der Universität Würzburg gehalten:

Jeweils zwei Tiere teilten sich einen Macrolon-Käfig, dessen Boden mit Holzspan- Streu bedeckt war. Die Käfige standen in Scanbur-Klimaschränken bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 20°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und einem 12 Stunden-hell-dunkel-Rhythmus. Alle Tiere erhielten Ratte-Maus-Pellets und Wasser ad libitum.

## 2.2 Heterotope Herztransplantation

Lange et al. beschrieben 1997 die Operationstechnik nach dem Modell von Yokoyama, das die Grundlage dieser Arbeit darstellt (Timmermann et al., 1997; Yokoyama et al., 1995):

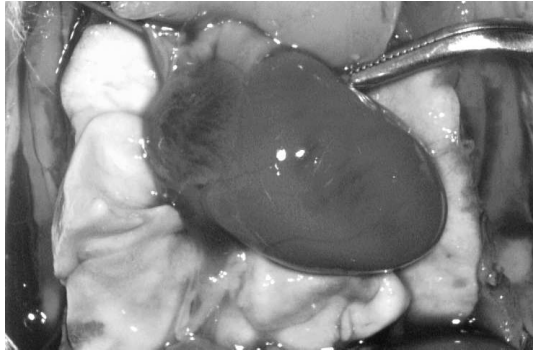


Die Tiere wurden mit einer Isoflurannarkose anästhesiert; hierzu wurde ihr Kopf in eine speziell für sie angefertigte Inhalationsmaske gesteckt. Die Zusammensetzung der Narkose bestand aus 2 l/min O<sub>2</sub> und 1,5 % Isofluran.

Abb. 7

### Spender

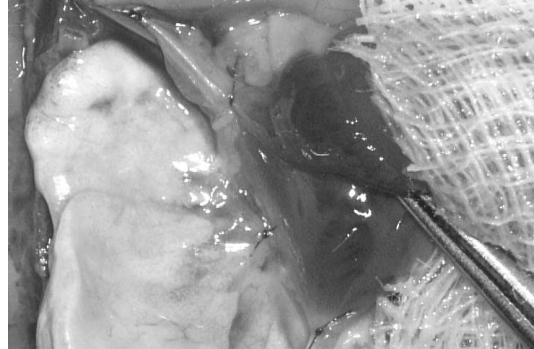
Das Spendertier wurde zuerst in einem Glasgefäß mit geringen Mengen Isofluran anästhesiert, anschließend gewogen und, nachdem das OP-Gebiet rasiert wurde, auf einer Korkplatte so fixiert, dass Nase und Mund vom Narkosegerät umschlossen wurden. Nach Erlöschen der Schmerzreaktion wurde das Abdomen eröffnet. Die großen Gefäße (abdominelle Aorta und V. cava inf.) wurden durchtrennt, um eine Entlastung des Herzens zu erzielen (durch Reduktion des Afterloads vor Ischämiebeginn). Anschließend wurde der Thorax im lateralen Bereich in kraniale Richtung eröffnet, das Diaphragma durchtrennt und der Brustkorb nach oben geklappt und fixiert.



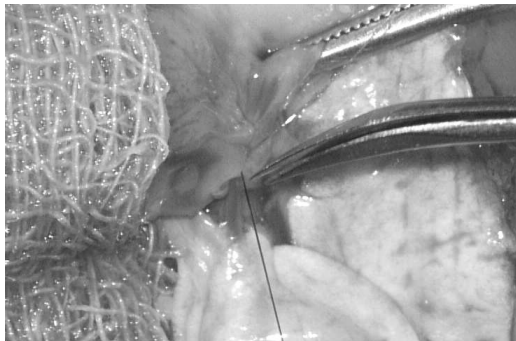
**Abb. 8**

Die V. cava. inf. und Vv. cavae sup. wurden abgeklemmt. Über die untere V. cava wurden ca. 15 ml einer 4°C kühlen, kardioplegen Lösung (HTK-Lösung nach Bretschneider = Custodil®) über den rechten Vorhof injiziert.

Nach anschließender antegrader Kardioplegie wurden zuerst die Gefäße der rechten Seite, die V. cava sup. dext., V. pulmonalis dext. und V. cava inf. freipräpariert, ligiert (7-0 Prolene, Ethicon Norderstedt) und durchtrennt.



**Abb. 9**

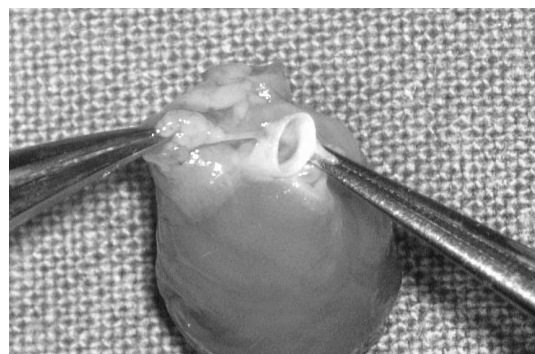


**Abb. 10**

Das Herz wurde nach rechts umgeklappt und folgende Gefäße wurden in einer großen Ligatur zusammengefasst und durchtrennt: V. cava sup. sin., V. pulmonalis sin. und V. pulmonalis l. caudati.

Ebenso wurde auch die A. pulmonalis ligiert und durchtrennt.

Zuletzt musste noch die Aorta freipräpariert und durchtrennt werden, wobei auf gerade Schnittländer geachtet wurde. Nach vollständiger Freipräparation des Herzens wurde es in 4°C kalter NaCl-Lösung aufbewahrt bis der Empfänger für die Transplantation vorbereitet war.



**Abb. 11**



## EMPFÄNGER

Das Empfängertier wurde auf die gleiche Weise anästhesiert, gewogen und rasiert. Nach der medianen abdominellen Inzision wurden die infrarenale abdominelle Aorta und die V. cava inf. freipräpariert. Die Lumbalgefäße wurden, wenn nötig, ligiert (7-0 Prolene, Ethicon Norderstedt).

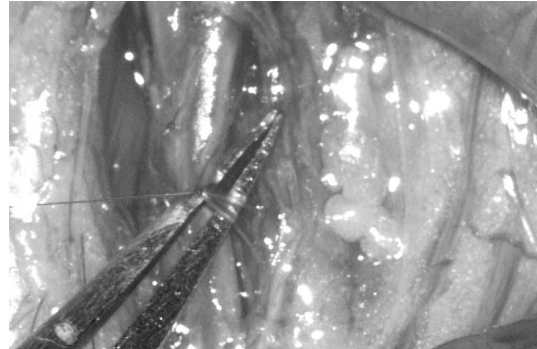


Abb. 12

## TRANSPLANTATION

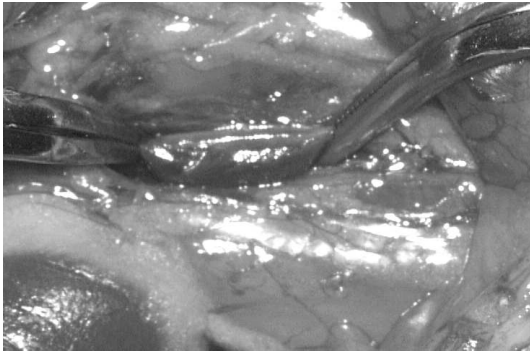


Abb. 13

Der Blutfluss der infrarenalen abdominellen Aorta und der V. cava inf. des Empfängers wurde mit Bulldockklemmen unterbrochen.

Anschließend wurde nach einer Längsinzision (ca. 2-3 mm) der abdominellen Aortenvorderwand die Spenderaorta mit der abdominellen Aorta des Empfängers End-zu-Seit anastomosiert (8-0 Prolene, Ethicon Norderstedt).

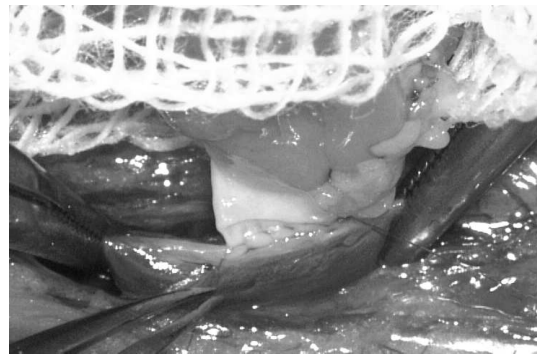


Abb. 14

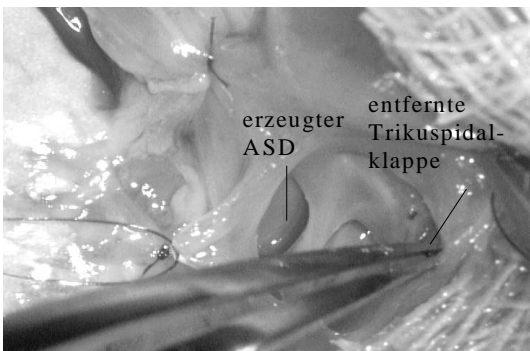
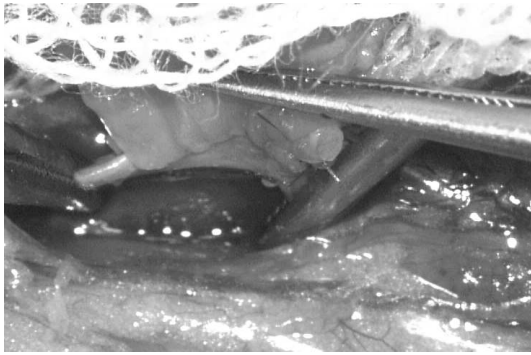


Abb.15

Der rechte Vorhof war bei der Herzentnahme in vertikaler Richtung inzidiert worden, um einen ASD und eine Trikuspidalinsuffizienz zu erzeugen. Hierdurch soll die Hämodynamik verbessert werden.



Anschließend wurde die Vorderwand der Empfängervene (V. cava inf.) longitudinal inzidiert (4-5 mm) und mit dem rechten Vorhof anastomosiert (8-0 Prolene, Ethicon Norderstedt).

**Abb. 16**

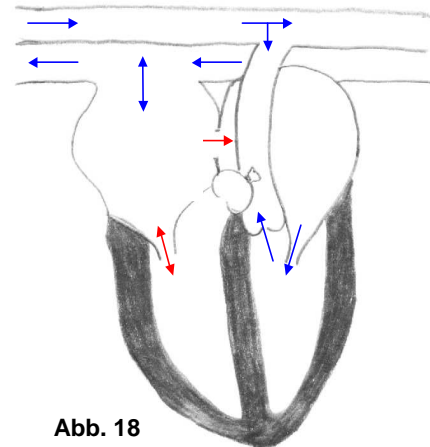
Nachdem die Gefäße anastomosiert waren, wurden die Bulldockklemmen geöffnet und der Blutstrom freigegeben. Nach kurzer Reperfusionzeit begann das Herz wieder zu schlagen. Abschließend wurde das Abdomen durch schichtweisen Wundverschluss wieder verschlossen (5-0 Prolene, Ethicon Norderstedt).



**Abb. 17**

#### SCHEMA DES BLUTFLUSSES DURCH DAS TRANSPLANTAT

Der linke Vorhof und der linke Ventrikel des Transplantats werden durch die interatriale Verbindung mit dem Blut vom rechten Vorhof belastet (siehe roter, horizontaler Pfeil). Dadurch produziert der linke Ventrikel des Transplantats einen systolischen Blutdruck, der gleich dem Aortendruck des Empfängers ist. Die Koronararterien des Transplantats werden sowohl mit dem oxygenierten arteriellen Blut über die Empfängeraorta, als auch mit un-oxygenierten, venösem Blut über den transplantierten linken Ventrikel perfundiert.



**Abb. 18**

## 2.3 Medikation der Tiere

Gruppe	Stamm-kombination	Behandlung Medikation	Anzahl (n)	Tiernummer
1	LEW → F344	Ovarektomie 17-β-Estradiol (+CsA)	7	SO 30-33 SO 40-42
2	LEW → F344	Ovarektomie ICI (+CsA)	6	SO 10-13 SO 26-27
3	LEW → F344	Ovarektomie Coumestrol (+CsA)	8	SO 52-55 SO 62-65
4	LEW → F344	Ovarektomie 17-β-Estradiol + ICI (+CsA)	8	SO 35-39 SO 66-68
5	LEW → F344	Ovarektomie Coumestrol + ICI (+CsA)	8	SO 56-59 SO 69-72
6	LEW → F344	Ovarektomie (CsA)	11	SO 1-5 SO 6-8 SO 44-46
7	F344 → F344 syngen	Ovarektomie (CsA)	7	SO 20-21 SO 23-25 SO 60-61
8	LEW → F344	Ovarektomie Erdnussöl (+CsA)	8	SO 14-19 SO 28-29
9	LEW → F344	Ovarektomie Ethanol (+CsA)	3	SO 47-49

**Tabelle 1**

Die Gruppen 1 bis 5 sind die eigentlichen Versuchsgruppen. Diese Tiere wurden mit den ER-Agonisten 17-β-Estradiol und Coumestrol, dem ER-Antagonisten ICI 182.780 bzw. einer Kombination aus Agonist und Antagonist behandelt. Die Tiere, die den Gruppen 6 bis 9 angehören bilden die Kontrollgruppen. Tiere der Gruppe 6 erhielten keine spezifische Medikation. Gruppe 7 ist die syngene Kontrollgruppe (F344→F344). Gruppe 8 und 9 entstanden, weil ICI und Coumestrol in Erdnussöl bzw. Ethanol gelöst werden. Um am Ende einen beobachteten Effekt auch wirklich der Grundsubstanz ICI bzw. Coumestrol zuschreiben zu können, müssen Effekte der Trägersubstanzen

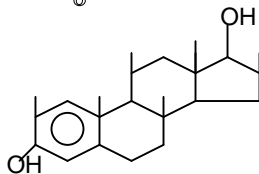
ausgeschlossen werden. Alle Tiere wurden 14 Tage post OP mit CsA (2 mg/kg/d) behandelt.

### 2.3.1 Cyclosporin A

Cyclosporin (CsA) wurde ursprünglich als Peptid aus einer Flechte (*Tolypocladium*) isoliert und gehört zur Gruppe der Calcineurin-Antagonisten. Ruhende Zellen werden kaum beeinflusst, demnach bleiben ruhende T-Zellen als Träger des immunologischen Gedächtnisses für die Infektabwehr unbeeinträchtigt. Zusätzlich wird durch CsA die Zytokinproduktion (IL-2) gehemmt.

Allen Tieren wurde ab dem Tag der Transplantation für 14 Tage CsA intramuskulär gespritzt. Die Dosierung von 2 mg/d CsA war bei jedem Tier gleich und blieb auch die 14 Tage über konstant. 20 mg CsA und 0.04 ml Ethanol (100%ig) wurden mit Miglyol auf einen ml gelöst. Jedes Tier bekam von diesem Ansatz 0.1 ml injiziert. CsA wurde von der Firma Novartis (Nürnberg) bezogen, Miglyol kam von der Firma Condea Chemie GmbH, Werk Witten.

### 2.3.2 17- $\beta$ -Estradiol

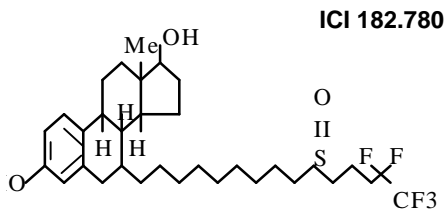


17- $\beta$ -Estradiol

Abb. 19

Die Dosierung für die 17- $\beta$ -Estradiol-Medikation (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) wurde mit täglich 2  $\mu$ g/kg/d s.c. gewählt. Das reine Estradiolpulver wurde mit NaCl vermischt (im Verhältnis 0.4  $\mu$ g/0.1 ml NaCl).

### 2.3.3 Estrogenrezeptorantagonist ICI 182.780



**Abb. 20**

Der Estrogenrezeptorantagonist ICI wurde den Tieren in der Dosierung 200 µg/kg/d s.c. gespritzt. Das ICI-Pulver wurde unter sterilen Bedingungen in 100%igem Ethanol (20 mg/ml Ethanol) gelöst und als 20µl-Aliquots bei -80°C gelagert. Vor Applikation wurden die Aliquots frisch aufgetaut und mit 980 µl Erdnussöl (1:49) verdünnt. Pro Tier wurden 0.1 ml injiziert. Das ICI-Pulver wurde von der Firma „Tocris Cookson“ aus den USA geliefert.

### 2.3.4 Coumestrol (= Phytoestrogen)

Das Phytoestrogen „Coumestrol“ bekamen die betreffenden Tiere zwei Mal wöchentlich intramuskulär verabreicht, da diese Substanz im Tierkörper nur sehr langsam abgebaut wird (Pelzer-Forschungsgruppe, Medizinische Klinik Würzburg). 0.4 µg Coumestrol wurden in 15 µl Ethanol (100%ig) gelöst, anschließend kamen noch 985 µl Erdnussöl hinzu. Dies ergab 1ml, dem Tier wurde 0.1 ml injiziert. Geliefert wurde Coumestrol von der Firma Sigma, Schnelldorf.

### 2.3.5 Erdnussöl

Das Erdnussöl wurde bereits fertig aus der Klinikapotheke der Universitätsklinik Würzburg geliefert. Jedes Tier der Gruppe 8 erhielt 0.1 ml/d subkutan.

### **2.3.6 Ethanol**

Jedes Tier der Gruppe 9 bekam 20 µl Ethanol (1:49 mit Erdnussöl verdünnt) subkutan injiziert. Ethanol wurde von der Firma Baker aus Holland geliefert.

## **2.4 Explantation**

Die Explantation der Transplantate wurde bei allen Gruppen nach 150 Tagen durchgeführt. Für die Explantation wurde das Tier (wie bereits unter „2.2 Heterotope Herztransplantation“ beschrieben) in einem Glasgefäß mit dem Narkotikum Isofluran betäubt, gewogen, rasiert und auf einer Korkplatte fixiert. Auch für die Explantation wurde das Isofluran-Inhalationsgerät zur Anästhesie verwendet. Nach der Eröffnung des Abdomens entlang der Linea alba wurde zuerst das transplantierte Herz nach Kontraktion, Farbe und Verwachsungen beurteilt. Anschließend wurde aus der V.cava inf. Blut für die Estradiol- und Lipidbestimmungen abgenommen.

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurde sowohl das abdominelle Transplantat als auch das native Herz entnommen. Außerdem der Uterus, der zusätzlich gewogen wurde.

Die entnommenen zwei Herzen (das Tx und das native Herz) wurden halbiert und wie folgt konserviert:

Der basisnahe Teil wurde für die Anfertigung der histologischen Färbungen mit H.E. und van Gieson verwendet. Hierfür wurde das Herzstück zuerst in ein Formalingefäß gelegt, dann wurde das so fixierte Stück in Paraffin gebettet und mit dem Schlittenmikrotom geschnitten (2 µm). Die Auswertung erfolgte dann morphometrisch.

Die Herzspitze wurde in Tissue Tek (Einbettmedium für Gefrierpräparate der Firma Hartenstein, Würzburg) fixiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Anfertigung der Kryoschnitte im Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt. Das Kryomaterial wurde im Kryostat geschnitten (4 µm). Die immunhistochemischen Färbungen im Verfahren der Immunperoxidase wurden mit den Antikörpern gegen CD4-positive Zellen (T-Helferzellen), CD8-positive Zellen (zytotoxische T-Zellen), Makrophagen, MHC-II-Strukturen und das Adhäsionsmolekül ICAM-1 durchgeführt.

## 2.5 Auswertung

Es wurden alle Herzen (das Transplantat und das native Herz) aller Gruppen folgendermaßen untersucht:

### 2.5.1 Auswertung der histologischen Färbungen

Die Hämatoxylin/Eosin (H.E.)-Färbung stellte eine Übersichtsfärbung dar, mit der das Ausmaß der Zellinfiltrate im Myokard, perivaskulär und epikardial beurteilt werden konnte. Außerdem konnten eventuell entstandene Ödeme identifiziert werden.

Der Nachweis von elastischen Fasern gelang mit der Elastica-van Gieson (EVG)-Färbung. Mit ihr konnten die Gefäße dargestellt und Aussagen über eine Gefäßobstruktion und die Integrität der Lamina elastica interna gemacht werden. Die Lumenobstruktion charakterisierte das Ausmaß der chronischen Transplantatvaskulopathie. Damit objektive Aussagen über die Ausprägung der Transplantatvaskulopathie der einzelnen Versuchsgruppen gemacht werden konnten, wurden die Elastica-van Gieson-Präparate planimetrisch ausgewertet: In jedem Präparat wurden die Gefäße mikroskopisch herausgesucht und fotografiert. Diese Fotos wurden eingescannt und computergestützt konnten die Flächen des aktuellen Lumens und des früheren Gefäßlumens (das durch die angefärbte Lamina elastica interna identifiziert werden kann) berechnet werden (s. Abb. 21).

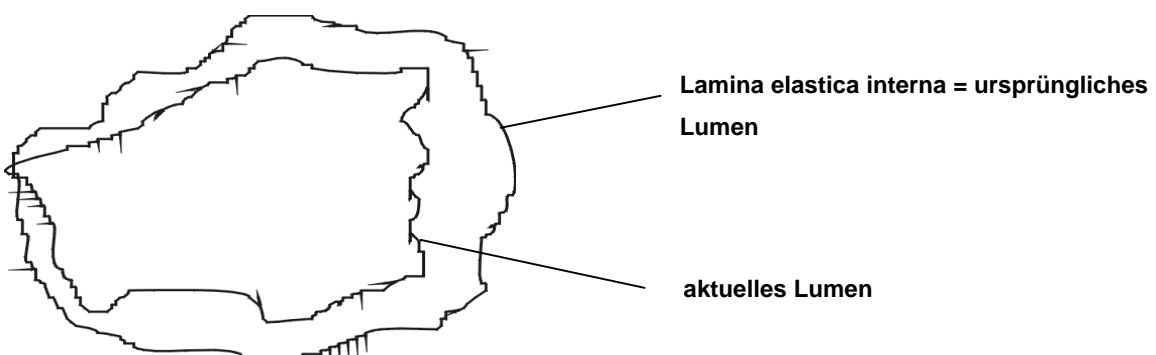


Abb. 21: Querschnitt eines Gefäßes

Die Differenz aus ursprünglichem und aktuellem Gefäßquerschnitt beschreibt die Obstruktion durch neointimale Proliferation. Durch Bildung des Quotienten mit dem ursprünglichen Gefäßquerschnitt ergibt sich die relative Querschnittsverminderung.

### 2.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Die zusätzlich durchgeführten immunhistochemischen Färbungen dienten der Identifikation der Entzündungszellpopulationen.

Für die Immunhistochemie wurden Antikörper gegen folgende Antigene verwendet:

- Mouse-anti-rat **CD4** [Klon OX38], Serotec (erkennt T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen)
- Mouse-Anti-Rat **CD8** [Klon MRC OX8], Serotec (erkennt T-Lymphozyten, Thymozyten, NK-Zellen)
- Mouse anti rat **ED1**, Serotec (erkennt Gewebsmakrophagen)
- **MHC-II** [AK Anti-IA], (erkennt MHC-II-exprimierende Zellen = antigenpräsentierende Zellen wie B-Zellen, Makrophagen und stimulierte Endothelzellen)
- Mouse-Anti-Rat **CD54** [ICAM-1] (Adhäsionsmolekül, wichtig bei der Zell-Zell-Interaktion).

Die gefärbten Präparate wurden unter dem Mikroskop beurteilt. Die Infiltratdichte wurde anhand einer Skala von 0 bis 4 bestimmt, wobei folgende Einteilung verwendet wurde:

0 = negativ

1 = mild

2 = moderat

3 = ausgeprägt

4 = schwer.

### 2.5.3 Estradiolbestimmung

Die Estradiolbestimmung erfolgte aus dem Serum. Für die Estradiolbestimmung wurden aus der V. cava inf. pro Tier zwischen 3 und 5 ml Blut abgenommen. Das entnommene Blut wurde bei 1000 U/min bei Raumtemperatur (24/25°C) 10 Minuten zentrifugiert, das Serum wurde in Röhrchen aliquotiert und anschließend im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Die Estradiolbestimmung wurde mit dem RIA-Test (Bioscentia) im endokriologischen Labor von Prof. Allolio (Universitätsklinik



Würzburg) durchgeführt. Dieser Test benötigt eine Serummenge von lediglich 200 µl, hat einen Standardbereich von 5 bis 500 pg/ml und seine Empfindlichkeit liegt bei 1.4 pg/ml. Weder Bilirubin noch Hämolyse haben einen signifikanten Einfluss auf den Test. Der Normwert für weibliche Ratten liegt zwischen 30 bis 50 pg/ml.

#### **2.5.4 Serumlipidspiegel**

Die Lipidspiegel wurden im klinisch-chemischen Labor des Zentrallabors der Universitätsklinik Würzburg bestimmt. Der Normwert von Cholesterin für weibliche F344-Ratten liegt bei zwischen 46 und 86 mg/dl.

#### **2.5.5 Statistische Tests**

Für Vergleiche wurden statistische Tests (t-Test für zwei Gruppen bzw. Varianzanalyse ANOVA mit anschließendem LSD postHoc-Test für mehrere Gruppen) verwendet, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  als signifikant erachtet wurde.

### 3. ERGEBNISSE

Die Explantation wurde bei allen Gruppen nach 150 Tagen durchgeführt. Zuerst wurde das transplantierte Herz nach Kontraktion, Farbe und Verwachsungen beurteilt. Die Ergebnisse sind in folgender Übersicht dargestellt:

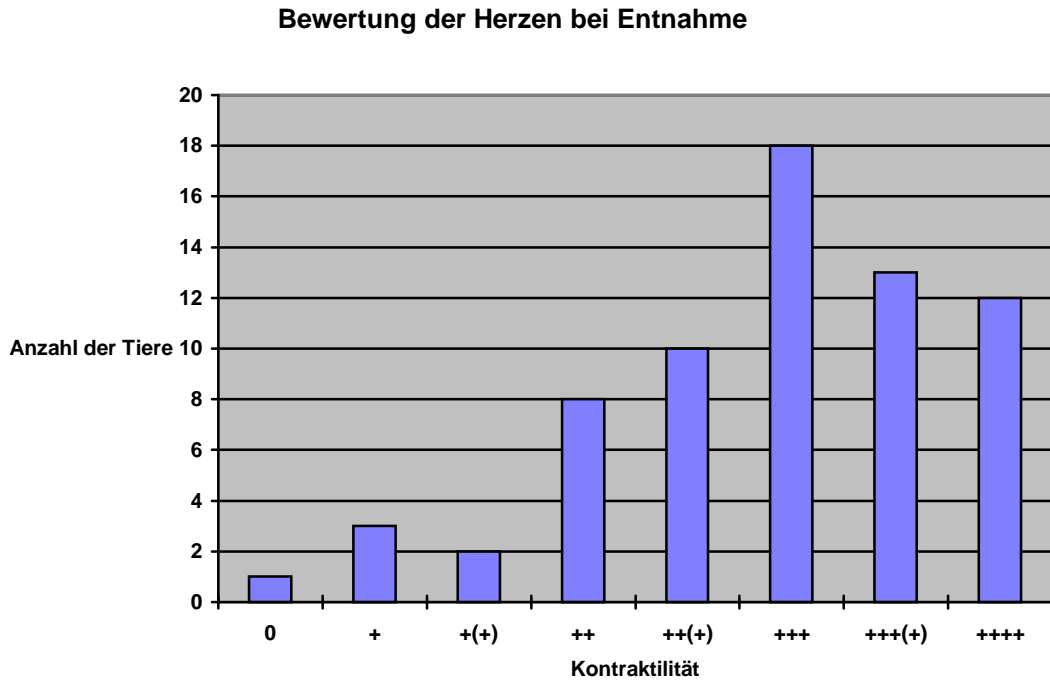


Abb. 22

- 0 : nur die Spitze zuckt autonom; Thrombenbildung
- + : Tx ist hart, schwache Kontraktion, Thrombenbildung
- +(+) : inhomogene Kontraktion
- ++ : gleichmäßige aber flau Kontraktion
- ++(+): Tx ist verwachsen, Kontraktion ist mäßig
- +++ : Tx ist verwachsen, aber kräftige Kontraktion
- +++(+): schöne Kontraktion, nur wenig verwachsen
- ++++ : keine Verwachsung, rosiges Tx, kräftige und homogene Kontraktion

Wie aus der Grafik zu sehen ist, waren viele entnommene Transplantate zwar mit den umliegenden Darmschlingen verwachsen, aber ihre Kontraktion war kräftig und

homogen, es hatten sich keine Thromben im Vorhof oder Ventrikel gebildet und es waren keine Infarktareale sichtbar.

### GEWICHT DER TIERE

Das durchschnittliche Gewicht der Tiere (Gruppen 2 und 3, 4-9) lag bei  $263\text{g} \pm 23\text{g}$ , wobei zu beobachten ist, dass das Gewicht bei zwei Gruppen signifikant geringer ausfiel: Sowohl das Gewicht der Estradiol-Gruppe lag mit  $213\text{g} \pm 32\text{g}$  signifikant ( $p < 0.001$ ) unter dem durchschnittlichen Wert der anderen Gruppen als auch das Gewicht der Estradiol+ICI-Gruppe ( $p < 0.01$ ), die durchschnittlich  $241\text{g} \pm 21\text{g}$  wog. Bei der Gruppe, die mit dem pflanzlichen Estrogen Coumestrol behandelt wurde, zeigte sich dieser Effekt nicht. Das Gewicht der Gruppen ICI, Coumestrol, Coumestrol+ICI, CsA, syngen, Erdnussöl und Ethanol unterscheidet sich fast nicht voneinander ( $p = 0.15$ ) (siehe Abb.23). Auf der anderen Seite unterscheidet sich das Gewicht der Estradiol-Gruppe kaum von der Estradiol plus ICI-Gruppe (n.s.).

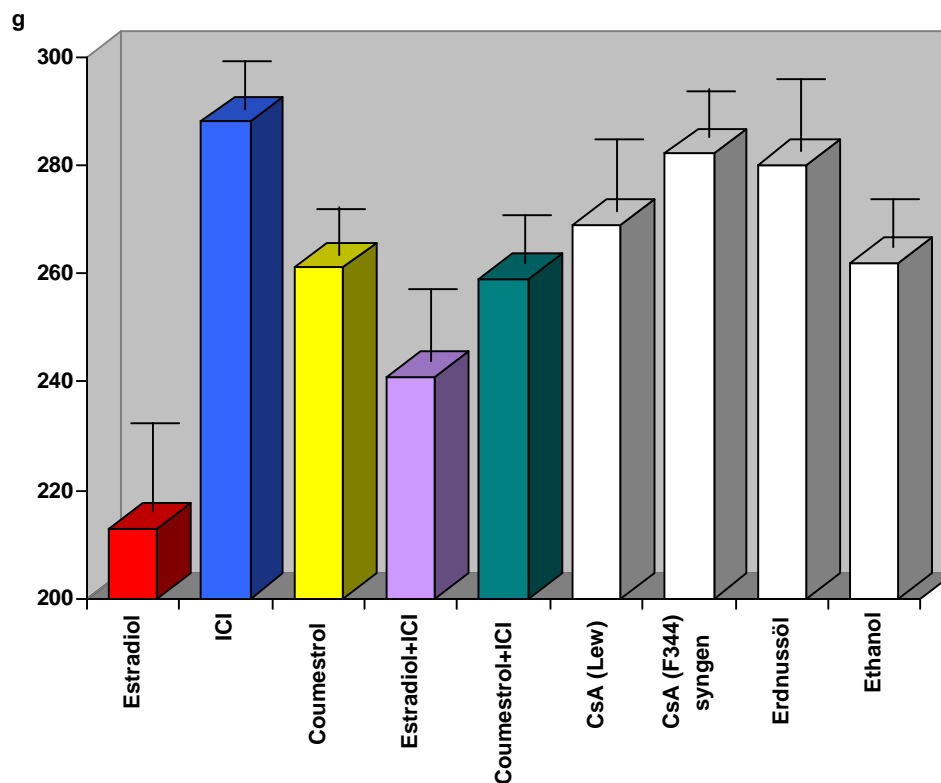


Abb. 23: Gewicht der Tiere (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

## UTERUSGEWICHT

Bereits makroskopisch war bei der Explantation ein deutlicher Größenunterschied zwischen dem Uterus der 17- $\beta$ -Estradiol-Gruppe und dem Uterus der anderen Gruppen zu erkennen. Der Uterus auf Abbildung 24 zeigt die typische Größe für die Tiere, die mit 17- $\beta$ -Estradiol behandelt wurden. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 25 ein repräsentativer Uterus aller anderen Gruppen zu sehen, dessen Uterushörner deutlich schmaler ausgeprägt sind.

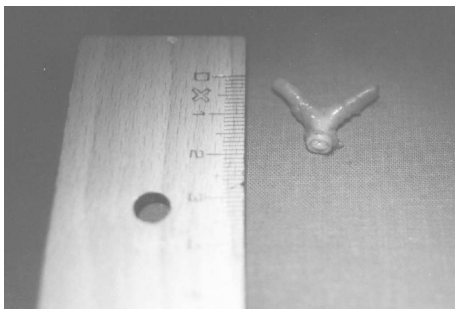


Abb. 24

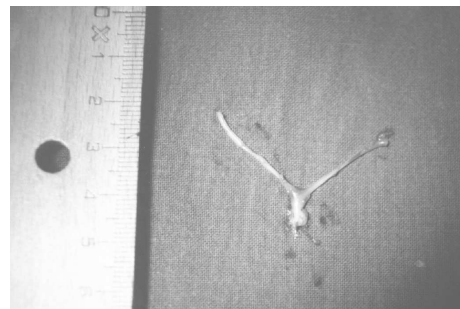


Abb. 25

In der statistischen Überprüfung konnte gezeigt werden, dass sich das Uterusgewicht der Gruppen, die kein 17- $\beta$ -Estradiol substituiert bekamen einerseits nicht signifikant untereinander unterscheidet ( $p=0.08$ ), andererseits aber ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen diesen Gruppen und der Estradiolgruppe ( $p<0.001$ ) bzw. der Estradiol+ICI-Gruppe ( $p<0.001$ ) vorliegt. Zwischen den Gruppen Estradiol und Estradiol+ICI konnte ebenfalls ein deutlicher Unterschied gemessen werden ( $p<0.001$ ). Die Coumestrol-Gruppe hatte keinen vergrößerten Uterus. In Abbildung 26 ist für jede einzelne Gruppe das durchschnittliche Uterusgewicht mit Standardabweichung angegeben. Die Abszisse zeigt die einzelnen Gruppen (die Versuchsgruppen [farbig] und die Kontrollgruppen [weiß]). Die Ordinate gibt das Uterusgewicht in mg an.

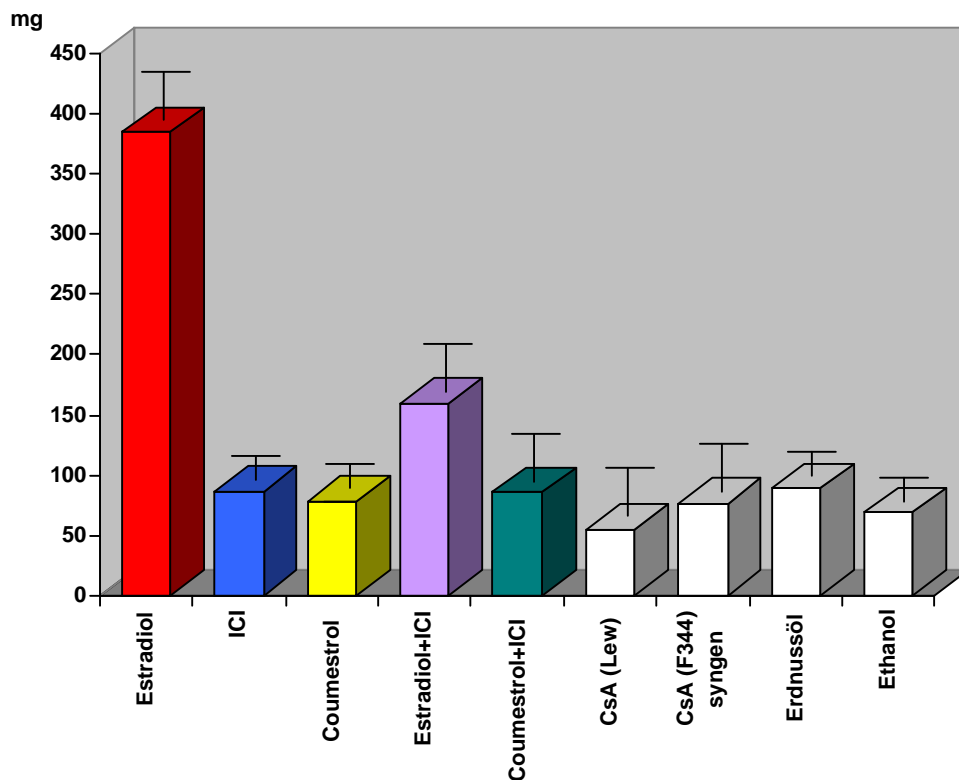


Abb. 26: Uterusgewicht (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

## ESTRADIOLWERT DER TIERE

Bei der Explantation wurden jedem Tier zwischen 3 und 5ml Blut in Serumröhrchen entnommen für die anschließenden Estradiol- bzw. Lipidbestimmungen.

Der physiologische Wert von Serumestrogen bei weiblichen F344-Ratten beträgt, abhängig vom Menstruationszyklus, 30-50 pg/ml.

In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass der Estradiolspiegel in den Gruppen, die mit 17- $\beta$ -Estradiol behandelt wurden (17- $\beta$ -Estradiol und 17- $\beta$ -Estradiol+ICI) signifikant erhöht ist ( $p < 0.001$ ). Die Estradiolwerte zwischen beiden Estradiol-substituierten Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p = 0.47$ ), ebenso ließen sich zwischen den anderen Gruppen keine signifikanten Unterschiede erkennen ( $p = 0.16$ ).

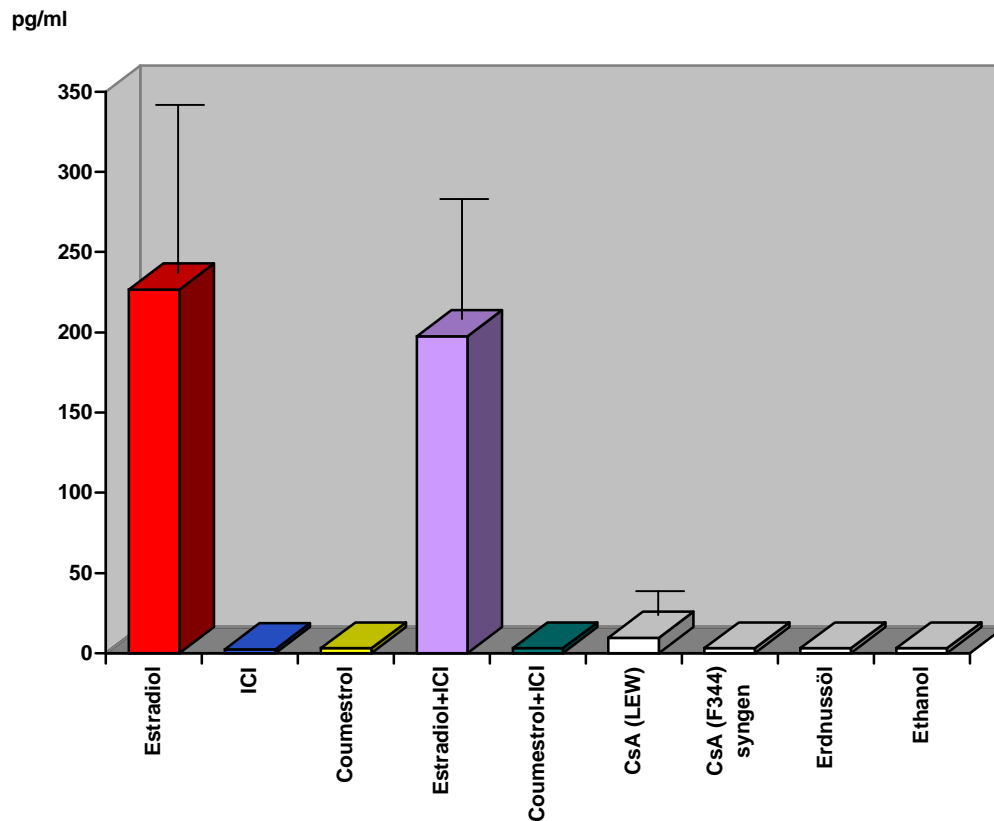


Abb. 27: Estradiolwert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

## LIPIDPROFIL DER TIERE

Aus dem gewonnenen Serum wurde neben dem Serumestradiol auch das Lipidprofil (Triglyceride, LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin) der Tiere bestimmt.

**Abbildung 28 zeigt den Mittelwert der Triglyceride der einzelnen Gruppen. Der Wert der ICI-Gruppe ist signifikant höher als bei allen anderen Gruppen ( $p < 0.001$ ).**

Bei den LDL-Cholesterinwerten unterscheidet sich die ICI-Gruppe ebenfalls signifikant von den anderen Gruppen (Abb. 29): Das LDL ist signifikant ( $p < 0.01$ ) höher als bei den restlichen acht Gruppen, die etwa gleich hohe Werte aufweisen ( $p = 0.25$ ).

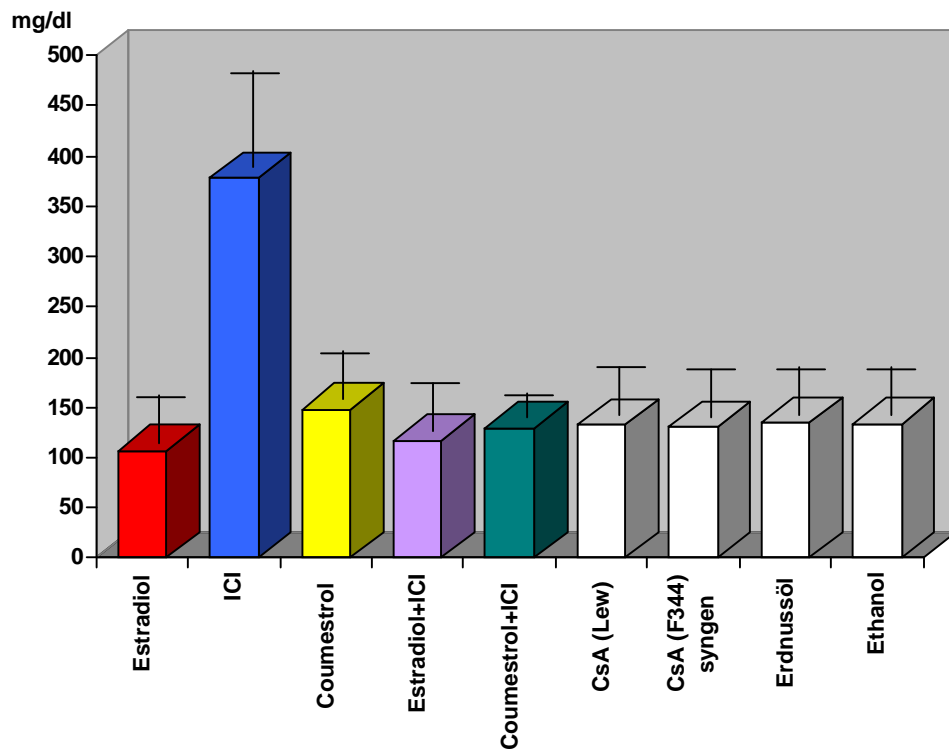


Abb. 28: Triglyceride (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

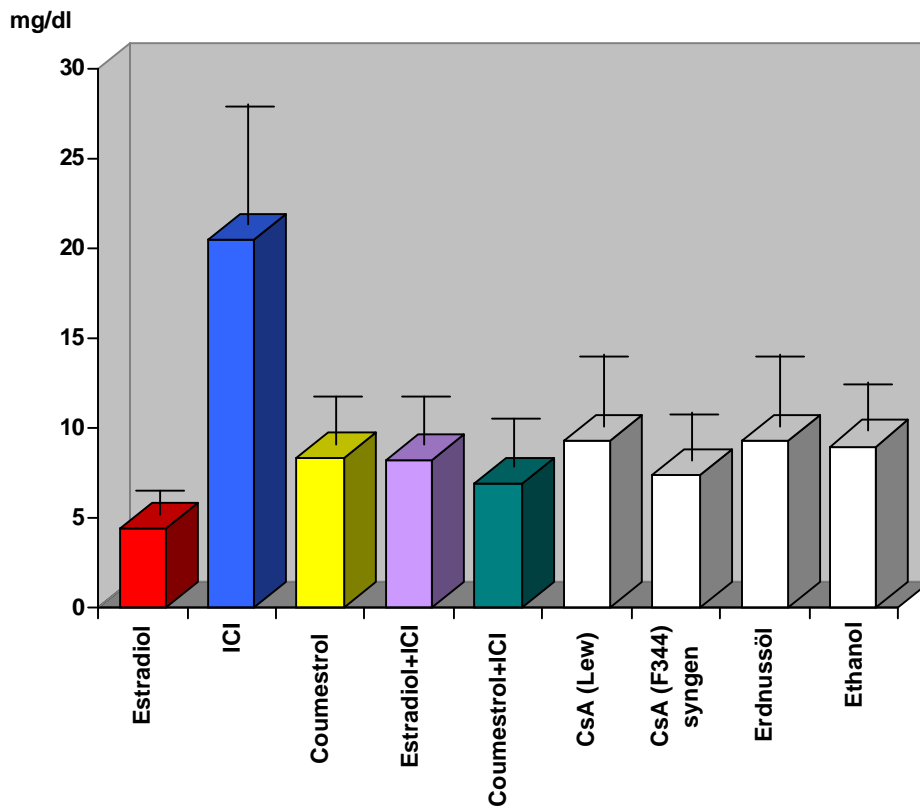


Abb. 29: LDL-Cholesterin (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

Bei den HDL-Cholesterinwerten (Abb. 30) sind keine signifikanten Ergebnisse zu beobachten. Es ist die Tendenz zu erkennen, dass die Coumestrol-Gruppe die höchsten HDL-Werte aufweist ( $p=0.08$ ).

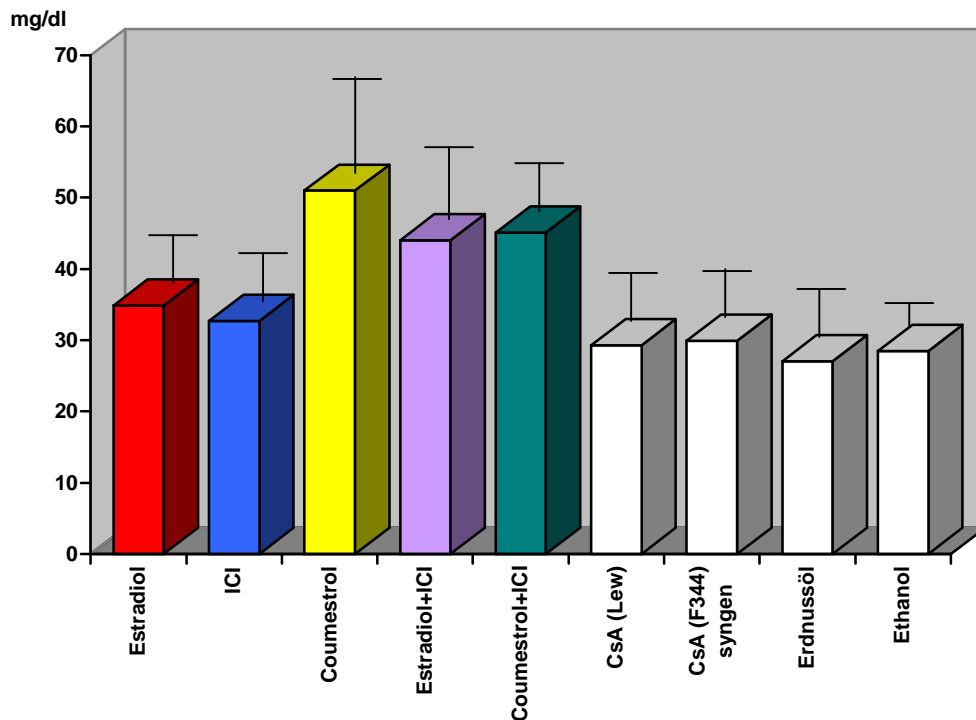


Abb. 30: HDL-Cholesterin (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

## HISTOLOGIE

Durch die *H.E.-Färbung* werden Degenerationen und Atrophien der Muskulatur sowie Infarktareale sichtbar. Infiltrate zeichnen sich durch intensive blaue Kernfärbungen der vermehrten Zellpopulationen ab. Diese Färbung liefert eine gute Übersicht über Gewebsstrukturen des Myokards und der Gefäße. Außerdem können perivaskuläre Fibrosen und Ödeme beurteilt werden.

Die nativen Herzen aller Tiere weisen keine pathologischen Veränderungen auf. Je nach Versuchsgruppe erkennt man bei den allogenen Transplantaten eine durchbrochene Lamina elastica interna und neointimale Zellproliferation. Bei einigen Gefäßen ist eine verstärkte perivaskuläre Fibrosierung nachweisbar.



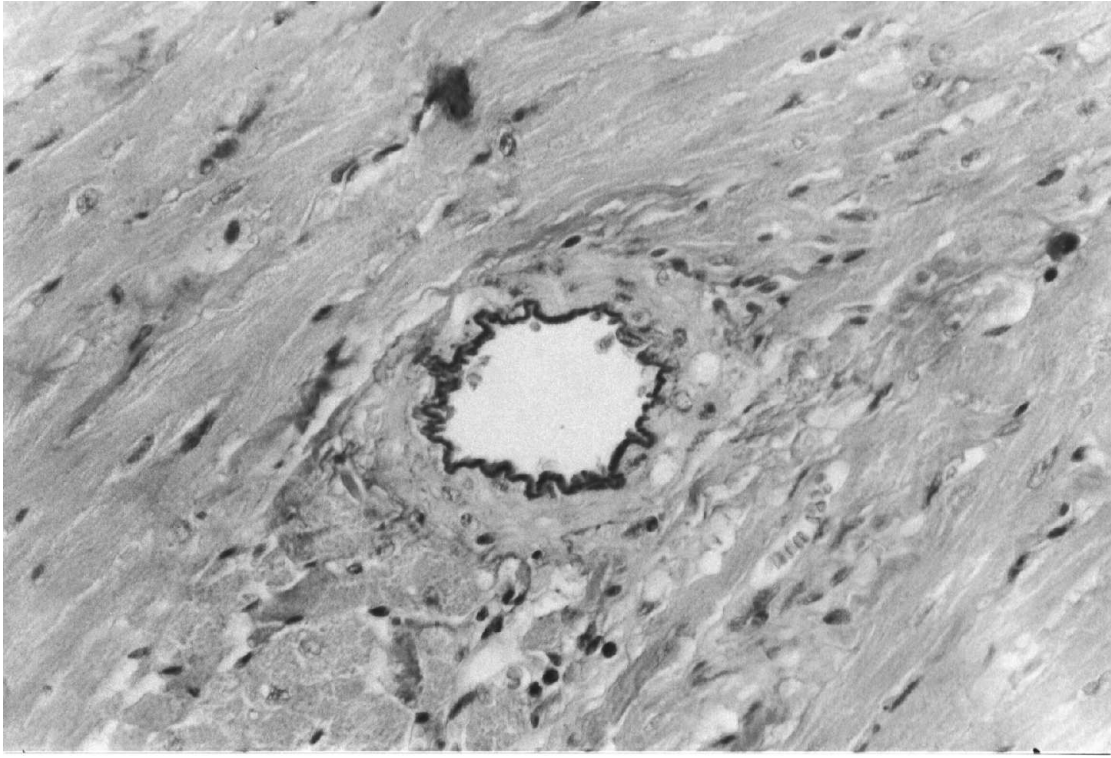
Bei syngenem Transplantat weisen die Gefäßwände keine Verdickung auf, ihre Struktur ist klar erkennbar. Das Myokard unterliegt jedoch vergleichbaren Veränderungen wie bei den allogenen Transplantaten, es wirkt aufgelockert und atrophisch.

Wandverdickungen und Lumenobstruktionen können in der H.E.-Färbung nur abgeschätzt werden. Für die Quantifizierung der Lumenobstruktion wurde die *Elastica-Van Gieson-Färbung* herangezogen. Die Lamina elastica interna der Gefäße wird durch eine kräftige Braunfärbung einerseits von ihren umgebenden Strukturen deutlich abgrenzbar, andererseits in ihrer Integrität beurteilbar. Bereits geringgradige Lumenobstruktionen können durch eine Zellvermehrung jenseits der Lamina eindeutig als solche erkannt werden. Unterbrechungen oder Verschmälerungen der Lamina verdeutlichen die verstärkte Immigration medialer Zellen in die Intima.

## **PLANIMETRIE**

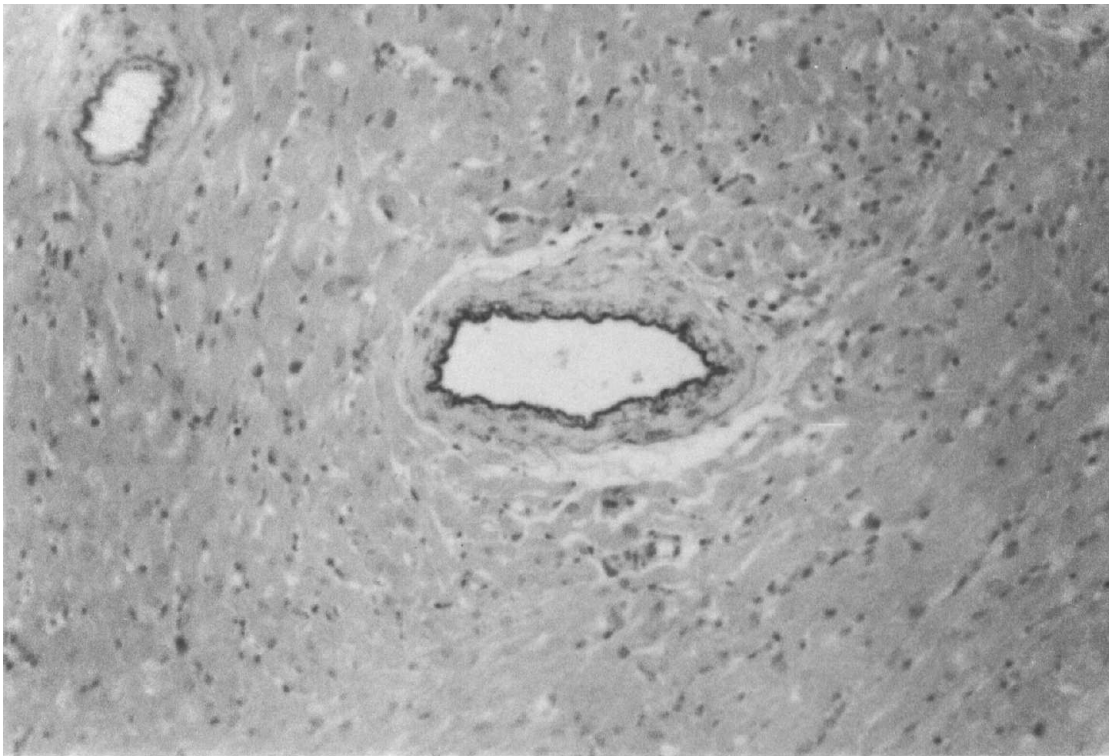
Die Lumenobstruktion ist ein Charakteristikum der chronischen Transplantatvaskulopathie. Um die Lumenobstruktion der intramyokardialen Gefäße quantitativ zu erfassen wurden Fotos von histologischen Schnitten in der *Elastica-van Gieson-Färbung* dieser Herzen in den Computer eingescannt. Es wurde der Anteil des im Schnitt sichtbaren ehemaligen Gefäßlumens errechnet, um den das Gefäß durch neointimale Zellansiedlungen eingeengt wurde.

Abbildung 31 zeigt ein Gefäß der syngenem Kontrollgruppe: Da bei der Transplantation von F344 auf F344 die Tiere in sowohl allen MHC Klasse II-Loci als auch in allen Klasse I-Loci und Non-MHC-Loci übereinstimmen, kann ein Gefäßschaden nicht immunologisch entstanden sein, sondern ist die Folge des Reperfusionsschadens. Abbildung 31 zeigt eine deutlich braun gefärbte Lamina elastica interna, die von den umgebenden Strukturen deutlich abgrenzbar ist und keine Unterbrechungen aufweist. Eine neointimale Proliferation, die sich lumenwärts zeigen würde, ist nicht nachweisbar. Ebenso lässt sich keine Wandverdickung nachweisen. Es sind keine morphologischen Zeichen einer chronischen TVP in diesem, wie auch in allen anderen Präparaten der syngenem Gruppe, vorhanden.



**Abb. 31: EVG- Färbung (Vergr. 400 $\times$ ) / syngene Kontrollgruppe (SO 21)**

Demgegenüber wird bei den übrigen Gruppen, bei denen Lew auf F344 transplantiert wurde, eine mehr oder weniger stark ausgeprägte TVP erwartet.



**Abb. 32: EVG-Färbung (Vergr. 400x) / Estradiol-Gruppe (SO 40)**

Abbildung 32 zeigt zwei Gefäße der Estradiol-Gruppe. Zentral liegt ein noch völlig intaktes Gefäß mit klar abgrenzbarer Lamina elastica interna ohne Lumenobstruktion. Das etwas kleinere Gefäß links im Bild weist zwar ebenfalls eine intakte braun gefärbte Lamina elastica interna auf, allerdings ist bei genauerer Betrachtung eine diskrete konzentrische neointimale Proliferation zu erkennen.

Diese morphologische Gegebenheit ist charakteristisch für die Estradiol-Gruppe: Neben völlig intakten Gefäßen liegen auch Gefäße, die leichte Veränderungen im Sinne einer Lumenobstruktion aufweisen, bei meist intakter Lamina elastica interna. Insgesamt ist die chronische TVP jedoch wesentlich milder ausgeprägt als bei den Gruppen 2, 4, 5, 6, 7 und 8.

Abbildung 33 zeigt ein repräsentatives Gefäß der Gruppe 2 (ICI-Gruppe) mit einer vielfach unterbrochenen Lamina elastica interna. Sehr ausgeprägt und deutlich zu erkennen ist die neointimale Proliferation mit Lumenobstruktion. Dieses morphologische Zeichen der chronischen TVP ist bei der Mehrzahl der Gefäße aus der ICI-Gruppe zu beobachten. Typisch ist auch die Wandverdickung des Gefäßes.

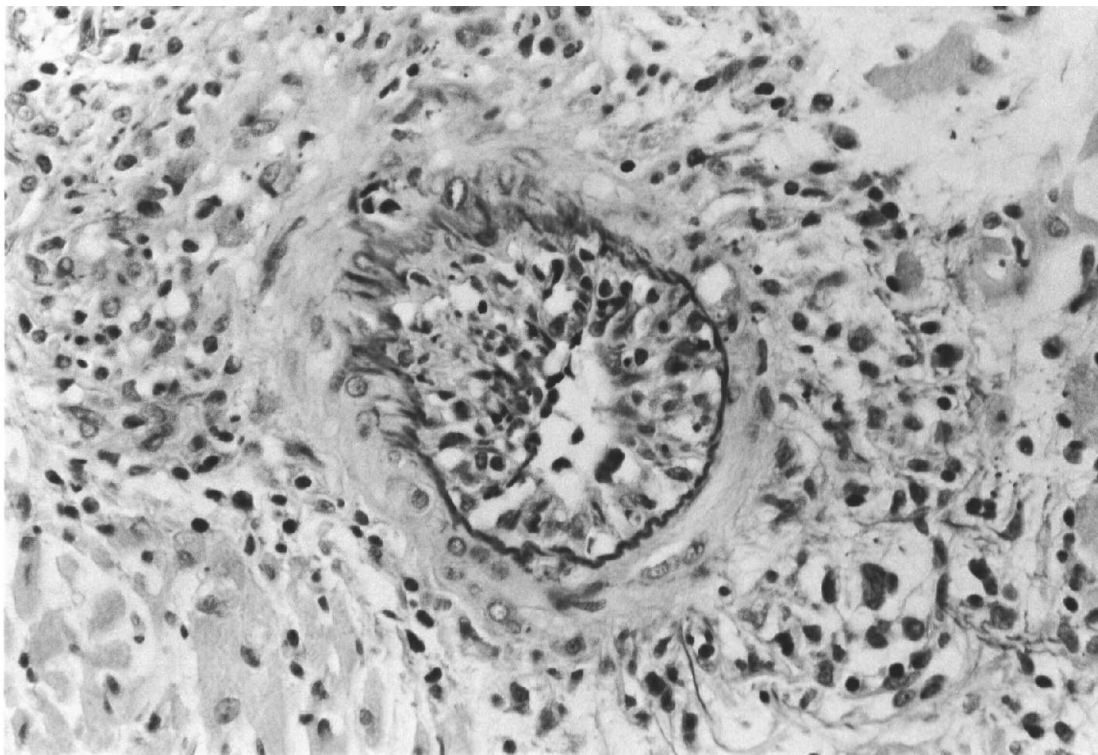
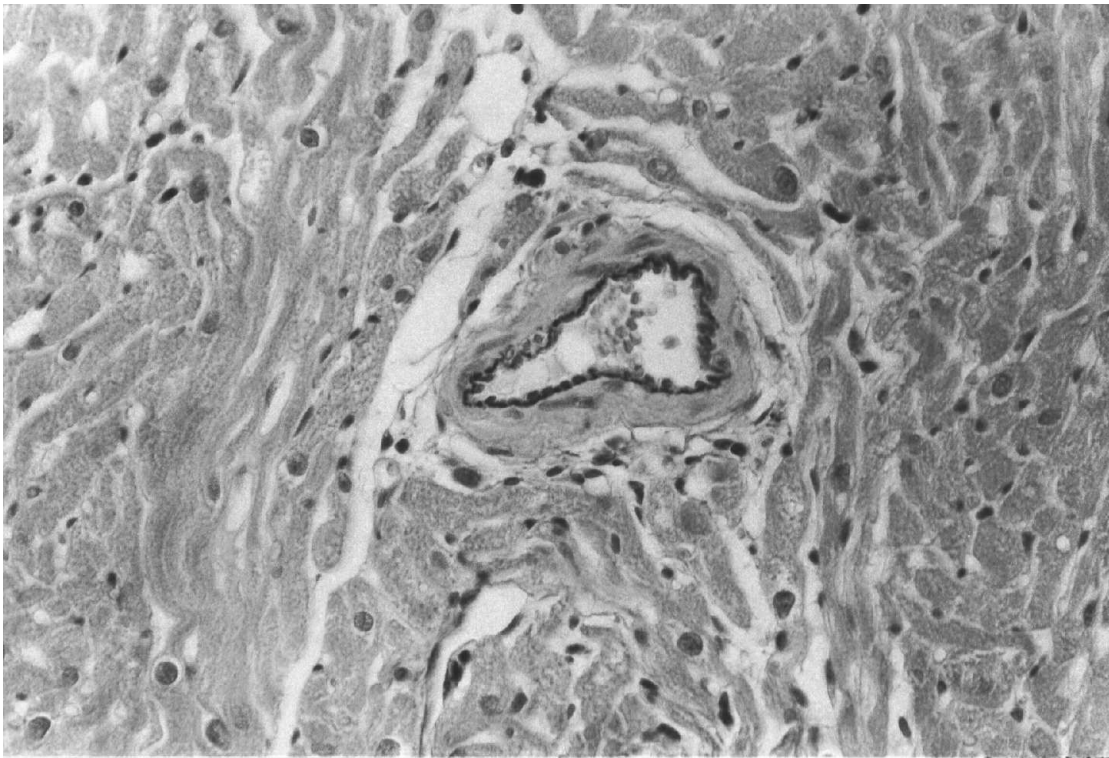


Abb. 33: EVG-Färbung (Vergr. 400 $\times$ ) / ICI-Gruppe (SO 26)

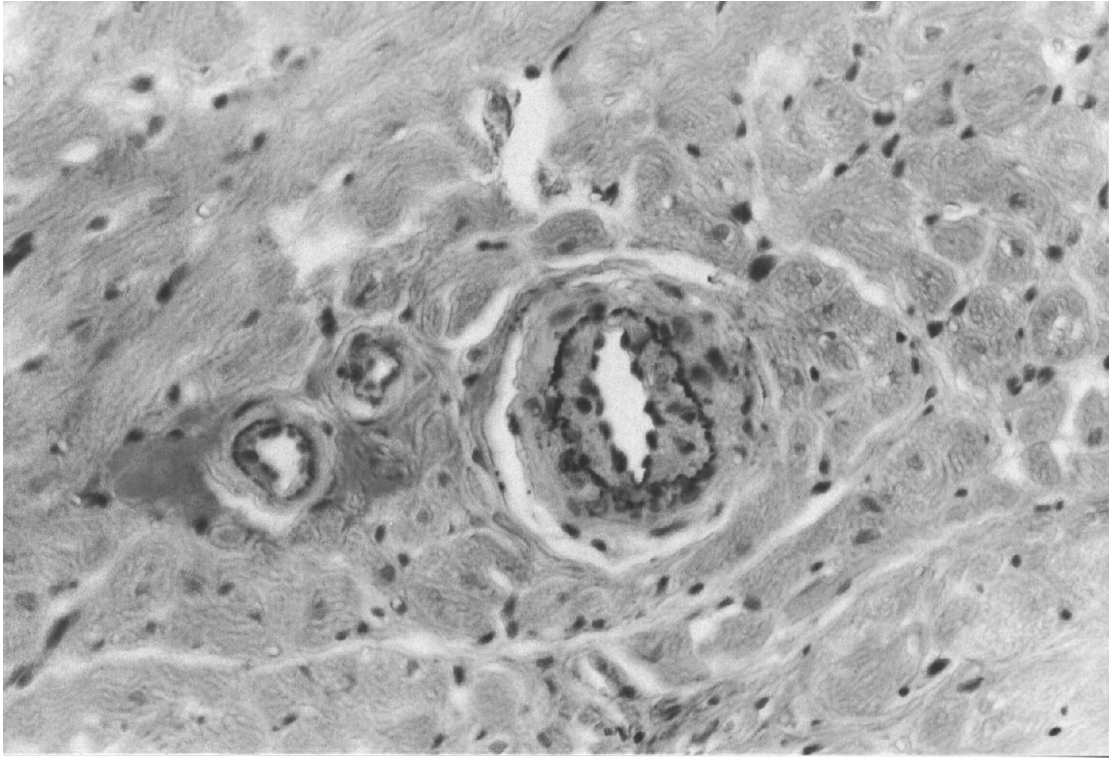
In Abbildung 34 ist ein Gefäß der Tiere abgebildet, die Coumestrol (= Phytoestrogen) bekamen.



**Abb. 34: EVG-Färbung (Vergr. 400 $\times$ ) / Coumestrol-Gruppe (SO 55)**

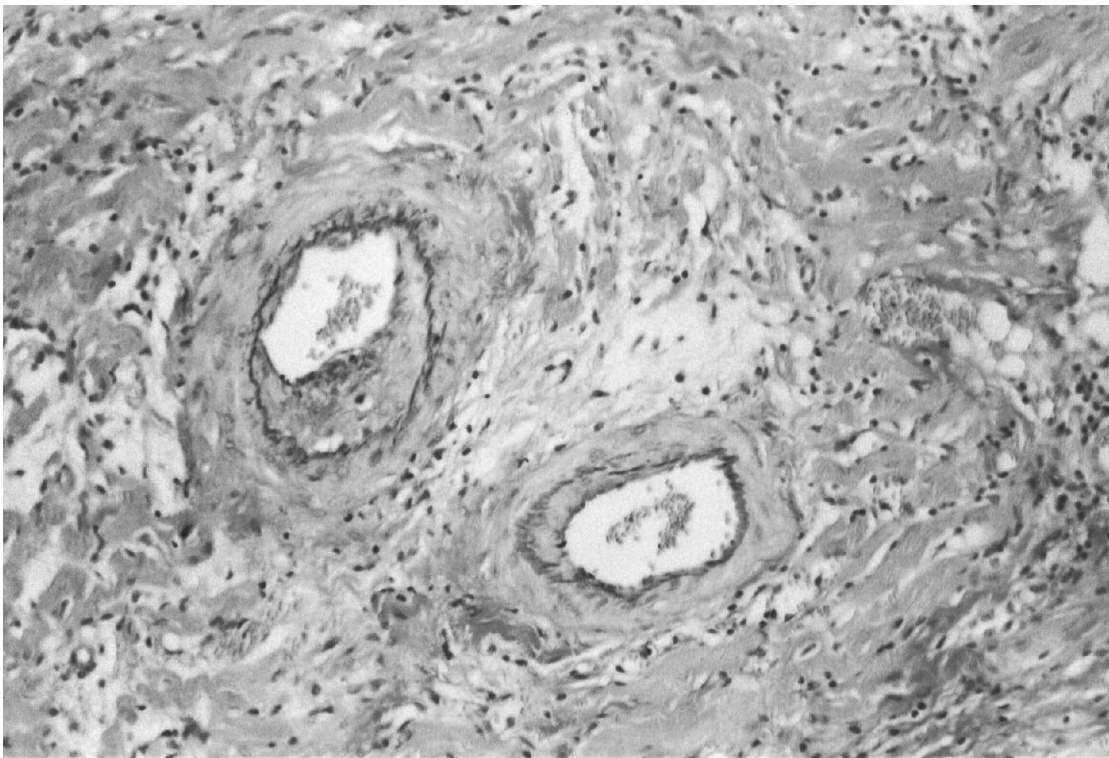
Die Wandstruktur ist klar erkennbar, das Gefäß ist nicht verändert und es gibt keine Zeichen einer neointimalen Proliferation oder Lumenobstruktion. Der Zustand der Gefäße dieser Gruppe ist vergleichbar mit den Gefäßen der Estradiol-Gruppe. Meist ist eine nur sehr diskret ausgebildete TVP erkennbar, die Lamina elastica interna zeigt sich fast immer intakt und die Gefäßwand zeigt keine Veränderungen im Sinne einer TVP.

Die Gefäße in der „Estradiol + ICI“-Gruppe sehen morphologisch wie in Abb. 35 aus: Alle drei Gefäße zeigen eine fortgeschrittene Lumenobstruktion, das ursprüngliche Lumen wird durch die Lamina elastica interna angedeutet, die teilweise unterbrochen ist. Es handelt sich morphologisch um ein fortgeschrittenes Stadium der chronischen TVP.



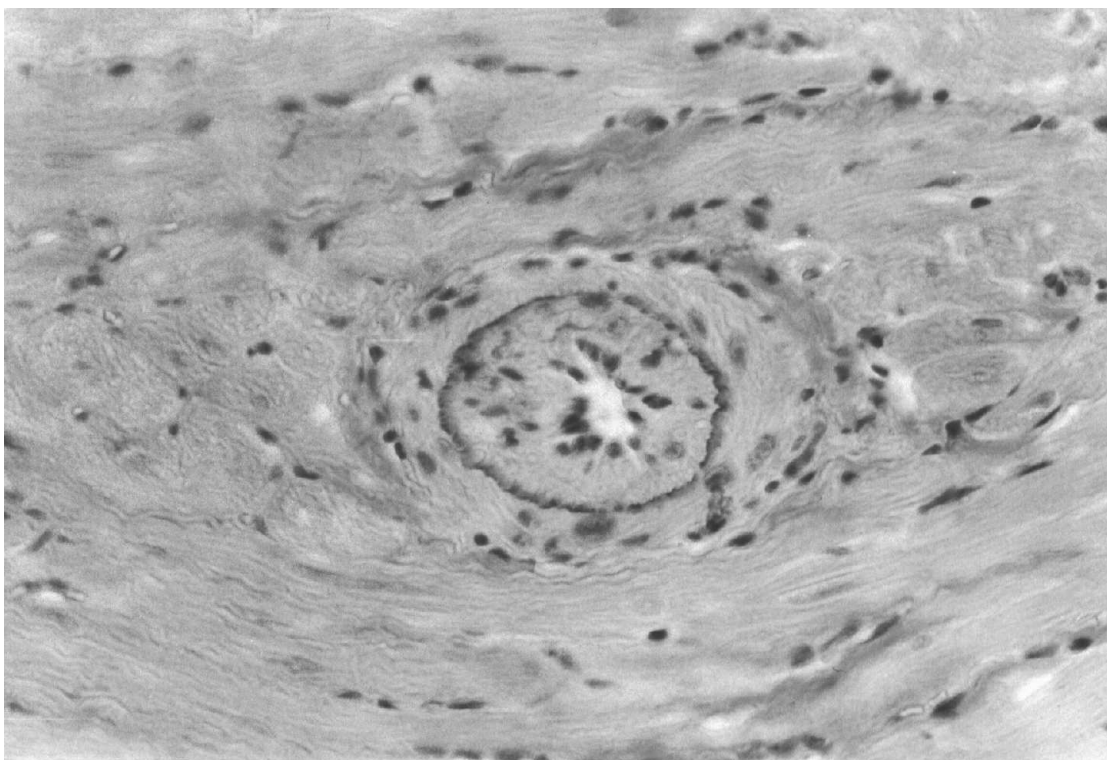
**Abb. 35: EVG-Färbung (Vergr. 400x) / Estradiol+ICI-Gruppe (SO 39)**

Vergleichbares zeigt sich in der Coumestrol+ICI-Gruppe: Die Gefäße zeigen eine ausgeprägte Wandverdickung und oftmals eine durchbrochene Lamina elastica interna. Das Lumen ist deutlich verengt (s. Abb. 36).



**Abb. 36: EVG-Färbung (Vergr. 400x) / Coumestrol+ICI-Gruppe (SO 72)**

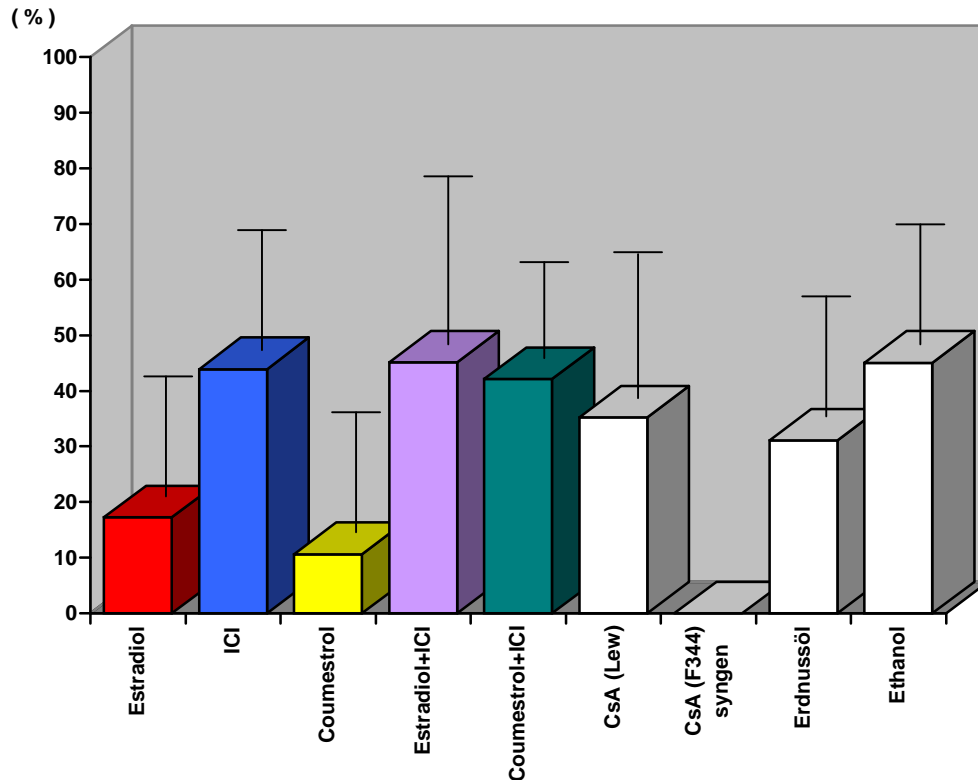
Bei der CsA-Gruppe, die als Kontrollgruppe dient, ist nach 150 Tagen eine deutlich ausgeprägte TVP zu beobachten. In Abbildung 37 ist ein repräsentatives Gefäß dieser Gruppe dargestellt, das eine klar erkennbare Wandverdickung und ein stark verengtes Lumen zeigt. Die restlichen Kontrollgruppen - Erdnussöl und Ethanol - zeigen ebenfalls eine TVP, die vergleichbar stark ausgeprägt ist wie die TVP der CsA-Gruppe. Das Aussehen der Gefäße der Kontrollgruppen entspricht dem gezeigten Gefäß in Abbildung 37: Es sind deutlich morphologische Zeichen der TVP vorhanden, es dominiert eine neointimale Proliferation lumenwärts der Lamina elastica interna, woraus eine deutliche Lumenobstruktion resultiert.



**Abb. 37: EVG-Färbung (Vergr. 400 $\times$ ) / CsA-Gruppe (SO 5)**

Damit objektive Aussagen über das Ausmaß der Transplantatvaskulopathie der einzelnen Versuchsgruppen gemacht werden können, wurden die Elastica-van Giesson-Präparate planimetrisch ausgewertet: Alle Gefäße die im Querschnitt getroffen waren wurden fotografiert und eingescannt. Computergestützt konnten die Flächen des aktuellen bzw. des ursprünglichen Lumens gemessen und die Gefäßobstruktion genau berechnet werden. Abbildung 38 zeigt die Mittelwerte der Gefäßobstruktionen für jede einzelne Gruppe: Es ist zu sehen, dass die Gefäße der syngenen Gruppe keine

messbaren Obstruktionen aufweisen. Dies war zu erwarten, weil die Empfängertiere dem gleichen Stamm angehörten wie die Spendertiere (F344→F344).



**Abb. 38: Gefäßobstruktion** (Mittelwerte ± Standardabweichung)

Die CsA-Kontrollgruppe (Gruppe 6) zeigt die chronische TVP, die sich innerhalb von 150 Tagen bei der Stammkombination Lew→F344 bildet, wenn die Tiere 14 Tage lang post OP nur mit CsA behandelt wurden. Vergleicht man die Gruppen Estradiol+ ICI, Coumestrol+ICI, CsA, Erdnussöl und Ethanol miteinander so wird deutlich, dass sie sich bezüglich des Ausmaßes der TVP nicht signifikant unterscheiden ( $p=0.55$ ). Auch die mit dem Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI behandelte Gruppe zeigt eine vergleichbar starke Obstruktionen der Gefäße ( $p= 0.66$ ).

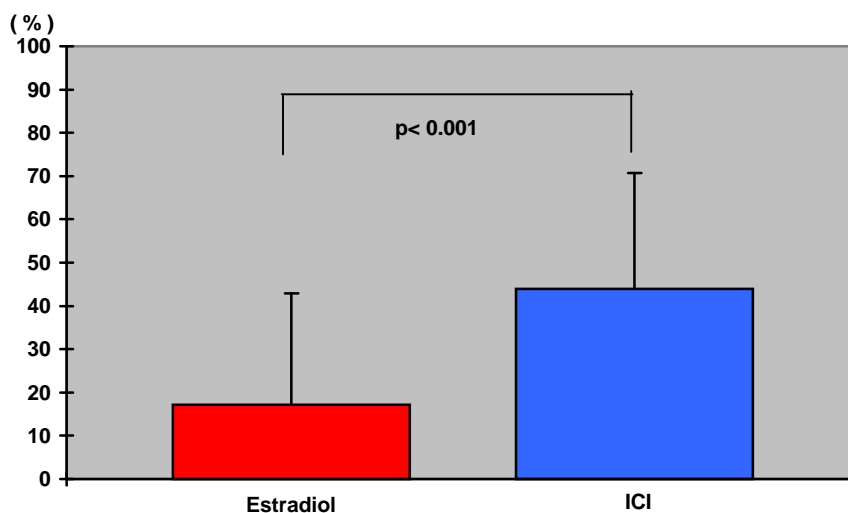
Auffällig ist, dass die Obstruktionen der Estradiol- bzw. Coumestrol-Gruppe deutlich weniger stark ausgeprägt sind als die der anderen Gruppen. Die Lumenobstruktion der

Estradiol-Gruppe ist signifikant ( $p < 0.002$ ) geringer ausgeprägt als die Obstruktionen der sechs anderen Gruppen (ICI, Estradiol+ICI, Coumestrol+ICI, CsA, Erdnussöl, Ethanol). Ebenso zeigt die Coumestrol-Gruppe eine signifikant mildere Ausprägung der TVP ( $p < 0.001$ ) als die sechs oben aufgeführten Gruppen.

Zwischen den beiden Gruppen „Estradiol“ und „Coumestrol“ besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich der Gefäßobstruktion. Die Tiere entwickelten eine vergleichbar gering ausgeprägte Lumenobstruktion.

In beiden Ergänzungsgruppen Estradiol+ICI und Coumestrol+ICI ist die TVP vergleichbar stark ausgeprägt wie in der ICI-Gruppe. Der „vasoprotektive“ Effekt, der in der Estradiol- bzw. Coumestrol-Gruppe zu sehen war, ist nicht vorhanden.

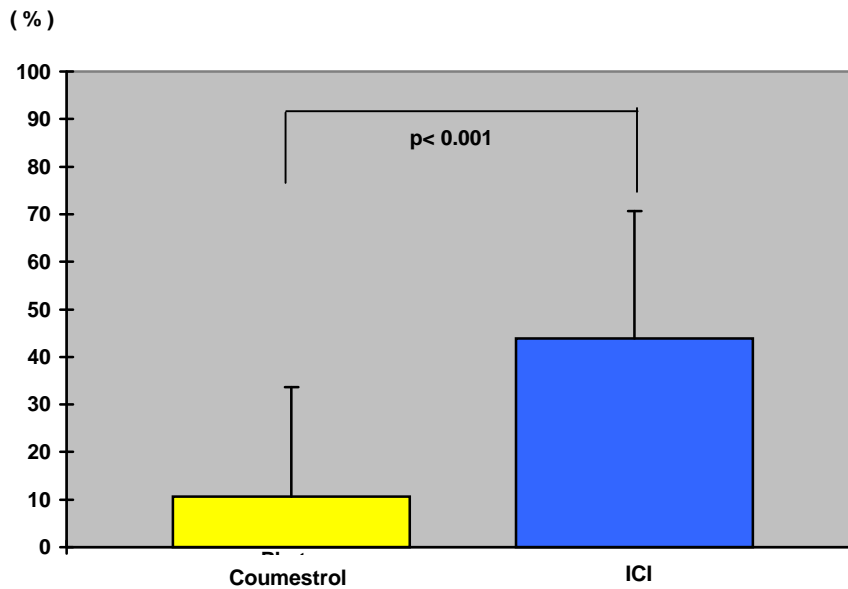
Da in dieser Arbeit geprüft werden sollte, ob sich die chronische TVP durch eine Estradiol- bzw. aufgehobene Estradiolwirkung unterschiedlich entwickelt, wurde die Estradiol-Gruppe isoliert mit der Gruppe, die den Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI gespritzt bekam, verglichen. In Abbildung 39 ist zu sehen, dass die statistische Prüfung die Beobachtungen der histologischen Bilder (Abb. 32 und 33) bestätigt: Die Estradiol-Gruppe zeigt eine signifikant geringer ausgeprägte Lumenobstruktion ( $p < 0.001$ ).



**Abb. 39: Gefäßobstruktion der Estradiol- und ICI-Gruppe**  
(Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)



Abbildung 40 zeigt, dass die Lumenobstruktion der Coumestrol-Gruppe ebenfalls signifikant milder ausgeprägt ist als in der ICI-Gruppe ( $p < 0.001$ ).



**Abb. 40: Gefäßobstruktion der Coumestrol- und ICI-Gruppe**  
(Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

Da Coumestrol für die Applikation mit Erdnussöl und Ethanol gemischt werden musste, ist der beobachtete vasoprotektive Effekt nicht eindeutig auf die Reinsubstanz Coumestrol zurückzuführen. Deshalb wurden die Gefäßobstruktionen der Erdnussöl- bzw. Ethanol-Gruppe mit den Ergebnissen der Coumestrol-Gruppe verglichen. Die Lumenobstruktion der Erdnussöl- bzw. Ethanol-Gruppe war signifikant stärker ausgeprägt als in der Coumestrol-Gruppe ( $p < 0.001$  bzw.  $p < 0.002$ ). Durch Ausschluss eines protektiven Effekts der Trägersubstanzen Erdnussöl und Ethanol kann die beschriebene Wirkung der Reinsubstanz Coumestrol zugeschrieben werden.

Zusammenfassend hat sich die chronische TVP sowohl in der Estradiol-, als auch in der Coumestrol-Gruppe gleichermaßen gering entwickelt, während sie in allen anderen allogenen Gruppen signifikant stärker ausgeprägt war.

## IMMUNHISTOCHEMIE

Die *immunhistochemischen Färbungen* mit Antikörpern gegen verschiedene Epitope relevanter, immunkompetenter Zellen dienten zur Identifizierung der verschiedenen Entzündungszellpopulationen im entzündlichen Infiltrat. Damit konnten neben der

Aussage über die Stärke und die Lokalisation der Entzündungsreaktion auch Aussagen über die Zusammensetzung des Infiltrats gemacht werden.

Mit immunhistochemischen Färbungen lassen sich auch in gesunden Herzen vereinzelt Entzündungszellen nachweisen: Makrophagen, CD4-positive und CD8-positive T-Lymphozyten, MHC-II- und ICAM-1-exprimierende Zellen.

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate ergab die in Tabelle 2 gezeigten Mittelwerte. Die myointimale MHC-II-Expression war in der 17- $\beta$ -Estradiol- und Coumestrol-Gruppe vergleichbar mild ausgeprägt wie in der syngenen Gruppe. Im Gegensatz hierzu war die MHC-II-Expression in der Myointima der anderen Gruppen signifikant erhöht ( $p < 0.002$ ). Die Infiltratdichte von ED1-positiven Makrophagen und CD8-positiven Lymphozyten (*Suppressor+zytotoxische Lymphozyten*) war sowohl in der 17- $\beta$ -Estradiol- als auch in der Coumestrol-Gruppe signifikant erniedrigt, nicht jedoch die der CD4-positiven Lymphozyten (*T-Helferzellen*) ( $p < 0.001$ ).

Alle beschriebenen Beobachtungen unter 17- $\beta$ -Estradiol- bzw. Coumestrol-Gabe konnten durch Zugabe des Rezeptorblockers ICI aufgehoben werden (s. Tabelle 2: Gruppen 4 und 5).

Gruppe	n	Medikation	MHC-II	ED1	CD4	CD8	ICAM-1
1	7	Estradiol	0.5 ± 0.5 <b>p&lt;0.001</b>	0.3 ± 0.5 <b>p&lt;0.001</b>	1.4 ± 0.5 <b>n.s.</b>	0.6 ± 0.5 <b>p&lt;0.001</b>	0.8 ± 0.5 <b>p&lt;0.002</b>
2	6	ICI	2.3 ± 0.4	1.5 ± 0.5	2.3 ± 0.4	2.2 ± 0.4	1.5 ± 0.4
3	8	Coumestrol	0.8 ± 0.4 <b>p&lt;0.001</b>	0.7 ± 0.5 <b>p&lt;0.001</b>	1.8 ± 0.5 <b>n.s.</b>	0.8 ± 0.4 <b>p&lt;0.001</b>	0.8 ± 0.5 <b>p&lt;0.002</b>
4	8	Estradiol+ICI	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.5	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.5	1.8 ± 0.5
5	8	Coumestrol+ICI	2.5 ± 0.9	1.2 ± 0.8	2.0 ± 0.5	1.6 ± 0.9	2.1 ± 0.8
6	11	Kontrolle	2.6 ± 0.7	1.5 ± 0.5	2.2 ± 0.9	2.3 ± 0.8	2.5 ± 0.5
7	7	syngen	0.8 ± 0.3	0	1.1 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5
8	8	Erdnussöl	2.6 ± 0.5	1.3 ± 0.8	1.6 ± 0.5	1.3 ± 0.5	2.5 ± 0.5
9	3	Ethanol	1.7 ± 0.6	1.3 ± 0.6	1.0 ± 0	1.3 ± 0.6	2.0 ± 0.5

**Tabelle 2: Immunhistochemische Auswertung** (Mittelwerte ± Standardabweichung)/ Für den Vergleich wurde als statistischer Test die Varianzanalyse ANOVA mit anschließendem LSD postHoc-Test durchgeführt, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von < 0.05 als signifikant erachtet wurde/ Bestimmung der Infiltratdichte anhand einer Skala von 0 bis 4 (0=negativ/1=mild/2=moderat/ 3=ausgeprägt/4=schwer)

ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das bei der Zell-Zell-Interaktion eine große Rolle spielt. Hierdurch können sich Entzündungszellen an das Endothel anheften. Die Expression von ICAM-1 war in beiden Estrogen-Gruppen signifikant geringer als in den anderen Gruppen (ausgenommen die syngene Kontrollgruppe, die ebenfalls eine niedrige Expression zeigte) ( $p < 0.002$ ). Durch zusätzliche Gabe von ICI konnte die beschriebene Wirkung von 17- $\beta$ -Estradiol bzw. Coumestrol nicht mehr beobachtet werden.

Zusammenfassend haben die immunhistochemischen Färbungen gezeigt, dass die myointimale MHC-II- und ICAM-1-Expression durch Estrogengabe (17- $\beta$ -Estradiol und Coumestrol) signifikant geringer ausgeprägt war. Ebenso die Infiltratdichte an ED1-positiven Makrophagen und CD8-positiven Lymphozyten, nicht jedoch die der CD4-positiven Lymphozyten. Alle beschriebenen Wirkungen der Estrogene konnten durch Zugabe des Rezeptorblockers ICI aufgehoben werden.

## 4. DISKUSSION

Die chronische Transplantatvaskulopathie ist die Hauptursache des Transplantatversagens nach dem ersten postoperativen Jahr nach Herztransplantation und Inhalt weltweiter Forschungsbemühungen (Adams et al., 1993; Billingham et al., 1994; Haverich et al., 1994). Als initiale Veränderung bei der Transplantatvaskulopathie wird eine immunologisch vermittelte zelluläre und humorale Endothelschädigung in einem Milieu zusätzlicher nichtimmunologischer Risikofaktoren angenommen (Crisp et al., 1994; Dong et al., 1996; Lowry et al., 1993). Adhäsionsmoleküle exprimierende Endothelzellen, proliferierende glatte Muskelzellen, aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten reagieren auf eine Vielzahl stimulatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren und setzen somit die primär immunologisch bedingte Endothelschädigung in eine chronische Entzündung im Sinne eines „response to injury“ um (Meiser et al., 1997). Durch die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen sowie durch Bildung einer interzellulären Matrix wird eine fortschreitende Intimaproliferation induziert (Cramer et al., 1992; Cunningham et al., 1994; Koskinen et al., 1997; Salomon et al., 1991; Tilney et al., 1989). Ebenso spielt der Ischämie-Reperfusionsschaden eine wichtige Rolle, da er eine frühe Endotheldysfunktion induziert. Es resultiert ein Ungleichgewicht der antithrombotischen und antiproliferativen Komponenten. Hierbei scheint freien Sauerstoffradikalen und anderen aggressiven Mediatoren (Proteasen, Zytokine, Eicosanoide) mit konsekutiver Aktivierung und Adhäsion zirkulierender Leukozyten eine zentrale Bedeutung zuzukommen (Chilian et al., 1993; Libby et al., 1989).

Um die Entwicklung der TVP zu untersuchen, kommen Kleintiermodelle - insbesondere Rattenmodelle - zur Anwendung. Der Nachteil des bei Ono und Lindsey weder druck- noch volumenbelasteten Herzens wurde durch die Modifikation nach Yokoyama gemindert und damit das Modell der realen Belastung des Transplantats angenähert (Yokoyama et al., 1995). Dieses Modell bildet die Grundlage dieser Arbeit, deren Anliegen es ist, den Einfluss von estrogenen Substanzen auf die Entwicklung der TVP zu untersuchen.

Seit 1884 gelten Estrogene als vasoprotektive Substanzen (MacKenzie et al., 1884). Seither haben zahlreiche hämodynamische und pharmakologische Studien diese Aussage überprüft. Den ersten Beweis, dass Estrogene im kardiovaskulären System die Transkription der Genexpression regulieren, erbrachten Horwitz et al.. Sie zeigten, dass radioaktiv markiertes 17- $\beta$ -Estradiol spezifisch an Aortengewebe bindet (Horwitz et al., 1982). 1994 wurde gezeigt, dass menschliche glatte Muskelzellen funktionstüchtige Estrogenrezeptoren exprimieren

(Karas et al., 1994), drei Jahre später wurden Estrogenrezeptoren in Kardiomyozyten und Fibroblasten nachgewiesen (Grohe et al., 1997).

Wir haben 150 Tage nach Herztransplantation die Lumenobstruktion als Charakteristikum der chronischen Transplantatvaskulopathie unter Gabe estrogener Substanzen planimetrisch untersucht. Die Gefäße der 17- $\beta$ -Estradiol- bzw. Coumestrol-Gruppe weisen leichte Veränderungen im Sinne einer Lumenobstruktion auf, bei meist intakter Lamina elastica interna. Insgesamt ist die chronische TVP signifikant milder ausgeprägt als bei den anderen Gruppen (ICI, Estradiol+ICI, Coumestrol+ICI, CsA (allogen), Erdnussöl und Ethanol). Fehlt die Behandlung mit estrogenen Substanzen, zeigt sich in der EVG-Färbung eine vielfach unterbrochene Lamina elastica interna mit ausgeprägter neointimaler Proliferation und daraus resultierender Lumenobstruktion. Da Coumestrol für die Applikation mit Erdnussöl und Ethanol gemischt werden musste, wurde geprüft, ob der beobachtete vasoprotektive Effekt auf die Reinsubstanz Coumestrol zurückzuführen ist. Die Lumenobstruktion der Erdnussöl- bzw. Ethanol-Gruppe ist signifikant stärker ausgeprägt als in der Coumestrol-Gruppe, ein protektiver Effekt der Trägersubstanzen Erdnussöl und Ethanol kann somit ausgeschlossen werden. Die beschriebene Wirkung kann somit der Reinsubstanz Coumestrol zugeschrieben werden.

Durch Zugabe des Estrogen-Rezeptorblockers ICI kann die Wirkung von 17- $\beta$ -Estradiol bzw. Coumestrol auf die Entwicklung der TVP aufgehoben werden. Dementsprechend scheint die Wirkung auf die Gefäße sowohl von 17- $\beta$ -Estradiol als auch von Coumestrol rezeptorabhängig zu sein, weil ihr erzielter Effekt mit ICI zu antagonisieren ist. Ebenfalls rezeptorvermittelt muss die Wirkung von 17- $\beta$ -Estradiol auf den Uterus sein, da die signifikante Größenzunahme bei alleiniger 17- $\beta$ -Estradiol-Gabe durch zusätzliche Gabe des Estrogenrezeptorantagonisten ICI nicht beobachtet wird. Obwohl durch Coumestrol-Gabe die Entwicklung der TVP ebenso signifikant vermindert ist wie durch Gabe von 17- $\beta$ -Estradiol, unterscheiden sich ihre Wirkungen auf den Uterus signifikant voneinander. Nur 17- $\beta$ -Estradiol bewirkt eine signifikante Größen- und Gewichtszunahme des Uterus. Der Uterus der Coumestrol-Gruppe zeigt keine Größen- bzw. Gewichtszunahme, obwohl Coumestrol ebenfalls den Estrogenrezeptor aktiviert. Dies bestätigt die Tatsache, dass es zwei verschiedene Estrogenrezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten für die verschiedenen Estrogene geben muss. Diese Vermutung wurde erstmals 1997 von Kuiper et al. beschrieben, die in ihrer Arbeit zeigten, dass zwei Estrogenrezeptoren (ER) existieren, ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  (Kuiper et al., 1997). Diese Rezeptoren sind in den verschiedenen Geweben unterschiedlich verteilt. Da am Uterus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren vergleichbar hoch exprimiert werden, aber (wie

gezeigt) nur 17- $\beta$ -Estradiol eine Größenzunahme bewirkt, hat eine Aktivierung des ER- $\beta$  vermutlich andere Folgen als die des ER- $\alpha$ . Die Studie von Kuiper et al. zeigte außerdem, dass die zwei Rezeptorsubtypen  $\alpha$  und  $\beta$  unterschiedliche Affinitäten für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen haben. Für die Bindungsaffinität des ER- $\alpha$  gilt 17- $\beta$ -Estradiol > Coumestrol > ICI. ER- $\beta$  zeigt folgende Reihenfolge: Coumestrol > ICI > 17- $\beta$ -Estradiol. 17- $\beta$ -Estradiol bindet somit stärker an den  $\alpha$ -Rezeptor, während Coumestrol eine höhere Bindungsaffinität zu  $\beta$ -Rezeptoren zeigt. Diese beschriebenen Unterschiede zwischen den beiden ER-Subtypen hinsichtlich ihrer relativen Liganden-Bindungsaffinität und ihrer unterschiedlichen Verteilung im Gewebe könnten ein wichtiger Grund für die selektive Wirkung von Estrogen-Agonisten und -Antagonisten in verschiedenen Geweben sein. Eine neue Studie wirft die Frage auf, ob 17- $\beta$ -Estradiol über einen noch nicht identifizierten Rezeptor wirkt (Karas et al., 2001). Karas et al. führten heterotope Herztransplantationen bei ER- $\alpha$ - und ER- $\beta$ -Knockout-Mäusen durch: 17- $\beta$ -Estradiol erhöhte signifikant das Uterusgewicht und inhibierte die Proliferation von glatten Muskelzellen in den Gefäßen. Es gilt zu diskutieren, ob der 17- $\beta$ -Estradiol-Effekt deshalb evtl. rezeptorunabhängig ist oder ob ein noch nicht identifizierter Rezeptor existiert. Hawkins et al. wiesen 2000 erstmals einen dritten Estrogenrezeptor (ER- $\gamma$ ) in einer Krake aus dem Atlantik nach. Phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass der ER- $\gamma$  durch Gen-Duplikation des ER- $\beta$  entsteht. Der dritte Rezeptorsubtyp weist Aminosäurenunterschiede in Regionen auf, die für die Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung wichtig sind (Hawkins et al., 2000). Die Anwesenheit von drei funktionellen Estrogenrezeptoren in einer Spezies erweitert die Wichtigkeit dieser Rezeptoren und lässt ein dynamisches System vermuten. Allerdings ist der Nachweis eines dritten funktionstüchtigen Estrogenrezeptors in Ratten und Menschen bisher nicht erbracht worden. In diesem Kontext fiel uns auf, dass sowohl die Tiere der Estradiol- als auch der Estradiol+ICI-Gruppe signifikant weniger wiegen, im Vergleich mit allen anderen Gruppen. Diese Wirkung wird nicht durch den Estrogen-Rezeptorblocker ICI antagonisiert und kann deshalb nicht über ER- $\alpha$  oder ER- $\beta$  vermittelt worden sein. Es stellt sich die Frage, ob Estradiol diesen beobachteten Effekt rezeptorunabhängig bewirkt oder ob diese Wirkung evtl. über einen noch nicht identifizierten ER-Subtyp vermittelt wird, zu dem 17- $\beta$ -Estradiol eine Affinität besitzt, ICI aber nicht. Dadurch wäre es erklärbar, dass ICI den Estradiol-Effekt nicht aufheben kann.

Estrogene sind Substanzen, die bisher auf die Therapie klimakterischer Beschwerden, die Prävention und Behandlung der Osteoporose und auf gynäkologische Anwendungen beschränkt sind. In der Postmenopause kann eine Estrogentherapie signifikant die

Mineralisierung des Knochens steigern und so die Frakturrate im Alter vermindern (DeGregorio et al., 1998; Fontana et al., 1999; Prelevic et al., 1997; Wenger et al., 1998). Der Mechanismus der Estrogenwirkung auf den Knochen ist nicht vollständig geklärt, allerdings ist bekannt, dass Estrogene direkt auf Knochenzellen wirken, in denen bereits Estrogenrezeptoren identifiziert wurden (Ribot et al., 1997). Estrogene sind in der Lage die Osteoklastengnese zu reduzieren, indem sie die Produktion von Zytokinen (IL, TNF) modulieren und zusätzlich die Wachstumsfaktoren von Knochenmark und Knochenzellen transformieren (Ribot et al., 1997). Außerdem wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass Estrogene einen positiven Effekt auf die kognitive Funktion haben (DeGregorio et al., 1998; Greene et al., 2000; Prelevic et al., 1997). Ribot et al. berichteten 1997 von Studien die gezeigt haben, dass Estrogene einerseits das Risiko an der Alzheimer Krankheit zu erkranken um 50% reduzieren und auf der anderen Seite bei bestehender Alzheimer Krankheit für ein verzögertes Fortschreiten sorgen (Ribot et al., 1997). Die Tatsache, dass Estrogene die Inzidenz von Herzkrankheiten (wie KHK und Myokardinfarkt) bei postmenopausalen Frauen deutlich senken können, ist in zahlreichen Studien gezeigt worden (Calaf et al., 1997; Schurz et al., 1997; Wenger et al., 1998). In diesem Zusammenhang wird immer wieder auf den positiven Einfluss der Estrogene auf das Lipidprofil verwiesen. Bush et al. vermuteten, dass für den kardioprotektiven Effekt einer Estrogen-Substitutionstherapie in der Postmenopause vor allem das erhöhte HDL von Bedeutung ist (Bush et al., 1996). Westerveld et al. zeigten, dass bei postmenopausalen Frauen durch Substitution von 17- $\beta$ -Estradiol die postprandiale HDL-Reduktion verhindert wurde (Westerveld et al., 1998). Die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass Estrogene eine Zunahme des HDL-Cholesterin bewirken, konnte in unserer Arbeit nicht nachvollzogen werden (Oparil et al., 1999). Da 17- $\beta$ -Estradiol und Coumestrol eine deutlich mildere Ausprägung der TVP bewirken, ohne das Lipidprofil signifikant zu beeinflussen, müssen noch andere, sich summierende Faktoren involviert sein. Doch welche Mechanismen dafür verantwortlich sein könnten, bleibt offen.

White et al. sahen den größten Vorteil einer Estrogenbehandlung einerseits in der Regulation der Zellproliferation und andererseits in der verminderten Infiltration von Makrophagen/Monozyten in die Gefäßwand (White et al., 1997). Denn diese Zelltypen spielen bei den sich entwickelnden Läsionen der Gefäßwand eine entscheidende Rolle in der TVP. Oparil et al. beobachteten, dass Estrogene die neointimalen Formationen der Gefäßwand ebenso die Proliferation in der medialen glatten Muskelzellschicht, eine Zellmigration in die Neointima und eine Stimulation des Endothels hemmen (Oparil et al., 1999). Unsere immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen CD8 und



Makrophagen/Monozyten zeigen durch 17- $\beta$ -Estradiol- bzw. Coumestrol-Gabe eine signifikante Verminderung von Suppressor- und zytotoxischen T-Lymphozyten und Makrophagen im Vergleich zu den anderen Gruppen. CD4-positive Zellen (T-Helferzellen) sind nicht signifikant vermindert. Lou et al. bestätigen ebenfalls eine signifikante Reduktion von CD8-positiven T-Lymphozyten nach Estrogen-Gabe. Sie fanden heraus, dass T-Helferzellen (im Gegensatz zu CD8-positiven T-Zellen) keine Estrogenrezeptoren exprimieren und es deshalb zu keiner Suppression der CD4-positiven T-Lymphozyten kommt (Athreya et al., 1993; Lou et al., 1996).

Weiterhin scheinen Estrogene die MHC-II-Expression und somit das Hauptsignal, durch das Blutgefäße des Spenderorgans von Empfängerlymphozyten als fremd erkannt werden, zu vermindern. Da dieser Vorgang das Transplantat zur Zielscheibe für immunologisch vermittelte Schäden macht, wäre diese Beobachtung eine Erklärung für den vermuteten kardioprotektiven Effekt der Estrogene nach Transplantation (Saito et al., 1998). Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikant höhere MHC-II-Expression in den Transplantaten der nicht Estrogen-behandelten Gruppen. Signifikant geringer war die Expression in der syngeneten Gruppe und der 17- $\beta$ -Estradiol- bzw. Coumestrol-Gruppe. In syngeneten Transplantaten ist der Reiz zur MHC-II-Expression nur durch den Ischämie-Reperfusionsschaden zu erklären. Dieser Reiz scheint nach unseren Ergebnissen keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der TVP zu haben. Lou et al. untersuchten den Effekt der chronischen Estradiolbehandlung auf die TVP und Immunogenität nach Herztransplantation bei Kaninchen. Die MHC-II-Expression war nach 6 Wochen in der Estradiol-Gruppe nicht nachzuweisen und die Anzahl der Makrophagen war deutlich vermindert, während die Zahl der T-Zellen unverändert war. Außerdem war die myointimale Proliferation der Estradiol-Gruppe wesentlich geringer ausgeprägt (Lou et al., 1997). Die Expression von MHC-II wird durch verschiedene Stimuli, wie z.B. IFN- $\gamma$  induziert (Saito et al., 1998). Russel et al. zeigten 1994, dass eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen IFN- $\gamma$  die chronische TVP nach Herztransplantationen bei Mäusen vermindert (Russel et al., 1994). Eine andere Studie zeigte in abdominalen Aortentransplantaten bei Ratten, dass Estrogene die MHC-II-Antigenexpression im Transplantat hemmen, obwohl IFN- $\gamma$  und der IFN- $\gamma$ -Rezeptor hochreguliert werden (Saito et al., 1998).

Eine weitere in der Literatur beschriebene Erklärung für die Estradiol-Wirkung ist die Reduktion des Zytokins TNF- $\alpha$ . Dadurch wird die Expression von ICAM-1 vermindert und somit die Leukozytenadhäsion am Endothel und damit die Entzündungsreaktion abgeschwächt (Ito et al., 2001 und 2002; Rogers et al., 2001; Squadrito et al., 1997). Die

Suppression von ICAM-1 nach Herztransplantation konnte auch von uns beobachtet werden. Sowohl die 17- $\beta$ -Estradiol- als auch die Coumestrol-Gruppe zeigen in der immunhistochemischen Färbung eine signifikant verminderte Expression.

Eine weitere mögliche Erklärung, warum estrogene Substanzen die Entwicklung der chronischen TVP deutlich verzögern, könnte der nachgewiesene antioxidative Effekt von Estrogenen sein, der durch ihren Phenolring zustande kommt (Sugioka et al., 1987). Keaney et al. zeigten 1994 in ihrer Studie mit ovariectomierten Schweinen, dass eine Estrogenbehandlung die Schweine vor der Oxidation von LDL schützte (Keaney et al., 1994). Ebenso wird die LDL-Oxidation bei postmenopausalen Frauen reduziert, wenn sie eine Estrogensubstitution erhalten (Sack et al., 1994). Estrogene entfalten ihre Wirkung so schnell, dass dies nicht durch eine Estrogen-induzierte Reduzierung der LDL-Oxidation erklärt werden kann. Es wird vielmehr vermutet, dass Estrogene die Anzahl der freien Radikale direkt in der Arterienwand reduzieren (Gerhard et al., 1995). Von White et al. wurde ein durch Estrogene induzierter Abfall des Redoxpotentials der Gefäßwand beobachtet. Dieser Abfall kommt durch eine Hemmung der Lipoproteinoxidation zustande (White et al., 1997). Sie verabreichten Mäusen zusätzlich zu Estrogenen den NO-Synthase-Hemmer L-NAME und stellten fest, dass die Zugabe von L-NAME den vasoprotektiven Effekt der Estrogene nicht änderte. Deshalb kamen sie zu dem Ergebnis, dass Estrogene ihren protektiven Effekt auf die Gefäße der Maus NO-unabhängig ausüben. Dieser Meinung sind auch Elhage et al., die 1997 zeigten, dass Estrogene zwar nicht die Oxidation von frei zirkulierenden Lipiden beeinflussen, sie aber durchaus in der Lage sind Läsionen in der Aorta ascendens von Mäusen deutlich zu reduzieren (Elhage et al., 1997). Dieser Effekt ist sowohl bei alleiniger Verabreichung von Estrogenen zu beobachten, als auch in Kombination mit L-NAME. Die alleinige Gabe von L-NAME zeigte jedoch keine Wirkung, d.h. nur die basale NO-Produktion in der Arterienwand schützt nicht vor den gefürchteten Läsionen. 1998 wurde gezeigt, dass die antioxidative Wirkung von Estrogenen über eine Beeinflussung des Glutathion-Metabolismus erklärbar ist. Denn in Abwesenheit von Estrogenen wird das intrazelluläre Antioxidans Glutathion im Myokard so stark reduziert, dass es zu einer myokardialen Dysfunktion kommt (Kim et al., 1998). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, kann das Phytoestrogen Coumestrol die Gefäße gleich stark vor einer TVP schützen wie 17- $\beta$ -Estradiol. 1998 wurde gezeigt, dass auch Phytoestrogene (wie Coumestrol oder auch Genistein, etc.) freie Radikale abfangen können (Clarkson et al., 1998). Somit scheint die Verhinderung der Glutathion-Reduktion eine mögliche Erklärung für unsere beobachtete gefäßprotektive Wirkung beider Substanzen zu sein.

Vielfach diskutiert wurde die Möglichkeit, dass NO bei der vasoprotektiven Wirkung von Estrogenen eine Rolle spielt. In einigen Studien wird Estrogenen eine endothelabhängige Wirkung auf das vasodilatierende System NO/cGMP nachgesagt (Drexler et al., 1994; Muck et al., 1994). Mehrere Studien beschreiben, dass Estrogene die endothelabhängige Vasodilatation sowohl bei normocholesterolemischen Affen, als auch bei Affen mit bereits manifester Atherosklerose steigern (Gerhard et al., 1995; Gisclard et al., 1988; Miller et al., 1988; Williams et al., 1990). Diese Verbesserung war mit einer erhöhten NO-Freisetzung assoziiert (Gerhard et al., 1995). Sie stellten außerdem fest, dass eine Estrogensubstitution bei postmenopausalen Frauen mit Atherosklerose eine endothelabhängige Vasodilatation bewirken kann. Die erhöhten Serumnitrate und Nitritwerte bei postmenopausalen Frauen mit einer Langzeit-Estrogensubstitution verstärken die These, dass die NO-Produktion durch Estrogene gesteigert wird, indem in menschlichen Endothelzellen über den Estrogenrezeptor die Transkription von eNOS hochreguliert wird (Hishikawa et al., 1995; Rosselli et al., 1995). In den ersten Tagen nach mechanischer Intimaverletzung übt die vermehrte NO-Produktion einen antithrombotischen Effekt aus, der eine Plättchenaggregation und eine nachfolgende Thrombosierung des Gefäßlumens verhindert. Durch zusätzliche Vasodilatation wird der Blutfluss durch das geschädigte Gefäß verbessert. Die schnell einsetzende NO-Produktion geschädigter Gefäßabschnitte hat hier die wichtige protektive Aufgabe einen ungestörten Blutfluss im Gefäß trotz des Intimaschadens aufrechtzuerhalten (Yan et al., 1994). Eine weitere Schutzfunktion für das Gewebe könnte NO über die Hemmung von CD8-positiven T-Zellen ausüben, welche *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Lewis et al., 1996). *In vitro*-Versuche an Hasen-Aorten belegen, dass NO die Adhäsionsfähigkeit von Makrophagen und Monozyten an das Endothel stark verringert (Tsao et al., 1994 und 1997). In unserer Arbeit zeigen die immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD8 und Makrophagen/Monozyten, dass estrogene Substanzen eine verminderte Infiltratdichte von CD8-positiven T-Zellen und Makrophagen/Monozyten bewirken. Szabolcs et al. untersuchten den Apoptosegrad bei Makrophagen und Kardiomyozyten im abgestoßenen Herztransplantat sowohl im Rattenmodell, als auch beim Menschen. Sie fanden jeweils eine Korrelation zwischen dem Apoptosegrad und dem Ausmaß der NO-Produktion und folgerten daraus, dass Apoptose eine wichtige Ursache des Herzmuskelzelltodes während des Abstoßungsprozesses darstellt, und dass dieser Mechanismus durch NO reguliert wird (Szabolcs et al., 1998). Eine pharmakologische Studie von 1999 untersuchte, welche Mechanismen bei der 17- $\beta$ -Estradiol-induzierten Vasodilatation am isolierten und perfundierten Rattenherzen eine Rolle spielen (Hugel et al., 1999). Hierfür wurden die Herzen mit verschiedenen Substanzen (L-NAME,

Diclofenac, Glibenclamid und Nifedipin) vorbehandelt. Es zeigte sich, dass es trotz Hemmung der NO-Synthese durch L-NAME zu einer Vasodilatation kam, 17- $\beta$ -Estradiol die Vasodilatation somit nicht über NO bewirkte. Sowohl Diclofenac (ein Prostaglandin-Synthese-Hemmer) als auch Glibenclamid (ein K<sup>+</sup>ATP-Blocker) verminderten die Vasodilatation, durch Nifedipin (ein Kalziumkanalblocker) wurde sie sogar komplett aufgehoben. Der dilatatorische 17- $\beta$ -Estradiol-Effekt wurde somit hauptsächlich über den Kalziumkanal vermittelt, allerdings spielte eine Prostaglandin-Freisetzung und eine K<sup>+</sup>ATP-Kanal-Aktivierung ebenfalls eine Rolle (Hugel et al., 1999). Diese Interaktion von Estrogenen mit Ionenkanälen von Gefäßzellen wurde in der Literatur mehrmals nachgewiesen (Jiang et al., 1991; Vargas et al., 1989). Estrogene verursachen durch eine Hemmung des Kalziumeinstroms in die Zelle eine Relaxation von Koronararterien (Christian et al., 2002; Helguera et al., 2002; Jiang et al., 1992). White et al. präsentierten 1995 Daten, die zeigen, dass bei Estrogen-Gabe die endothelunabhängige Relaxation der Koronararterien durch einen erhöhten Kalziumausstrom aus der Zelle und einer Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (also einem erhöhten Kaliumausstrom) zustande kommt (White et al., 1995). Zusammenfassend vermindern 17- $\beta$ -Estradiol und Coumestrol rezeptorabhängig die Entwicklung der TVP. Dieser Effekt ist auf mehrere Mechanismen zurückzuführen: Beide estrogene Substanzen besitzen einen immunmodulierenden Effekt, indem sie einerseits eine signifikant verminderte Expression von MHC-II und ICAM-1 und andererseits eine verminderte Infiltratdichte von CD8-positiven Lymphozyten und Makrophagen bewirken. Eine signifikante positive Beeinflussung des Lipidprofils mit HDL-Cholesterin-Erhöhung und LDL-Cholesterin-Verminderung konnten wir im Tiermodell nicht nachvollziehen. Deshalb kann der beobachtete gefäßprotektive Effekt eventuell nicht alleine auf eine Lipidbeeinflussung zurückzuführen sein. Als mögliche Erklärung sind unter anderem folgende nachgewiesene Mechanismen denkbar: 17- $\beta$ -Estradiol und Coumestrol vermindern die Infiltratdichte von Makrophagen, Monozyten sowie Lymphozyten, sie bewirken eine Reduktion des Zytokins TNF- $\alpha$  mit folgender verminderter Leukozytenadhäsion, sie besitzen eine antioxidative Wirkung und induzieren eine vermehrte endothelabhängige NO-Freisetzung. Allerdings gilt zu beachten, dass Estrogene auch unerwünschte Wirkungen verursachen: Sie erhöhen für Frauen das Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken um das 6-fache. Durch zusätzliche Progesteron-Gabe kann dieser unerwünschte Effekt verhindert werden (Meinertz et al., 1997). Kontroverse Meinungen herrschen darüber, ob eine Estrogen-Therapie das Risiko für Brustkrebs erhöht. Einige Studien beschreiben eine positive Korrelation zwischen der postmenopausalen Einnahme von Estrogenen und dem Auftreten von

Brustkrebs, die mit jedem Einnahmejahr ansteigt (Colditz et al., 1998). Andere Studien konnten kein erhöhtes Risiko nachweisen (Stanford et al., 1995; DeGregorio et al., 1998). Prelevic et al. kamen zu der Schlussfolgerung, dass das Risiko in den ersten 12 Monaten einer Estrogentherapie an einer venösen Thromboembolie zu erkranken viel höher ist als das Brustkrebsrisiko, dieses Risiko aber besser akzeptiert wird (Prelevic et al., 1997). Calaf et al. kamen zu dem Schluss, dass eine Hormonersatztherapie allen Frauen in der Postmenopause zugute kommt, die keine gravierenden vorbestehenden Erkrankungen (wie z.B. Thromboseneigung oder arterielle Hypertonie) aufweisen (Calaf et al., 1997). Eine familiäre Brustkrebsanamnese zählt nicht zu solchen vorbestehenden Risikofaktoren, da nach DeGregorio et al. Frauen, in deren Familienanamnese gehäuft Brustkrebs vorkam trotz ihrer Hormontherapie kein erhöhtes Brustkrebsrisiko hatten, verglichen mit gleichaltrigen Frauen ohne vorbestehender Familienanamnese (DeGregorio et al., 1998). Es sind noch eine Reihe von prospektiven randomisierten Studien nötig, um zu klären, ob durch Estrogensubstitution das Brustkrebsrisiko erhöht ist und durch welche neueren estrogenhaltigen Präparate dieses Risiko gesenkt werden könnte (Fontana et al., 1999; Meinertz et al., 1997). Ein Ansatz in diese Richtung wären z.B. selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (Rao et al., 1998; Spencer et al., 1999; Weryha et al., 1999). Die Entwicklung neuer Medikamente mit ähnlichem Wirkprofil wie die Estrogentherapie, aber gesichertem Ausschluss einer Risikoerhöhung für Brustkrebs würde postmenopausalen Frauen sehr viel Gutes bringen. Deshalb wurden hierzu schon einige Untersuchungen gemacht, wie z.B. 1998 von Clair et al.: Da die Entwicklung einer Atherosklerose im Tiermodell und die Inzidenz einer KHK bei postmenopausalen Frauen deutlich durch eine Estrogenbehandlung reduziert wird, suchten sie nach estrogenähnlichen Substanzen und entdeckten die Phytoestrogene. Phytoestrogene sind unter anderem in Sojabohnen enthalten und haben eine schwache estrogenartige Wirkung, dafür scheinen sie aber starke positive Effekte auf die Arterienwand zu haben. Laut Clair et al. sind Phytoestrogene vergleichbar mit "Designerhormonen", die wegen ihres positiven Effektes auf das Skelett und kardiovaskuläre System und dem ausbleibendem krebsfördernden Effekt auf Brust und Endometrium entwickelt wurden (Clair et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass nicht nur das physiologische 17- $\beta$ -Estradiol eine gefäßprotektive Wirkung besitzt, sondern auch das in Pflanzen vorkommende Phytoestrogen Coumestrol. Histologie und Planimetrie zeigen, dass sowohl 17- $\beta$ -Estradiol als auch Coumestrol gegen die Entstehung einer TVP protektiv wirken. Fitzpatrick et al. veröffentlichten 1999 ihre Beobachtungen, dass bereits viele Frauen in den USA Phytoestrogene in der Postmenopause verwenden, allerdings fehlen noch brauchbare Aussagen über ihre Langzeiteffekte

(Fitzpatrick et al., 1999). Auch Clarkson et al. beschäftigten sich 1998 mit dieser alternativen Behandlungsmethode für Frauen in der Postmenopause: Sie wollen den Patientinnen eine Therapie bieten, die die guten Effekte ohne negative Aspekte aufweist und hoffen, dass diese natürlichen Estrogene, die mit der Nahrung (z.B. Sojabohnen) aufgenommen werden können, mehr Akzeptanz finden als die pharmakologische Estrogentherapie (Clarkson et al., 1998). Die Vor- und Nachteile einer Estrogentherapie sind sorgfältig abzuwägen. Die therapeutische Anwendung von Estrogenen bei Herzkrankheiten wird hauptsächlich durch zwei Fragen eingeschränkt: „Erhöhen Estrogene bei Frauen die Inzidenz von Brustkrebs?“ und „Welche Dosierung dieser weiblichen Hormone ist für männliche Patienten angemessen ohne feminisierende Probleme, Unfruchtbarkeit und ein erhöhtes Risiko für Hodenkrebs zu verursachen?“. Dann könnten sich eventuell neue Behandlungsstrategien für transplantierte Patienten ergeben. Gegenwärtig ist kein Immunsuppressivum mit eindeutig bewiesenem Nutzen bezüglich der Prävention der TVP routinemäßig im Einsatz (z.B. Cyclosporin A, Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil, 15-Deoxyspergualin, Rapamycin, Antikörper gegen den IL-2-Rezeptor oder ICAM-1, CTLA 4Ig, etc.) (Gregory et al., 1995; Hosenpud et al., 1996; Russell et al., 1996). Zum Erhalt der Endothelfunktion und Verhinderung einer Intimaproliferation wurden experimentell unter anderem ein Somatostatinanalogon (Angiopeptin) oder L-Arginin (NO-Vorläufer) verabreicht (Lou et al., 1996; Meiser et al., 1992). Außerdem wird versucht durch Gabe von Diltiazem (= Kalziumantagonist), ACE-Hemmer oder HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren die Entwicklung einer chronischen TVP in der Klinik zu verzögern und somit das Langzeitüberleben zu verbessern (Kobashigawa et al., 1995; Mehra et al., 1995; Schroeder et al., 1993). Es wäre also durchaus sinnvoll transplantierten Frauen in der Postmenopause ergänzend eine Estrogen-Substitution zukommen zu lassen (Foegh et al., 1995). Um für Männer die protektiven Wirkungen von Estrogenen nutzen zu können, müssen die Wirkungen der Estrogenrezeptor-Untergruppen untersucht werden und eventuell selektive Agonisten gefunden werden, die nicht feminisieren.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Herztransplantation stellt heute oftmals die einzig effektive Therapie für Patienten mit Herzerkrankungen im Endstadium dar (Meiser et al., 1997). Seit dem routinemäßigen Einsatz von Cyclosporin A kann die akute Abstoßung besser kontrolliert werden. Die chronische Abstoßung, die sich bereits nach drei Monaten entwickeln kann, stellt heute die Hauptursache aller Transplantatversagen nach dem ersten postoperativen Jahr dar. Da sie sich hauptsächlich durch pathologische Veränderungen am Gefäßbett des Transplantats manifestiert, wird sie auch chronische Transplantatvaskulopathie (*TVP*) genannt. Um die histologischen Vorgänge der TVP zu ergründen, die zum Transplantatversagen führen, sind verschiedene Tiermodelle erarbeitet worden. Durchgesetzt haben sich heterotope Herztransplantationen bei Ratten verschiedener Inzuchtstämme. In dieser Arbeit wurde das als besonders günstig empfundene und bereits vielfach verwendete Tiermodell heterotoper Rattenherztransplantationen in der Stammkombination Lew→F344 verwendet (Ono et al., 1969). Die sich hier einstellenden Veränderungen entsprechen in hohem Grad denen menschlicher Transplantate.

Seit 1995 ist bekannt, dass zwei Estrogenrezeptoren (*ER- $\alpha$*  und *ER- $\beta$* ) mit unterschiedlicher Expression in den verschiedenen Organsystemen existieren. Im Herzen überwiegt die Expression des ER- $\beta$  (Savolainen et al., 2001). In dieser Arbeit wurden zwei Hormone mit unterschiedlicher Affinität zum ER- $\alpha$  bzw. ER- $\beta$  der Estrogenfamilie ausgewählt: 17- $\beta$ -Estradiol (ein physiologisches Estrogen mit höherer Affinität zum ER- $\alpha$ ) und Coumestrol (ein pflanzliches Estrogen mit höherer Affinität zum ER- $\beta$ ). Außerdem wurde ICI 182.780 (ein kompetitiver ER-Antagonist) verwendet. Die angefertigten histologischen Präparate stellten die histologischen Veränderungen im Gewebe der chronisch abgestoßenen Herzen nach 150 Tagen dar. Es konnte deutlich dargestellt werden, dass bei Gabe von 17- $\beta$ -Estradiol und Coumestrol die proliferativen Intimaveränderungen der TVP signifikant vermindert werden können. Bemerkenswert war, dass dieser protektive Effekt von 17- $\beta$ -Estradiol- bzw. Coumestrol durch zusätzliche Gabe des Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI aufgehoben wurde. Diese Ergebnisse konnten durch die genaue rechnergestützte Vermessung der Gefäßlumina dargestellt werden.

Durch immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern zur Markierung von T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, MHC-II-Strukturen, Makrophagen und ICAM-1 wurde außerdem gezeigt, dass die myointimale MHC-II-Expression durch 17- $\beta$ -Estradiol bzw. Coumestrol-Gabe signifikant geringer ausgeprägt war. Ebenso die Infiltratdichte an Makrophagen und CD8-positiven Lymphozyten (*Suppressor+zytotoxische Lymphozyten*), nicht jedoch die der

CD4-positiven Lymphozyten (*T-Helferzellen*). Alle beschriebenen Wirkungen von 17- $\beta$ -Estradiol bzw. Coumestrol waren rezeptorabhängig, da sie durch Zugabe des Estrogenrezeptorblockers ICI aufgehoben werden konnten.

Aus den gewonnenen Ergebnissen könnten sich neue Therapie- bzw. Präventionsansätze für Herztransplantierte ergeben.



## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abbott-CP**, Lindsey-ES, Creech-O, DeWitt-CW: A technique for heart transplantation in the rat. *Arch Surg* 1964; 89:645.
2. **Adams-DH**, Russell-ME, Hancock-WW, Sayegh-MH, Wyner-LR, Karnovsky-MJ: Chronic rejection in experimental cardiac transplantation: Studies in the Lewis-F344 model. *Immunol Rev* 1993; 134:5-19.
3. **Adams-DH**, Tilney-NL, Collins-JJ,jr., Karnovsky-MJ: Experimental graft arteriosclerosis I. The Lewis-to-F344 allograft model. *Transplantation* 1992; 53(5):1115-19.
4. **Athreya-BH**, Pletcher-J, Zulian-F, Weiner-DB, Williams-WV: Subsetspezifische effects of sex hormones and pituitary gonadotropins on human lymphocyte proliferation in vitro. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 66:201-211.
5. **Barnard-CN**: The operation. A human cardiac transplant: An interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J* 1967; 41(48):1271-4.
6. **Billingham-ME**: Pathology and etiology of chronic rejection of the heart. *Clin Transplant* 1994; 8(3 Pt 2):289-92.
7. **Brezinka-V**, Padmos-I: coronary heart disease risk factors in women. *Eur Heart J* 1994; 15,1571-1584.
8. **Bush-TL**: Evidence for primary and secondary prevention of coronary artery disease in women taking oestrogen replacement therapy. *Eur Heart J* 1996; Suppl. D:9-14.
9. **Calaf i Alsina-J**: Benefits of hormone replacement therapy—overview and update. *Int J Fertil Womens Med* 1997; 42 Suppl 2:329-46.
10. **Cheng-LP**, Kuwahara-M, Jacobsson-J, Foegh-ML: Inhibition of myointimal hyperplasia and macrophage infiltration by estradiol in aorta allografts. *Transplantation* 1991; 52(6):967-72.
11. **Chilian-WM**, Kuo-L, DeFily-DV, Jones-CJ, Davis-MJ: Endothelial regulation of coronary microvascular tone under physiological and pathophysiological conditions. *Eur Heart J* 1993; 14 SupplI:55-9.
12. **Christian-RC**, Harrington-S, Edwards-WD, Oberg-AL, Fitzpatrick-LA: Estrogen status correlates with the calcium content of coronary atherosclerotic plaques in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3):1062-7.
13. **Clair-RW**: Estrogens and atherosclerosis: phytoestrogens and selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9(5):457-63.

14. **Clarkson-TB**, Anthony-MS : Phytoestrogens and coronary heart disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998; 12(4):589-604.
15. **Clarkson-TB**, Anthony-MS, Williams-JK, Honore-EK, Cline-JM : The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217(3):365-8.
16. **Colditz-GA**, Hankinson-SE, Hunter-DJ: The use of oestrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1995; 332:1589-93.
17. **Colditz-GA**: Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(11):814-23.
18. **Costanzo-MR**, Naftel-DC, Pritzker-MR, Heilmann-JK, Miller-LW, and the Cardiac Transplant Research Database: Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17:744-53.
19. **Cramer-DV**, Wu-GD, Chapman-FA, Cajulis-E, Wang-HK, Makowka-L: Lymphocytic subsets and histopathologic changes associated with the development of heart transplant arteriosclerosis. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: 458-66.
20. **Crisp-SJ**, Dunn-MJ, Rose-ML, Babir-M, Yacoub-MH: Antiendothelial antibodies after heart transplantation: The accelerating factor in transplant-associated coronary artery disease? *J Heart Lung Transplant* 1994; 13(1Pt1):81-91.
21. **Cunningham-DA**, Dunn-MJ, Yacoub-MH, Rose-ML: Local production of cytokines in the human cardiac allograft. *Transplantation* 1994; 57(9): 1333-37.
22. **DeGregorio-MW**, Taras-TL: Hormone replacement therapy and breast cancer: revisiting the issues. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 1998; 38(6):738-44;quiz744-6.
23. **Dong-C**, Redenbach-D, Wood-S, Battistini-B, Wilson-JE, McManus-BM: The pathogenesis of cardiac allograft vasculopathy. *Curr Opinion Cardiol* 1996; 11:183-90.
24. **Fitzpatrick-LA**: Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens: new therapies for the postmenopausal women. *Mayo Clin Proc* 1999; 74(6):601-7.
25. **Foegh-ML**, Zhao-Y, Farhat-M, Ramwell-PW: Oestradiol inhibition of vascular myointimal proliferation following immune, chemical and mechanical injury. *Ciba Found Symp* 1995; 191:139-45; discussion 145-9. Review.
26. **Fontana-A**, Delmas-PD: Bone and hormones. Estrogens and antiestrogens: action on osteoporosis. *Presse Med* 1999; 28(10):555-8.

27. **Forbes-RDC**, Zheng-SX, Gomersall-M, Guttman-RD: Irreversible chronic vascular rejection occurs only after development of advanced allograft vasculopathy. *Transplantation* 1997; 63(5):743-9.
28. **Gardner-CD**, Tribble-DL, Young-DR, Ahn-D, Fortmann-SP: Population frequency distributions of HDL, HDL(2), and HDL(3) cholesterol and apolipoproteins A-I and B in healthy men and women and associations with age, gender, hormonal status, and sex hormone use: The Stanford five city project. *Prev Med* 2000; 31(4):335-345.
29. **Gilligan-DM**, Quyyumi-AA, Cannon-RO: Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation* 1994; 89:2545-51.
30. **Gimbrone-MA**: Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75:67B-70.
31. **Gisclard-V**, Miller-VM, Vanhoutte-PM: Effect of 17- $\beta$  estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244:19-22.
32. **Goldschmid-M**, Barrett-Connor-E, Edelstein-S, Wingard-D, Cohn-B, Hermann-WH: Dyslipidemia and ischemic heart disease mortality among men and women with diabetes. *Circulation* 1994; 89:991-997.
33. **Greene-RA**: Estrogen and cerebral blood flow: a mechanism to explain the impact of estrogen on the incidence and treatment of Alzheimer`s disease. *Int J Fertil Womens Med* 2000; 45(4):253-7.
34. **Gregory-CR**, Huang-X, Pratt-RE: Treatment with rapamycin and mycophenolate acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995; 59:655-61.
35. **Grodstein-F**, Stampfer-MJ: Estrogen for women at varying risk of coronary disease. *Maturitas* 1998; 30(1):19-26.
36. **Grohe-C**, Kahlert-S, Löbber-K, Stimpel-M, Neyses-L: Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional Estrogen receptors. *FEBS Letters* 1997; 416:107-12.
37. **Harrison-DG**, Ohara-Y: Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: implications for impaired vasomotion. *Am J Cardiol* 1995; 75:75B-81B.
38. **Haverich-A**, Costard-Jäckle-A, Cremer-J, Herrmann-G, Simon-R: Cyclosporin A and transplant coronary disease after heart transplantation: Facts and fiction. *Transplant Proc* 1994; 26(5): 2713-5.

39. **Helguera-G**, Olcese-R, Song-M, Toro-L, Stefani-E: Tissue-specific regulation of Ca(2+) channel protein expression by sex hormones. *Biochem Biophys Acta* 2002; 15;1569(1-3):59-66.
40. **Hishikawa-K**, Nakaki-T, Marumo-T, Suzuki-H, Kato-R, Saruta-T: Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 1995; 360(3):291-3.
41. **Hong-L**, Teruaki-K, Foegh-ML: Inhibition of transplant coronary arteriosclerosis in rabbits by chronic estradiol treatment is associated with abolition of MHC class II antigen expression. *Circulation* 1996; 94:3355-3361.
42. **Horwitz-KB**, Horwitz-LD: Canine vascular tissues are targets for androgens, estrogens, progestins and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1982; 69:750.
43. **Hosenpud-JD**, Novick-RJ, Bennett-LE, Keck-BM, Fiol-B, Daily-OP: The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 13<sup>th</sup> Official report. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15:655-74.
44. **Hugel-S**, Neubauer-S, Lie-SZ, Ernst-R, Horn-M, Schmidt-HH, Allolio-B, Reincke-M: Multiple mechanisms are involved in the acute vasodilatory effect of 17beta-estradiol in the isolated perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33(6):852-8.
45. **Ito-A**, Bebo-BF Jr, Matejuk-A, Zamora-A, Silverman-M, Fyfe-Johnson-A, Offner-H: Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol* 2001; 167(1):542-52.
46. **Ito-A**, Buenafe-AC, Matejuk-A, Zamora-A, Silverman-M, Dwyer-J, Vandebark-AA, Offner-H: Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF-alpha and recruitment of TNF-alpha(+) T cells and macrophages into the CNS of mice developing experimental encephalomyelitis. *Clin Immunol* 2002; 102(3):275-82.
47. **Jiang-C**, Poole-Wilson-PA, Sarrel-PM, Mochizuki-S, Collins-P, MacLeod-KT: Effect of 17 beta-oestradiol on contraction, Ca<sup>2+</sup> current and intracellular free Ca<sup>2+</sup> in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 1992; 106(3):739-45.
48. **Jiang-C**, Sarrel-PM, Lindsay-DC, Pool-Williams-PA, Collins-P: Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17β-oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol* 1991; 104:1033-7.
49. **Karas-RH**, Patterson-BL, Mendelsohn-ME: Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 1994; 98:1943-1950.

50. **Karas-RH**, Schulten-H, Pare-G, Aronovitz-MJ, Ohlsson-C, Gustafsson-JA, Mendelsohn-ME: Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice. *Circ Res* 2001; 89(6):534-9.
51. **Kato-S**, Endoh-H, Kitamoto-T, Uchiyama-S, Cambon-P: Activation of the Estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995; 270:1491-94.
52. **Keaney-JF**, Shwaery-GT, Xu-A, Nicolosi-RJ, Loscalzo-J, Foxall-TL, Vita-JA: 17- $\beta$  estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 1994; 89:2252-59.
53. **Kim-YD**, Farhat-MY, Myers-AK, Kouretas-P, DeGroot-KW, Pacquing-A, Ramwell-PW, Suyderhoud-JP, Lees-DE: 17-beta estradiol regulation of myocardial glutathione and its role in protection against myocardial stunning in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32(3):457-65.
54. **Knight-RJ**, Dikman-S, Liu-H, Martinelli-GP: Cold ischemic injury accelerates the progression to chronic rejection in a rat cardiac allograft model. *Transplantation* 1997; 64(8): 1102-7.
55. **Kopp-P** : Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the “French paradox”? *Eur J Endocrinol* 1998; 138(6):619-20.
56. **Koskinen-PK**, Lemström-KB: Adhesion molecule P-Selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in enhanced heart allograft arteriosclerosis in the rat. *Circulation* 1997; 95(1): 191-196.
57. **Kuiper-GJM**, Carlsson-BO, Grandien-K, Enmark-E, Häggblad-J, Nilsson-S, Gustafsson-JA: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 1997; 138:863-70.
58. **Kurzer-MS**, Xu-X: Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr* 1997; 17:353-81.
59. **Lange-V**, Gassel-AM, Deuse-T, Ulrichs-K, Silber-RE: Effect of hemodynamics on graft rejection in the heterotopic heart transplantation model. *Transplant Proc* 1998; 30: 1014-16.
60. **Lewis-NP**, Tsao-PS, Rickenbacher-PR, Xue-C, Johns-RA, Haywood-GA, v.d.Leyen-H, Billingham-ME: Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle. *Circulation* 1996; 93(4):720-9.
61. **Liao-F**, Andalibi-A, Lusic-AJ, Fogelman-AM: Generic control of the inflammatory response induced by oxidized lipids. *Am J Cardiol* 1995; 74:65B-66B.

62. **Libby-P**, Salomon-RN, Payne-DD: Functions of wall cells related to the development of transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Transplant Proc* 1989; 21: 3677.
63. **Lieberman-EH**, Gerhard-M, Yeung-AC, Anderson-TJ, Merdith-IT, Ganz-P, Selwyn-AP: Estrogen improves coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation* 1993; 88(Suppl I):I-79.Abstract.
64. **Lorsodo-DW**, Kearney-M, Kim-EA, Jekanowski-J, Isner-JM: Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of postmenopausal women. *Circulation* 1994; 89:1501-10.
65. **Lou-H**, Kodama-T, Wang-YN, Katz-NM, Ramwell-PW, Foegh-ML: Major histocompatibility complex class II antigen expression is suppressed by estradiol in cardiac allografts. *Transplant Proc* 1997; 29(6):2626-7.
66. **Lou-H**, Kodama-T, Zhao-YJ: Inhibition of transplant coronary arteriosclerosis in rabbits by chronic estradiol treatment is associated with abolition of MHC class II antigen expression. *Circulation* 1996; 94(12):3355.
67. **Lowry-RP**, Takeuchi-T, Cremisi-H, Konieczny-B, Someren-A: Chronic rejection of organ allografts may arise from injuries sustained in recurring foci of acute rejection that resolve spontaneously. *Transplant Proc* 1993; 25(2): 2103-5.
68. **Ludmer-PL**, Selwyn-AP, Shook-TL, Wayne-RR, Mudge-GH, Alexander-RW, Ganz-P: Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315:1046-51.
69. **MacKenzie-J**: Irritation of the sexual apparatus. *Am J Med Sci* 1884; 87:360.
70. **Manolio-TA**, Furberg-CD, Shemanski-L, Psaty-BM, O`Leary-DH, Tracy-RP, Bush-TL: Associations of postmenopausal estrogen use with cardiovascular disease and its risk factors in older women. *Circulation* 1993; 88[part1]:2163-71.
71. **Mehra-MR**, Ventura-HO, Smart-FW, Collins-TJ, Ramee-SR, Stapleton-DD: An intravascular ultrasound study of the influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors and calcium entry blockers on the development of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Cardiol* 1995; 72:853-4.
72. **Meinertz-T**: Estrogens for prevention of coronary heart disease? *Herz* 1997; 22(3):151-7.
73. **Meiser-BM**, von Scheidt-W, Reichart-B: Short-term angiopeptin treatment significantly reduces intimal proliferation after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14:56.

74. **Meiser-BM**, von Scheidt-W, Weis-M, Reichart-B: Herztransplantation-State of the art today. *Herz* 1997; 22:237-52.
75. **Meiser-BM**, Wolf-S, Devens-C: Continuous infusion of angiopeptin significantly reduces accelerated graft vessel disease induced by FK506 in a rat heart allograft model. *Transplant Proc* 1992; 24:1671-2.
76. **Mennander-A**, Tikkanen-MJ, Raisanen-Sokolowski-A, Paavonen-T, Hayry-P: Chronic rejection in rat aortic allografts. IV. Effect of hypercholesterolemia in allograft arteriosclerosis. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12(1 Pt 1):123-31.
77. **Meredith-IT**, Yeung-AC, Weidinger-FF, Anderson-TJ, Uehata-A, Ryan-TJ, Selwyn-AP, Ganz-P: Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestations of coronary artery disease. *Circulation* 1993; 87(Suppl V):V56-66.
78. **Miller-VM**, Gisclard-V, Vanhoutte-PM: Modulation of endothelium-dependent and vascular smooth muscle responses by oestrogens. *Phlebology* 1988; 3:63-69.
79. **Miniati-DN**, Robbins-RC: Heart transplantation: A thirty-year perspective. *Annu Rev Med* 2002; 53:189-205.
80. **Muchmore-JS**, Cooper-DK, Ye-Y, Schlegel-V, Pribil-A, Zuhdi-N: Prevention of loss of vertebral bone density in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11(5):959-63.
81. **Nabel-EG**, Ganz-P, Gordon-JB, Alexander-RW, Selwyn-AP: Dilation of normal and constriction of atherosclerotic coronary arteries caused by the cold pressor test. *Circulation* 1988; 77:43-52.
82. **Naruse-K**, Shimizu-K, Muramatsu-M, Toki-Y, Miyazaki-Y, Okumura-K, Hashimoto-H, Ito-T: Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Arterioscler Thromb* 1994; 14(5):746-52.
83. **Neyses-L**, Pelzer-T: The biological cascade leading to cardiac hypertrophy. *European Heart Journal* 1995; 16(supplement N), 8-11.
84. **Ono-K**, Lindsey-ES: Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1969; 57:225-9.
85. **Oparil-S**, Arthur-C. Corcoran Memorial Lecture. Hormones and vasoprotection. *Hypertension* 1999; 33(1 Pt 2):170-6.
86. **Pelzer-T**, Shamim-A, Neyses-L: Estrogen effects in the heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1996; 160-161:307-313.
87. **Prelevic-GM**, Jacobs-HS: Menopause and post-menopause. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1997;11(2):311-40.

88. **Rao-AV**: Coronary heart disease risk factors in women: focus on gender differences. *J La State Med Soc* 1998; 150(2):67-72.
89. **Reis-SE**, Gloth-ST, Blumenthal-RS, Resar-JR, Zacur-HA, Gerstenblith-G, Brinker-JA: Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation* 1994; 89:52-60.
90. **Ribot-CA**, Tremollieres-FA: Effect of estrogens on bone and other systems and hormonal substitute treatment. *Curr Opin Rheumatol* 1997; 9(4):362-9.
91. **Rogers-A**, Eastell-R: The effect of 17beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. *Bone* 2001; 29(1):30-4.
92. **Rosselli-M**, Imthurn-B, Keller-PJ, Jackson-EK, Dubey-RK: Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 $\beta$ -estradiol and norethisterone acetate: a two-year follow-up study. *Hypertension* 1995; 25:848-53.
93. **Russell-ME**, Hancock-WH, Wallace-AF, Glysing-Jensen-T, Willett-TA, Sayegh-MH: Chronic cardiac rejection in the Lew to F344 rat model. *J Clin Invest* 1996; 97:833-8.
94. **Russell-ME**, Wallace-AF, Wyner-LR, Newell-JB, Karnovsky-MJ: Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant arteriosclerosis. *Circulation* 1995; 92(3): 457-64.
95. **Russel-PS**, Chase-CM, Winn-HJ, Colvin-RB: Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts: effects of recipient treatment with a monoclonal antibody to interferon- $\gamma$ . *Transplantation* 1994; 57:1367.
96. **Sack-MN**, Rader-DJ, Cannon-RO: Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 1994; 343:269-70.
97. **Saito-S**, Foegh-ML, Mtomura-N Lou-H, Kent-K, Ramwell-PW: Estradiol inhibits allograft-inducible major histocompatibility complex class II antigen expression and transplant arteriosclerosis in the absence of immunosuppression. *Transplantation* 1998; Vol.66,1424-1431.
98. **Salomon-RN**, Hughes-CCW, Schoen-FJ, Payne-DD, Pober-JS, Libby-P: Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. *Am J Pathol* 1991; 138: 791-8.
99. **Savolainen-H**, Frösen-J, Petrov-L, Aavik-E, Häyry-P: Expression of estrogen receptor sub-types  $\alpha$  and  $\beta$  in acute and chronic cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20:1252-64.
100. **Schmid-C**, Heemann-U, Tilney-NL: Factors contributing to the development of chronic rejection in heterotopic rat heart transplantation. *Transplantation* 1997; 64(2): 222-8.



101. **Schmid-C**, Heemann-U, Tilney-NL: Retransplantation reverses mononuclear infiltration but not myointimal proliferation in a rat model of chronic cardiac allograft rejection. *Transplantation* 1996; 61(12):1695-99.
102. **Schroeder-JS**, Gao-SZ, Alserman-EL: A preliminary study of diltiazem in the prevention of coronary artery disease in heart transplant recipients. *N Engl J Med* 1993; 328:164-70.
103. **Schurz-RA**, Benzer-W: Hormone replacement in postmenopausal women with coronary heart disease. Results and clinical consequences from recent studies. *Wien Klin Wochenschr Suppl* 1997; 2:42-5.
104. **Silva de Sa-MF**, Meirelles-RS : Vasodilatation effect of estrogen on the human umbilical artery. *Gynecol Invest* 1977; 8:307.
105. **Spencer-AP**: Hormone replacement therapy should be administered as secondary prevention of coronary artery disease. *Pharmacotherapy* 2000; 20(9):1028-33.
106. **Spencer-CP**, Morris-EP, Rymer-JM: Selective estrogen receptor modulators: Women`s panacea for the next millenium? *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180(3Pt1):763-70.
107. **Squadrito-F**, Altavilla-D, Squadrito-G, Campo-GM, Arlotta-M, Arcoraci-V, Minutoli-L, Serrano-M, Saitta-A, Caputi-AP: 17beta-oestradiol reduces cardiac leukocyte accumulation in myocardial ischaemia reperfusion injury in rat. *Eur J Pharmacol* 1997; 335(2-3):185-92.
108. **Stanford-JL**, Weiss-NS, Voigt-LF, Daling-JR, Habel-LA, Rossing-MA: Combined oestrogen and progestin hormone replacement therapy in relation to risk of breast cancer in middle-aged women. *JAMA* 1995; 274:137-42.
109. **Steinberg-D**: Antioxidants in the prevention of human atherosclerosis. *Circulation* 1992; 85:2337-44.
110. **Sugioka-JM**, Shimosegawa-Y, Nakano-MM: Estrogens as natural antioxidants of membrane lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1987; 210:37-39.
111. **Szabolcs-MJ**, Ravalli-S, Minanov-O, Sciacca-RR, Michler-RE, Cannon-PJ: Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection. *Transplantation* 1998; 65(6):804-12.
112. **Szafran-H**, Smielak-Korombel-W: The role of estrogens in hormonal regulation of lipid metabolism in women. *Przegl Lek* 1998; 55(5):266-70.
113. **Tilney-NL**, Kupiec-Weglinski-JW: Advances in the understanding of rejection mechanisms. *Transplant Proc* 1989; 21(1): 10-13.

114. **Timmermann-W**, Gassel-HJ, Ulrichs-K, Zhong-R, Thiede-A: Organtransplantation in rats and mice. Springer-Verlag ISBN 3-540-64081-9 S.69-72.
115. **Tsao-PS**, McEvoy-LM, Drexler-H, Butcher-EC, Cooke-JP: Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 1994; 89(5):2176-82.
116. **Tsao-PS**, Wang-B, Buitrago-R, Shyy-JY, Cooke-JP: Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* 1997; 96(3):934-40.
117. **Ueland-K**, Parer-JT: Effects of estrogens on the cardiovascular system of the ewe. *Am J Obstet Gynecol* 1966; 96:400.
118. **Uretsky-BF**, Kormos-RL: Cardiac events after heart transplantation: incidence and predictive value of coronary arteriography. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:45-51.
119. **Vargas-R**, Thomas-G, Wroblewska-B, Ramwell-PW: Differential effects of  $17\alpha$  and  $17\beta$  estradiol on  $PGF_{17\alpha}$  mediated contraction of the porcine coronary artery. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* 1989; 19:277-80.
120. **Vita-JA**, Treasure-CB, Nabel-EG, McLenachan-JM, Fish-RD, Yeung-AC, Vekshtein-VI, Selwyn-AP, Ganz-P: Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81:491-97.
121. **von Scheidt-W**: Herztransplantation. Hrsg Klinische Kardiologie (4.Aufl.) Berlin-Heidelberg-NewYork: Springer 1996; 1060-90.
122. **Weiner-CP**, Lizasoain-I, Baylis-SA, Knowles-RG, Charles-IG, Moncada-S: Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91:5212-16.
123. **Wenger-NK**: Postmenopausal hormone therapy. Is it useful for coronary prevention? *Cardiol Clin* 1998; 16(1):17-25.
124. **Weryha-G**, Pascal-Vigneron-V, Klein-M, Leclere-J: Selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11(4):301-6.
125. **Westerveld-HE**: Estrogens and postprandial lipid metabolism. *Atherosclerosis* 1998; 141Suppl 1:S105-7.
126. **White-RC**, Darley-Usmar-V, Oparil-S: No role for NO in estrogen-mediated vasoprotection? *Circulation* 1997; 96:2769-71.
127. **White-RE**, Darkow-DJ, Lang-JL: Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 1995; 77(5):936-42.

128. **Williams-JK**, Adams-MR, Herrington-DM, Clarkson-TB: Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:452-57.
129. **Williams-JK**, Adams-MR, Klopfenstein-HB: Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1990; 81:1680-87.
130. **Witztum-JL**, Steinberg-D: Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88:1785-92.
131. **Worrall-NK**, Chang-K, Suau-GM, Allison-WS, Misko-TP, Sullivan-PM, Tilton-RG, Williamson-JR, Ferguson-TB jr: Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents myocardial and systemic vascular barrier dysfunction during early cardiac allograft rejection. *Circulation Res* 1996; 78(5):769-78.
132. **Worrall-NK**, Misko-TP, Sullivan-PM, Hui-JJ, Ferguson-TB jr: Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates established acute cardiac allograft rejection. *Ann Thorac Surg* 1996; 62:378-85.
133. **Worrall-NK**, Pyo-RT, Botney-MD, Misko-TP, Sullivan-PM, Ferguson-TB jr: Inflammatory cell-derived NO modulates cardiac allograft contractile and electrophysiological function. *Am J Physiol* 1997; 273:H28-37.
134. **Yan-Z**, Yokota-T, Zhang-W, Hansson-GK: Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. *Circulation Res* 1996; 79(1):38-44.
135. **Yokoyama-H**, Ohmi-M, Murate-S, Mohri-H: Proposal of a working left heart model with a heterotopic transplantation technique in rats. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14(4):706-12.

## **DANKSAGUNG**

Herzlichen Dank an das Team der Würzburger Herz- und Thoraxchirurgie, das es ermöglichte, dass diese Dissertation mit dem Nachwuchsförderpreis 2002 der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie ausgezeichnet wurde:

Hierfür danke ich in erster Linie meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. O. Elert, Direktor der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität Würzburg. Ihm möchte ich außerdem für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. V. Lange aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität Würzburg für alle wissenschaftlichen Ratschläge, die Schaffung eines angenehmen, freundschaftlichen Arbeitsklimas, sein stetes Interesse am Fortgang der Dissertation und die zahlreichen Möglichkeiten, meine Arbeit präsentieren zu dürfen. Sein enormes persönliches Engagement bei der Vermittlung mikrochirurgischer Operationstechniken war von großer Hilfe.

Dank gilt auch Herrn Dr. med. T. Deuse für die hilfreiche, konstruktive Kritik an der Arbeit sowie für die Motivation beim Fertigstellen. Außerdem für seine engagierte Mitarbeit bei den mikrochirurgischen Operationen.

Ein liebes Dankeschön an Frau R. Wahn für die sorgfältige Anfertigung von histologischen Präparaten und die hilfsbereite und freundschaftliche Begleitung der Promotion.

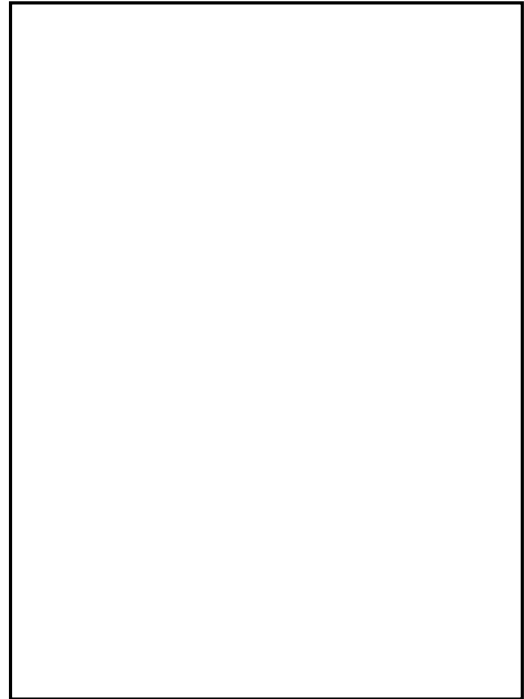
Mein Dank gilt weiterhin:

Herrn Professor Dr. med. B. Allolio, Leiter des Schwerpunktes Endokrinologie/Diabetologie/Rheumatologie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, für die Durchführung der biochemischen Untersuchungen in seinem Endokrinologischen Labor und die hilfreiche Beratung bei endokrinologischen Fragen.

Herrn Professor Dr. med. A. Thiede, Direktor der chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die Bereitstellung tierexperimenteller Operationsräume.

## Lebenslauf

Geburtstag: 26.12.1974  
Geburtsort: Würzburg  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig  
Kinder: keine



26.12.1974 geboren in Würzburg  
1981 - 1984 Grundschule in Würzburg  
1984 - 1994 Mozart-Gymnasium (neusprachlich) in Würzburg  
1993 Teilnahme bei „Jugend forscht“ im Fachgebiet Biologie  
1994 Abitur  
1995 - 2000 Medizinstudium an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg  
1997 Physikum  
1998 1. Staatsexamen  
2000 2. Staatsexamen  
2000 - 2001 Medizinstudium an der LMU München  
2001 3. Staatsexamen (1,0)  
2001 Teilapprobation  
2001 - 2002 ÄiP in der Herzchirurgie Grosshadern (Ludwig-Maximilian-Universität, München)  
2001 Auszeichnung der Dissertation mit dem Nachwuchsförderpreis der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie  
2002 Wechsel in die Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Hamburg