

**Kardiovaskuläre Östrogenwirkungen unter Berücksichtigung der
aeroben Kapazität sowie der Leukozyten- und
Thrombozytenfunktion *in vitro* und *in vivo* bei postmenopausalen
Frauen mit Syndrom X**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Rainer U. Pliquett,
geboren am 9. September 1970 in Leipzig,

angefertigt an
der Universität Leipzig, Herzzentrum GmbH,
Klinik für Innere Medizin und Kardiologie,
Professor G. Schuler,

Betreuer:
Privatdozent Dr. Rainer J. Zotz

Beschluß über die Verleihung des Doktorgrades vom:

Bibliographische Beschreibung:

Pliquett, Rainer: Kardiovaskuläre Östrogenwirkungen unter Berücksichtigung der aeroben Kapazität sowie der Leukozyten- und Thrombozytenfunktion *in vitro* und *in vivo* bei postmenopausalen Frauen mit Syndrom X.

Universität Leipzig, 1999 ; Dissertation.

81 S., 68 Lit., 10 Abb., 13 Tab.

Referat:

In dieser Arbeit wurde der Östrogeneinfluß auf die Monozytenfunktion bei postmenopausalen Frauen mit Syndrom X gezeigt über eine verminderte Expression von monozytärem Pan-Leukozyten-Antigen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* und hinsichtlich einer geringeren Apoptosebereitschaft neutrophiler Granulozyten nach Inkubation mit Östradiol *in vitro*. Weiter bewirkte Östrogen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Aktivierung der Thrombozyten beurteilt am von-Willebrand-Faktor-Rezeptor ; dagegen zeigt sich nach 4 Wochen Östrogentherapie *in vivo* eine tendenzielle Abnahme der Fibrinogenrezeptor-Expression. Die Spiroergometrie-Resultate vor und nach Östrogensubstitution zeigten eine signifikante Zunahme der aeroben Kapazität als Hinweis auf eine Verbesserung der endothelabhängigen vaskulären Regulation.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Problemstellung und Literaturübersicht	6
1.2	Hintergrund zur kardiovaskulären Protektion durch Östrogen	7
1.2.1	Lipoproteinmetabolismus	7
1.2.2	Gerinnung	8
1.2.3	Endotheldysfunktion	9
1.2.4	Aerobe Kapazität	10
1.2.5	Apoptoseverhalten peripherer mononukleärer Blutzellen unter Östrogen	11
1.3	Zielstellung	11
1.4	Arbeitshypothesen	12
1.5	Aufgabenstellung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Patientinnen	13
2.2	Blutuntersuchungen	16
2.2.1	Blutabnahme	16
2.2.2	Oxidativer Streß	16
2.2.3	Hormonstatus	17
2.3	Durchflußzytometrie	17
2.3.1	Antikörper für Durchflußzytometrie	17
2.3.2	Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Eigenschaften	19

	Seite	
2.3.3	Reagenzien	20
2.3.4	Präparation der Blutproben von Gruppe I (in vivo) und Gruppe II (<i>in vitro</i>): Thrombozyten-Leukozyten-Assay	21
2.3.5	Präparation der Blutproben der Probandinnen von Gruppe III: Apoptose-Assay	22
2.3.6	Durchflußzytometrie-Messung	23
2.4	Spiroergometrie	25
2.5	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Thrombozytenfunktion und Östrogen	27
3.1.1	Einfluß von 17 β -Östrogen auf die Thrombozytenaggregation über CD41 und –adhäsion über CD42b <i>in vivo</i>	27
3.1.2	Einfluß von 17 β -Östrogen auf die Thrombozytenadhäsion via CD42b und kein Einfluß auf die Thrombozytenaggregation via CD41 <i>in vitro</i>	31
3.2	Leukozytenfunktion und Östrogen	37
3.2.1	Einfluß von 17 β -Östrogen auf die Monozyten- und Lymphozytenfunktion über CD45 <i>in vivo</i>	37
3.2.2	Einfluß von 17 β -Östrogen auf die Monozytenfunktion via CD45 und CD14 <i>in vitro</i>	39
3.2.3	Verringerung der Bereitschaft zu Apoptose bei neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i> durch Östrogen	43
3.3	Oxidativer Streß und Östrogen	46
3.3.1	Vermittlung einer tendenziell geringeren Malondialdehyd-Bildung <i>in vivo</i> durch Östrogen	46

	Seite
3.3.2 Fehlender Nachweis auf Beeinflussung der anti-LDLox-Bildung <i>in vivo</i>	47
3.4 Aerobe Kapazität und Östrogen	48
4 Diskussion	51
4.1 Dateninterpretation, Limitationen und Fehlerdiskussion	51
4.1.1 Thrombozyten	51
4.1.2 Monozyten	51
4.1.3 Lymphozyten	52
4.1.4 Neutrophile Granulozyten	52
4.1.5 Limitationen der Studie	53
4.1.6 Fehlerbetrachtung	53
4.2 Östrogen und Endotheldysfunktion	54
4.2.1 Östrogen als Therapie der endothelialen Dysfunktion	54
4.2.2 Aerobe Kapazität und endotheliale Dysfunktion	56
4.2.3 Kardiovaskuläre Ereignisse und Endotheldysfunktion	58
4.3 Nebenwirkungen	59
5 Schlußfolgerungen in bezug auf die Arbeitshypothesen	59
Fachwortverzeichnis	62
Abkürzungsverzeichnis	64
Abbildungsverzeichnis	65
Tabellenverzeichnis	66
Literaturverzeichnis	68

1 Einleitung

1.1 Problemstellung und Literaturübersicht

Östrogene sind alle Wirkstoffe, die bei der Frau in der ersten Zyklushälfte die Funktion des Ovars ersetzen können (SCHMIDT-MATTHIESEN, 1992). Dem Östradiol als biologisch aktivstem Östrogen kommt die größte therapeutische Bedeutung zu. In der Prämenopause bei Reproduktion und Ausbildung des weiblichen Phänotyps bedeutsam stellt es nach der Menopause eine potente antiatherogene Therapie dar.

So haben Frauen bis zur Menopause im Vergleich zu Männern gleichen Alters und Risikoprofils eine geringere Inzidenz an koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt. Nach der Menopause nimmt die Infarktinzidenz bei Frauen zu und erreicht die gleiche Häufigkeit wie bei Männern. Durch den prämenopausal genossenen Schutz sind Frauen beim Erleiden Ihres ersten Infarktes deutlich älter als Männer. Eine Hormonersatztherapie (HRT) vermag den prognostischen Vorteil aufrechtzuerhalten (GRODSTEIN et al. 1997, HENDERSON et al. 1991). Der kardiovaskuloprotektive Effekt einer Hormonersatztherapie wird dem Östrogen zugeschrieben, da es im Vergleich zur Kombination mit Progesteron einen günstigeren Einfluß auf Lipidparameter hat, antioxidativ wirksam ist und bei postmenopausalen Frauen mit koronarer Herzerkrankung im Gegensatz zur Kombinationstherapie eine Zunahme der Herzfrequenzvariabilität bewirkt (CHRIST et al. 1999).

Insbesondere Frauen mit früher, natürlicher oder chirurgischer Menopause ohne Hormonsubstitution entwickeln eine Koronarsklerose (HU et al. 1999) bzw. Syndrom X (SARREL et al. 1992). Eine frühe Menopause wird deshalb als eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor angesehen. Ursache des Symptomenkomplexes Syndrom X stellt eine endotheliale Dysfunktion dar (EGASHIRA et al. 1993). Diese wird offensichtlich durch Östrogenmangel begünstigt und durch Östrogensubstitution gelindert (ROSANO et al. 1995).

und 1996). Bereits jetzt stellt die Hormonersatztherapie eine Behandlungsoption aus kardiologischer Sicht für Indikationen wie Hyperlipidämie (DARLING et al. 1997) und Sekundärprävention nach Myokardinfarkt (RYAN et al. 1996) dar. Neben klimakterischen Beschwerden sind weitere Indikationen wie Osteoporose etabliert, der Einsatz bei seniler Demenz wird aufgrund neuroprotektiver Eigenschaften untersucht.

Eine Hormonersatztherapie ist mit einer Verminderung der Zahl von Myokardinfarkten und somit arteriellen Thrombosen, jedoch tendenziell mit einer Zunahme venöser Thrombosen verbunden. Der Einfluß auf die Gerinnung ist somit uneindeutig. Vor Ausweitung der Anwendung einer Östrogensubstitution aus kardiologischer Sicht sollte der Mechanismus des Schutzes vor kardiovaskulären Ereignissen auf Gerinnungsebene weiter beleuchtet werden.

1.2 Hintergrund zur kardiovaskulären Protektion durch Östrogen

1.2.1 Lipoproteinmetabolismus

Die prognostisch günstige Wirkung von Östrogen auf das kardiovaskuläre System wird dadurch erklärt, daß Östrogen LDL-Cholesterol (engl. „low density lipoprotein-cholesterol“, Cholesterol niedriger Dichte) um ca. 37% senkt und HDL-Cholesterol (engl. „high density lipoprotein-cholesterol“, Cholesterol hoher Dichte) um ca. 14% erhöht. Zusätzlich als ungünstiger Effekt kommt es zu einer Erhöhung der Triglyzeride um ca. 15% (THE WRITING GROUP FOR THE PEPI TRIAL, 1995).

Darüberhinaus senkt Östrogen die Konzentration von Lipoprotein (a) um 22% (MESCHIA et al. 1998). Lp (a) ist ein prognostisch bedeutsamer Serummarker für das Risiko des Auftretens von Myokardinfarkten. Die Konzentrationserniedrigung durch Östrogen ist im Vergleich zu anderen lipidsenkenden Therapien eine einzigartige Wirkung. Östrogen vermittelt weiter im Gegensatz zu Gestagen und Testosteron einen antioxidativen Effekt, der die Entstehung von Lipidperoxidationsprodukten wie oxidiertes LDL- Cholesterol und Isoprostane behindert (ARTEAGA et al 1998). Die Kombination dieser Mechanismen begründet die antiatherogene Potenz von

Östrogen, da die Entstehung von oxidiertem LDL-Cholesterol von verschiedenen Ansätzen bekämpft wird.

1.2.2 Gerinnung

Östrogen erniedrigt die Konzentration von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor und von Fibrinogen. Eine prothrombotische Wirkung erwächst aus der Senkung der Serumkonzentrationen von Protein S und Antithrombin III (MENDELSON et KARAS, 1999). Die Aktivierbarkeit des Faktor VII wird durch Östrogen beeinflusst (SCARABIN et al. 1989). Der Östrogeneffekt ist auf Gerinnungsebene im arteriellen Gefäßsystem ein überwiegend fibrinolytischer (KOH et al. 1997). In einem Primatenmodell trat unter experimenteller Östrogengabe keine Neigung zu arteriellen Thrombosen auf (BELLINGER et al. 1998). Die tatsächliche Verminderung der Inzidenz an Myokardinfarkten und so arteriellen Thrombosen unter Östrogensubstitution rückt die Blutplättchenfunktion in den Blickpunkt, da antithrombozytäre Therapiekonzepte wie die Gabe von Acetylsalicylsäure ebenfalls eine Abnahme arterieller Thrombosen bewirken. Der Aktivitätszustand der Thrombozyten hängt von einer Reihe von Faktoren ab (GAWAZ 1999, in modifizierter Form), die hier zur Abgrenzung von der plasmatischen Gerinnung als thrombozytäre Gerinnungsparameter angeführt werden.

Aktivatoren

Adenosindiphosphat, Kollagen,
Thrombin, Thromboxan,
Adrenalin, PAF, ADH,
F2-Isoprostan, Serotonin ;

Inhibitoren der Thrombozyten

Stickstoffmonoxid,
Prostaglandine E2 und I2
Antioxidantien,
Theophyllin ;

Der Einfluß von Östrogen auf die Thrombozytenfunktion ist weitgehend unklar. Studien zeigen eine zyklusabhängige und somit östrogen- oder progestinabhängige Expression des Plättchenintegrins GpIIb bei prämenopausalen Frauen (FARADAY et al. 1997). Als Mechanismus kommt die Beeinflussung der Endothelfunktion durch Östrogen in Frage, da endotheliales Stickstoffmonoxid die Blutplättchen inhibiert (DE GRAAF et al. 1992). LDL-Cholesterol, welches durch Östrogen im Serum vermindert wird,

beeinflusst die Fibrinogenanbindung (VOLF et al. 1997), Hypercholesterolämie hat insgesamt einen aktivierenden Effekt auf die Thrombozytenfunktion (DAVI et al. 1996). Antioxidative Eigenschaften von Östrogen können die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten wie z.B. gerinnungsaktiven Isoprostanen beeinflussen. Eine Östrogensersatztherapie beeinflusst ferner das Thrombozytenvolumen (RANGANATH et al. 1996), dies gilt als morphologischer Hinweis auf einen veränderten Aktivitätszustand (SHITIKOVA et al. 1997). Der experimentelle Hinweis, daß Östrogen die Apoptoserate endothelialer Zellen vermindert (ALVAREZ et al. 1997), kann über eine herabgesetzte Bildung von Mikropartikeln als Schutz vor Plättchenaktivierung interpretiert werden (MALLAT et al. 1999).

1.2.3 Endotheldysfunktion

Das Endothel stellt ein Ziel der Östrogenwirkung durch die Beeinflussung der Mitogen-Activated Protein Kinase (KIM-SCHULZE et al. 1998) dar. Östrogen verändert günstig die endothelabhängige Gefäßreagibilität (COLLINS et al. 1995, REIS et al. 1994), als Mechanismus wird die Aktivierung der konstitutiven endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (KLEINERT et al. 1998, CAULIN-GLASER et al. 1997) diskutiert. Eine kombinierte Hormonersatztherapie verfehlte jedoch eine korrektive Wirkung auf die gestörte Gefäßreagibilität bei endothelialer Dysfunktion (SORENSEN et al. 1997). Weiter vermindert Östrogen die Endothelin-1-Produktion (CHEN et al. 1998).

Die Prinzmetal-Angina als Extremform koronarer Vasospasmen infolge endothelialer Dysfunktion tritt vorwiegend in Ruhe auf und kann mit akutem Myokardinfarkt, ventrikulären Arrhythmien und somit plötzlichem Herztod assoziiert sein.

Davon abzugrenzen ist das kardiale Syndrom X, definiert als belastungsabhängige Angina pectoris trotz angiographisch unauffälliger Koronarien. Neben der Affektion epikardialer Leitgefäße kommt eine mikrozirkulatorische Angina für ein Syndrom X in Betracht. Die endotheliale Dysfunktion von Arteriolen verursacht einen verzögerten koronaren Blutabfluß

infolge des erhöhten Vasotonus. Die dynamische Obstruktion wird bei beiden Formen durch eigentlich physiologische Stimuli der Vasodilatation wie vermehrte Scherkräfte am Endothel und vasoaktive Substanzen aus Plättchen wie Serotonin und Thromboxan A2 induziert (BRAUNWALD, 1997). Acetylcholin vermittelt bei der endothelialen Dysfunktion anstelle von Vasodilatation paradoxerweise eine Vasokonstriktion. Die Arbeiten von FURCHGOTT und ZAWADZKI (1980) belegen, daß Acetylcholin nur bei anatomisch und physiologisch erhaltener Intima eine Vasodilatation auslöst. Stickstoffmonoxid (NO) dagegen entfaltet endothelunabhängig eine Vasodilatation. Die verringerte Bildung von Stickstoffmonoxid an Orten endothelialer Dysfunktion durch z.B. eine vermehrte Bildung des endogenen Antagonisten der endothelialen konstitutiven NO-Synthase, N,N-dimethylarginin (MIYAZAKI et al. 1999), erklärt das erhöhte Atherothromboserisiko.

Diagnostiziert werden kann eine gestörte endothelabhängige Vasodilatation mittels Gefäßsonographie unter Stimulationsbedingungen nichtinvasiv oder durch Induktion von paradoxen Vasokonstriktionen mittels Acetylcholin oder Ergotamin invasiv. Hinweise bestehen darauf, daß die Korrektur einer Endotheldysfunktion sich in einer Normalisierung der systemischen Vasoregulation und so Verbesserung der aeroben Kapazität niederschlägt (HAMBRECHT et al. 1998, NIEBAUER et al. 1999).

1.2.4 Aerobe Kapazität

Es ist bekannt, daß bei Patienten, die an koronarer Herzerkrankung leiden, die aerobe Kapazität oder Atemreserve erniedrigt ist (Takkunen et al. 1978). Die aerobe Kapazität wird einerseits durch die anaerobe Schwelle (AT), d.h. der Zustand des Übergangs von überwiegend aerober zu anaerober Glykolyse, und andererseits durch die maximale Sauerstoffaufnahme pro Zeit und Körpermasse ($V_{O_{2max}}$) definiert. Die nicht adäquate $V_{O_{2max}}$ wird erklärt durch beeinträchtigte myokardiale Sauerstoffzufuhr aufgrund hämodynamisch wirksamer Stenosen. Dadurch steigt das Herz-Zeit-Volumen nicht adäquat, die Leistungsfähigkeit und $V_{O_{2max}}$ sind herabgesetzt. Es ist bislang das Verhalten der aeroben Kapazität bei Patienten mit Syndrom X unbekannt. Die

dynamische Obstruktion der sonst unauffälligen Gefäße sollte sich – für den Fall einer funktionellen Myokardischämie – ebenfalls in einer beeinträchtigten aeroben Kapazität niederschlagen.

Die Testung der aeroben Kapazität vor und nach Östrogensubstitution bei Syndrom X wird als eine neue Monitoruntersuchung der endothelialen Dysfunktion getestet, da eine morphologische kardiale und pulmonale Erkrankung nicht vorliegt. Ferner erfolgt keine Intervention, die die Skelettmuskulatur involviert.

1.2.5 Apoptoseverhalten peripherer mononukleärer Blutzellen unter Östrogen

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein regulatorisches Instrument kernhaltigen Blutzellen. Die Apoptosebereitschaft als Antwort auf proapoptotische Signale oder internen Stress ist ein bestimmbares Merkmal der Zellfunktion. Apoptose ist gekennzeichnet durch morphologische Zeichen wie Chromatinkondensation, Fragmentation der DNS in Abschnitte von 200kbp, mitochondriale Schwellung, zelluläre Größenzunahme und durch Veränderungen an der Zelloberfläche wie der Externalisierung von Phosphatidylserin. Hier soll die Frage untersucht werden, ob Östrogen einen Einfluß auf die Apoptosebereitschaft von Leukozyten hat. Es konnte bereits eine Abnahme der Apoptosebereitschaft durch Östrogen bei Endothelzellen (ALVAREZ et al. 1997), bei peripheren mononukleären Zellen von Frauen mit regelrechtem Zyklus *in vitro* (EVANS et al. 1997) und bei monoblastoiden Zellen (VEGETO et al. 1999) gezeigt werden.

1.3 Zielstellung

Im Focus dieser Arbeit steht der Einfluß einer Östrogentherapie auf die korpuskuläre Gerinnung bzw. Plättchen-Leukozyten-Interaktion *in vitro* und *in vivo*. Die Frage ist, ob die geringere Inzidenz an koronaren Ereignissen bei prämenopausalen Frauen bzw. postmenopausalen Frauen mit Hormonersatztherapie über die Beeinflussung der Blutplättchenfunktion zumindest teilweise erklärt werden kann. Neben der kardiovaskulären Protektion vermittelt Östrogen eine prothrombotische Nebenwirkung im

venösen System, welche auf Ebene der Thrombozyten hier ebenfalls beurteilt werden soll. Weiterhin wird der Einfluß von Östrogen auf die Apoptosebereitschaft bei peripheren mononukleären Zellen als Teil der Zellfunktion *in vitro* untersucht. Die Endothelfunktion wird nicht nur indirekt über Unterschiede aus Messungen *in vitro* und *in vivo* beurteilt, sondern auch über die Bestimmung der maximalen Sauerstoffaufnahme-Kapazität in der Spiroergometrie erfaßt vor und nach Östrogensersatztherapie.

1.4 Arbeitshypothesen

- Östrogen entfaltet eine hemmende Wirkung auf die thrombozytäre Gerinnung. Die Wirkung von Östrogen auf die korpuskuläre Gerinnung hängt sowohl von der Endothelfunktion als auch von der Interaktion kernhaltiger Blutzellen mit Blutplättchen ab.
- Östrogen induziert Veränderungen in der Funktion mononukleärer Zellen einschließlich einer veränderten Bereitschaft zu Apoptose.
- Östrogen reduziert den oxidativen Streß.
- *In vivo* normalisiert Östrogen bei postmenopausalen Frauen mit Syndrom X die Endothelfunktion und somit die endothelabhängige Vasoregulation, meßbar an einer verbesserten aeroben Kapazität. Dies impliziert das Vorliegen einer reduzierten aeroben Kapazität vor Östrogensubstitution.

1.5 Aufgabenstellung

Eine prospektive, klinische Studie wird durchgeführt zur Detektion von Parametern der thrombozytären Gerinnung und Leukozytenfunktion *in vivo* vor und nach Östrogentherapie und *in vitro* mit und ohne Inkubation von Vollblut mit Östrogen. Zusätzlich werden in der *in vivo*- Gruppe die aerobe Kapazität via maximale Sauerstoffaufnahme in der Spiroergometrie sowie Serumparameter zum oxidativen Streß via Malondialdehyd und Antikörper gegen oxidiertes LDL-Cholesterol untersucht.

- Die thrombozytäre Gerinnung wird beurteilt anhand der Expressionen der thrombozytären Differenzierungsantigene CD41, CD62p, CD42b und der

Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten in der Durchflußzytometrie *in vivo* und *in vitro*.

- Die Lymphozyten-, Monozyten- und Neutrophilenfunktion wird anhand der Expression von CD14 und CD45 erfaßt sowie bezüglich der Apoptosebereitschaft evaluiert.

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnen

Zwei Patientinnengruppen (Gruppe I und II, Tab.1) wurden aus dem Patientengut, eine Probandinnengruppe (Gruppe III, Tab.1) aus Mitarbeiterinnen des Herzzentrums Leipzig gebildet.

Patienten	Anzahl	LVEF	BMI	Medikation	
	N	(%)	(cm ² /kg)	Antihyper- tensiva	CSE- Inhibitor
Gruppe I	13	66	28,5	67%	0
Gruppe II	9	62	29,7	78%	22%
Gruppe III	11	k.A.	23	70%	20%

Tabelle 1: Charakteristika der Teilnehmerinnen der Gruppen I, II und III unter Angabe der linksventrikulären Ejektionsfunktion (LVEF), des body mass index (BMI) und der Begleitmedikation.

Gruppe I (in vivo – Studie)

20 postmenopausale Frauen mit kardialem Syndrom X gaben ihr Einverständnis zu einer kontrollierten, achtwöchigen Östrogen-substitution sowie zu Blutuntersuchungen vor und nach 4 oder 8 Wochen Östrogensubstitution sowie zu einer Spiroergometrie-Untersuchung vor und nachher. Keine Patientin nahm steroidale oder nonsteroidale antiinflammatorische Medikamente. Zwei Frauen zogen Ihr Einverständnis nach der Grunduntersuchung zurück ; eine Frau wurde vor Beginn der Hormongabe ausgeschlossen, weil sie noch perimenopausal war. Die Östrogensersatztherapie wurde bei den verbliebenen 17 Frauen nach schriftlichem Einverständnis und nach Prüfung der für diese Studie festgelegten Ein- und Ausschlußkriterien sowie nach Zustimmung des mitbehandelnden Gynäkologen mit synthetischem 17β -Östrogen (2mg/d Estradiol p.o., Jenapharm®) begonnen. Ein positives Votum der lokalen Ethikkommission wurde für diese Studie eingeholt.

Zwei Patientinnen beendeten die Hormonsubstitution vorfristig nach 6- bzw. 7-tägiger Behandlung wegen Mastodynie bzw. Unterleibschmerzen und wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die durchflußzytometrische Kontrolluntersuchung erfolgte bei 5 Patientinnen nach 4 Wochen und bei 8 Patientinnen nach ca. 8 Wochen Behandlung, eine Patientin erschien nicht zum angegebenen Termin, oder das entnommene Blut mußte wegen zu langer Lagerung verworfen werden. Alle Patientinnen pausierten die Östrogensubstitution nach längstens 8 Wochen, um einer Endometriumhyperplasie vorzubeugen.

Von 12 Patientinnen liegen komplette Spiroergometrie-Daten vor. Zwei Patientinnen standen der Kontrolluntersuchung ablehnend gegenüber, eine Patientin konnte die Kontrolluntersuchung wegen Schmerzen infolge Degeneration der Hals- und Brustwirbelsäule nicht absolvieren.

Bei 5 konsekutiven Patientinnen erfolgten Serumbestimmungen auf Marker des oxidativen Stresses vor und nach Östrogensersatztherapie.

Nachfolgend sind die Ein- und Ausschlußkriterien für Patientinnen der Gruppen I und II aufgelistet:

Einschlusskriterien

- postmenopausale Patientinnen bis 72 Jahre mit Angina pectoris (CCS II - III) und positivem Ischämienachweis in einer Fahrradergometrie oder Szintigraphie oder ischämiehinweisenden Veränderungen im Ruhe-EKG oder regionalen Wandbewegungsstörungen in der 2D-Echokardiographie bzw. Ventrikulographie
- schriftliche Einwilligung für eine Östrogenbehandlung nach Aufklärung über mögliche Risiken

Ausschlusskriterien

- angiographischer Nachweis von signifikanten Koronarstenosen oder Notwendigkeit einer Behandlung mit Acetylsalicylsäure
- Notwendigkeit einer Falthrombehandlung
- bereits bestehende Hormonbehandlung
- manifester arterieller Hypertonus mit Hinweis auf linksventrikuläre Hypertrophie oder diastolischer Therapiefolgsamkeitstörung in der 2D-Echokardiographie
- hypertrophe (obstruktive) Cardiomyopathie
- hämodynamisch relevanter Klappenfehler
- Herzschrittmacher-Träger oder Träger eines implantierbaren Kardioverter/Defibrillators
- Hinweise auf eine psychische Erkrankung, die einen Entscheidungsprozeß zur Teilnahme an einer klinischen Studie behindern
- schwerwiegende Begleiterkrankung
- Alter über 72 Jahre

Gruppe II (in vitro – Studie)

Um die Wirkung von Östrogen auf Thrombozyten und Leukozyten *in vitro* zu testen, wurden venöse Blutproben von einer alters- und risikogleichen Gruppe von 9 Patientinnen mit Syndrom X abgenommen. Ein- und Ausschlusskriterien sind analog zu Gruppe I. Die Verarbeitung erfolgte analog zu Gruppe I.

Gruppe III (Apoptose-Assay)

Venöses Blut von 11 gesunden postmenopausalen Frauen ohne Hormonsubstitution wurde zur *in vitro* Östrogen-Inkubation abgenommen zum Zwecke der Testung auf Apoptosebereitschaft neutrophiler Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten.

2.2 Blutuntersuchungen

2.2.1 Blutabnahme

Die Blutentnahme ist ohne Stauung mittels Manschette o.ä. erfolgt, um eine mögliche Thrombozytenaktivierung zu vermeiden. Am herabhängenden Arm wurde mit einer 17Gauge - Nadel eine antecubitale Vene punktiert, das Blut tropfte direkt in die vorbereiteten Blutentnahmeröhrchen mit Citratzusatz für Gruppen I und II bzw. Heparinzusatz für Gruppe III. Für die *in vitro* Inkubation des Blutes der Gruppen II und III wurde vor Blutentnahme Östradiol-Glucuronid in die Blutentnahmeröhrchen gegeben, es wurden so Östrogen - Endkonzentrationen von $c=0.01\text{nmol/l}$ und $c=1\text{nmol/l}$ (Gruppe II) bzw. $c=1.2\text{nmol/l}$ (Gruppe III) erreicht. Je ein Blutröhrchen pro Patientin blieb östrogenfrei und diente als Negativkontrolle. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach Abnahme unmittelbar (Gruppe I) oder nach 30minütiger Inkubation (Gruppen II und III) bei 37°Celsius und 5%iger Kohlendioxid-Atmosphäre mit und ohne Östrogen.

Die Östrogenkonzentration der Stammlösung wurde mehrfach extern laborchemisch (ACKERMANN, BAUMANN, VOERKEL, Leipzig-Mölkau, BRD) kontrolliert, die angegebene Endkonzentration wurde über die Verdünnung im Blutentnahmeröhrchen errechnet.

2.2.2 Oxidativer Streß

Blutproben von 5 konsekutiven Patientinnen aus Gruppe I wurden vor und nach Östrogensubstitution auf Surrogatparameter des oxidativen Stresses untersucht. Die Bestimmung von Malondialdehyd und von Antikörpern gegen oxidiertes LDL-Cholesterin mittels eines ELISA wurde im Lipidlabor von Prof. Richter, Institut für Pathobiochemie der Universität Leipzig, vorgenommen.

2.2.3 Hormonstatus

Follikelstimulierendes Hormon und 17 β -Östradiol sind vor Beginn der Östrogensubstitution zum Nachweis eines postmenopausalen Status extern untersucht worden im Labor ACKERMANN, BAUMANN, VOERKEL, Leipzig-Mölkau, BRD. Stichprobenweise erfolgte auch eine Serumspiegelkontrolle nach der 8wöchigen Östrogensubstitution, um die Therapiefolgsamkeit zu kontrollieren.

2.3 Durchflußzytometrie

2.3.1 Antikörper für Durchflußzytometrie

- Anti-CD41, Phycoerythrin-konjugiert (Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg, BRD) ;

Klon: P2 ;
Immunglobulin-Subtyp: murines IgG 1 ;
Immunogen: humanes GpIIb (CD41a auf Thrombozyten und Megakaryozyten) ;
Liganden des CD41: Fibrinogen, Fibronektin, Vitronektin, Kollagen, von – Willebrand - Faktor, Thrombospondin

Spezifität: reagiert mit GpIIb als Bestandteil des GpIIb/IIIa-Rezeptorkomplexes und inhibiert die ADP-, Thrombin- bzw. kollageninduzierte Thrombozytenaggregation (MCGREGOR et al. 1983). GpIIb/IIIa gehört zu den β_3 -Integrinen und ist Bestandteil der Plasmamembran, des offenen kanalikulären Systems und der α -Granula der Blutplättchen. Man unterscheidet den niedrigaffinen und den nach Plättchenaktivierung hochaffinen Zustand des Rezeptors, der durch diesen Antikörper nicht differenziert wird. Über die Markierung des Integrins läßt sich eine Aussage über eine veränderte Oberflächendichte des Integrins CD41 bzw. GpIIb und somit über den Aktivitätszustand der Thrombozyten machen.

- Anti-CD42b, Phycoerythrin - konjugiert (Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg, BRD) ;

Klon: SZ2 ;

Immunglobulin-Subtyp: murines IgG 1 ;

Immunogen: humanes Gplb (CD42b, von Willebrand-Faktor-Rezeptor) auf Thrombozyten und Megakaryozyten ;

Liganden des CD42: von Willebrand-Faktor, Thrombin

Spezifität: reagiert mit Gplb auf Megakaryozyten ristocetinabhängig, inhibiert die ristocetininduzierte Thrombozytenagglutination und inhibiert die Kollagen Typ I- und PAF (platelet activating factor) - induzierte Thrombozytenaggregation (RUAN et al. 1987). Von Willebrand-Faktor-Rezeptor interagiert mit an subendotheliale Kollagen verankertem, membranständigen von-Willebrand-Faktor und vermittelt so die initiale thrombozytäre Zellwand-Adhäsion oder Kontaktphase (GAWAZ, 1999). Im Gegensatz zu GpIIa/IIIb oder P-Selektin verringert sich die Oberflächendichte des von Willebrand-Faktor-Rezeptors nach Thrombinaktivierung durch Rezeptorinternalisierung. Der Aktivierungsgrad des Thrombozyten kann so über die Abnahme der CD42-Expression durchflußzytometrisch bestimmt werden.

- Anti-CD62P, Fluoreszein Isothiozyanat-konjugiert (Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg, BRD) ;

Klon: CLB-Thromb/6 ;

Immunglobulin-Subtyp: murines IgG 1 ;

Immunogen: humanes Thrombozytenantigen „granule membrane protein 140“ (CD 62p, P-Selectin) ;

Liganden des CD62 Sialyl LewisX, PSGL-1

Spezifität: reagiert mit GMP 140 auf Thrombozyten (MCEVER 1990). P-Selektin als thrombozytärer Aktivierungs- oder Degranulationsmarker wird bei Sekretion aus der α -Granula an die Membranoberfläche transloziert. P-Selektin ist ein entscheidender Rezeptor für die Thrombozytenadhäsion an

Leukozyten und ist involviert in inflammatorischen Reaktionen der neutrophilen Granulozyten.

- Anti-CD45, Allophycoyanin-konjugiert (Medac GmbH, BRD) ;

Klon: H130 ;
Immunglobulin-Subtyp: murines IgG 1 ;
Immunogen: humanes Pan-Leukozyten-Antigen
(CD45) ;

Spezifität: bindet an das Pan-Leukozyten-Antigen (STREULI et al. 1988).

- Anti-CD14, Fluoreszein Isothiozyanate-konjugiert (BD Immunocytometry Systems, USA) ;

Klon: MP9 ;
Immunglobulin-Subtyp: murines IgG 2b
Immunogen: humaner Lipopolysaccharidrezeptor
(CD14, GP55),

Spezifität: reagiert mit humanem Monozyten-/Makrophagen-Antigen CD14 sowie mit Neutrophilenantigen (DIMITRIU-BONA et al. 1983).

- Annexin V, Fluoreszein Isothiozyanat-konjugiert (Bender MedSystems, Wien, Österreich),

Im Kit sind Annexin V-FITC Propidiumjodid und Annexin-V-Binding-Buffer (Lot:30617/E8Fio2) enthalten.

Spezifität: Annexin V bindet an Phosphatidylserin.

2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Eigenschaften

Die Fluoreszenzfarbstoffe sind an der konstanten Region der monoklonalen Antikörper (Fc) konjugiert.

- Phycoerythrin (PE), Wellenlänge der Emissionsfluoreszenz: $\lambda=585\text{nm}$;
so markierte Antikörper: anti CD42b, anti CD41a
- Allophycoyanin (APC): Wellenlänge der Emissionsfluoreszenz:
 $\lambda=661\text{nm}$; so markierte Antikörper: anti CD45

- Fluoreszein Isothiozyanat (FITC): Wellenlänge der Emmissionsfluoreszenz: $\lambda=530\text{nm}$; so markierte Antikörper: anti CD62p, AnnexinV, anti CD14

2.3.3 Reagenzien

- Östradiol

für Patientinnengruppe I : Estradiol 2mg/d (Jenapharm®, BRD) ;

Wirkstoff: Estradiolvalerat.

für Patientinnengruppe II und III: Estradiol, (Sigma Deisenhofen, BRD) ;

Wirkstoff: 17 β -Estradiol-Natrium-glucuronid).

Lot-Nummer: 102H38832 ;

- TRAP6, Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6 (Bachem AG, Schweiz) ;

Aminosäuren-Sequenz: SFLLRN (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn),

Lot-Nummer: 521544,

verwendete Konzentration: 30 $\mu\text{mol/l}$;

- ADP, Adenosin 5´diphosphat (Sigma, Deisenhofen, BRD),

verwendete Konzentration: 15 $\mu\text{mol/l}$;

- Phosphatpuffer (Beckmann-Coulter GmbH) ;

500 mL destilliertes Wasser mit 0.01 mol/l Kaliumphosphat, 0.15 mol/l Natriumchlorid mit einem pH von 7.2 ± 0.2 ;

- Wasserstoffperoxid 30% (MERCK, Darmstadt, BRD) ;

Kulturmedium RPMI 1640 einschließlich 5% fetales Kälberserum, 1% humanes Serumalbumin, Antibiotikum/Antimycotikum, ph:7,4,: (Gibco-BRL, BRD),

CoolCalf™, fetales Kälberserum (Sigma, Deisenhofen, BRD) ;

Humanes Serumalbumin (Sigma, Deisenhofen, BRD), 30%-Lösung,
Antibiotic/Antimycotic 100x (Gibco BRL, Eggenstein ; BRD):
10000 IU Penicillin, 10000µg Streptomycin, 25µg/ml Amphotericin B in
physiologischer Kochsalzlösung.

2.3.4 Präparation der Blutproben von Gruppe I (in vivo) und Gruppe II (in vitro): Thrombozyten-Leukozyten-Assay

Die Expression von CD41, CD42b und CD62p auf Thrombozyten und CD45 und CD14 auf peripheren mononukleären Zellen sowie die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten wurde vor und nach Östrogensatztherapie *in vivo* bzw. nach *in vitro* Inkubation mit und ohne Östrogen mittels fluorochrommarkierter, monoklonaler Immunglobuline untersucht. Zur Präparation wurde das Blut im Verhältnis 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt und in drei Aliquots zu je 100µl verteilt. Nach Zugabe von 30µl PBS, 30µl Adenosindiphosphat (ADP) bzw. 60µl Thrombinrezeptor-Aktivator- Peptid (TRAP6) in je ein Aliquot wurden diese für 10 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Die Plättchenstimulanzien ADP und TRAP6 kommen zum Einsatz, um eine Aussage über die Stimulierbarkeit im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu machen. Danach werden je 20µl Zellsuspension aus den drei Aliquots in vorbereitete Reagenzgläser mit je zwei verschiedenen Antikörpergemischen gegeben, so daß aus einer Blutprobe zwei Stimulierungs- und ein Kontrollansatz und daraus schließlich 6 Ansätze mit fluorochrommarkierten Antikörpern zur durchflußzytometrischen Messung entstanden.

Pro 20µl Zellsuspension wurden folgende Antikörpermischungen verwendet:

- Antikörper-Mischung 1:

7µg anti CD41-PE, 4µg anti CD45-APC, 4µg anti CD14-FITC

- Antikörper-Mischung 2:

7µg anti CD42-PE, 8µg anti CD62p-FITC

Die erhaltenen Gemische aus fluorochrommarkierten Antikörpern und Zellsuspension wurden in einer 100µl-Pipettenspitze durch dreimaliges Aspirieren vermischt und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur und

Dunkelheit inkubiert, schließlich wurde die Fluorochrom-Bindungsreaktion durch Zugabe von je 0,5ml kaltem Phosphatpuffer vor der Messung gestoppt.

2.3.5 Präparation der Blutproben der Probandinnen von Gruppe III: Apoptose-Assay

Das Vollblut wurde nach entsprechender Inkubation mit und ohne Östradiol einer Dichtegradienten-Zentrifugation zur Zellseparation zugeführt. Dabei wurden 2ml Blut auf eine 1ml Ficoll®- Phase (Histopaque 1119) im Reagenzglas überschichtet. Die peripheren mononukleären Zellen wurden dann durch 20minütige Zentrifugation (400xErdbgravitation) isoliert, abpipettiert und in RPMI 1640 - Kulturmedium mit 5% fetalem Kälberserum und 1% humanem Serumalbumin resuspendiert. Wasserstoffperoxid wurde zu je 50µl Zellsuspension in zwei verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Die niedrigere Endkonzentration (H_2O_2 , c=0,5%) diente der Apoptose-Induktion. Die höhere verwendete Wasserstoff-peroxidkonzentration (H_2O_2 , c=15%) wurde gewählt zur Induktion von Nekrose als Kontrolle zur Abgrenzung von Apoptose. Als Negativkontrolle diente die Zugabe eines gleichen Volumen von Kulturmedium bei einem dritten Ansatz pro Blutprobe. Nach 10minütiger Inkubation wurden die Zellen mit Phosphatpuffer gewaschen und mit Bindungspuffer für weitere 10 Minuten inkubiert. Jeder Ansatz wurde dann 10 Minuten mit FITC-markiertem Annexin V und Propidiumjodid bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Die Reaktion wurde durch Lagerung der Reagenzgläser auf Eis gestoppt, die Proben wurden umgehend der Durchflußzytometrie zur Beurteilung der Apoptoserate der peripheren mononukleären Blutzellen zugeführt. Bei dem AnnexinV-Apoptose-Assay wird die spezifische, kalziumabhängige Bindung von FITC-markiertem Annexin V an Phosphatidylserin, einem asymmetrischen, normalerweise gegen das Zellinnere gerichteten Membranprotein, untersucht. Unter der Bedingung des programmierten Zelltodes verlieren die Zellen ihre Membrankonsistenz, und Phosphatidylserin läßt sich via Annexin V als Hinweis auf Apoptose auf der Membranoberfläche nachweisen. In dem Stadium ist die Zellmembran noch integer.

Durch den Verlust der Membranintegrität kann Propidiumjodid ungehindert Nukleotide des Zellkerns nekrotischer Zellen anfärben.

So ergeben sich folgende Konstellationen:

- annexinnegative/ propidiumjodidnegative Zellen: vital Zellen ;
- annexinpositive/ propidiumjodidnegative Zellen: apoptotische Zellen ;
- propidiumjodid-positive Zellen: nekrotische Zellen ;

2.3.6 Durchflußzytometrie-Messung

- *Gerät:* Die Proben wurden mit einem Tischdurchflußzytometer (FACSCalibur™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD), ausgestattet mit zwei Laserlicht-Quellen (Argon, $\lambda=488\text{nm}$ und Helium-Neon, $\lambda=635\text{nm}$), untersucht.

- *Meßprinzip:* Die zu untersuchenden Zellsuspensionen (je ca. 0,55ml) werden aus einem Reagenzglas durch eine Kanüle aspiriert, der Flüssigkeitsstrom mittels Trägerflüssigkeit (hydrodynamisch) mittig fokussiert und so Zelle auf Zelle von einem Laserstrahl erfaßt. Dabei wird sowohl die emittierte (spezifische) Fluoreszenz über Photomultiplier als auch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht von Partikeln über Photodioden erfaßt. Das Vorwärtsstreulicht oder 180°-Streulicht ist proportional der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht oder 90°-Streulicht ist proportional der Zell-Granularität. Die reflektierte Fluoreszenz kann durch seine Wellenlänge über ein System von Filtern einem Fluorochrom und so einem Antikörper bzw. Antigen zugeordnet werden. Dies erlaubt einen Rückschluss auf das Expressionsmuster einerseits von markierten Oberflächenproteinen, andererseits von zytosolischem Antigen im Fall einer permeabilisierten Zellmembran der zu untersuchenden Zellen.

- *Auswertung der Durchflußzytometriedaten:* Mittels eines Analyseprogramms (CellQuest™, BDIS, USA) können die Daten entsprechend den untersuchten Parametern in zweidimensionalen Diagrammen dargestellt und mittels Polygonumrahmung Populationen zugeordnet werden.

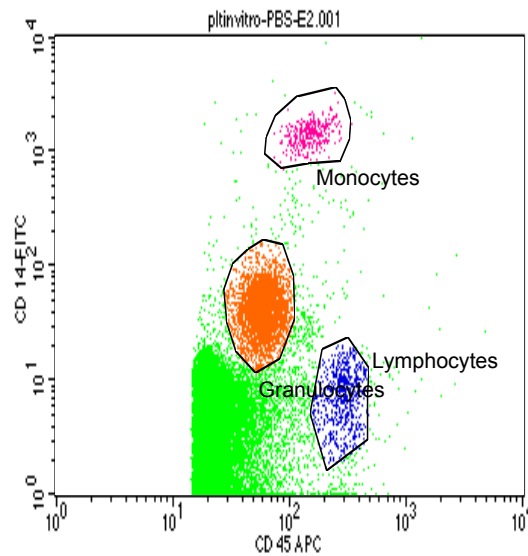


Abbildung 1: Gating der Leukozyten-Subpopulationen.

Die so durch Gating erhaltenen Populationen können nun mit Bool'scher Mathematik logisch verknüpft und dann analysiert werden. Zur Auswertung werden die Fluoreszenzintensitäten in Verhältnis zur Negativ-Kontrolle, die zeitgleich bestimmt wurde, gesetzt. So wird im Vergleich zur östrogenfreien Probe bzw. zur Probe vor Östrogenbehandlung eine relative Aussage möglich bezüglich Zu- oder Abnahme der Expression der untersuchten Oberflächenepitope unter Östrogeneinfluß.

- *Gerätekalibrierung und interne Qualitätskontrolle:* Als interner Standard für die durchflußzytometrische Auswertung dienen industriell gefertigte fluorchrommarkierte Kügelchen, die täglich zur Qualitätssicherung nach GCP als Partikelsuspension gemessen werden. Gerätespezifische Schwankungen können dann durch Adaption der Geräteeinstellung (z.B. durch Farbkompensation) ausgeglichen werden. Die Gerätekalibrierung erfolgte mit Kalibrierungspartikeln:

SPHERO™ APC und SPHERO™ Rainbow (Spherotech Inc., Liberville, USA)

2.4 Spiroergometrie

Vor und nach Hormonersatztherapie erfolgte eine symptomlimitierte Spiroergometrie. Das verwendete Fahrradergometer, Spirograph, die angeschlossene Computereinheit und Software sind ein Produkt der Firma Erich Jaeger GmbH, Höchberg, BRD. Das Gerät wurde täglich vor Benutzung geeicht. Die Ausgangsbelastung des Fahrradergometers betrug 25 Watt und ist stufenweise um 25 W nach je 3 Minuten gesteigert worden. Permanent sind die Herzfrequenz und die spiographischen Daten überwacht worden. Vor Beendigung jeder Belastungsstufe wurden Blutdruck und ein EKG registriert. Vor Beginn der Messung erfolgte eine dreiminütige Erwärmungsphase ohne Belastung. Dabei hat die Patientin Gelegenheit, sich an die Atemmaske zu gewöhnen, die Aufmerksamkeit wird von der Untersuchungssituation ab- und auf die Belastung hingelenkt.

Die Untersuchung wurde wegen muskulärer Erschöpfung und intractabler Dyspnoe oder Angina pectoris abgebrochen.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Meßergebnisse für CD41 und CD42b sowie CD14 und CD45 aus Grund- und Kontrolluntersuchung nach Hormonersatztherapie erfolgte mittels gepaartem zweiseitigem student's t-Test, wobei eine Normalverteilung vorausgesetzt wurde. Eine Signifikanz der Daten wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (Bonferoni) angenommen. Weil der Test für die begrenzte Größe nicht adäquat ist, erfolgte separat eine Betrachtung der Konfidenzintervalle für einen 95% Vertrauensbereich..

Es erfolgte zu jedem Meßpaar aus Grund- und Kontrolluntersuchung nach Hormonersatztherapie die Errechnung der relativen Änderung gemäß der Gleichung (1):

$$\text{relative Änderung (\%)} = \left(\frac{\text{Östrogen - Kontrolle}}{\text{Kontrolle}} \right) * 100\%$$

Von der Gesamtheit der relativen Änderungen pro Meßparameter sind die mittlere Änderung, die Standardabweichung (SD) und das Konfidenzintervall ($\alpha=0,05\%$) errechnet worden. Statistische Signifikanz wird anhand der Konfidenzintervalle postuliert, wenn die Null im Konfidenzintervall nicht eingeschlossen wird.

3 Ergebnisse

3.1 Thrombozytenfunktion und Östrogen

3.1.1 Einfluß von 17 β -Östrogen auf die Thrombozytenaggregation über CD41 und –adhäsion über CD42b *in vivo*

- Meßdaten der Thrombozytenreaktivität von Blut aus Gruppe I:

Stimulus/ Epitop	Vor Östrogen	28d Östrogen	56d Östrogen
Unstimuliert			
CD41	230,5 \pm 30,6	201,4 \pm 31,2	198,80 \pm 28,8
CD42b	311,9 \pm 32,2	289,8 \pm 26,6	276,6 \pm 47,5
CD62p	31,9 \pm 5,3	25,9 \pm 4,2	27,5 \pm 2,6
ADP			
CD41	499,5 \pm 78,1	465,0 \pm 110,3	440,1 \pm 38,5
CD42b	215,9 \pm 28,0	216,6 \pm 16,7	205,5 \pm 48,8
CD62p	38,0 \pm 5,3	32,7 \pm 2,7	39,3 \pm 8,3
TRAP 6			
CD41	417,8 \pm 34,1	307,0 \pm 63,9	385,8 \pm 75,7
CD42b	204,0 \pm 43,6	200,1 \pm 51,5	201,6 \pm 29,9
CD62p	64,9 \pm 15,4	52,5 \pm 19,9	55,5 \pm 10,2

Tabelle 2: Mittelwerte (\pm Konfidenzintervall) der Fluoreszenz-intensitäten von CD41, CD42b und CD62p vor und nach 4 bzw. 8 Wochen Östrogensubstitution (Gruppe I), angegeben in arbiträren Einheiten.

- Relation der Meßdaten der Thrombozytenreaktivität nach Östrogensatztherapie im Vergleich zur Grunduntersuchung:

Stimulus/ Epitop	% Änderung nach 28d Östrogen	P	% Änderung nach 56d Östrogen	p
Unstimuliert				
CD41	-9,9±11,1		-5,9±22,2	
CD42b	-10,5±6,3	0,03	-21,0±15,0	0,03
CD62p	-14,6±26,7		1,8±29,2	
ADP				
CD41	-6,2±20,1		10,3±44,3	
CD42b	-2,4±11,0		-14,0±20,5	
CD62p	-10,0±15,2		7,3±23,5	
TRAP 6				
CD41	-26,9±19,1	0,06	1,7±27,6	
CD42b	2,8±27,5		-0,3±30,1	
CD62p	-11,8±46,5		-17,6±22,3	

Tabelle 3: Prozentuale Änderung (\pm Konfidenzintervall) der Expressionen der Werte aus Tab.2. Östrogensubstitution im Vergleich zur Grunduntersuchung.

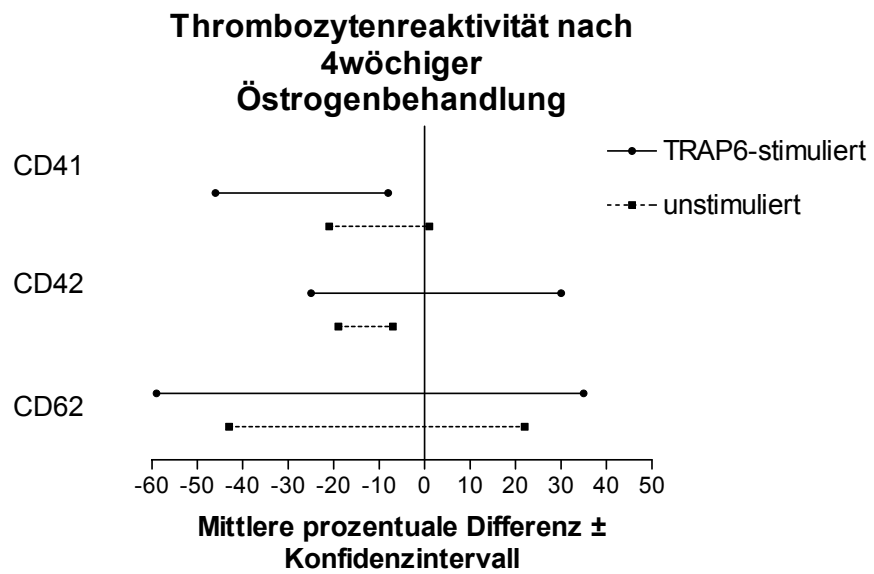
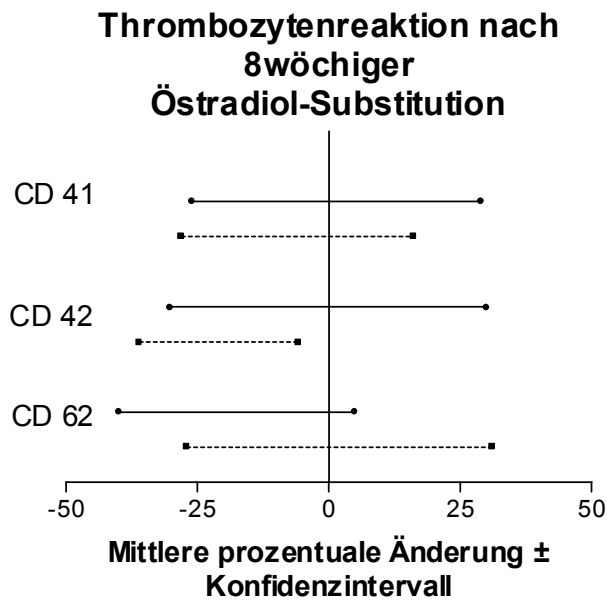


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Thrombozyten-Reaktivität nach 4 bzw. 8 Wochen Östrogensubstitution im Vergleich zur Grunduntersuchung. Angabe der relativen Änderung der Mittelwerte ± Konfidenzintervall (in %) der Expressionen von CD41, CD42b und CD62p.

Aus den *in vivo* Meßdaten der Thrombozytenreaktivität auf Östrogensatztherapie der Patientinnengruppe I sind folgende Ergebnisse ableitbar:

- Nach *4 Wochen* Östrogensatztherapie im Vergleich zur Grunduntersuchung:

- a) Eine tendenzielle Abnahme der GpIIb-Expression um 27% (Konfidenzintervall: 19%, $p=0,059$) ist nach TRAP6-Stimulation nachweisbar.
- b) Eine signifikante Zunahme der von-Willebrand-Faktor-Rezeptor vermittelten Adhäsionsneigung ist in unstimulierten Blutproben nachweisbar.
- c) Keine signifikante Beeinflussung des Aktivierungsparameters P-Selektin ist durch Östrogen nachweisbar.

- Nach *8 Wochen* Östrogensatztherapie im Vergleich zur Grunduntersuchung:

- d) Kein Einfluß ist auf die GpIIb-Expression durch Östrogen nachweisbar.
- e) Eine signifikante Zunahme der von-Willebrand-Faktor-Rezeptor vermittelten Adhäsionsneigung ist in den unstimulierten Blutproben nachweisbar.
- f) Kein Einfluß von Östrogen ist auf den Aktivierungsparameters P-Selektin nachweisbar.

3.1.2 Einfluß von 17 β -Östrogen auf die Thrombozytenadhäsion via CD42b und kein Einfluß auf die Thrombozytenaggregation via CD41 *in vitro*

- Meßdaten der *in vitro* - Thrombozytenreaktivität (Gruppe II):

Stimulus/ Epitop	Ohne Östrogen	C=0,01nmol/l Östradiol	C=1nmol/l Östradiol
Unstimuliert			
CD41	295,0 \pm 52,2	302,9 \pm 61,3	297,8 \pm 47,7
CD42b	484,0 \pm 138,3	439,2 \pm 128,1	526,1 \pm 84,2
CD62p	3,8 \pm 0,5	3,9 \pm 0,6	3,8 \pm 0,4
ADP			
CD41	780,1 \pm 172,6	721,8 \pm 157,6	741,3 \pm 157,3
CD42b	294,3 \pm 61,3	295,2 \pm 66,6	297,4 \pm 63,3
CD62p	17,2 \pm 7,0	15,0 \pm 5,5	15,6 \pm 5,6
TRAP 6			
CD41	378,0 \pm 105,5	365,8 \pm 74,1	330,2 \pm 69,3
CD42b	311,3 \pm 71,0	322,6 \pm 79,5	350,6 \pm 90,3
CD62p	44,0 \pm 25,9	42,0 \pm 19,9	36,3 \pm 20,1

Tabelle 4: Mittelwerte (\pm Konfidenzintervall) der Fluoreszenz-intensitäten von CD41, CD42b und CD62p von Blutproben der Patientinnen aus Gruppe II mit und ohne 30minütiger Östrogen-Präinkubation ; angegeben in arbiträren Einheiten.

- Relation der Meßdaten der *in vitro* - östrogenbehandelten Proben zur östrogenfreien Kontrolle:

Stimulus/ Epitop	% Änderung bei Östradiol (c=0,01nmol/l) versus kein Östradiol	% Änderung bei Östradiol (c=1nmol/l) versus kein Östradiol
Unstimuliert		
CD41	2,08±7,67	3,1±14,9
CD42b	-9,37±5,54*	-0,1±6,3
CD62p	4,67±6,97	2,4±10,2
ADP		
CD41	-6,76±5,90	-4,0±5,8
CD42b	-0,03±7,06	1,0±5,6
CD62p	-11,10±12,76	-7,9±10,9
TRAP 6		
CD41	-6,33±9,64	-14,1±10,9
CD42b	12,99±17,19	19,9±12,7
CD62p	-11,98±9,42	-22,4±16,8

Tabelle 5: Relative Änderung (\pm Konfidenzintervall) der Meßwerte aus Tab. 4. Östrogen-Präinkubation in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zu östrogenfreier Kontrolle.

*p-Wert=0,02 (gepaarter, zweiseitiger t-Test)

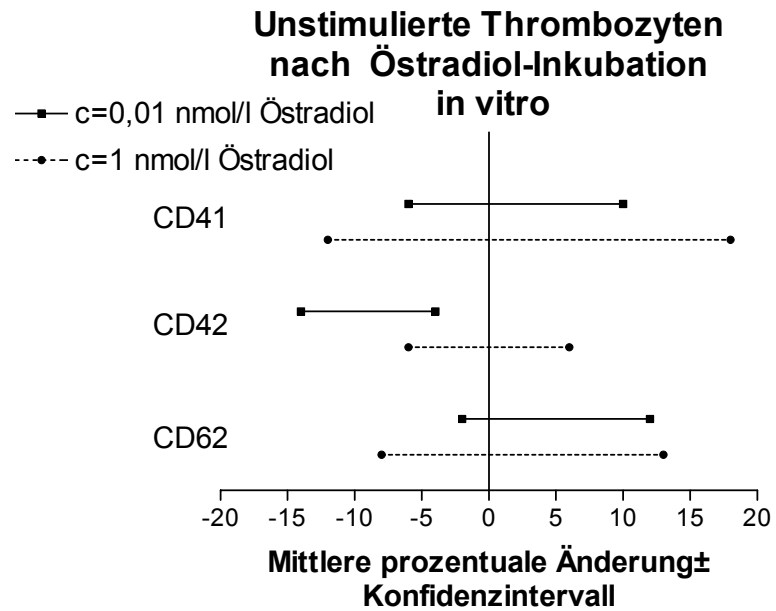


Abbildung 3: Graphische Darstellung der prozentualen Änderung (\pm Konfidenzintervall) des Expressionsmusters von CD41, CD42b und CD62p nach *in vitro* Inkubation mit 17β -Östrogen ohne Plättchenstimulation.

*p-Wert=0,02 (gepaarter, zweiseitiger t-Test)

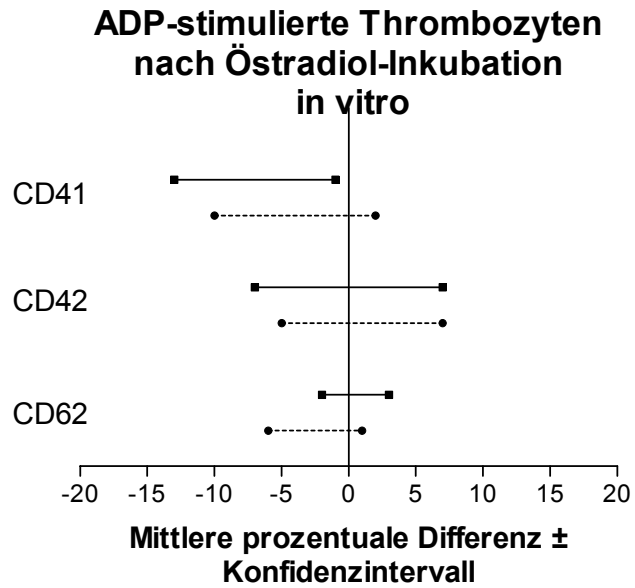


Abbildung 4: Graphische Darstellung der prozentualen Änderung (\pm Konfidenzintervall) des Expressionsmusters von CD41, CD42b und CD62p nach *in vitro* Inkubation mit 17β -Östrogen nach ADP-Stimulation.

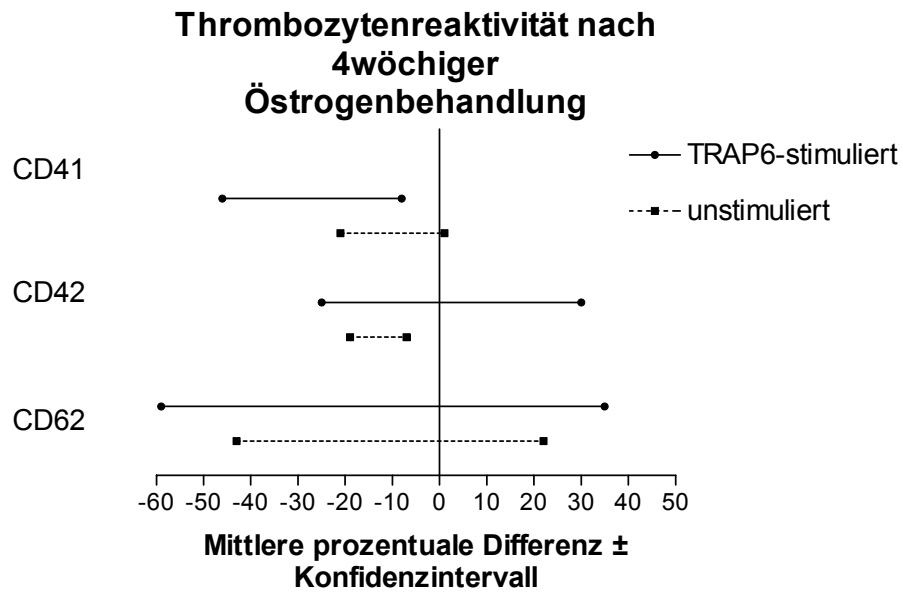


Abbildung 5: Graphische Darstellung der prozentualen Änderung (\pm Konfidenzintervall) des Expressionsmusters von CD41, CD42b und CD62p nach *in vitro* Inkubation mit 17β -Östrogen und TRAP6-Stimulation.

Aus den Meßdaten der *in vitro* – Thrombozytenreaktivität auf 17β -Östrogen von Blutproben der Patientinnengruppe II sind folgende Ergebnisse ableitbar:

- *postmenopausale* Östrogenkonzentration ($c=0,01\text{nmol/l}$):

- a) Kein Einfluß der GpIIb-Expression ist durch Östrogen *in vitro* nachweisbar.
- b) Eine signifikante Zunahme der von Willebrand-Faktor-Rezeptor vermittelten Adhäsionsneigung ist *in vitro* in den unstimulierten Blutproben nach Östrogeninkubation nachweisbar.
- c) Kein Einfluß ist in bezug auf den Aktivierungsparameters P-Selektin durch Östrogengabe *in vitro* erkennbar.

- *prämenopausale* Östrogenkonzentration (c=1nmol/l):

d) Es ist kein Einfluß durch Östrogen auf die Expression von CD41 (GpIIb) , CD42 (von Willebrand-Faktor-Rezeptor) oder CD62p (P-Selektin) nachweisbar. Bei thrombinmimetischer Stimulation zeigt sich zwar über die Konfidenzintervalle, die nicht die Null schneiden, eine günstige Beeinflussung der Plättchenfunktion (CD41-, CD62- Abnahme, CD42- Zunahme), die Meßresultate erreichen jedoch nach Kontrolle im gepaarten, zweiseitigen t-Test keine statistische Signifikanz.

3.2 Leukozytenfunktion und Östrogen

3.2.1 Einfluß von 17 β -Östrogen auf die Monozyten- und Lymphozytenfunktion über CD45 *in vivo*

Eine signifikant erniedrigte Expression des Pan-Leukozyten-Antigens CD45 war sowohl in der Lymphozyten- als auch Monozyten-subpopulation nach 4 Wochen Östrogensubstitution unter TRAP6-Stimulation nachweisbar.

Monozyten:

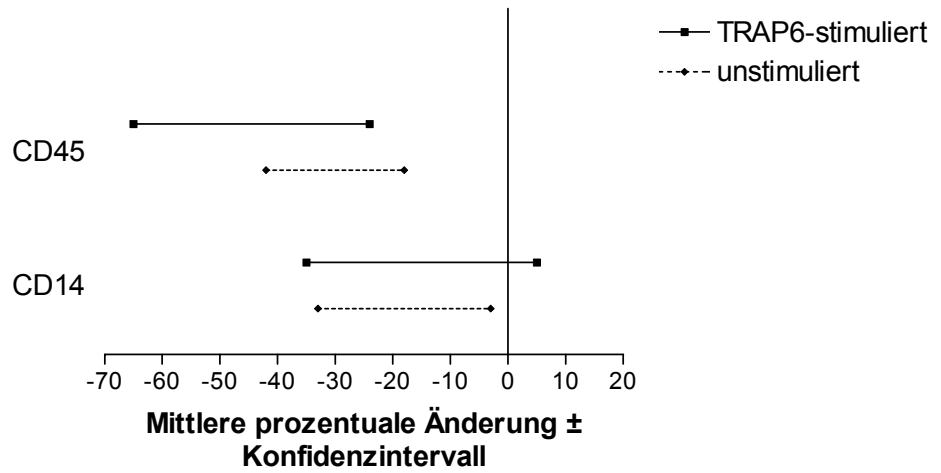
Relative Änderung der Mittelwerte:	-44,8%
Konfidenzintervall:	20,6%
Gepaarter, zweiseitiger t-Test:	p=0,05

Lymphozyten:

Relative Änderung der Mittelwerte:	-31%,
Konfidenzintervall:	13,9%
Gepaarter, zweiseitiger t-Test:	p=0,03

Eine tendenziell erniedrigte Expression um -29,8% (Konfidenzintervall: 17,5% ; p=0,06) zeigte sich auch bei dem granulozytären Pan-Leukozyten-Antigen (CD45) nach 4 Wochen Östrogensubstitution unter TRAP6-Stimulation. Nach 8 Wochen Östrogensubstitution waren generell keine signifikanten Veränderungen mehr nachweisbar ; es wurde keine Beeinflussung der Leukozyten-Plättchenaggregate deutlich.

Reaktion von CD 14 and 45 auf Monozyten nach 4 Wochen Östradiol-Substitution



Reaktion von CD 45 auf Lymphozyten und Neutrophilen nach 4wöchiger Östradiol-Substitution

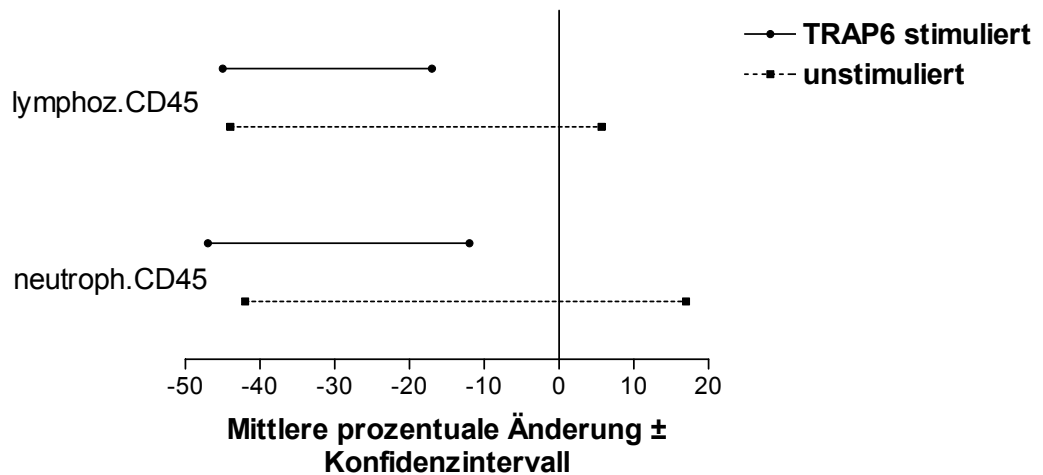


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Konfidenzintervalle um die mittlere Expressionsänderung von monozytärem CD14 und CD45 sowie CD45 von Lymphozyten und Neutrophilen nach 4 Wochen Östrogensubstitution.

3.2.2 Einfluß von 17 β -Östrogen auf die Monozytenfunktion via CD45 und CD14 *in vitro*

- Mittelwerte der Meßdaten zur Monozytenreaktivität der Gruppe II:

Stimulus/ Epitop	Ohne Östrogen	C=0,01nmol/l Östradiol	C=1nmol/l Östradiol
Unstimuliert			
CD45	224,5 \pm 50,5	144,4 \pm 18,8	149,0 \pm 25,1
CD14	1606,5 \pm 239,1	1265,0 \pm 174,3	1276,9 \pm 200,6
TRAP 6			
CD45	210,2 \pm 60,8	148,8 \pm 32,8	141,2 \pm 35,3
CD14	1674,1 \pm 264,8	1361,9 \pm 205,3	1344,5 \pm 181,1

Tabelle 6: Mittelwerte (\pm Konfidenzintervall, arbiträre Einheiten) der Expression von CD45 und CD14- von TRAP6- bzw. unstimulierten Blutproben der Patientinnen aus Gruppe II: *in vitro* Östrogen-Inkubation versus Kontrolle.

- Relative Änderung der Meßdaten der östrogenbehandelten Proben im Vergleich zu östrogenfreier Kontrolle:

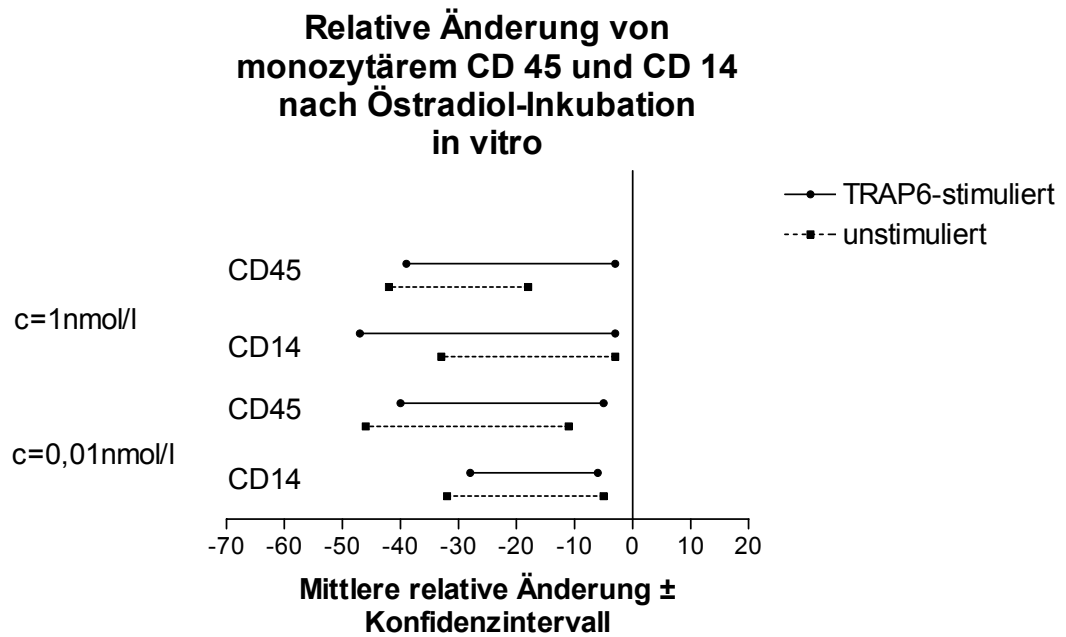


Abbildung 7: Signifikante Erniedrigung der Expression von Pan-Leukozyten-Antigen CD45 und Lipopolysaccharidrezeptor CD14 auf Monozyten nach 30minütiger Inkubation von Blut mit Östrogen.

- mittlere Änderungen der Meßdaten unter Östrogen:

Monozyten-Parameter	Östrogenisierte Probe / östrogenfreie Kontrolle (in %)	p
Unstimuliert	C=0,01 nmol/l Östradiol/Kontrolle	
CD45	-28,% ±17,4%	0,015
CD14	-18,6%±13,5%	0,03
TRAP6-stimuliert		
CD45	-22,3%±17,6%	0,036
CD14	-17,0±11,1%	0,014
Unstimuliert	C=1 nmol/l Östradiol/Kontrolle	
CD45	-30,9%±23,3%	0,003
CD14	-18,3%±18,6%	0,04
TRAP6-stimuliert		
CD45	-31,8%±19,7%	0,026
CD14	-25,1%±13,7%	0,015

Tabelle 7: Relative Änderung (\pm Konfidenzintervall, in %) der Monozytenparameter aus Tab. 6. *In vitro* Inkubation mit Östrogen (c=0,01nmol/l und c=1nmol/l) versus östrogenfreie Kontrolle.

Aus den Meßdaten der Monozytenreaktivität *in vitro* auf 17β -Östrogen von Blutproben der Patientinnen aus Gruppe II sind folgende Ergebnisse für die *postmenopausale* ($c=0,01\text{nmol/l}$) und für die *prämenopausale* Östrogenkonzentration ($c=1\text{nmol/l}$) ableitbar:

- a) Es zeigt sich für beide Konzentrationen im Vergleich zur östrogenfreien Kontrolle eine signifikante Abnahme sowohl des Pan-Leukozyten-Antigens CD45 als auch des Lipopolysaccharidrezeptors CD14 und dies sowohl in unstimulierten als auch in TRAP6-stimulierten Blutproben.
- b) Die Bildung von Monozyten-Plättchen-Konjugaten blieb durch Östrogen unbeeinflusst *in vitro*.
- c) Die neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten wurden in ihrem Expressionsmuster für CD45 und CD14 durch 17β -Östrogen *in vitro* nicht beeinflusst.

3.2.3 Verringerung der Bereitschaft zu Apoptose bei neutrophilen Granulozyten *in vitro* durch Östrogen

- Resultate:

ohne Östrogen	mit Östrogen	Relative Änderung
% annexinpositive Zellen		
60,9	36,8	-39,5
55,5	34,6	-37,8
48,2	60,4	25,5
83,9	36,9	-56,0
70,6	63,2	-10,6
84,8	62,7	-26,0
73,8	56,0	-24,1
71,3	60,5	-15,2
90,7	71,2	-21,5
76,1	71,6	-6,0
47,6	50,9	7,0
Mittelwert:		-18,6
Konfidenzintervall		13,4
p-Wert, zweiseitiger, gepaarter t-Test		0,01

Tabelle 8: Durchflußzytometrisch bestimmte prozentuale Fraktion der annexinpositiven und somit apoptotischen neutrophilen Granulozyten nach Wasserstoffperoxidinkubation (Gruppe III).

- Darstellung der Gating-Strategie

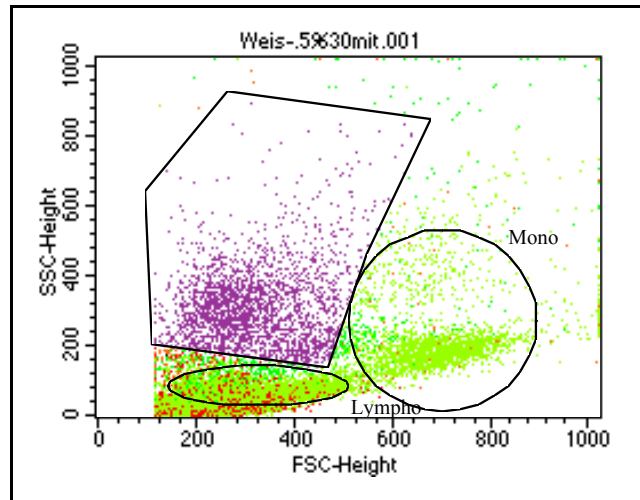
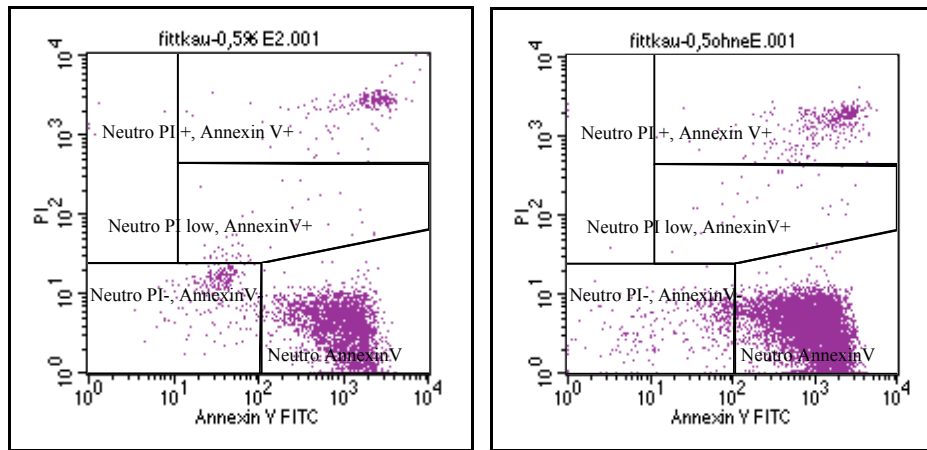


Abbildung 8: Gating der Leukozytenpopulationen aus 180°- versus 90°-Streulicht in der Durchflußzytometrie nach H₂O₂-Stimulation.



mit Östradiol

ohne Östradiol

Abbildung 9: Gating der Annexin- versus Propidiumjodid-Fluoreszenz aus der Subpopulation der neutrophilen Granulozyten.

Aus den Meßdaten der Apoptoseinduktion *in vitro* bei peripheren mononukleären Zellen nach 17β -Östrogen Inkubation (Gruppe III) sind folgende Ergebnisse ableitbar:

a) Unter Verwendung eines AnnexinV-Apoptoseassays gelang der Nachweis, daß eine 30minütige Inkubation von Vollblut mit 17β -Östrogen ($c=1,2\text{nmol/l}$) die Apoptosebereitschaft der neutrophilen Granulozyten um 18,6% (Konfidenzintervall: 13,4% ; $p=0,01$) verringert.

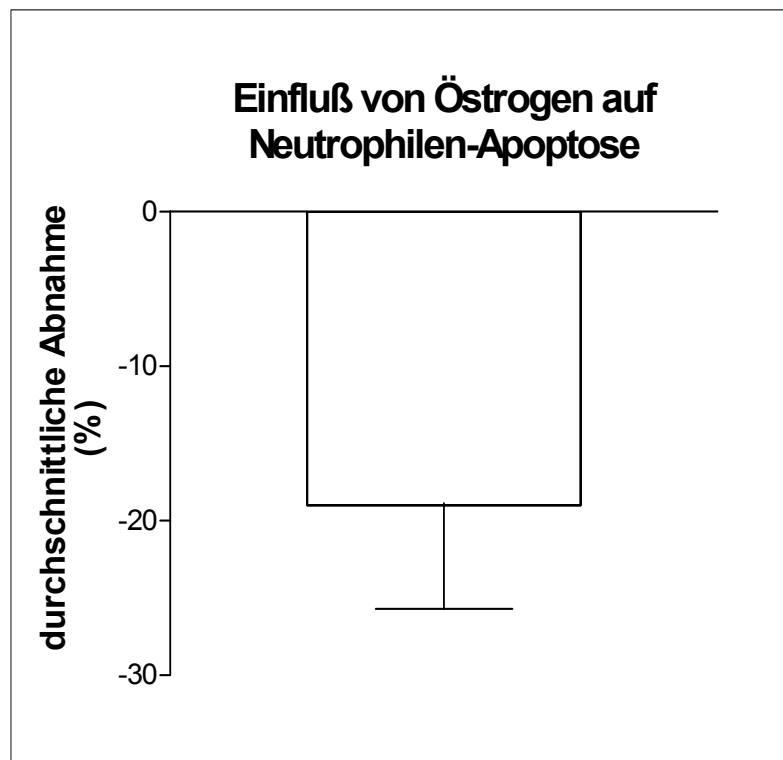


Abbildung 10: Graphische Darstellung des Östrogeneinflusses auf Neutrophilen-Apoptose in Relation zur östrogenfreien Kontrolle (mittlere Änderung in % \pm Konfidenzintervall).

b) 17β -Östrogen hat keinen Einfluß auf die Apoptoserate bei Monozyten und Lymphozyten in dieser Untersuchung.

3.3 Oxidativer Streß und Östrogen

3.3.1 Vermittlung einer tendenziell geringeren Malondialdehyd-Bildung *in vivo* durch Östrogen

Die achtwöchige Östrogensubstitution vermittelt antioxidative Effekte, die sich an den hier untersuchten Blutproben in einer tendenziellen Abnahme der Malondialdehyd - Konzentration offenbaren.

- Meßdaten der MDA - Konzentration (Gruppe I):

Patienten-Initialen	Östrogen	1.) MDA	2.) MDA
	Tage	µmol/l	µmol/l
CJ	75	4,5	3,6
ML	57	3,6	3,4
HB	29	2,5	2,4
MP	55	2,5	2,4
MS	64	2,8	1,3
Mittelwert	56,0	3,2	2,6

Tabelle 9: Resultate aus Malondialdehyd-Serumbestimmung von Frauen aus Gruppe I vor (1) und nach (2) 8wöchiger Östrogensatztherapie.

- Es ergaben sich folgende relative Veränderungen in der Serumkonzentration der Malondialdehyd-Aktivität nach Östrogensubstitution im Vergleich zur Grunduntersuchung:

Relative Änderung der Mittelwerte: -18,5%
Konfidenzintervall: 18,1%
Gepaarter, zweiseitiger t-Test: p=0,09

3.3.2 Fehlender Nachweis auf Beeinflussung der anti-LDLox-Bildung *in vivo*

Es zeigt sich unter der Therapie keine signifikante Änderung der gemittelten Konzentrationen der anti-LDLox, wenngleich dieses Ergebnis durch einen Fall von Zunahme versus 4 Aktivitätsabnahmen zustande kommt.

- Meßdaten der anti-LDLox - Konzentration (Gruppe I):

Patienten-Initialen	Östrogen Tage	1.) anti-LDLox MU/ml	2.) anti-LDLox mU/ml
CJ	75	2134,0	2702,0
ML	57	168,6	148,8
HB	29	454,9	409,4
MP	55	335,4	288,1
MS	64	180,0	167,2
Mittelwert	56,0	654,6	743,1

Tabelle 10: Resultate aus Aktivitätsbestimmung von Antikörpern gegen oxidiertes LDL von Frauen aus Gruppe I vor (1.) und nach (2.) 8wöchiger Östrogensubstitutionstherapie.

- Es ergaben sich folgende relative Veränderungen in der Serumkonzentration von anti-LDLox-Aktivität nach Östrogensubstitution im Vergleich zur Grunduntersuchung:

Aktivität der Antikörper gegen oxidiertes LDL-Cholesterol

Relative Änderung der Mittelwerte: 13,5%

Konfidenzintervall: 14,8%

Gepaarter, zweiseitiger t-Test: p= 0,25

3.4 Aerobe Kapazität und Östrogen

Die maximale Sauerstoffaufnahme-Kapazität ($V_{O_{2max}}$) steigt bei Patientinnen mit kardialen Syndrom X nach Östrogensatztherapie signifikant an.

Resultate aus Spiroergometrie-Untersuchung nach im Mittel 51 Tagen Behandlungszeit mit 17β -Östrogen:

- Gewichtsverhalten:

Vor Östrogen	Nach Östrogen	Relative Änderung
Mittelwert (kg)	Mittelwert (kg)	%
73,5	74,8	1,7±1,4

Tabelle 11: Mittlere Körpermasse und prozentuale Änderung ±Konfidenzintervall im Vergleich vor und nach Östrogentherapie ($p=0,04$).

- aerobe Kapazität bei ventilatorischer Schwelle:

Vor	Nach Östrogen	Relative Änderung
V_{O_2} bei AT	V_{O_2} bei AT	%
12,3	14,4	17,2±11,6

Tabelle 12: Mittlere spezifische Sauerstoffaufnahme (V_{O_2}) bei Erreichen der ventilatorischen Schwelle (AT) vor und nach Östrogensatztherapie ($p=0,01$).

- Relative Änderung der maximalen Sauerstoffaufnahme-Kapazität nach Östrogensubstitution im Vergleich zu vorher:

Patient	1.Messung	2.Messung	Rel. Änderung
Initialen	VO2/kg max	VO2/kg max	%
DH	18,9	19,6	3,7
MS	17,1	19,4	13,5
RK	12,5	14,8	18,4
BK	18,6	21,2	14,0
RL	16,0	20,6	28,7
HB	19,2	20,7	7,8
HS	21,3	22,8	7,0
UF	26,3	28,8	9,5
LS	17,6	21,8	23,9
ML	19,2	23,4	21,9
RS	20,0	18,4	-8
CJ	12,0	30,4	153,3
Mittelw.	19,36	22,03	24,5
Konfidenzint.			5,9
t-Test			P<0,03

Tabelle 13: Zunahme der maximalen Sauerstoffaufnahme-Kapazität (V_{O2max}) nach Östrogensubstitution im Vergleich zu vorher, Angabe der mittleren prozentualen Änderung (%) fallbezogen.

Aus der Spiroergometrie-Untersuchung vor und nach einer zeitlich begrenzten Östrogensersatztherapie bei Patientinnen mit kardialem Syndrom X gehen folgende Ergebnisse hervor:

- Die Sauerstoffaufnahme bei der ventilatorischen Schwelle erhöhte sich signifikant um 17% (Konfidenzintervall: 11.6%).
- Die Belastungszeit insgesamt stieg nach Östrogensersatztherapie nichtsignifikant um im Mittel 60s an.
- Die Herzfrequenz bei Abbruch der Untersuchung vor und nach Östrogensubstitution als Zeichen der körperlichen Ausbelastung und Motivation war nicht statistisch signifikant unterschiedlich (Abbruchfrequenz im Mittel: 136/s und 138/s, p=ns).
- Das Körpergewicht der Patientinnen hat sich in der Behandlungszeit mit Östrogen um im Mittel 1,3kg erhöht und erreichte mit statistische Signifikanz.
- Die maximale Sauerstoffaufnahme – Kapazität hat sich nach Östrogensubstitution um 24,5% signifikant erhöht (Konfidenzintervall: 23,6%).

4 Diskussion

4.1 Dateninterpretation, Limitationen und Fehlerdiskussion

4.1.1 Thrombozyten

Bezüglich der Thrombozytenfunktion *in vitro* ergab sich eine verringerte Expression des von Willebrand Rezeptors (Gplb, CD42b) um 9,4% (Konfidenzintervall: 5,5%, $p=0,02$) ohne Blutplättchenstimulantien in der niedrigen Östrogenkonzentration ($c=0,01\text{nmol/l}$). *In vivo* verringerte sich analog zu *in vitro* die Expression des von-Willebrand-Faktor-Rezeptors um 10,5% (Konfidenzintervall: 6,3%, $p=0,03$) nach 4 Wochen und um 21% (Konfidenzintervall: 15,0%, $p=0,02$) nach 8 Wochen. Die Abnahme der Expression des Glycoprotein Ib gilt als Hinweis für Blutplättchenaktivierung im Sinne von gesteigerter Adhäsion (GAWAZ, 1999) und ist somit im Kontext der Östrogensubstitution als negativ zu werten. Diese Form der Aktivierung wurde nach ADP- oder TRAP 6- Stimulation weder *in vivo* noch *in vitro* beobachtet.

Nach 4 Wochen Östrogensubstitution erwächst eine günstige Beeinflussung der Thrombozytenaggregation aus der tendenziellen Abnahme der Expression des Fibrinogenrezeptors um 10% (Konfidenzintervall: 11%, $p=\text{ns}$) ohne Blutplättchenstimulation und um 27% (Konfidenzintervall: 19%, $p=0,059$) nach TRAP6-Stimulation. Nach 8 Wochen Östrogensubstitution war keine signifikante Änderung in der Fibrinogenrezeptor-Expression in Gruppe I nachweisbar. Die Expression von GpIb blieb nach Östrogengabe *in vitro* in Gruppe II unbeeinflusst.

4.1.2 Monozyten

Es konnte erstmals eine Beeinflussung der Monozytenfunktion durch Östrogen über die verringerte Expression des Pan-Leukozyten-Antigen CD45 *in vitro* sowie *in vivo* gezeigt werden. *In vitro* fiel eine Verringerung der Expression des Lipopolysaccharidrezeptors CD14 auf, die auf eine günstige und direkte Beeinflussung der Monozytenfunktion durch Östrogen hinweist. Die Limitation bei dem Experiment ist, daß die genannten Parameter keine

eigentlichen monozytären Aktivierungsparameter wie z.B. LFA 1 oder MAC 1 sind, die erst nach Zellaktivierung exprimiert werden. Im Gegensatz zu den Aktivierungsmarkern zeigt sich hier erstmals eine generelle Beeinflussung der Monozytenfunktion durch Östrogen über Abnahme der Expression der genannten zellulären Marker.

4.1.3 Lymphozyten

Nach 4 Wochen Östrogensubstitution wurde analog zu dem Monozyten-Resultat auch bei den Lymphozyten eine signifikant erniedrigte Expression des Pan-Leukozyten-Antigens CD45 nach Stimulation mit TRAP6 auffällig. Die veränderte Expression von CD45 in Abhängigkeit vom Östrogenstatus weist auf eine beeinflusste Signaltransduktion und auf einen veränderten Aktivitätszustand der Zellen hin (LEDBETTER et al. 1988, TIELEMANS et al. 1993). Bei einer veränderten TRAP6-Stimulierbarkeit der Lymphozyten und Monozyten kann weiter von einer veränderten intrazellulären Kalziumhomöostase unter Östrogen-Therapie ausgegangen werden. So zeigen vorangegangene Untersuchungen, daß Thrombin sowohl bei Monozyten als auch bei Blutplättchen die zytosolischen Kalziumkonzentrationen beeinflusst (HOFFMAN et CHURCH 1993).

4.1.4 Neutrophile Granulozyten

Eine Beeinflussung der Zellfunktion der neutrophilen Granulozyten wurde in dieser Arbeit durch eine geringere Bereitschaft zu Apoptose auf Wasserstoffperoxyd nach Östrogenbehandlung *in vitro* deutlich. Dieses Ergebnis wird durch die Vorarbeiten von EVANS (1997) bestätigt, der eine Abnahme der Apoptosebereitschaft nach TNFalpha-Induktion bei Leukozyten prämenopausaler Frauen nach Östrogeninkubation feststellte.

Weitere Arbeiten müssen die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Atherogenese abklären. Vitale neutrophile Granulozyten können in der manifesten koronaren Herzerkrankung über proteolytische Enzyme Unterschiede in der Dicke und Konsistenz der fibrösen Kappe einer atheromatösen Plaque bewirken. Dadurch können geschlechtsabhängige Unterschiede im Mechanismus und in Prognose eines Myokardinfarktes, die BURKE (1998) beschrieb, erklärt werden.

4.1.5 Limitationen der Studie

Diese Studie ist angelegt zur Detektion von Östrogenwirkungen auf periphere mononukleäre Zellen *in vitro* und *in vivo* und ist geplant gewesen für 20 Patienten. Doch die Therapiefolgsamkeit der Studienteilnehmerinnen war zu Beginn nicht zufriedenstellend: 6 Studienteilnehmerinnen aus Gruppe 1 (30%) traten die Substitution entweder gar nicht an oder brachen diese vorzeitig ab. Dabei traten keine ernsthaften Nebenwirkungen und nur in einem Falle mit Mastodynie eine anerkannte, unerwünschte Nebenwirkung auf. Daraus wird die Bedeutung der Arzt-Patienten-Unterrichtung über Nutzen und Risiko der Therapie, aber auch bestehende Vorurteile und Emotionalität gegenüber Östrogensersatztherapie bei den Patientinnen deutlich. Die Entscheidung zu einer Hormonersatztherapie ist in hohem Maße eine persönliche Entscheidung, wie aus Umfragen hervorgeht (SCHNEIDER, 1997). Bei den übrigen, verbliebenen Patientinnen zeigt sich eine gute Therapieadhärenz, was an schon bekannten und zu erwartenden Ergebnissen wie Gewichtszunahme und Verbesserung des antioxidativen Potentials unter Östrogensubstitution deutlich wird.

Eine weitere Limitation wird in der Patientinnengruppe I deutlich. In dieser Gruppe wurde nur nach Unterteilung in 4- und 8wöchige Therapieabschnitte in der Auswertung eine tendenzielle Abnahme der Resultate für die Fibrinogenrezeptor-Expression (CD41) unter Östrogen erkennbar. Ebenso zeigte die Mono- bzw. Lymphozytenreaktivität (CD45) *in vivo* eine östrogenabhängige Beeinflussung nur nach vierwöchiger Therapiedauer.

4.1.6 Fehlerbetrachtung

Ein systematischer Fehler erwächst aus Blutentnahme, Präparation und Untersuchung. Einerseits wurde bei allen drei Punkten Wert auf ein standardisiertes Vorgehen gelegt. Bei der Präparation wurden internationale Standards berücksichtigt (MICHELSON 1996). Von Seiten der Blutplättchen wurde die jeweils schonendste Methode der Präparation ohne Zentrifugation oder Anwendung von Fixierungsmitteln ausgewählt.

Andererseits wird über die unterschiedliche Expressionsdichte eines Markers im Vergleich zur Negativkontrolle auf Aktivierung oder Passivierung des

Funktionszustand der Thrombozyten oder Leukozyten nach medikamentöser Intervention geschlossen. Aufgrund einer fehlenden Methode, diesen Einfluß mit der Durchflußzytometrie exakt zu quantifizieren, werden hier keine absoluten Angaben gemacht, d.h. der Funktionszustand von Zellen oder eines Thrombozyten kann nicht ohne Negativkontrolle evaluiert werden. Die semiquantitative Analyse der Werte (gemäß Gleichung (1) S. 25) relativiert gleichsam den systematischen und untersucherabhängigen Fehler.

Durch interne Qualitätskontrollen werden mögliche Fehlerquellen im Zusammenhang mit der Messung z.B. durch Über- oder Unterfarbkompensation reduziert.

Die Verlässlichkeit der Daten zur Plättchenreaktivität wird weiter dadurch erhöht, daß keine antithrombotische Begleitmedikation wie Acetylsalicylsäure bei diesen Patientinnen erforderlich war.

Die Durchflußzytometrie ersetzt zwar keine zusätzlichen Thrombozytenfunktionstests, ermöglicht aber die sensitive Feststellung von Reaktionen auf Interventionen auf Einzelzell-Basis. Die Konsistenz der Ergebnisse aus den Messungen *in vivo* und *in vitro* bezüglich der Expressionen von CD42b auf Thrombozyten und CD45 auf Monozyten bestätigt die Verlässlichkeit der Methode. Die relativ breiten Konfidenzintervalle der prozentualen Änderungen machen deutlich, daß die Ergebnisse noch weit gestreut sind. Dennoch ändert diese Limitation nichts an der Aussage einer evidenten Beeinflussung von Monozyten-, Neutrophilen- und Endothelfunktion durch Östrogen.

4.2 Östrogen und Endotheldysfunktion

4.2.1 Östrogen als Therapie der endothelialen Dysfunktion

Aufgrund der Erfahrung, daß eine Östrogensubstitution bei vegetativ-vasomotorischen Störungen postmenopausaler Frauen sowie bei der Behandlung des Syndrom X wirksam ist (ROSANO et al 1996), wurde bei dieser Studie eine Östrogenmonotherapie mit synthetischem 17 β -Östradiol von 2mg/d gewählt.

Weil nicht alle Studienpatientinnen hysterektomiert sind, wurde generell eine Pause nach 8 Wochen empfohlen, um einer Endometriumhyperplasie

entgegenzuwirken. Eine sonst übliche kombinierte Hormonersatztherapie ist bewusst nicht gewählt worden, weil viele Hinweise dafür sprechen, daß der Gestagenanteil einer fix kombinierten Hormonersatztherapie den Nutzen des Östrogen aufwiegt.

Die Östrogenkonzentrationen für die *in vitro* Inkubation wurden einerseits postmenopausal niedrig ($c=0,01\text{nmol/l}$), andererseits in physiologischer Konzentration eines prämenopausalen Status ($c=1\text{nmol/l}$) gewählt. Die relativ kurze Inkubationszeit von Östrogen mit Vollblut *in vitro* kann eine genomische Antwort der peripheren mononukleären Zellen limitieren. Die kurze Inkubationszeit soll die Integrität und Vitalität der Blutzellen garantieren. Eine frühe Gen-Antwort erscheint auch innerhalb von 30 Minuten möglich. Weiterhin wird eine nongenomische Wirkung von Östrogen mit Einfluß auf Translationsprozesse diskutiert (CHEN et al. 1999).

Es stellt sich die Frage, ob die gestörte Vasomotion bei postmenopausalen Frauen mit Syndrom X als vegetativ-vasomotorische Störung im Rahmen eines Menopause-Syndroms angesehen werden kann. Aufgrund des Behandlungserfolges mit Östrogen und der zeitlichen Koinzidenz des Beschwerdebeginns und der Menopause, ja. Andererseits wird der Östrogeneffekt als protektiv angesehen, nach Wegfall bewirken nun evidente kardiovaskulären Risikofaktoren die raschere Progression zur Endotheldysfunktion und koronaren Herzerkrankung. So gesehen ist das Syndrom X ein Begleitphänomen der Menopause, was durch Östrogen reversibel ist.

Die herkömmliche antianginöse Therapie mit Nitrat und Betablocker bringt dagegen meist keine Linderung. Die Östrogengabe ist aufgrund der Verbesserung der vaskulären Reaktivität und Symptomatik vielversprechend, die Indikation ist bei Syndrom X noch nicht etabliert, weil diesbezügliche Studien fehlen (BRAUNWALD, 1997). Ob die Östrogensubstitution die optimale Therapie im Vergleich zu anderen Therapiekonzepten für Syndrom X bzw. Endotheldysfunktion darstellt, ist unklar. Endotheliale Dysfunktion als Oberbegriff umfaßt eine Reihe distinkter klinischer Symptome. Zum Beispiel wird Mikroalbuminurie, die mit Diabetes mellitus vergesellschaftet ist, als

endotheliale Dysfunktion der Gefäße der Glomerula der Niere angesehen und ist durch ACE-Hemmer reversibel. Bei Hyperhomocysteinämie kommt zur Beeinflussung neben Antioxidantien, Vitamin B6 und Folat eine Östrogensubstitution zur Behandlung in Frage (MIJATOVIC et al. 1998). β HMG-Reductase-Hemmer (VAUGHAN CJ et al. 1996), Antioxidantien (MOTOYAMA et al. 1998) aber auch weibliche Sexualhormone (LEKAKIS et al. 1998) sind konkurrierende Therapiekonzepte zur Verbesserung einer gestörten Endothelfunktion. Der Einsatz von β HMG-Reductase-Hemmern und Hormonersatztherapie wurde mehrfach gegeneinander (DARLING et al. 1997) und auch in Kombination miteinander (SBAROUNI et al. 1998 ; KOH et al. 1999) auf Beeinflussung von Lipid-Surrogatparametern getestet, jedoch nicht im klinischen Kontext der endothelialen Dysfunktion. Dieses Ziel, die Evaluierung des Therapiekonzepts Östrogen bei dem Syndrom X als klinisch manifeste endotheliale Dysfunktion, stellt sich diese Arbeit. So werden alle Unterschiede bezüglich Plättchen- und Monozytenreaktivität auf Östrogen zwischen *in vitro* und *in vivo* auf eine Beeinflussung durch das Endothel zurückgeführt. Es ist auch der Grund, daß die Patientinnengruppen I und II verhältnismäßig klein sind, da die Diagnose Syndrom X gefordert wurde.

4.2.2 Aerobe Kapazität und endotheliale Dysfunktion

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit, der eine Brücke zur Endothelfunktion schlägt, ist die Quantifizierung der kardiopulmonalen Belastbarkeit in der Spiroergometrie. Aufgrund des häufigeren Auftretens des Syndrom X bei Frauen ist der prädiktive Wert eines positiven Belastungselektrokardiogramms für das weibliche Geschlecht gegenüber dem männlichen reduziert (ALEXANDER et al.). Der kombinierte Test von Spirometrie und Ergometrie erhöht die Aussagekraft über die Ermittlung des Parameters 'maximale gewichtsbezogene Sauerstoffaufnahme' ($V_{O_{2max}}$ in ml/(min*kg)). Diese hängt von der vaskulären, kardialen und pulmonalen Kompetenz des Probanden ab (ASLIBEKIAN et al. 1978). Bei Konstanz der letzten beiden Funktionen und vermuteter Störung der vasoregulatorischen Kompetenz stellt die Bestimmung der $V_{O_{2max}}$ ein geeignetes Mittel zur Evaluierung der Endothelfunktion klinisch, nichtinvasiv dar.

Der Nachweis einer primär erniedrigten aeroben Kapazität bei Syndrom X und einer Verbesserung der aeroben Kapazität nach Östrogensubstitution stellen neue Erkenntnisse dar. Neben der Beschwerdenlinderung (ROSANO et al. 1996) verbesserte sich als meßbarer Parameter die kardiopulmonale Funktion durch Korrektur der endothelialen, vaskulären Regulation, da pulmonale Funktion und linksventrikuläre Ejektionsfraktion vorher unauffällig waren. Der bekannte und auch hier beobachtete Effekt einer initialen Gewichtszunahme unter Östrogen konnte die Verbesserung der $V_{O_{2max}}$ nicht maskieren, zeigt aber die Therapieadhärenz.

HAMBRECHT (1998 et 1999) fand eine Verbesserung der aeroben Kapazität bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach Training ; ein Effekt, der einerseits durch eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation bedingt sein kann, andererseits überlagert sein kann durch verbesserte Kondition bei allgemein zugenommener Muskelmasse, verbesserter muskulärer Durchblutung und durch Veränderungen der Expression der iNOS der Skelettmuskulatur selbst. Weiter fand NIEBAUER (1999) nach Training hypercholesterolämischer Ratten eine Verbesserung der vorbestehend eingeschränkten aeroben Kapazität auf beinahe Normalwerte, was als Korrektur einer vorbestehenden endothelialen Dysfunktion angesehen wird. Alternativ kann eine Konditionierung der Skelettmuskulatur zu dem Ergebnis beitragen.

Bei den erhaltenen Ergebnissen aus der Spiroergometrie fallen zwei Extreme auf:

- a) Die einzige Hormonanwenderin ohne Verbesserung, sondern mit leichter Abnahme der $V_{O_{2max}}$ nach Östrogensubstitution war mit 72 Jahren die älteste Frau im Studienkollektiv.
- b) Die Frau mit der größten Zunahme der $V_{O_{2max}}$ um 153% hat die deutlichsten Beschwerden im Sinne eines Syndrom X mit typische Angina pectoris, unauffälligen Koronariegefäßen sowie einer regionalen Hypokinesie und Linksschenkelblock als Hinweis auf Myokardschädigung durch entweder passagere Koronarthrombosen oder Spasmen.

Die Betrachtung dieser Grenzwerte offenbart folgendes:

- a) Östrogen kann den altersabhängigen Verfall der Endothelfunktion analog zu vorherigen Studienergebnissen (SORENSEN et al. 1998) nicht aufhalten vermag. So wird die Frage des Einstiegsalters für eine Hormonsubstitution aufgeworfen und die Verlässlichkeit von Studienergebnissen zu Hormonersatztherapie und kardiologischen Endpunkten bei älteren Studienteilnehmerinnen wie dem HERS-trial (HULLEY et al. 1998) hinterfragt. Bei dieser sekundären Präventionsstudie mit kombinierter Hormonersatztherapie waren die Teilnehmerinnen durchschnittlich 66 Jahre alt, ein sichtbarer Nutzen konnte in der Studie bis jetzt (4,1 Jahre nach Beginn) nicht dokumentiert werden.
- b) Östrogen hat einen ausgeprägten Nutzen als Therapeutikum bei Syndrom X mit aggravierenden Begleitfaktoren wie bestehender Myokardschädigung und neu aufgetretener Linksschenkelblock. Die Verbesserung der in diesem Fall schweren Form endothelialer Dysfunktion schlägt sich am deutlichsten in einer Verbesserung der aeroben Kapazität nieder.

Aufgrund der Resultate dieser Studie erscheint die Spiroergometrie geeignet als Verlaufskontrolle bei vermuteter oder bekannter koronarendothelialer Dysfunktion. Die Ergebnisse legen nahe, daß ausschließlich die Restaurierung der vaskulären Regulation den Nutzen in der Spiroergometrie in dieser Studie begründet.

4.2.3 Kardiovaskuläre Ereignisse und Endotheldysfunktion

Eine klinische Verbindung zwischen suboptimaler behandelter Endotheldysfunktion und atherothrombotischen Ereignissen wird in einer retrospektiven neuseeländischen Studie gezeigt, die eine Exzess-Mortalität nach Wechsel vom potenteren Simvastatin zum billigeren Fluvastatin in einem großen Patientenkollektiv detektieren konnte (THOMAS et al. 1998). Diese klinische Evidenz zeigt, daß die Endothelfunktion offenbar die Thrombozytenfunktion entscheidend beeinflusst. Daraus erwächst die

Notwendigkeit, die endotheliale Dysfunktion als Krankheitsbild frühzeitig zu erkennen und Anstrengungen zur adäquaten Behandlung zu unternehmen.

4.3 Nebenwirkungen

Zu den erwarteten, seltenen Nebenwirkungen, die einer Hormonersatztherapie inhärent sind, gehören venöse Thrombosen, die in entsprechenden Studien jedoch vermehrt bei Kontrazeption und kaum bei Hormonsubstitution postmenopausaler Frauen aufgetreten sind. Die Inzidenz venöser Thrombosen wird in der Literatur mit einer Fallzunahme pro 5000 Patientinnen pro Behandlungsjahr mit Hormonersatztherapie (DALY et al. 1996 ; JICK et al. 1996) angegeben. Ebenso verdoppelt sich das relative Risiko, eine Lungenembolie zu erleiden (GRODSTEIN et al. 1996).

Eine Stellung als "late-stage-promoter" in der Onkogenese des Mammakarzinoms wird für Östrogen angenommen (SERVICE et al. 1998). Es bestehen jedoch in Inzidenz, Prognose und Verlauf der Tumorerkrankung Unterschiede zu dem überwiegend genetisch determinierten Mammakarzinom der jüngeren Frau. Im Vergleich zur Letalität an koronaren Herzerkrankung von fast 50% bei Männern und bei Frauen der Industrienationen beträgt die statistische Wahrscheinlichkeit für Frauen ca. 4%, an den Folgen von Brustkrebs zu versterben. Für keine der genannten Nebenwirkungen erwächst eine nennenswerte Chance bei kurzfristiger Anwendung. Bei dauerhafter Therapie muß eine Risikoabwägung zusammen mit der Patientin erfolgen.

Studien mit anderen antioxidativen und lipidsenkenden Therapeutika müssen mit der Frage Effektivität und Nebenwirkungsprofil erfolgen.

5 Schlußfolgerungen in bezug auf die Arbeitshypothesen

Anhand der festgelegten Arbeitshypothesen lassen sich aus den Ergebnissen dieser Studie folgende Schlußfolgerungen ziehen:

- Die Daten der Meßgruppe I konnten eine Abnahme im Trend der thrombozytären Expression von CD41 als antithrombotischen Wirkmechanismus *in vivo* belegen. Daß dieses Ergebnis *in vitro* nicht

reproduzierbar war, legt eine Rolle für das Endothel nahe. Die Ergebnisse sind an größeren Kollektiven zu überprüfen, um den Mechanismus als neuen Weg einer östrogenvermittelten kardiovaskulären Protektion vorzuschlagen.

- Zu den in beiden Meßgruppen erhaltenen, konsistenten Befunden bezüglich Thrombozytenreaktivität gehört die Herunterregulierung und somit Aktivierung des thrombozytären von-Willebrand-Faktor-Rezeptors. Diese Form der Thrombozytenaktivierung durch Östrogen kann prothrombotische Wirkungen im venösen Gefäßbett erklären.

- Die Östrogenwirkung umfaßt als Zielzellen die Mono- und Lymphozyten über eine veränderte Expression von CD45 *in vivo*. Der Effekt ließ sich für die Monozyten *in vitro* bestätigen. Weiterhin entwickelte Östrogen bei den Granulozyten einen antiapoptotischen Effekt *in vitro*. Dieser experimentelle Hinweis bestätigt die Hypothese, daß Östrogen einen Einfluß auf Aktivität und Funktionalität peripherer mononukleärer Zellen hat.

- Eine antioxidative Wirkung ließ sich im Trend in mit Östrogen behandelten Patientinnen aus Gruppe I anhand der Malondialdehyd-Konzentration vor und nach Intervention nachweisen. Die Antikörper-Titer gegenüber oxidiertem LDL-Cholesterol wurden nicht signifikant beeinflusst.

- Die *in vivo* erhobenen Spiroergometrie-Daten zeigen eine Verbesserung der aeroben Kapazität nach Östrogensubstitution bei Frauen mit Syndrom X. Dies gibt einen Hinweis auf eine Verbesserung der primär gestörten endothelabhängigen vaskulären Regulation, da die pulmonale und kardiale Funktion vor Östrogensubstitution unbeeinträchtigt war. Ferner legt dieses Ergebnis nahe, daß der Spiroergometrie als Kontrolluntersuchung bei Syndrom X eine Bedeutung zukommt.

Die Östrogenwirkung verbessert die regulatorische Funktion der Gefäßwand, die klinische Symptomatik und verbessert die Leistungsfähigkeit, hier dokumentiert durch eine erhöhte AT und $V_{O_{2max}}$, d.h. die verbesserte aerobe Kapazität. Mehrnoch, eine Östrogenwirkung zielt auch auf periphere mononukleäre Blutzellen und Blutplättchen ab. Da die Blutplättcheneigenschaften wahrscheinlich von der Geschwindigkeit des fließenden Blutes abhängen, ist die Auswirkung von Östrogen auf die thrombozytäre Gerinnung differenziert zu betrachten. Die vermehrte

Adhäsionsneigung der Thrombozyten via von-Willebrand-Faktor kann die gehäufte Inzidenz venöser Thrombosen unter Östrogentherapie erklären, wohingegen aus der verminderten Aggregationsbereitschaft unter Östrogen ein günstiger Effekt im arteriellen Gefäßbett erwachsen kann. Diesbezüglich sind weitere Studien notwendig, um diese Frage zu klären.

Aus der herabgesetzten Bereitschaft zu Apoptose und Deregulierung von monozytären Oberflächenmarkern nach 4 Wochen Östrogengabe und *in vitro* kommen weitere, bis dato unbekannte Mechanismen einer möglichen kardiovaskulären Protektion für Anwenderinnen einer Östrogensubstitution in Frage. Weitere Studien müssen Aufschluß über mögliche Alternativen zu Östrogen wie z.B. selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren oder Kombinationen aus Lipidsenkern und Antioxidativa erbringen, um die bestehenden Nebenwirkungen einer Östrogentherapie zu minimieren.

Ein zyklisch verabreichtes Östrogen mit Pause nach 4wöchigem Therapieintervall kann aufgrund der vorliegenden Daten vielversprechend sein zur Behandlung des kardialen Syndrom X. Bei diskontinuierlicher Östrogengabe kann auch bei nichthysterektomisierten Frauen die zusätzliche Anwendung eines Progestins zur Verhinderung einer Endometriumproliferation minimiert werden. Zu dem Modus einer Hormonersatztherapie müssen weitere Studien und eine interdisziplinäre Zusammenarbeit Lösungen erbringen.

Fachwortverzeichnis

CD-Nomenklatur-Erläuterungen:

- CD41: Glykoprotein IIb oder Fibrinogenrezeptor auf Thrombozyten,
CD42b: Glykoprotein Ib oder von-Willebrand-Faktor-Rezeptor auf Thrombozyten,
CD62p: P-Selektin als Aktivierungsmarker auf Thrombozyten,
CD14: Lipopolysaccharidrezeptor vorwiegend auf Monozyten,
CD45: Pan-Leukozyten-Antigen auf Mono-, Lympho- und Granulozyten ;

Hormonersatztherapie ist eine Behandlungsform bei postmenopausalen Frauen mit weiblichen Sexualhormonen bestehend aus einer Kombination von Östrogen und Gestagen. Eine *Östrogensatztherapie* stellt den Spezialfall dar, bei dem Östrogene als Monotherapie ohne Gestagenzusatz verabreicht werden.

Menopause ist der Zeitpunkt der letzten regulären Menstruation, der Zeitpunkt der hormonellen Umstellung der Frau mittleren Alters. Die Hormonumstellung ist gekennzeichnet durch Veränderungen von Haut, Hautanhangsgebilden und Genitalien, oftmals begleitet von vegetativ-vasomotorischen Störungen und gehäuft vergesellschaftet mit Osteoporose und Atherosklerose (SCHMIDT-MATTHIESEN, 1992).

Östrogen im engeren Sinne ist 17β -Östrogen oder Östradiol, im weiteren Sinne Östron, Östriol oder Östradiol.

Perimenopause ist die Zeit ab Beginn einer unregelmäßig und seltener werdenden Regelblutung bis zu 1 Jahr nach der Menopause.

Postmenopause ist die Zeit nach der Menopause, aus kardiologischer Sicht per definitionem ein Jahr nach der letzten Regelblutung oder ein Zustand

nach gynäkologischer Totaloperation. Serologisch ist ein erhöhter Spiegel an follikelstimulierendem Hormon wiederholt meßbar.

Syndrom X ist ein Synonym für eine typische Angina-pectoris-Symptomatik verbunden mit positiver nichtinvasiver Myokard-ischämiediagnostik trotz angiographisch unauffälligen Koronarien (BRAUNWALD, 1997).

Abkürzungsverzeichnis

AT	engl. „anaerobic threshold in exercise“, anaerobe Schwelle
BMI	engl. „body mass index“, Körper-Massen-Index (Größe ² /Gewicht, in cm ² /kg)
CCS	engl. „Canadian Cardiovascular Society“, hier: Klassifikation der Angina pectoris nach der vorgeschlagenen Einteilung der kanadischen Herz-Kreislauf-Gesellschaft
CD	engl. „cluster of differentiation“, Differenzierungsantigen
CSE-I	Inhibitor des cholesterolsynthetisierenden Enzyms
DNS	Deoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
eNOS	endotheliale, konstitutive Stickstoffmonoxyd-Synthase
GCP	Guidelines of good clinical practice
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxyd-Synthase
kbp	kilo Basenpaare
NO	Stickstoffmonoxyd
V _{O2max}	maximale körperliche Sauerstoffaufnahme pro Gewichts- und Zeiteinheit (in ml/(kg*min))

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Gating der Leukozyten-Subpopulationen. 24
- Abbildung 2:** Graphische Darstellung der Thrombozyten-Reaktivität nach 4 bzw. 8 Wochen Östrogensubstitution im Vergleich zur Grunduntersuchung. Angabe der relativen Änderung der Mittelwerte \pm Konfidenzintervall (in %) der Expressionen von CD41, CD42b und CD62p. 29
- Abbildung 3:** Graphische Darstellung der prozentualen Änderung (\pm Konfidenzintervall) des Expressionsmusters von CD41, CD42b und CD62p nach *in vitro* Inkubation mit 17β -Östrogen ohne Plättchenstimulation. 33
- Abbildung 4:** Graphische Darstellung der prozentualen Änderung (\pm Konfidenzintervall) des Expressionsmusters von CD41, CD42b und CD62p nach *in vitro* Inkubation mit 17β -Östrogen nach ADP-Stimulation. 34
- Abbildung 5:** Graphische Darstellung der prozentualen Änderung (\pm Konfidenzintervall) des Expressionsmusters von CD41, CD42b und CD62p nach *in vitro* Inkubation mit 17β -Östrogen und TRAP6-Stimulation. 35
- Abbildung 6:** Graphische Darstellung der Konfidenzintervalle um die mittlere Expressionsänderung von monozytärem CD14 und CD45 sowie CD45 von Lymphozyten und Neutrophilen nach 4 Wochen Östrogensubstitution. 38
- Abbildung 7:** Signifikante Erniedrigung der Expression von Pan-Leukozyten-Antigen CD45 und Lipopolysaccharidrezeptor CD14 auf Monozyten nach 30minütiger Inkubation von Blut mit Östrogen. 40
- Abbildung 8:** Gating der Leukozytenpopulationen aus 180° - versus 90° -Streulicht in der Durchflußzytometrie nach H_2O_2 -Stimulation. 44
- Abbildung 9:** Gating der Annexin- versus Propidiumjodid-Fluoreszenz aus der Subpopulation der neutrophilen Granulozyten. 44
- Abbildung 10:** Graphische Darstellung des Östrogeneinflusses auf Neutrophilen-Apoptose in Relation zur östrogenfreien Kontrolle (mittlere Änderung in % \pm Konfidenzintervall). 45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der Gruppen I, II und III unter Angabe der linksventrikulären Ejektionsfunktion (LVEF), des body mass index (BMI) und der Begleitmedikation (Cholesterolsynthese-Enzym-Inhibitor und Antihypertensiva).	13
Tabelle 2: Mittelwerte (\pm Konfidenzintervall) der Fluoreszenz-intensitäten von CD41, CD42b und CD62p vor und nach 4 bzw. 8 Wochen Östrogensubstitution (Gruppe I), angegeben in arbiträren Einheiten.	27
Tabelle 3: Prozentuale Änderung (\pm Konfidenzintervall) der Expressionen der Werte aus Tab.2. Östrogensubstitution im Vergleich zur Grunduntersuchung.	28
Tabelle 4: Mittelwerte (\pm Konfidenzintervall) der Fluoreszenz-intensitäten von CD41, CD42b und CD62p von Blutproben der Patientinnen aus Gruppe II mit und ohne 30minütiger Östrogen-Präinkubation ; angegeben in arbiträren Einheiten.	31
Tabelle 5: Relative Änderung (\pm Konfidenzintervall) der Meßwerte aus Tab. 4. Östrogen-Präinkubation in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zu östrogenfreier Kontrolle.	32
Tabelle 6: Mittelwerte (\pm Konfidenzintervall, arbiträre Einheiten) der Expression von CD45 und CD14- von TRAP6- bzw. unstimulierten Blutproben der Patientinnen aus Gruppe II: <i>in vitro</i> Östrogen-Inkubation versus Kontrolle.	39
Tabelle 7: Relative Änderung (\pm Konfidenzintervall, in %) der Monozytenparameter aus Tab. 6. <i>In vitro</i> Inkubation mit Östrogen (c=0,01nmol/l und c=1nmol/l) versus östrogenfreie Kontrolle.	41
Tabelle 8: Durchflußzytometrisch bestimmte prozentuale Fraktion der annexinpositiven und somit apoptotischen neutrophilen Granulozyten nach Wasserstoffperoxidinkubation (Gruppe III).	43
Tabelle 9: Resultate aus Malondialdehyd-Serumbestimmung von Frauen aus Gruppe I vor (1) und nach (2) 8wöchiger Östrogensatztherapie.	46
Tabelle 10: Resultate aus Aktivitätsbestimmung von Antikörpern gegen oxidiertes LDL von Frauen aus Gruppe I vor (1.) und nach (2.) 8wöchiger Östrogensatztherapie.	47

- Tabelle 11:** Mittlere Körpermasse und prozentuale Änderung \pm Konfidenzintervall im Vergleich vor und nach Östrogentherapie ($p=0,04$). 48
- Tabelle 12:** Mittlere spezifische Sauerstoffaufnahme (V_{O_2}) bei Erreichen der ventilatorischen Schwelle (AT) vor und nach Östrogensatztherapie ($p=0,01$). 48
- Tabelle 13:** Zunahme der maximalen Sauerstoffaufnahme-Kapazität ($V_{O_{2max}}$) nach Östrogensatztherapie im Vergleich zu vorher, Angabe der mittleren prozentualen Änderung (%) fallbezogen. 49

Literaturverzeichnis

1. Alexander, K.P., Shaw, L.J., DeLong, E.R., Mark, D.B., Peterson, E.D. (1998): Value of exercise treadmill testing in women. *J Am Coll Cardiol.* 32: 1657-1664
2. Alvarez, R.J., Gips, S.J., Moldovan, N., Wilhide, C.C., Milliken, E.E., Hoang, A.T., Hruban, R.H., Silverman, H.S., Dang, C.V., Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997): 17beta-estradiol inhibits apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 237 ; 2: 372-381
3. Arteaga, E., Rojas, A., Villaseca, P., Bianchi, M., Arteaga, A., Durán, D. (1998): In vitro effect of estradiol, progesterone, testosterone, and of combined estradiol/progestins on low density lipoprotein (LDL) oxidation in postmenopausal women. *Menopause.* 5 ; 1: 16-23
4. Aslibekian, I.S., Todorov, R.N., Kirichenko, A.A., Borovkov, Al. F. (1978): (Ergospirometry study of the functional state of the cardiovascular system in chronic ischemic heart disease). *Vnutr Boles.* 17 ; 4: 47-52
5. Bellinger, D.A., Williams, J.K., Adams, M.R., Honoré, E.K., Bender, D.E. (1998): Oral contraceptives and hormone replacement therapy do not increase the incidence of arterial thrombosis in a nonhuman primate model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18: 92-99
6. Braunwald, E. (1997): Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 5. Aufl., *W.B.Saunders* ; 1340-1344
7. Burke, A.P., Farb, A., Malcom, G.T., Liang, Y., Smialek, J., Virmani, R. (1998): Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation.* 97 ; 21: 2110-2116

8. Chen, F.P., Lee, N., Wang, CH., Cherng, W.J., Soong, Y.K. (1998): Effects of hormone replacement therapy on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Fertil Steril.* 69 ; 2: 267-273
9. Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., Shaul, P.W. (1999): Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 103 ; 3: 401-406
10. Christ, M., Seyffarth, K., Wehling, M. (1999): Attenuation of heart-rate variability in postmenopausal women on progestin-containing hormone replacement therapy. *Lancet.* 353: 1939-1940
11. Collins, P., Rosano, G.M., Sarrel, P.M., Ulrich, L., Adamopoulos, S., Beale, C.M., McNeill, J.G., Poole-Wilson, P.A. (1995): 17beta-Estradiol attenuates Acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation.* 92 ; 1: 24-30
12. Daly, E., Vessey, M.P., Hawkins, M.M., Carson, J.L., Gough, P., Marsh, S. (1996): Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet.* 348: 977-980
13. Darling, G.M., Johns, J.A., McCloud, P.I., Davis, S.R. (1997): Estrogen and progestin compared with simvastatin for hypercholesterinemia in postmenopausal women. *New Engl J Med.* 337: 595-601
14. Davi, G., Gresele, P., Violi, F., Basili, S., Catalano, M., Giammarresi, C., Volpato, R., Nenci, G.G., Ciabattini, G., Patrono, C. (1997): Diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and hypertension but not vascular disease per se are associated with persistent platelet activation in vivo. *Circulation.* 96: 69-75

15. Devor, M., Barrett-Connor, E., Renvall, M., Feigal, D., Ramsdell, J. (1992): Estrogen replacement therapy and the risk of venous thrombosis. *Am J of Medicine*. 92: 275-82
16. Dimitriu-Bona, A., Burmester, G.R., Waters, S.J., Winchester, R.J. (1983): Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 130 ; 1: 145-152
17. Egashira, K., Inou, T., Hirooka, Y., Yamada, A., Urabe, Y., Takeshita, A. (1993): Evidence of impaired endothelium-dependent coronary vasodilation in patients with angina pectoris and normal coronary arteries. *New Engl J Med*. 328: 1659-1664
18. Evans, M.J., MacLaughlin, S., Marvin, R.D., Abdou, N.I. (1997): Estrogen decreases in vitro apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from women with normal menstrual cycles and decreases TNF-alpha production in SLE but not in normal cultures. *Clin Immunol Immunopathol*. 82 ; 3: 258-262
19. Faraday, N., Goldschmidt-Clermont, P., Bray, P.F. (1997): Gender Differences in Platelet GpIIb-IIIa-Activation. *Thrombosis and Haemostasis*. 77 ; 4: 748-754
20. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by Acetylcholine. *Nature*. 288 ; 5789: 373-376
21. Gawaz, M.P. (1999): Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzkrankheit. *Thieme Stuttgart, New York*: 17ff. und 37

22. Graaf, J.C. de, Banga, J.D., Moncada, S., Palmer, R.M., Groot, P.G. de, Sixma, J.J. (1992): Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation*. 85: 2284-2290.
23. Grodstein, F., Stampfer, M.J., Goldhaber, S.Z., Manson, J.E., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Willett, W.C., Hennekens, C.H. (1996): Prospective study of exogenous hormones and risk of pulmonary embolism in women. *Lancet*. 348: 983-987
24. Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willet WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE (1997): Postmenopausal hormone therapy and mortality. *New Engl J Med*. 336: 1769-1775
25. Hambrecht, R., Fiehn, E., Weigl, C., Gielen, S., Hamann, C., Kaiser, R., Yu, J., Adams, V., Niebauer, J., Schuler, G. (1998): Regular Physical Exercise Corrects Endothelial Dysfunction and Improves Exercise Capacity in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation*. 98: 2709-2715
26. Hambrecht, R., Adams, V., Gielen, S., Linke, A., Möbius-Winkler, S., Yu, J., Niebauer, J., Jiang, H., Fiehn, E., Schuler, G. (1999): Exercise intolerance in patients with chronic heart failure and increased expression of inducible nitric oxide synthase in the skeletal muscle. *J Am Coll Cardiol*. 33 ;1: 174-179
27. Henderson, B.E., Paganini-Hill, A., Ross, R.K. (1991): Decreased mortality in users of estrogen replacement therapy. *Arch Intern Med*. 151: 75-78
28. Hoffman, M., Church, F.C. (1993): Response of blood leukocytes to thrombin receptor peptides. *J Leukoc Biol*. 54 ; 2: 145-151
29. Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B., Vittinghoff, E. (1998): Randomized trial of estrogen plus progestin for

secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA*. 280: 605-613

30. Jick, H., Derby, L.E., Myers, M.W., Vasilakis, C., Newton, K.M. (1996): Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. *Lancet*. 348: 981-983

31. Kim-Schulze, S., Lowe jr., W.L., Schaper, W. (1998): Estrogen stimulates delayed Mitogen-Activated Protein Kinase Activity in Human Endothelial Cells via an Autocrine Loop that involves Basic Fibroblast Growth Factor. *Circulation*. 98: 413-421

32. Kleinert, H., Wallerath, T., Euchenhofer, C., Ihrig-Biedert, I., Li, H., Forstermann, U. (1998): Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension*. 31 ; 2: 582-588

33. Koh, K.K., Mincemoyer, R., Bui, M.N., Csako, G., Pucino, F., Guetta, V., Waclawiw, M., Cannon III, R.O. (1997): Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *New Engl J Med*. 336: 683-690

34. Koh, K.K., Cardillo, C., Bui, M.N., Hathaway, L., Csako, G., Waclawiw, M.A., Panza, J.A., Cannon III, R.O. (1999): Vascular Effects of Estrogen and Cholesterol-Lowering Therapies in Hypercholesterolemic Postmenopausal Women. *Circulation*. 99: 354-360

35. Ledbetter, J.A., Tonks, N.K., Fischer, E.H., Clark, E.A. (1988): CD45 regulates signal transduction and lymphocyte activation by specific association with receptor molecules on T or B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85 ; 22: 8628-8632

36. Lekakis, J., Papamichael, C., Mavrikakis, M., Voutsas, A., Stamatelopoulos, S. (1998): Effect of long-term estrogen therapy on brachial

arterial endothelium-dependent vasodilation in women with Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis. *Am J Cardiol.* 82 ; 12: 1555-1557

37. Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Lesèche, G., Freyssinet, J.M., Tedgui, A. (1999): Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaque. *Circulation.* 99: 348-353.

38. McEver, R.P. (1990): Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells.* 16 ; 1: 73-83

39. McGregor, J.L., Brochier, J., Wild, F., Follea, G., Trzeciak, M.C., James, E., Dechavanne, M., McGregor, L., Clemetson, K.J. (1983): Monoclonal antibodies against platelet membrane glycoproteins. Characterization and effect on platelet function. *Eur J Biochem.* 131 ; 2: 427-436

40. Meschia, M., Bruschi, F., Soma, M., Amicarelli, F., Paoletti, R., Crosignani, P. (1998): Effects of oral and transdermal hormone replacement therapy on Lipoprotein(a) and lipids: a randomized controlled trial. *Menopause.* 5 ; 3: 157-162

41. Mendelsohn, M.E., Karas, R.H. (1999): The protective effect of estrogen on the cardiovascular system. *New Engl J Med.* 340 ; 23: 1801-1811

42. Michelson, A.D. (1996): Flow Cytometry: A Clinical Test of Platelet Function. *Blood.* 87 ; 12: 4925-4936

43. Mijatovic, V., Kenemans, P., Netelenbos, C., Jakobs, C., Popp-Snijders, C., Peters-Muller, E.R., van der Mooren, M.J. (1998): Postmenopausal oral 17beta-estradiol continuously combined with dydrogesterone reduces fasting serum homocysteine levels. *Fertil Steril.* 69 ; 5: 876-82

44. Miyazaki, H., Matsuoka, H., Cooke, J.P., Usui, M., Ueda, S., Okuda, T., Imaizumi, T. (1999): Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor: A Novel Marker of Atherosclerosis. *Circulation*. 99: 1141-1146
44. Motoyama, T., Kawano, H., Kugiyama, K., Hirashima, O., Ohgushi, M., Tsunoda, R., Moriyama, Y., Miyao, Y., Yoshimura, M., Ogawa, H., Yasue, H. (1998): Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol*. 32 ; 6: 1672-1679
45. Niebauer, J., Maxwell, A.J., Lin, P.S., Tsao, P.S., Kosek, J., Bernstein, D., Cooke, J.P. (1999): Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. *Am J Physiol*. 276 ; 4: H1346-1354
46. Ranganath, L.R., Christofides, J., Semple, M.J. (1996): Increased mean platelet volume after oestrogen replacement therapy. *Ann Clin Biochem*. 33 ; 6: 555-560
47. Reis, S.E., Gloth, S.T., Blumenthal, R.S., Resar, J.R., Zacur, H.A., Gerstenblith, G., Brinker, J. (1994): Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to Acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation*. 89: 52-60
48. Rosano, G.M., Collins, P., Kaski, J.C., Lindsay, D.C., Sarrel, P.M., Poole-Wilson, P.A. (1995): Syndrome X in women is associated with estrogen deficiency. *Eur Heart J*. 16: 610-614
49. Rosano, G.M., Peters, N.S., Lefroy, D., Lindsay, D.C., Sarrel, P.M., Collins, P., Poole-Wilson, P.A. (1996): 17-beta-Estradiol therapy lessens angina in postmenopausal women with syndrome X. *J Am Cardiol*. 28 ; 6: 1500-1505
50. Ruan, C.G., Xi, X.D., Du, X.P., Wan, H.Y., Wu, X., Li, P.X., Gu, J.M. (1987): Studies on monoclonal antibodies against human platelets--a

monoclonal antibody to human platelet glycoprotein I α -SZ-2. *Sci Sin.* 30 ; 4: 404-412

51. Ryan, T.J., Anderson, J.L., Antmann, E.M., Braniff, B.A., Brooks, N.H., Califf, R.M., Hillis, L.D., Hiratzka, L.F., Rapaport, E., Riegel, B.J., Russel, R.O., Smith, E.E., Weaver, W.D. (1996): AHA/ACC Guidelines for the Management of Patients with Acute Myocardial Infarction: Executive Summary. *Circulation.* 94: 2341-2350

52. Sarrel, P.M., Lindsay, D., Rosano, G.M., Poole-Wilson, P.A. (1992): Angina and normal coronary arteries in women: gynecologic findings. *Am J Obstet Gynecol.* 167 ; 2: 467-471

53. Sbarouni, E., Kyriakides, Z.S., Kremastinos, DT (1998): The effect of hormon replacement therapy alone and in combination with simvastatin on plasma lipids of hypercholesterolemic postmenopausal women with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 32: 1244-50

54. Scarabin, P.Y., Bonithon-Kopp, C., Bara, L., Malmejac, A., Guize, L., Samama, M. (1990): Factor VII activation and menopausal status. *Thromb Res.* 57 ; 2: 227-234

55. Schmidt-Matthiesen, H. (1992): Gynäkologie und Geburtshilfe: Kurzlehrbuch für Studium und Praxis unter Berücksichtigung des Lernzielkatalogs. *Schattauer.* Stuttgart: S.45 und S.102

56. Schneider, H.P. (1997): Cross-national study of women's use of hormone replacement therapy (HRT) in Europe. *Int J Fertil Womens Med.* 42 ; 2: 365-375

57. Service, R.F. (1997): New Role for Estrogen in Cancer? *Science.* 279: 1631-1633

58. Shitikova, A.S., Beliazo, O.E., Tarkovskaja, L.R., Kargin, V.D. (1997): (Metodopredelenia vnutrisosudistoi aktivisii trombocitov i ego znachenie v klinicheskoi praktike.) *Klin Lab Diagn (GUS)*: 23-35
59. Sorensen, K.E., Dorup, I., Hermann, A.P., Mosekilde, L. (1998): Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function. *Circulation*. 97 ; 13: 1234-1238
60. Stampfer, M.J., Willet, W.C., Colditz, G.A., Rosner, B., Speizer, F.E., Hennekens, C.H. (1985): A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease. *New Engl J Med*. 313: 1044-1049
61. Streuli, M., Morimoto, C., Schrieber, M., Schlossman, S.F., Saito, H. (1988): Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens. *J Immunol*. 141 ; 11: 3910-3914
62. Takkunen, J., Rajasalmi, M., Palatsi, I. (1978): Ergospirometry and coronary arteriography in young patients with angina pectoris or atypical chest pain. *Ann Clin Res*. 10 ; 5: 263-72
63. Thomas, M., Mann, J. (1998): Increased thrombotic vascular events after change of statin. *Lancet*. 352: 1830-1831
64. Tielemans, C.L., Delville, J.P., Husson, C.P., Madhoun, P., Lambrechts, A.M., Goldman, M., Vanherweghem, J.L. (1993): Adhesion molecules and leukocyte common antigen on monocytes and granulocytes during hemodialysis. *Clin Nephrol*. 39 ; 3: 158-165
65. Vaughan, C.J., Murphy, M.B., Buckley, B.M. (1996): Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*. 348: 1079-1082.

66. Vegeto, E., Pollio, G., Pellicciari, C., Maggi, A. (1999): Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid77 cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis. *FASEB J.* 13 ; 8: 793-803
67. Volf, I., Koller, E., Bielek, E., Koller, F. (1997): Colocalization of gold-labeled LDL and fibrinogen on platelets: enhanced fibrinogen binding induced by LDL. *Am J Phys.* 273 ; 1: C118-129
68. (The) Writing Group for the PEPI Trial (1995): Effects of oestrogen or oestrogen/progestin regimens on the heart disease risk factors in postmenopausal women. *JAMA.* 273: 199-208

Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: Kardiovaskuläre Östrogenwirkungen unter Berücksichtigung der aeroben Kapazität sowie der Leukozyten- und Thrombozytenfunktion *in vitro* und *in vivo* bei postmenopausalen Frauen mit Syndrom X.

eingereicht von Rainer U. Pliquett

angefertigt an der Universität Leipzig, Herzzentrum GmbH,
Abteilung für Kardiologie von Prof. G. Schuler

betreut von PD Dr. R.J. Zotz

Oktober 1999

In dieser Arbeit werden Mechanismen der Östrogenwirkungen auf Monozyten-, Lymphozyten und Neutrophilenfunktion sowie auf die korpuskuläre Gerinnung untersucht anhand postmenopausaler Frauen mit Syndrom X *in vivo* und *in vitro*. Vor und nach Östrogengabe bzw. mit und ohne Östrogen-Präinkubation erfolgte die durchflußzytometrische Beurteilung der Thrombozytenmarker P-Selektin, von Willebrand Rezeptor und Fibrinogenrezeptor sowie der Leukozytenmarker Pan-Leukozyten-Antigen und Lipopolysaccharidrezeptor. Ein Apoptoseassay erfolgte zusätzlich nach Inkubation von Blut postmenopausaler Frauen mit und ohne Östrogen *in vitro*. Es zeigte sich, daß die Monozytenfunktion über die verminderte Expression von Pan-Leukozyten-Antigen durch Östrogen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beeinflusst wird. *In vitro* zeigt sich zusätzlich eine Abnahme des monozytären und Lipopolysaccharidrezeptors. Neutrophile Granulozyten zeigten eine signifikant geringere Apoptosebereitschaft auf H₂O₂ nach Östrogen-Präinkubation *in vitro*. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* induziert Östrogen eine Aktivierung der Thrombozytenfunktion beurteilt an Von-Willebrand-Faktor-Rezeptor, gegenläufig zeigt sich in eine tendenzielle Abnahme der

Fibrinogenrezeptor-Expression nach 4 Wochen Östrogentherapie unter Thrombozytenstimulation. Neben der nachgewiesenen Beeinflussung der peripheren mononukleären Zellen zeigt sich indirekt eine Beeinflussung der endothelabhängigen, vaskulären Regulation.

Vor und nach Östrogensubstitution wurde eine Spiroergometrie durchgeführt. Diese konnte eine signifikante Zunahme der aeroben Kapazität nach Östrogensubstitution nachweisen. Dies wird als klinische Evidenz für eine Verbesserung der endothelabhängigen Gefäßregulation gewertet, da die pulmonale und kardiale Funktion vor medikamentöser Intervention unbeeinträchtigt waren. Somit ergeben sich neue Ansätze für kardiovaskuläre Östrogenwirkungen.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Unterstützung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, daß Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und daß die vorgelegte Arbeit weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den 24.10.1999

Rainer Pliquett

Lebenslauf

Name: Pliquett
Vorname: Rainer Ullrich
Geburtsdatum: 9.9.1970
Geburtsort: Leipzig
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Ausbildung:

Juni 1989 Abitur: mit Auszeichnung
Nov.1989 – Sept.1990 Wehrdienst
Okt.1990 – März 1997 Medizinstudium an der Universität Leipzig,
beendet als teilapprobierter Arzt
Okt.1998 Vollapprobation
Juni 1998 – Okt.1999 Promotion über Kardiovaskuläre
Östrogenwirkungen unter Berücksichtigung der aeroben Kapazität sowie der
Leukozyten- und Thrombozytenfunktion *in vitro* und *in vivo* bei
postmenopausalen Frauen mit Syndrom X

Praktische Erfahrung:

Mai 1996 – Aug.1996 Centre Hospitalier d`Université de Nancy,
Abteilung für Kardiologie, Pflichtassistenz

April 1997 – Sept.1998 Herzzentrum Leipzig, Abteilung für Kardiologie,
Arzt im Praktikum

Okt.1998 – Okt. 1999 Assistenzarzt im Herzzentrum Leipzig, Abteilung
für Kardiologie und wissenschaftlicher Assistent bei PD Dr. R.J. Zotz

Leipzig, den 24.Oktober 1999

Rainer Pliquett