

Aus dem Zentrum für Neurologie der Universität Tübingen  
Neurologische Klinik und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung  
Abteilung Allgemeine Neurologie  
Komm. Leiter: Professor Dr. A. Melms

**Einfluss der Betarezeptorenblocker Nebivolol und  
Metoprolol auf inflammatorische Prozesse und die  
Progression cholesterininduzierter Atherosklerose im  
Kaninchenmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Carolin Grundgeiger, geb. Lorenz  
aus Ludwigsburg

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Brehm

2. Berichterstatter: Professor Dr. M Horger



Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>3</b>
2.1	Tiermodell	3
2.1.1	Versuchstiere und Tierhaltung	3
2.1.2	Gruppeneinteilung und Behandlungsschema	3
2.1.3	Blutentnahme und Messung der Herzfrequenz	6
2.1.4	Versuchende	6
2.1.4.1	Blutentnahme	6
2.1.4.2	Entnahme der Karotiden	7
2.1.4.3	Perfusionsfixierung mit Formalin	7
2.1.4.4	Organ- und Gefäßentnahme	7
2.2	Analyse der Blutparameter	8
2.3	Real-time-RT-PCR	9
2.3.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	9
2.3.2	RNA-Isolierung	11
2.3.3	Reverse Transkription	12
2.3.4	Polymerasekettenreaktion	12
2.4	Quantitative Bestimmung von MCP-1 mittels ELISA	13
2.5	Anfertigung histologischer und immunhisto-chemischer Präparate	14
2.5.1	Herstellung von Paraffinpräparaten	14
2.5.2	Herstellung von Kryostatpräparaten	16
2.5.3	Histologische Färbungen	16
2.5.3.1	Elastica van Gieson-Färbung (EvG-Färbung)	16
2.5.3.2	Silbernitratfärbung nach von Kossa	16
2.5.3.3	Ölrot-Färbung	17
2.5.4	Immunhistochemische Färbungen	17

2.6	Auswertung der Gefäßpräparate	20
2.6.1	Verwendete Geräte	20
2.6.2	Morphometrische Auswertung	22
2.6.2.1	Bestimmung der Plaquefläche und der Stenose des Gefäßlumens	22
2.6.2.2	Bestimmung kalziumhaltiger Bereiche	23
2.6.3	Digitale Auswertung	23
2.6.3.1	Prinzipielles Vorgehen	23
2.6.3.2	Bestimmung des Lipidanteils	25
2.6.3.3	Bestimmung des Anteils an Makrophagen	25
2.6.3.4	Bestimmung des Anteils an glatten Muskelzellen	25
2.6.3.5	Bestimmung des Anteils an Endothelin-1	25
2.6.3.6	Bestimmung des Anteils an Kollagen	25
2.6.4	Sonstige Auswertungsmethoden	26
2.6.4.1	Bestimmung der Zelldichte und Proliferationsrate	26
2.6.4.2	Bestimmung des Anteils an NFκB-positiven Zellen	26
2.7	Statistische Auswertung	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Überlebenszeit	28
3.1.1	Parameter bei Versuchsbeginn	30
3.1.2	Plaquefläche	30
3.2	Körpergewicht und Futteraufnahme	32
3.2.1	Körpergewicht	32
3.2.2	Futter-, Cholesterin- und Medikamentenaufnahme	33
3.3	Herzfrequenz	36
3.4	Organgewichte	37
3.5	Blutparameter	38
3.5.1	Konzentration der Plasmalipide und -lipoproteine	38
3.5.1.1	Gesamtcholesterin	38
3.5.1.2	Triglyzeride	39

3.5.1.3	Lipoproteine	40
3.5.2	Kleines Blutbild	43
3.5.3	Leber- und Pankreaswerte	49
3.6	Real-time-RT-PCR	52
3.6.1	Kollagen-Typ-I	52
3.6.2	Kollagen-Typ-VIII	53
3.6.3	VCAM-1	54
3.6.4	PDGF- $\beta$	55
3.6.5	VEGF	56
3.6.6	bFGF	57
3.6.7	MCP-1	58
3.7	MCP-1-ELISA	59
3.8	Morphometrie und Histologie	60
3.8.1	Plaueflache und Stenose des Gefalumens	60
3.8.1.1	Aortenbogen	60
3.8.1.2	Aorta thoracalis	62
3.8.2	Plauezusammensetzung	66
3.8.2.1	Makrophagen im Aortenbogen	66
3.8.2.2	Makrophagen in der Aorta thoracalis	68
3.8.2.3	Kalzium, Lipide, glatte Muskelzellen, Endothelin-1, Kollagen Typ I und Typ III, NFkB-positive Zellen	70
3.8.2.4	Proliferationsrate, Zelldichte und Gesamtzellzahl	74
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	78
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
4.1	Literaturübersicht	83
4.1.1	Atherosklerose	83
4.1.1.1	Bedeutung und Definition	83
4.1.1.2	Klassifikation histopathologischer Plaquetypen	85
4.1.1.3	Endotheliale Dysfunktion und Stickstoffmonoxid (NO)	87

4.1.1.4	Atherogenese	88
4.1.2	Betarezeptorenblocker	91
4.1.2.1	Betaadrenorezeptoren	92
4.1.2.2	Substanzklassen und einzelne Vertreter	93
4.1.3	Wahl eines geeigneten Tiermodells	97
4.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse	100
4.2.1	Überlebenszeit	100
4.2.2	Versuchsverlauf	101
4.2.3	Plasmalipide, Plasmalipoproteine und Parameter des kleinen Blutbilds	103
4.2.4	Leberschädigung	106
4.2.5	Einfluss der Betablockertherapie auf Plaquebeschaffenheit und Atherogenese	107
4.2.5.1	Plaqueeentwicklung	107
4.2.5.2	Plaquezusammensetzung	109
4.2.5.3	Einfluss auf inflammatorische Mediatoren	112
4.3	Material- und Methodenkritik	118
4.4	Abschließende Beurteilung und Ausblick	120
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>137</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Aa	Arterien (Pl.)
AHA	American Heart Association
Ao abd	Aorta abdominalis
Ao thor	Aorta thoracalis
AoBo	Aortenbogen
ATP	Adenosin-Triphosphat
BE	Blutentnahme
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CRP	C-reaktives Protein
cGMP	cyclic (zyklisches) Guanosin 3',5'-Monophosphat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EvG-Färbung	Elastica van Gieson-Färbung
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
hcaSMC	human coronary artery smooth muscle cells (humane koronararterielle glatte Muskelzellen)
HDL	High Density Lipoprotein
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
ISA	intrinsisch sympathomimetische Aktivität
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
MCH	Mean corpuscular haemoglobin (mittlerer Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten)
MCHC	Mean corpuscular haemoglobin concentration (mittlere Hämoglobinkonzentration aller zellulären Blutbestandteile)
MCSF	Macrophage Colony-stimulating Factor

MCP-1	Monocyte Chemotactic (Monozyten chemotaktisches) Protein-1
MCV	Mean corpuscular volume (mittleres Volumen des einzelnen Erythrozyten)
Mittel	arithmetischer Mittelwert
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NZW	New Zealand White Rabbit (Weißes Neuseelandkaninchen)
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RT-PCR	Real-time-Polymerasekettenreaktion
SEM	Standard Error of Measurement (Standardfehler)
TGF-β1	Transforming Growth Factor-beta1
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transpeptidase

# 1 Einleitung und Fragestellung

Weltweit starben 2005 etwa 17,5 Mio. Menschen an Herz-Kreislauf-erkrankungen. Das entspricht 30 % aller Todesfälle.<sup>1,2</sup> In Deutschland war im Jahre 2005 nahezu jeder zweite Todesfall (44,2 %) Folge einer Erkrankung des Kreislaufsystems.<sup>3</sup> Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderem die chronisch ischämische Herzkrankheit, der Myokardinfarkt, die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) sowie zerebrovaskuläre Ereignisse. Die Atherosklerose, eine chronisch entzündliche Erkrankung großer und mittlerer, elastischer und muskulärer Arterien, ist die Hauptursache dieser Gruppe von Erkrankungen.<sup>4,5</sup>

Eine wichtige Medikamentengruppe in der Therapie von Herz-Kreislauf-erkrankungen sind Betarezeptorantagonisten ( $\beta$ -Blocker).<sup>6</sup> Sie senken Morbidität und Mortalität nachweislich.<sup>7,8,9</sup> Nebivolol, ein hochselektiver  $\beta_1$ -Rezeptorenblocker ohne intrinsisch sympathomimetische Aktivität (ISA) und membranstabilisierende Wirkung,<sup>10,11,12</sup> ist ein Betablocker der dritten Generation und besitzt im Gegensatz zu anderen  $\beta$ -Blockern wie Metoprolol NO-vermittelte vasodilatierende Eigenschaften.<sup>13,14,15</sup> Die durch Nebivolol induzierte erhöhte Bioverfügbarkeit von NO wirkt der endothelialen Dysfunktion in der frühen Atherogenese entgegen.<sup>10,16,15</sup> Neben seinen antioxidativen Wirkung besitzt Nebivolol weitere Eigenschaften, die die Entstehung atherosklerotischer Plaques auf antiproliferativer<sup>17,18</sup> und antiinflammatorischer<sup>19</sup> Ebene beeinflussen.

Auch für die nächsten 20 Jahren wird erwartet, dass kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit aufgrund zunehmender Prävalenz in Entwicklungsländern und Osteuropa sowie steigender Inzidenz an adipösen und an Diabetes mellitus leidenden Patienten in der westlichen Welt die Todesursache Nummer eins bleiben wird.<sup>20,21</sup> Dies zeigt, dass die Therapie von Atherosklerosebedingten Erkrankungen optimiert werden muss. In der Behandlung von Herz-Kreislauf-erkrankungen sollten Medikamente eingesetzt werden, die nicht nur symptomatisch wirksam sind, sondern antiatherosklerotische Effekte haben

und somit die Pathogenese der Erkrankung positiv beeinflussen. Die Erforschung inflammatorischer Mechanismen eröffnet zunehmend Möglichkeiten, Medikamente gezielt gegen Entzündungsmediatoren einzusetzen und so den bisherigen Therapiebenefit zu erweitern. Nebivolol ist nach dem aktuellen Stand der Forschung ein Medikament mit einem solchen Potential.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der selektiven Beta-1-Rezeptorenblocker Nebivolol und Metoprolol auf die Entstehung und Zusammensetzung cholesterininduzierter Atherosklerose an 24 Weißen Neuseelandkaninchen (New Zealand White [NZW] Rabbit) in vivo untersucht. Dazu wurden bei den Tieren während einer 15-wöchigen Versuchsphase über dreizehn Wochen durch eine Diät mit 1 % bzw. 0,5 % Cholesteringehalt atherosklerotische Läsionen in der Aorta erzeugt. Die Kaninchen der medikamentös behandelten Gruppen erhielten von Beginn an die  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Metoprolol. Nach Versuche wurde den Tieren die Aorta entnommen und die entstandenen Plaques auf Größe und Gehalt an Makrophagen, Kalzium, Lipiden, glatte Muskelzellen und Kollagene morphologisch und histologisch untersucht. Begleitend wurden diverse klinisch-chemische Laborparameter ermittelt. Mittels histologischer Färbungen, RT-PCR und ELISA wurde die Expression verschiedener an der Atherogenese beteiligter inflammatorischer Adhäsionsmoleküle, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren (VCAM-1, Endothelin-1, MCP-1, PDGF- $\beta$ , bFGF, VEGF, NF $\kappa$ B) sowie verschiedene Kollagene bestimmt.

Ziel der Studie war, mögliche protektive antiatherosklerotische Eigenschaften von Metoprolol und Nebivolol sowie antiinflammatorische und antiproliferative Fähigkeiten von Nebivolol am Kaninchenmodell zu bestätigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell

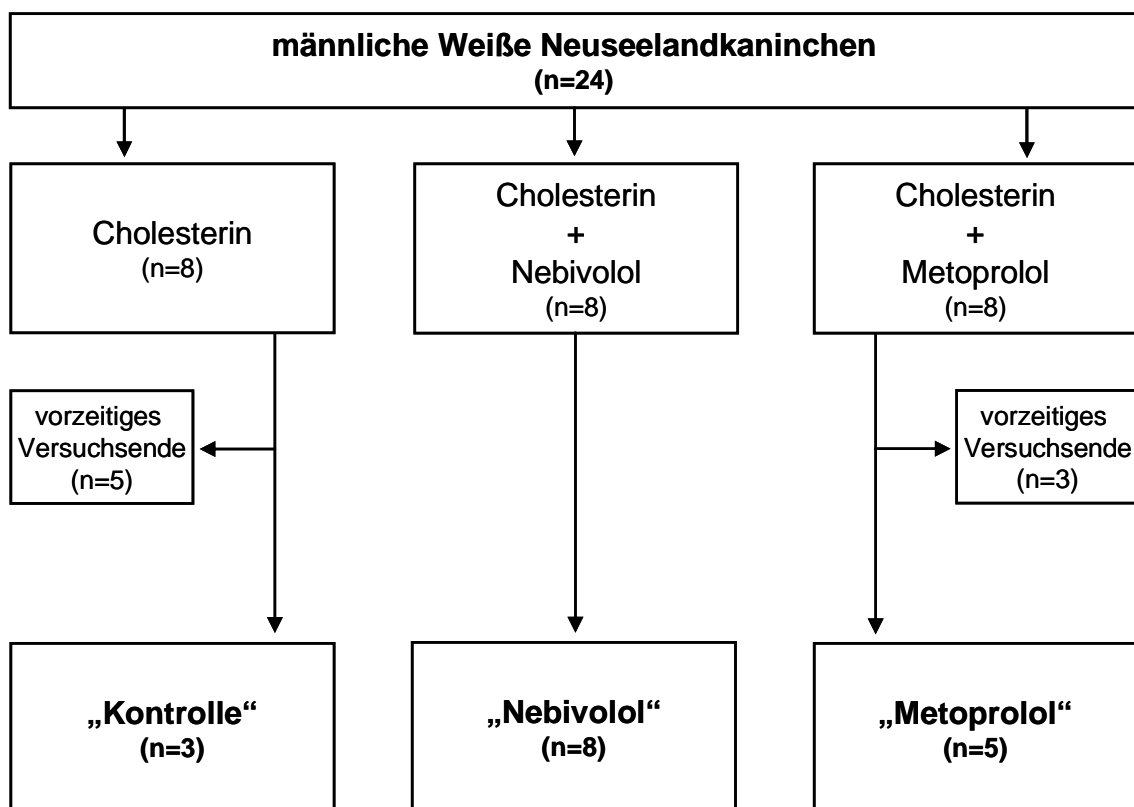
#### 2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 24 männliche Weiße Neuseelandkaninchen (Charles River, Kißleg). Das Alter der Tiere betrug zu Versuchsbeginn etwa fünf Wochen, das durchschnittliche Körpergewicht (KG) lag bei  $1793 \pm 126$  g. Die Kaninchen wurden in Einzelkäfigen bei künstlicher Beleuchtung mit einem Tag-Nacht-Zyklus von zwölf Stunden gehalten. In einer Eingewöhnungsphase von zwei Wochen erhielten alle Tiere Standardfutter (Fa. Altromin, Lage), nach Versuchsbeginn wurde eine spezielle Diät (Fa. Altromin, Lage) verabreicht. Während der gesamten Dauer erhielten sie Futter und Wasser ad libitum. Wöchentlich wurde neben der Gewichtszunahme auch die Futterraufnahme durch Rückwiegen des restlichen Futters und durch Einwiegen einer neuen Menge ermittelt. Aus der Konzentration im Futter wurde die wöchentliche Cholesterin- und Medikamentenaufnahme berechnet. Der Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde von der zuständigen Behörde unter der Versuchsnummer M 2/03 genehmigt.

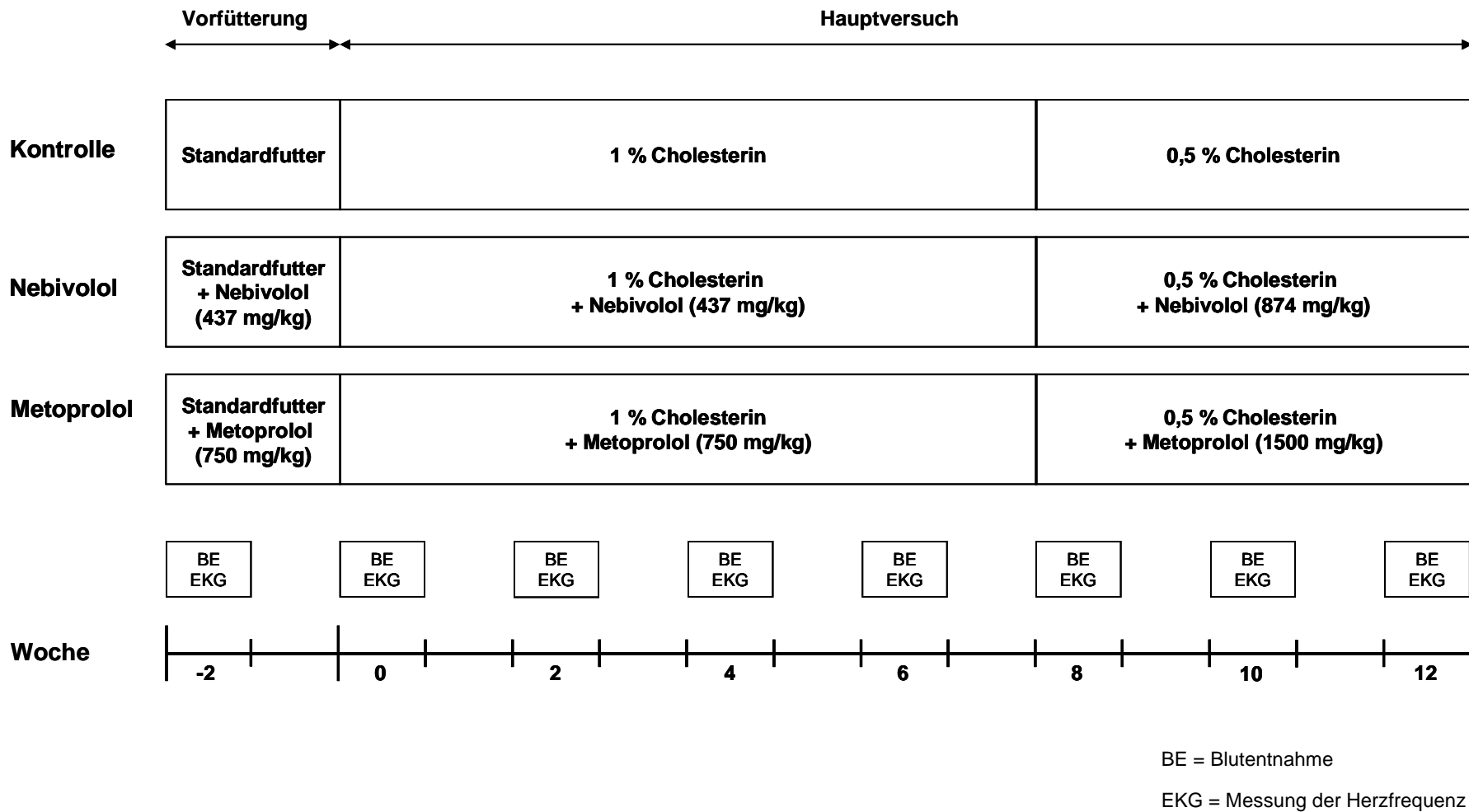
#### 2.1.2 Gruppeneinteilung und Behandlungsschema

Die Versuchsdauer betrug insgesamt 15 Wochen, unterteilt in eine zweiwöchige Vorfütterungsphase und eine 13-wöchige Hauptphase. Die Tiere wurden in drei Gruppen zu je acht Tieren randomisiert (**Abb. 1**). Die Tiere der Gruppe 1 (**Kontrolle**), die keiner medikamentösen Behandlung unterzogen wurden, dienten als Kontroll-Gruppe. Sie erhielten in der Vorfütterungsphase Standardfutter und während des Hauptversuches ausschließlich mit Cholesterin angereichertes Futter. Den übrigen Tieren wurde bereits in der Vorfütterungsphase Medikamente über das Futter verabreicht (**Abb. 2**). Die Gruppe 2 (**Nebivolol**) erhielt den  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Gruppe 3

(**Metoprolol**) den  $\beta$ -Blocker Metoprolol, in der Hauptphase wurde dem Futter beider Gruppen zusätzlich Cholesterin beigemischt. Wegen der schlechten Verträglichkeit wurde die Cholesterindosis aller Gruppen von zunächst 1 % nach acht Wochen auf 0,5 % gesenkt. Die Medikamentendosis wurde aufgrund der verminderten Futterraufnahme auf die doppelte Menge erhöht, Nebivolol von 437 auf 874 mg/kg Futter und Metoprolol von 750 auf 1500 mg/kg Futter. Um die Medikamentendosis möglichst konstant zu halten, wurden bei geringer Futterraufnahme Nebivolol bzw. Metoprolol zusätzlich verabreicht. Nebivolol wurde aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit in einer präparierten Möhre oral und Metoprolol, gelöst in 0,9 % NaCl, subcutan appliziert. Acht der 24 Tiere wurden wegen der zunehmenden Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes vorzeitig aus dem Versuch genommen und von der Auswertung ausgeschlossen (**Abb. 1**).



**Abb. 1:** Übersicht über die Versuchsgruppen



**Abb. 2:** Behandlungsschema, Zeitpunkte der Untersuchungen sowie Cholesterin- und Medikamentendosis im Futter (mg/kg Futter)

### **2.1.3 Blutentnahme und Messung der Herzfrequenz**

Zu Beginn der Vorfütterung, zu Beginn des Hauptversuchs, am Ende der Woche 2 und dann in zweiwöchentlichem Abstand wurde den Tieren im wachen Zustand Blut entnommen und die Herzfrequenz gemessen (**Abb. 2**). Den Kaninchen wurde ohne Nahrungskarenz 6-8 ml Blut aus der Ohrarterie mit Hilfe einer Butterfly-Kanüle (Butterfly®-19; ABOTT IRELAND, Sligo, Irland) in EDTA- und Lithium-Heparin-(Li-Hep) Röhrchen abgenommen. Diese wurden direkt nach der Entnahme auf Eis gekühlt und mit Ausnahme der Röhrchen für die Untersuchungen in Vollblut anschließend 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen/min (14900 g) in einer Kühlzentrifuge (ROTINA 35 R, Multimed Wicker GmbH, Kirchheim u. Teck) bei 10 °C zentrifugiert.

Die Messung der Herzfrequenz erfolgte mit Hilfe eines 3-Kanal-EKG-Gerätes (MEGACART; Siemens, Solna Schweden). Die Elektroden wurden an drei gut angefeuchteten Pfoten des möglichst ruhigen Kaninchens angelegt und so eine Ableitung der Herztätigkeit über mehrere Sekunden aufgezeichnet.

### **2.1.4 Versuchende**

#### **2.1.4.1 Blutentnahme**

Zu Versuchende wurde den Kaninchen insgesamt ca. 10 ml eines Narkosegemisches aus Esketaminhydrochlorid (Ketanest-S®) 25 mg/ml (Fa. PARKE-DAVIS GmbH, Lage, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%) 20 mg/ml (Fa. Bayer Vital GmbH, Lage, Deutschland) im Verhältnis 0,25 ml Xylazinslösung und 0,7 ml Esketaminhydrochloridlösung pro kg/KG verabreicht. Unter der Narkose wurden die Tiere erst an Thorax und Abdomen rasiert, in Rückenlage zur Gefäßentnahme am Tisch fixiert, anschließend wurde durch direkte Herzpunktion mit einer Monovette®-Kanüle (20 G, Sarstedt, Nümbrecht) Blut entnommen, bis der Tod durch Kreislaufversagen eintrat.



#### **2.1.4.2 Entnahme der Karotiden**

Unmittelbar nach dem Exitus der Tiere erfolgte die Entnahme der Karotiden. Nach dem Ausschneiden des ventralen Halsbereiches und longitudinaler Inzision der Haut, wurde zunächst die Muskulatur dargestellt. Durch stumpfe Präparation mit chirurgischem Besteck (Aesculap, Tuttlingen) wurden vorsichtig die Aa. carotides communes freigelegt. Nach Anschlingen der Gefäße mit Nahtmaterial wurden sie proximal der Bifurcatio carotis und distal des Manubrium sterni mitsamt umliegendem Binde- und Fettgewebe entnommen. Dabei wurde unter Vermeidung von Zug und Druck auf eine äußerst schonende Präparation geachtet, um Schäden am Gefäßendothel zu vermeiden. Die Präparate wurden nach Entnahme in Kryo schockgefroren.

#### **2.1.4.3 Perfusionsfixierung mit Formalin**

Anschließend wurde das untere Abdomen eröffnet, die Iliakalgefäße und ein Teil der Aorta abdominalis freipräpariert und ein Venenverweilkatheter (Vasofix® Braunüle 18G; Braun, Melsungen) in eine der Iliakalarterien gelegt. Über diesen Katheter wurde ca. 1 l einer 5%igen Formalinlösung über einen Zeitraum von ca. 1 h mittels eines Infusionsgerätes (IVAC®; Medical Systems, San Diego, USA) mit dem Druck von 1,5 m Wassersäule in das Gefäßsystem infundiert. Diese Perfusionsfixierung diente dem Erhalt der ursprünglichen Gefäßstruktur.

#### **2.1.4.4 Organ- und Gefäßentnahme**

Nach der Perfusionsfixierung wurde das restliche Abdomen und der Thorax entlang des Sternums eröffnet. Lunge, Magen, Darm, Leber und Pankreas wurden unter Schonung der abgehenden Gefäße entnommen. Leber und Milz wurden gewogen. Anschließend wurde der gesamte Gefäßbaum mit Aortenbogen, Aorta thoracalis und abdominalis, den Iliakal- und den proximalen Femoralarterien mitsamt den Abgängen der Aa. carotides communes, der Aa. subclaviae, lienalis, hepatica, celiaca, renales und dem Herzen freigelegt, reseziert und von überschüssigem Bindegewebe freipräpariert. Der Gefäßbaum wurde zur weiteren Behandlung in sechs kleinere Stücke unterteilt.

## 2.2 Analyse der Blutparameter

Im Blut der Kaninchen wurden verschiedene klinisch-chemische Laborparameter in zwei- oder vierwöchigem Rhythmus bzw. nur zu Beginn und zu Ende des Versuches ermittelt (**Tab. 1**).

**Tab. 1:** Ermittelte klinisch-chemische Laborparameter

Blutprobe	Parameter	Einheit	Entnahmerhythmus	
Vollblut	Leukozyten	1/ $\mu$ l	vierwöchentlich	
	Erythrozyten	Mio/ $\mu$ l		
	Hämatokrit	%		
	Hämoglobin	g/dl		
	MCH	pg		
	MCHC	g/dl		
	MCV	fl		
	Thrombozyten	1000/ $\mu$ l		
Plasma	Bilirubin gesamt	mg/dl	zweiwöchentlich	
	GOT (ASAT)	U/l		
	GPT (ALAT)	U/l		
	$\gamma$ -GT	U/l		
	Lipase	U/l		
	Gesamtcholesterin	mg/dl		
	Triglyzeride	mg/dl		
	HDL-Cholesterin	mg/dl		Beginn, Ende
	VLDL-Cholesterin	mg/dl		
LDL-Cholesterin	mg/dl			

Die aus dem Vollblut und Plasma ermittelten Werte wurden nach den üblichen Routine-Analyse-Verfahren im klinisch-chemischen Zentrallabor, Abteilung IV, der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Einzelne fehlende Laborparameter wurden für die statistische Auswertung anhand einer linearen Trendlinie aus dem Verlauf der vorliegenden Werte extrapoliert.

Das Gesamtcholesterin wurde nach der CHOD-PAP (Cholesterinoxidase-para-Aminoantipyrin) Methode (Ecoline<sup>®</sup> 25, Boehringer, Mannheim) gemessen, Triglyceride mit der GPO-PAP (Glycerinphosphatoxidase-para-Aminophenazon) Methode (Duo-S, Biomed Labordiagnostik GmbH, Oberschleißheim). Zur Bestimmung der Lipoproteinfaktionen wurde EDTA-Plasma in einer Ultrazentrifuge (Beckman, Ti 50,3 Rotor) bei 40 000 U/min und 10 °C für 18 h zentrifugiert. Zur Trennung von LDL- und HDL-Cholesterin, die sich im Unterstand befinden, wurde ein Fällungsreagenz (Nr. 543 004, Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet und erneut bei 12 000 U/min für 2 min zentrifugiert. Die LDL-Cholesterin-Konzentration ergibt sich aus der Differenz des Cholesteringehalts des Unterstandes und HDL-Cholesterin-Konzentration. Durch Subtraktion der Konzentrationen des HDL- und LDL-Cholesterins vom Gesamtcholesterin wurde die VLDL-Cholesterin-Konzentration berechnet.

## **2.3 Real-time-RT-PCR**

Mittels Real-time-RT (reverse transcription)-PCR (Polymerasekettenreaktion) wurde die mRNA-Expression von Kollagen Typ I und VIII, Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1, Platelet Derived Growth Factor (PDGF)-beta, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Monozyten-chemotaktisches-Protein (MCP)-1 in den rechten und linken schockgefrorenen Karotiden (Kollagen Typ I nur an der rechten Karotis) der Versuchstiere untersucht.

### **2.3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte**

Chemikalien:

- RNA-Bee<sup>™</sup> RNA Isolation Solvent (Tel-Test, Frienswood, USA)
- Applied Biosystems High Capacity cDNA Archive Kit Nr. 4322171 (Applied Biosystems, Foster City, USA) (enthält 10x RT buffer,

- 25x dNTPs, 10x Random Hexamers und Multiscribe Reverse Transkriptase (50/μl))
- Applied Biosystems RNase Inhibitor Nr. N8080119 (Applied Biosystems, Foster City, USA)
  - SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) (enthält SYBR<sup>®</sup> Green I dye, Ampli Taq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase, dNTP Mix mit dUTP, Passive Reference I und optimierte Pufferkomponenten)
  - Primer Express<sup>®</sup> Primer Design Software v2.0
  - Primer (Invitrogen, Karlsruhe) (**Tab. 2**)

**Tab. 2:** für die RT-PCR verwendete Primer

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
Housekeeping-Gen	rabbit 18S rRNA forward	TTCGTATTGCGCCGCTAGA
	rabbit 18S rRNA reverse	TTGGCA AATGCTTTCGCTC
Kollagen Typ I	rabbit Typ I Collagen forward	GGAGAGTACTGGATTGACCCCA
	rabbit Typ I Collagen reverse	CATGTCGCAGAAGACCTTGATG
Kollagen Typ VIII	rabbit Typ VIII Collagen forward	ACATGAAGGAAGTTCAACCGGT
	rabbit Typ VIII Collagen reverse	CCCTCGTAAACTGGCTAATGGT
VCAM-1	rabbit VCAM-1 forward	ATATGGCTCATCATTCCGCAAG
	rabbit VCAM-1 reverse	CATAGGCAGCCATTTCTTTCCA
PDGF-β	rabbit PDGF-β forward	GCCCATCTACATCATCACCGA
	rabbit PDGF-β reverse	CTGCAGGAAGGTGTGCTTGTT
VEGF	rabbit VEGF forward	CTGCTGCAATGATGAAAGCCT
	rabbit VEGF reverse	AGGTTTGATCCGCATGATCTG
bFGF	rabbit bFGF forward	AGAAGAGCGACCCACACATCA
	rabbit bFGF reverse	AACGGTTTGCACACACACCTT
MCP-1	rabbit MCP-1 forward	TGATCTTCATGACCAAAGTGGC
	rabbit MCP-1 reverse	ATCCTGGACCCACTTCTGCTT

Geräte:

- Autoklav: Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Homogenisiergerät: Polytron<sup>®</sup> PT-MR 3000 (Kinematica, Littau, Schweiz)
- Küvette: Micro Cell 4 Position (Beckman, Fullerton, USA)
- Real-time-PCR-Gerät: ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Spectrophotometer: DU<sup>®</sup> 460 (Beckman, Fullerton, USA)
- Thermal Cycler: Peltier Thermal Cycler DNA Engine PTC-200 (MJ RESEARCH, Watertown, USA)
- PCR-Platten: 96-well-PCR-Platten (Greiner, Frickenhausen)
- Zentrifugen: Megafuge 1,0 R (Heraeus, Hanau)

Eppendorf Centrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg)

### 2.3.2 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden schockgefrorene Karotiden verwendet. Diese wurden in 1,5 ml RNA-Bee<sup>™</sup> RNA Isolation Solvent im Homogenisator zerkleinert. Nach Zugabe von 300 µl Chloroform und 30 sec Vortexen wurden die Proben 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt (Eppendorf Centrifuge) bei 12 000 rpm und 4 °C an. Hierbei konzentriert sich die RNA in der wässrigen Oberphase, die abpipettiert, in ein neues Probengefäß überführt und nach Zugabe von 700 µl Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die dabei ausgefällte RNA war nach der folgenden Zentrifugation (15 min, 12 000 rpm, 4 °C) als Pellet zu sehen. Es folgten das Dekantieren des Überstandes, die Zugabe von 1 ml 75%igem Ethanol und ein abschließender Zentrifugationsschritt (8 min, 8 000 rpm, 4 °C). Danach wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet luftgetrocknet und in 30 µl autoklaviertem Aqua dest. gelöst.

### **2.3.3 Reverse Transkription**

Im Anschluss an die spektrophotometrische Messung der isolierten Gesamt-RNA erfolgte die Reverse Transkription mit Hilfe des Applied Biosystems High Capacity cDNA Archive Kit. Dabei wurde jeweils 1 µg RNA in einem Reaktionsansatz von 30 µl (1x RT Puffer, 1x dNTPs, 1x Random Hexamers, 0,4 U/µl RNase Inhibitor, 2,5 U/µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase) im Peltier Thermal Cycler DNA Engine PTC-200 (MJ RESEARCH, Watertown, USA) zunächst 10 min bei 25 °C und dann 120 min bei 37 °C inkubiert. Nach der RT-Reaktion wurden jeweils 45 µl H<sub>2</sub>O zugegeben.

Alle cDNA-Proben wurden bis zur Verwendung in der PCR bei -20 °C gelagert.

### **2.3.4 Polymerasekettenreaktion**

Die PCR wurde für diese Arbeit als Real-time-PCR in einem ABI PRISM® 7000 Sequence Detection mit SYBR® Green als Detektionsfarbstoff durchgeführt. Das Prinzip der quantitativen Real-time-PCR beruht auf der enzymatischen Vermehrung eines spezifischen DNA-Abschnittes durch Wiederholung der Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation. Dem Reaktionsansatz wird hierbei der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green zugefügt, der unspezifisch in die entstehende Doppelstrang-DNA interkaliert. Dadurch kommt es mit steigender Zyklenzahl zu einem der Produktmenge proportionalen Anstieg der Fluoreszenz. Die Quantifizierung basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold-Cycle oder C<sub>T</sub>-Wert. Dabei handelt es sich um jenen PCR-Zyklus, in dem erstmals ein statistisch signifikanter Anstieg der Reporterfluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz hinaus zu verzeichnen ist. Zur Berücksichtigung der Variabilität in der initial eingesetzten Gesamt-RNA erfolgte eine Normalisierung auf das Housekeeping-Gen 18S rRNA, von dem angenommen wird, dass es in konstanter Menge im Karotidgewebe exprimiert wird.

Die Reaktionen wurden in 96-well-PCR-Platten in Ansätzen von 10 µl in Doppelbestimmungen durchgeführt. 3 µl cDNA wurden mit 1x SYBR<sup>®</sup> Green Mastermix, sowie forward- und reverse-Primern (Endkonzentration 300 nmol/l) mit folgendem Thermoprofil inkubiert: 50 °C für 2 min, 95 °C für 10 min, 40 Zyklen mit 95 °C für 15 sec, gefolgt von 1 min bei 60 °C.

Zur relativen Quantifizierung wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode angewandt.<sup>22</sup>

## 2.4 Quantitative Bestimmung von MCP-1 mittels ELISA

Die Bestimmung des Monocyten-chemotaktisches-Protein-1 (MCP-1) erfolgte mit Hilfe des humanen ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay) Kit Quantikine<sup>®</sup> (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) in (gekühlten) Serumproben vom Versuchende. Nach Angaben des Herstellers eignet sich dieser primär für humane Proben konzipierte Assay auch zur Messung des Kaninchen-MCP-1-Antigens. Das Prinzip dieses kolorimetrischen Verfahrens ist folgendes: Die Serumproben werden in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert, die mit einem Anti-MCP-1-Antikörper beschichtet ist. In den Proben vorhandenes MCP-1 bindet während einer ca. 2-stündigen Inkubationzeit an die Antikörper. Anschließend werden mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Anti-MCP-1-Antikörper auf die Platte gegeben und für weitere 2 h inkubiert. Danach werden die an der Platte gebundenen Immunkomplexe mit dem Färbesubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) detektiert. Hierbei entsteht ein blauer Farbstoff. Durch Zugabe von 0,3 M Schwefelsäure als Stopplösung nach ca. 30 min wird die Reaktion abgebrochen und es erfolgt ein Farbumschlag zu gelb. Dieses Reaktionsprodukt kann nun durch Absorptionsmessung bei 450 nm in einem ELISA-Reader (DYNATECH MR 7000, Guernsey, Großbritannien) quantifiziert werden. Die Absorption korreliert mit der Menge an MCP-1, welches in der Probe enthalten war. Anhand einer Standardkurve aus mitgelieferten Standards werden die Messergebnisse ausgewertet. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

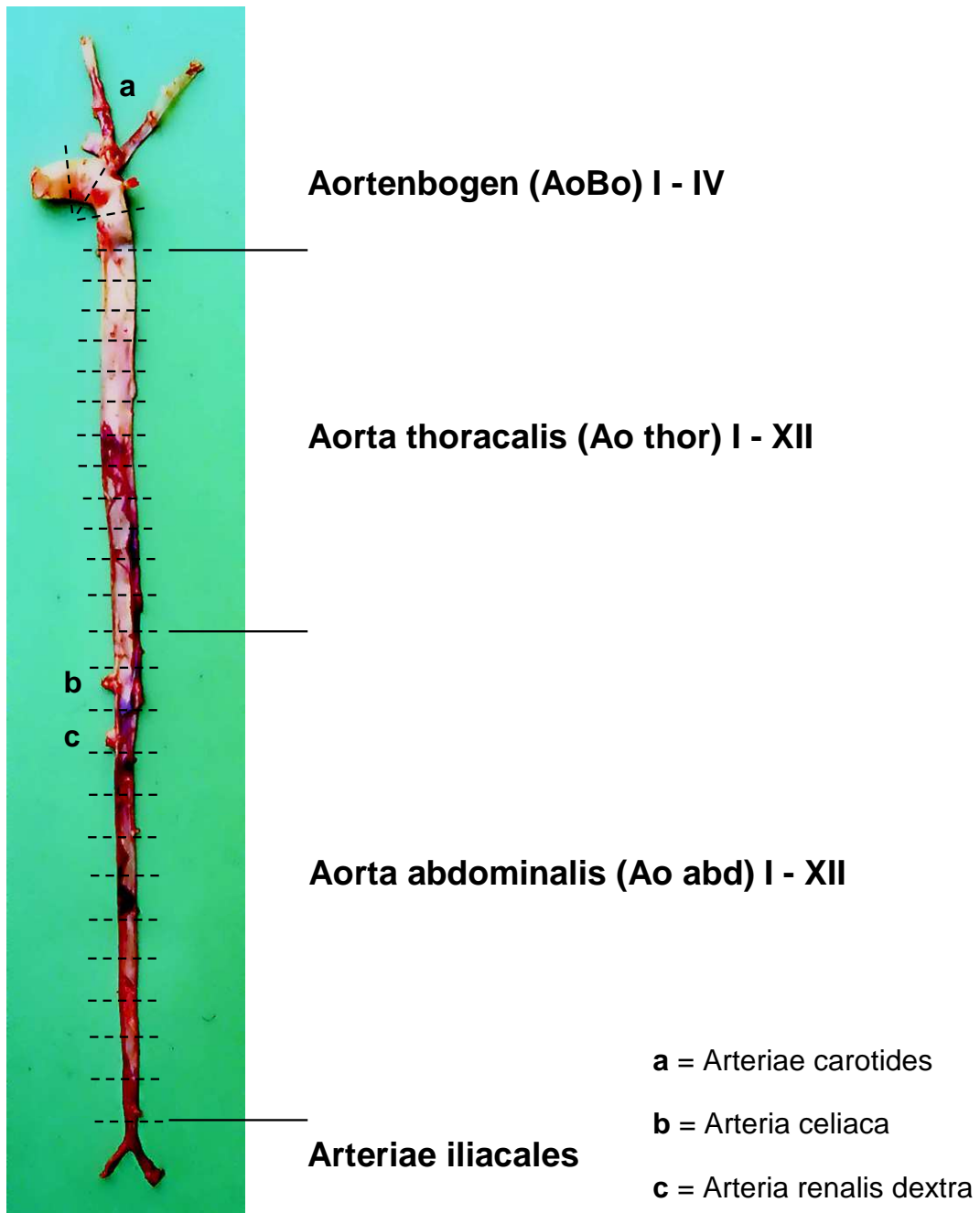
## **2.5 Anfertigung histologischer und immunhistochemischer Präparate**

Von den entnommenen Gefäßsegmenten und Organen wurden Paraffin- und Kryostatpräparate angefertigt und für histologische und immunhistochemische Färbungen verwendet.

### **2.5.1 Herstellung von Paraffinpräparaten**

Nach der Entnahme wurden die Gefäßsegmente und Organproben für 24 h in 5%iger Formalinlösung fixiert. Nach Abpräparieren von eventuell noch vorhandenem Bindegewebe wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-99 %) entwässert. Anschließend wurden die Präparate für 1 h, 15 h, und für mindestens 24 h in Methylbenzoat® (Merck, Darmstadt), dann zweimal für 10 min in Rotihistol® (Roth, Karlsruhe) und schließlich in Paraffin (Paraplast®, Sherwood, St. Louis, USA) für 1 h, 5 h und 24 h überführt. Abschließend wurden die Gefäße in 0,5-1 cm große Abschnitte unterteilt (**Abb. 3**) und in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Jung RM 2045, Leica, Bensheim) wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Bis auf die Ölrot-Färbung wurden alle histologischen und immunhistochemischen Färbungen an Paraffinschnitten durchgeführt.





**Abb. 3:** Bezeichnung der verschiedenen Gefäßsegmente am Beispiel des Gefäßbaumes eines nicht cholesterin-gefütterten Weißen Neuseeland-kaninchens

## **2.5.2 Herstellung von Kryostatpräparaten**

Die zwei für die Ölrot-Färbung vorgesehenen Gefäßsegmente AoBo I und Thor V eines jeden Tieres wurden nach der Perfusionsfixierung bis zur weiteren Verarbeitung in Formalinlösung gelagert. Nach der Einbettung in Tissue-Tek® (10,24 % Polyvinylalkohol, 4,26 % Polyethylenglycol, 85,5 % nichtreaktive Bestandteile, Sakura Finetek Europe B. V., Zoeterwoude, Niederlande), wurden mit einem Gefriermikrotom (Mod. 2700-Frigocut, Reichert-Jung, Nussloch) 10 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Superfrost/Plus-Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen) aufgetragen und anschließend gefärbt.

## **2.5.3 Histologische Färbungen**

### **2.5.3.1 Elastica van Gieson-Färbung (EvG-Färbung)**

Die Elastica van Gieson-Färbung dient zur morphometrischen Beurteilung der Präparate und zur Bestimmung der Plaquefläche. Elastische Fasern stellen sich dunkelviolett bis schwarz dar, Bindegewebe leuchtend rot und Muskulatur gelb.

Die entparaffinierten Gefäßschnitte wurden 30 min mit Resorcinfuchsin (Chroma Gesellschaft, Köngen) gefärbt, mit 80%igem Alkohol und Wasser gespült und für 6 min mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (Chroma Gesellschaft, Köngen) behandelt. Nach Differenzierung in HCl-Alkohol wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser 10 min gebläut und nach erneutem 2-minütigem Spülen in van Gieson-Lösung (Chroma Gesellschaft, Köngen) belassen. Nach erneuter Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die gefärbten Präparate kurz in Xylol getaucht und in Vitro Clud® (Langenbrinck, Emmendingen) eingebettet.

### **2.5.3.2 Silbernitratfärbung nach von Kossa**

Die Silbernitratfärbung nach von Kossa wird zur Bestimmung kalziumhaltiger Bereiche herangezogen. Diese färben sich braun-schwarz an, Zellkerne

erscheinen rötlich. Diese Färbung wurde an den Segmenten II und III des Aortenbogens angefertigt.

Die entparaffinierten Schnitte wurden bei Tageslicht 10-20 min in eine 5%ige wässrige Silbernitratlösung gegeben und anschließend mit Aqua dest. gespült. Die Fixierung erfolgte 2 min in 5%iger Natriumthiosulfatlösung. Nach wiederholter Spülung mit Aqua dest. wurden die Zellkerne 3 min lang mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat gegengefärbt. Vor der Einbettung in Vitro Clud® (Langenbrinck, Emmedingen) erfolgte eine weitere Spülung und Entwässerung.

### **2.5.3.3 Ölrot-Färbung**

Mit der Ölrot-Färbung werden Lipide dargestellt. Diese erscheinen rosa, Zellkerne blau und das Zytoplasma schwach bläulich.

Die Kryostatschnitte wurden 5 min in Isopropanol (50%ig) gegeben und anschließend für 10 min mit frisch filtrierter Ölrot-Lösung (100 ml 98%iges Isopropanol + 0,5 g Ölrot + 65 ml Wasser; Certastain® Ölrot, Nr. 5230, Merck, Darmstadt) gefärbt. Nach Spülung mit Isopropanol (50%ig) und Aqua dest. folgte eine 7-minütige Färbung in Hämalaun-Lösung (Merck, Darmstadt). Unter fließendem Wasser wurden die Schnitte 10 min gebläut und in Mowiol (12 g Mowiol 4-88, Hoechst AG, Frankfurt, in 30 ml Aqua bidest., mit 0,2 M TRIS-HCl-Puffer auf pH 8,5 titriert, Zugabe von 30 g Glycerin) eingebettet.

### **2.5.4 Immunhistochemische Färbungen**

In der Immunhistochemie werden mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmte Epitope von Zellen und Zellbestandteile dargestellt. Bei der hier verwendeten indirekten Methode wird nicht der Primärantikörper detektiert, sondern ein enzymkonjugierter Sekundärantikörper.

Es wurden folgende immunhistochemische Färbungen angefertigt: RAM-11,  $\alpha$ -Aktin, Endothelin-1, Kollagen Typ I und III, PCNA und Anti-NFkB.

Das im Folgenden beschriebene Verfahren wurde für alle immunhistochemischen Färbungen standardisiert an den Aortenbogensegmenten II und III angewandt. Die RAM-11-Färbung wurde zusätzlich an den Segmenten II, V und X der Aorta thoracalis sowie an ausgewählten Segmenten mit einer Plaquergröße von 1 mm<sup>2</sup> und 2 mm<sup>2</sup> durchgeführt.

Zunächst wurden die Präparate schrittweise in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (99-70 %) entparaffiniert und mit Aqua bidest. gespült. Anschließend wurden alle Färbungen außer der  $\alpha$ -Aktin-Färbung für 15 min in Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) bei 750 Watt in der Mikrowelle erhitzt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte 30 min in einem mit 30%igem Hydrogenperoxid versetzten PBS-Puffer belassen (1 l Puffer = 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l Aqua bidest., pH 7,4). Nach jedem Schritt wurden sie für 10 min mit PBS-Puffer gespült. Vor der Inkubation mit dem jeweils spezifischen Primärantikörper wurde zur Blockierung von unspezifischen Bindungen im Gewebe Normalserum aufgetragen, verdünnt in PBS und Rinderserumalbumin (Albumin Bovine Fraction V, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Die Präparate wurden dazu 10 min bei 37 °C in die feuchte Kammer gestellt. Als Sekundärantikörper wurde ein Brückenantikörper zugegeben, der sich an den Erstantikörper anlagert. In einem weiteren Schritt wurde als Detektionssystem ein Enzymkomplex aufgetragen, der an den Brückenantikörper bindet. Dieser wird durch Zugabe eines Färbekomplexes angefärbt. Nach Aufbringen des Primärantikörpers wurde nach jedem Schritt mit PBS-Puffer gespült und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbintensität wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Durch zweimaliges Spülen mit PBS-Puffer wurde der Färbeprozess abgebrochen. Durch kurzes Eintauchen in Hämalaun-Lösung erfolgte die Gegenfärbung. Eingebettet wurden die Gefäßschnitte in Gelatine (Aquatex, Merck 8562). (**Tab. 3**)

Färbung	Normalserum	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Detektionssystem	Färbung
Ram -11	Normal Horse Serum; Jackson Immuno Research Lab. Inc., West Grove, USA	Monoclonal Mouse Anti-Rabbit Macophage; Dako Corp., Carpinteria, USA	Biotinylated Mouse Antibody, Mouse UniTect ABC Kit; Calbiochem, San Diego, USA	Avidin DH, Mouse UniTect ABC Kit; Calbiochem, San Diego, USA	Biotinylated horseradish peroxidase H, Mouse UniTect ABC Kit; Calbiochem, San Diego, USA
$\alpha$ -Aktin	Normal Horse Serum; Jackson Immuno Research Lab. Inc., West Grove, USA	Monoclonal Anti-Smooth Muscle Actin; Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, USA	Biotinylated Anti-Mouse IgG, Vectastain ABC Kit PK-4002; Vector Laboratories, Burlingame, USA	Avidin DH, Vectastain ABC Kit PK-4002; Vector Laboratories, Burlingame, USA	Biotinylated horseradish peroxidase H, Vectastain ABC Kit PK-4002; Vector Laboratories, Burlingame, USA
Endothelin	Normal Horse Serum; Jackson Immuno Research Lab. Inc., West Grove, USA	Endothelin-1, Mouse monoclonal IgG; Oncogene Research Products, San Diego, USA	Biotinylated Anti-Mouse IgG, BA-2000; Vector Laboratories, Burlingame, USA	Streptavidin Peroxidase conjugated; Jackson Immuno Research Lab. Inc., West Grove, USA	AEC Peroxidase Substrate Kit SK-4200; Vector Laboratories, Burlingame, USA
Kollagen Typ I/III	Normal Rabbit Serum, Vectastain ABC Kit PK-4500; Vector Laboratories, Burlingame, USA	Goat Anti-Type I/III Collagen IgG; Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA	Biotinylated Anti-Goat IgG, Vectastain ABC Kit PK-4500; Vector Laboratories, Burlingame, USA	Avidin DH, Vectastain ABC Kit PK-4005; Vector Laboratories, Burlingame, USA	Biotinylated horseradish peroxidase H, Vectastain ABC Kit PK-4005; Vector Laboratories, Burlingame, USA
PCNA	Normal Horse Serum; Jackson Immuno Research Lab. Inc., West Grove, USA	Monoclonal Antibody PCNA IgG; Immunotech, Marseille, France	Biotinylated Mouse Antibody, Mouse UniTect ABC Kit; Calbiochem, San Diego, USA	Avidin DH, Mouse UniTect ABC Kit; Calbiochem, San Diego, USA	Biotinylated horseradish peroxidase H, Mouse UniTect ABC Kit; Calbiochem, San Diego, USA
Anti-NF $\kappa$ B	Swine Serum; DAKO, Glostrup, Denmark	Mouse Anti-NF $\kappa$ B IgG p65 subunit monoclonal antibody; Chemicon International, Temecula, USA	Rabbit Anti-Mouse IgG,Z0259; DAKO, Glostrup, Denmark	APAAP Mouse Monoclonal, D 651; DAKO Glostrup, Denmark	Fast Red Tablets; Roche Mannheim, Deutschland

**Tab 3:** Immunhistochemische Färbungen und verwendete Antikörper

## 2.6 **Auswertung der Gefäßpräparate**

### 2.6.1 **Verwendete Geräte**

Für die morphometrischen Messungen an **EvG**-, und **von-Kossa**-gefärbten Schnitten wurden folgende Geräte verwendet:

- |                         |   |
|-------------------------|---|
| Mikroskop               | <ul style="list-style-type: none"><li>– Laborlux S.; Leica, Bensheim</li><li>– 2,5faches Objektiv (PL 2,5/0,08; Leitz, Wetzlar, Okkular 10fach, Tubus 1,23fach)</li><li>– 10faches Objektiv (EF 10/0,25; Leica, Bensheim; Okkular 10fach, Tubus 1,23fach)</li></ul> |
| Digitalisierungstableau | <ul style="list-style-type: none"><li>– SummaSketch III, Summagraphics; München</li><li>– Laborlux S., Leica, Bensheim</li></ul>  |
| Software                | <ul style="list-style-type: none"><li>– BIOQUANT INTRO: BQANALYSIS BQ-IAD Analysis Software; Bilany Consultants GmbH, Düsseldorf</li><li>– BQANALYSIS BQ-IAD Measurement Software; Bilany Consultants GmbH, Düsseldorf</li></ul>                                    |

Für die digitale Auswertung der **RAM-11** gefärbten Schnitte wurden folgende Geräte verwendet:

- |               |  |
|---------------|--|
| Mikroskop     | <ul style="list-style-type: none"><li>– AxioPlan 2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen)</li><li>– 10faches Objektiv (Plan-Neofluar 10/0,30; Carl Zeiss AG, Oberkochen)</li></ul>  |
| Digitalkamera | <ul style="list-style-type: none"><li>– AxioCam HR (Carl Zeiss AG, Oberkochen)</li></ul>   |
| Software      | <ul style="list-style-type: none"><li>– AxioVision Vs 40 V4.3 (Carl Zeiss AG, Oberkochen)</li><li>– Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA)</li><li>– Auswertungsprogramm Analyze IT; (Till-Karsten Hauser)</li></ul> |

Für die digitale Auswertung aller anderen Färbungen wurden folgende Geräte verwendet:

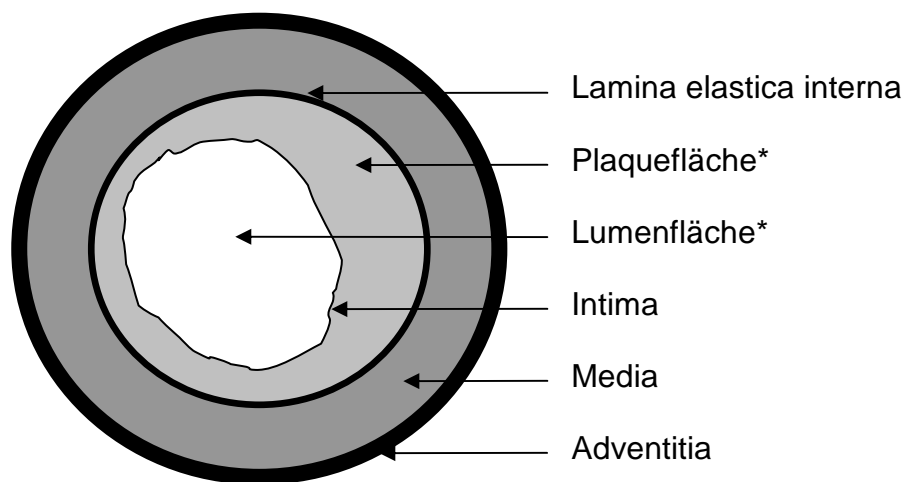
- |               |   |
|---------------|---|
| Mikroskop     | <ul style="list-style-type: none"><li>– BH-2-Mikroskop; Olympus, Japan</li><li>– 10faches Objektiv sPlan Apo 10; Olympus, Japan</li><li>– 20faches Objektiv sPlan Apo 20 PL; Olympus, Japan</li><li>– 40faches Objektiv Plan Apo 40; Carl Zeiss, Oberkochen</li></ul>   |
| Digitalkamera | <ul style="list-style-type: none"><li>– FUJIX DIGITAL CAMERA HC-300Z; FUJIFILM; Japan</li></ul>   |
| Software      | <ul style="list-style-type: none"><li>– Videosystem für Mikroskope AVT-HORN; Hans-Peter Horn, Aalen</li><li>– Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 7.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA</li><li>– Auswertungsprogramm Analyze IT; programmiert von Till-Karsten Hauser</li><li>– Auswertungsprogramm ImageJ 1.32j, NIH, USA</li></ul> |
| Drucker       | <ul style="list-style-type: none"><li>– Color Laser Jet 4500; Hewlett Packard, Kalifornien, USA</li></ul>   |

## 2.6.2 Morphometrische Auswertung

### 2.6.2.1 Bestimmung der Plauefläche und der Stenose des Gefäßlumens

Die Messung der Plauefläche ( $\text{mm}^2$ ) erfolgte je Tier morphometrisch an den vier EvG-gefärbten Segmenten des Aortenbogens sowie den zwölf Präparaten der Aorta thoracalis. Dazu wurden die Lumenfläche und die durch die Lamina elastica interna begrenzte Fläche gemessen und voneinander subtrahiert (**Abb. 4**).

Aus jeweils zwei Messungen am selben Segment wurde der arithmetische Mittelwert bestimmt. Die berechnete Plauefläche wurde zu der von der Lamina elastica interna begrenzten Fläche ins Verhältnis gesetzt und so die prozentuale Stenose des Gefäßlumens ermittelt. Je nach Größe des Gefäßes wurde das Objektiv mit 2,5facher oder 10facher Vergrößerung verwendet.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der ermittelten Parameter (\*) bei den morphometrischen Messungen



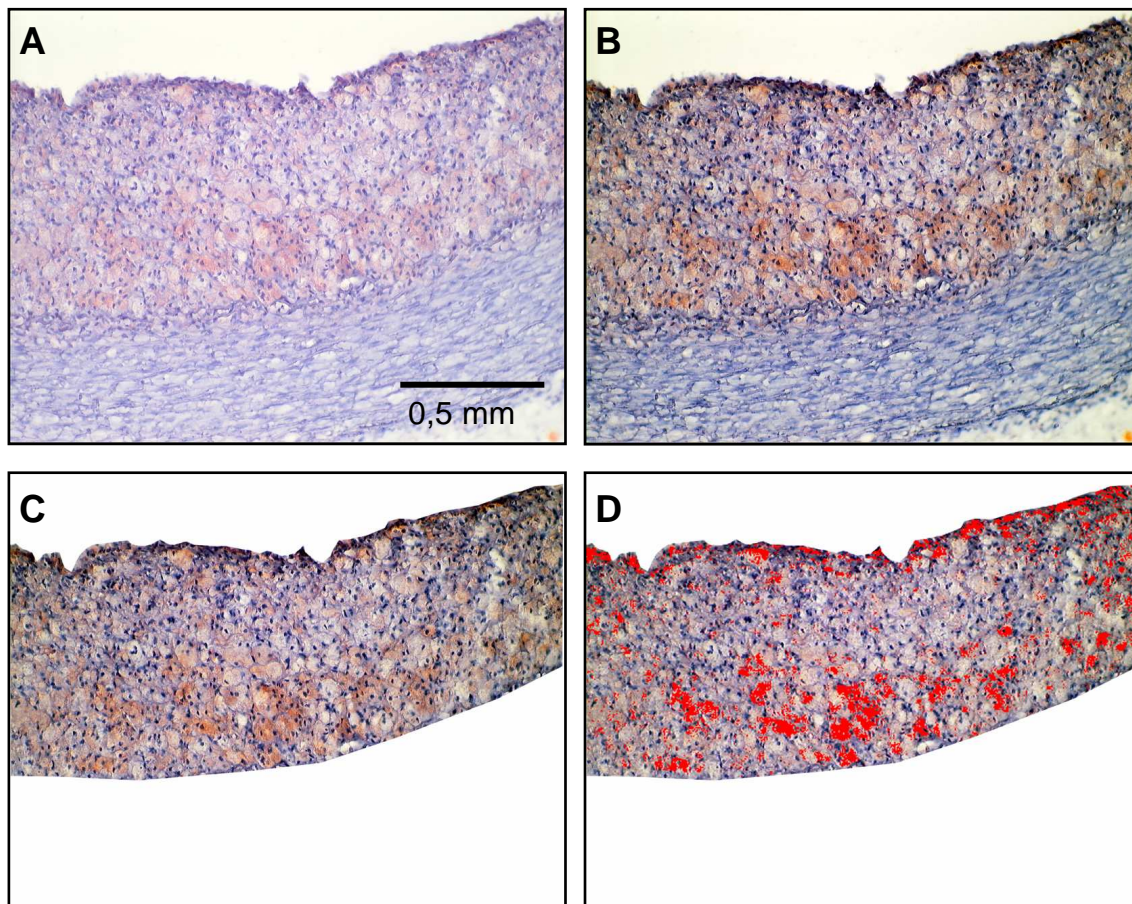
### 2.6.2.2 Bestimmung kalziumhaltiger Bereiche

Der Kalziumanteil wurde an Präparaten, die mit der Silbernitratfärbung nach von Kossa angefärbt waren, bestimmt. Zunächst wurde nach oben beschriebener Methode (Kap. 2.6.2.1) die Plaquefläche mit dem 2,5fachen Objektiv an den Segmenten AoBo II und AoBo III morphometrisch ermittelt. Die Fläche (mm<sup>2</sup>) der schwärzlich gefärbten kalziumhaltigen Bereiche wurde mit dem 10fach Objektiv ausgemessen und ins Verhältnis zur Gesamtplaquefläche gesetzt. Daraus ergab sich der prozentuale Anteil an der Plaque. Dieser prozentuale Anteil wurde mit der Plaquefläche multipliziert und daraus die Fläche (mm<sup>2</sup>) der kalziumhaltigen Bereiche berechnet.

## 2.6.3 Digitale Auswertung

### 2.6.3.1 Prinzipielles Vorgehen

Zur digitalen Auswertung wurden vier diametral gelegene Ausschnitte der Plaque eines Gefäßsegments fotografiert. Diese wurden im Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 7.0 mit der automatischen Tonwertkorrektur (Bereich 0-255) nachbearbeitet. Dadurch wurde der Kontrast in Bildern mit mittlerer Farbwertverteilung verbessert, indem die hellsten und dunkelsten Pixel eines Bildes neu definiert wurden. Anschließend wurden die Bildanteile, die nicht zur Plaque gehörten, entfernt. Die Auswertung erfolgte mit der Software „Analyze It“, die den prozentualen Anteil der rot gefärbten Pixel an der Gesamtpixelzahl bestimmt (**Abb. 5**). Aus den vier Einzelmessungen wurde die Summe aller roten Pixel berechnet und zur Gesamtpixelzahl ins Verhältnis gesetzt. Dieser prozentuale Anteil wurde mit der Plaquefläche multipliziert und daraus die Fläche (mm<sup>2</sup>) der jeweiligen Plaquebestandteile berechnet.



**Abb. 5:** Arbeitsschritte bei der digitalen Nachbearbeitung und Auswertung positiv gefärbter Areale der Plaque am Beispiel einer Ölrotfärbung (A: Originalfotografie; B: nach Tonwertkorrektur, C: ausgeschnittene Plaque, D: Auswertung mit der Software „Analyze It“)

An einem Ölrot-Präparat wurde zunächst das prinzipielle Vorgehen getestet. Dazu wurden jeweils mit dem Objektiv 10facher und 20facher Vergrößerung vier diametral gelegene Ausschnitte der Plaque fotografiert. Mit dem 2,5fach Objektiv wurde eine Übersichtsaufnahme der gesamten Plaquefläche erstellt. Um zu ermitteln, welchen Anteil an der gesamten Plaquefläche die einzelnen Vergrößerungen erfassten, wurden die Bilder ausgedruckt, die darauf abgebildete Plaque morphometrisch vermessen und in Relation zur gesamten Plaquefläche gesetzt (vgl. Kap. 2.6.2.1). Mit dem 10fach Objektiv wurden so ca. 56 % der Gesamtplaque erfasst, mit dem 20fach Objektiv ca. 28 %. Das Programm „Analyze It“ erkannte mit dem 10fach Objektiv durchschnittlich 9,1 % rote Pixel, mit dem 20fach Objektiv 10,4 %. Das bedeutet, dass sich in Bezug auf das Auswertungsergebnis im Programm „Analyze It“ im Vergleich zwischen

10fach und 20fach Objektiv kein relevanter Unterschied vorhanden war. Jedoch konnte mit dem 10fach Objektiv ein doppelt so großer Plaqueanteil erfasst werden. Aus diesem Grund wurden in der weiteren Auswertung die Ausschnittsfotografien mit dem 10fach Objektiv angefertigt. Alle nachfolgenden Messungen folgen diesem Prinzip. Auf Abweichungen wird im jeweiligen Kapitel eingegangen.

#### **2.6.3.2 Bestimmung des Lipidanteils**

Der Lipidanteil wurde an den Ölrot-gefärbten Kryostatpräparaten der Segmente AoBo I und Thor V bestimmt. Die Abschnitte des Aortenbogens wurden wie beschrieben mit dem 10fach Objektiv fotografiert, diejenigen der Aorta thoracalis aufgrund des kleineren Durchmessers mit dem 20fach Objektiv.

#### **2.6.3.3 Bestimmung des Anteils an Makrophagen**

Die Bestimmung des Makrophagenanteils an RAM-11-gefärbten Präparaten erfolgte zusätzlich zu den Aortenbogensegmenten II und III auch an den Segmenten II, V und X der Aorta thoracalis. Zudem wurde je ein Präparat der Aorta thoracalis mit ca. 1 mm<sup>2</sup> und ca. 2 mm<sup>2</sup> Plaquefläche ausgewertet, um den Makrophagen-Anteil bei gleicher Plaquefläche beurteilen zu können. Die Präparate der Aorta thoracalis wurden aufgrund des kleinen Durchmessers mit dem 20fach Objektiv fotografiert.

#### **2.6.3.4 Bestimmung des Anteils an glatten Muskelzellen**

An den  $\alpha$ -Aktin-gefärbten Segmente AoBo II und AoBo III wurde der Anteil glatter Muskelzellen ermittelt.

#### **2.6.3.5 Bestimmung des Anteils an Endothelin-1**

Die Endothelin-1-Färbung wurde an den Segmenten AoBo II und AoBo III angefertigt und ausgewertet.

#### **2.6.3.6 Bestimmung des Anteils an Kollagen**

Der Anteil an Kollagen vom Typ I und vom Typ III wurde jeweils an den Präparaten AoBo II und AoBo III bestimmt.

## **2.6.4 Sonstige Auswertungsmethoden**

### **2.6.4.1 Bestimmung der Zelldichte und Proliferationsrate**

Die Zelldichte und die Proliferationsrate wurde an den PCNA-gefärbten Aortenbogensegmenten II und III bestimmt. Die Fotografien an den vier diametral gelegenen Stellen wurden nicht mit dem 10fach, sondern dem 20fach Objektiv erstellt, da sie zum Teil manuell ausgewertet werden mussten. Die Plaque wurde im Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 7.0 ausgeschnitten. Mit dem Analyseprogramm ImageJ wurde die Plaquefläche ( $\text{mm}^2$ ) und die Gesamtzellzahl bestimmt. Aus diesen Daten wurde die Zellzahl pro  $\text{mm}^2$  errechnet. Zur weiteren Auswertung wurden die vier Bilder tonwertkorrigiert (Kap. 2.6.3.1) ausgedruckt. Die rötlich gefärbten, PCNA-positiven Zellkerne wurden manuell ausgezählt und zur Gesamtzahl der Zellkerne ins Verhältnis gesetzt. Der Anteil der positiven Zellen ergab die Proliferationsrate.

### **2.6.4.2 Bestimmung des Anteils an NFkB-positiven Zellen**

Die rot angefärbten NFkB-positiven Zellen wurden unter dem Mikroskop mit dem 40fachen Objektiv mit Immersionsöl ausgezählt. Die Ergebnisse von jeweils zwei Zählungen wurden gemittelt. Bereiche mit Artefakten wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Aus der morphometrisch bestimmten Plaquefläche (Kap. 2.6.2.1) und der Zelldichte (Kap. 2.6.4.1) wurde die Gesamtzellzahl ermittelt und der prozentuale Anteil NFkB-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet.

## 2.7 Statistische Auswertung

Aus den Daten jeder Gruppe wurden der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet. Im Text, in den Tabellen und in den Abbildungen werden arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (Mittelwert  $\pm$  SEM) angegeben.

Die statistische Auswertung der Verlaufparameter Herzfrequenz und Blutparameter erfolgte anhand der „area under the curve“ (AUC) (**Tab. 15**, Seite 139) wie in Bewick et al.<sup>23</sup> beschrieben. Dieser Wert erlaubt eine Beurteilung der zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelten Messwerte über die gesamte Versuchsdauer.

Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm JMP (Version 3.1.6.2, SAS, Heidelberg, Cary, NC, USA). Die Prüfung der Signifikanz erfolgte auf einem  $\alpha$ -Signifikanzniveau von  $< 0,05$ .

Die Überlebenszeitanalyse wurde nach der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt. Alle anderen Parameter wurden mittels Oneway-ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer-Test analysiert.

### 3 Ergebnisse

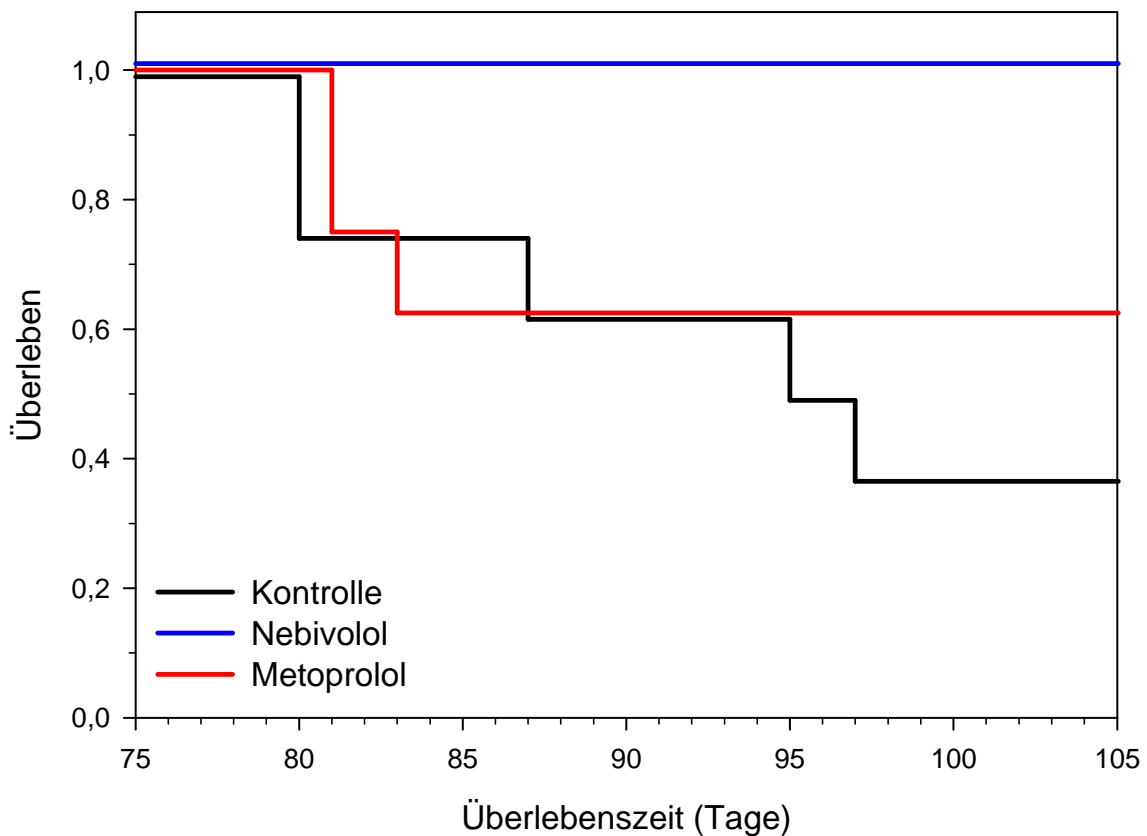
#### 3.1 Überlebenszeit

Die Versuchsdauer betrug insgesamt 105 Tage. Von den 24 Tieren erreichten 16 Tiere das Versuchsende. Acht Tiere wurden wegen der zunehmenden Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes vorzeitig aus dem Versuch genommen. In der Kontroll-Gruppe schieden fünf Tiere und in der Metoprolol-Gruppe drei Tiere aus (**Tab. 4**). Alle Tiere der Nebivolol-Gruppe erreichten das Versuchsende.

**Tab. 4:** Übersicht der vorzeitig aus dem Versuch genommenen Tiere

Gruppe	Anzahl der Tiere (n)	Zeitpunkt des Versuchsendes	Überlebenszeit in Tage
Kontrolle	2	Woche 9	80
	1	Woche 10	87
	1	Woche 11	95
	1	Woche 11	97
Metoprolol	2	Woche 9	81
	1	Woche 9	83

Das Überleben der Tiere unterschied sich zwischen den Gruppen signifikant voneinander ( $p=0,0473$ ). Im Einzelvergleich lag der signifikante Unterschied zwischen der Nebivolol- und der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0097$ ). Zwischen den Gruppen Metoprolol und Kontrolle ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen ( $p=0,4668$ ), zwischen den medikamentös behandelten Gruppen wurde die Signifikanzgrenze knapp verfehlt ( $p=0,0637$ ) (**Abb. 6**).



**Abb. 6: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenszeit ( $p=0,0473$ )**

Gezeigt ist das Überleben der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit der Versuchsdauer von 105 Tagen.

Von insgesamt 24 Versuchstieren erreichten 16 Tiere das Versuchsende. In der Kontroll-Gruppe schieden fünf Tiere aus, in der Metoprolol-Gruppe drei Tiere. Alle acht Tiere der Nebivolol-Gruppe erreichten das Versuchsende. Das Überleben der Tiere in der Nebivolol-Gruppe unterschied sich im Einzelvergleich signifikant von dem der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0097$ ). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht feststellbar ( $p=0,4668$  für den Unterschied zwischen der Metoprolol- und Kontroll-Gruppe und  $p=0,0637$  zwischen den medikamentös behandelten Gruppen).

### 3.1.1 Parameter bei Versuchsbeginn

Zum Vergleich der überlebenden mit den vorzeitig ausgeschiedenen Tieren wurden zwei Gruppen „Nicht-Überlebende“ (n=8) und „Überlebende“ (n=16) gebildet. Die zu Versuchsbeginn (Woche -2) gemessenen Parameter wurden zwischen diesen beiden Gruppen verglichen (**Tab. 14**, Seite 136).

Das Körpergewicht betrug zu Versuchsbeginn in der Gruppe der Nicht-Überlebenden im Mittel  $1848 \pm 27$  g, in der Gruppe der Überlebenden durchschnittlich  $1766 \pm 35$  g. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen wurde nicht festgestellt ( $p=0,1394$ ). Die Futteraufnahme lag im Mittel der Nicht-Überlebenden bei  $78,4 \pm 2,7$  g/d und kg KG, in der Gruppe der Überlebenden bei  $79,0 \pm 1,6$  g/d und kg KG ( $p=0,8516$ ). Die Herzfrequenz unterschied sich zwischen den beiden Gruppen ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,5426$ ), in der Gruppe der Nicht-Überlebenden lag sie bei  $267 \pm 9$  /min und bei den Überlebenden bei  $274 \pm 7$  /min.

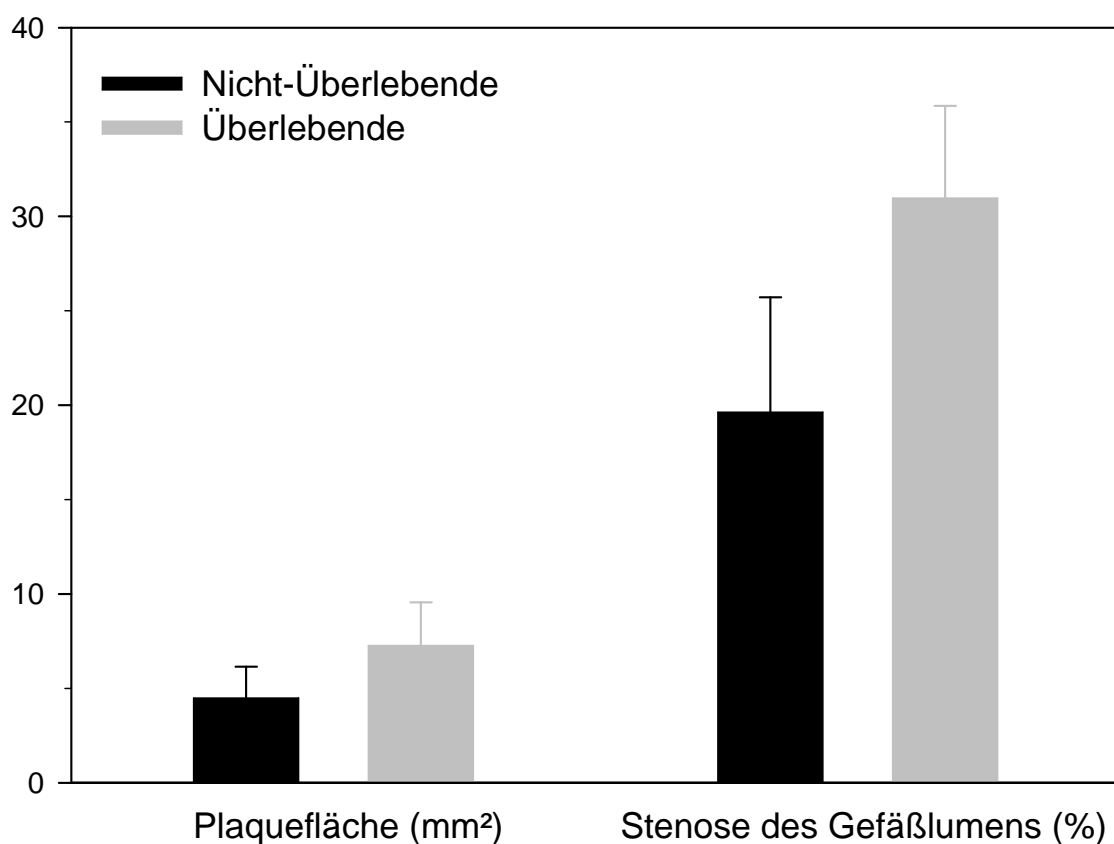
Bei den Blutparametern war zwischen den zwei Gruppen kein signifikanter Unterschied feststellbar, außer in den Parametern Hb, Hämatokrit und GOT. Der Hb lag in der Gruppe Nicht-Überlebende bei durchschnittlich  $12,1 \pm 0,3$  mg/dl versus  $11,3 \pm 0,1$  mg/dl in der Gruppe Überlebende ( $p=0,0265$ ), der Hämatokrit war analog zum Hb höher in der Gruppe Nicht-Überlebende ( $40,5 \pm 0,8$  % versus  $37,6 \pm 0,5$  %;  $p=0,0130$ ). Das Leberenzym GOT lag in der Gruppe der Nicht-Überlebenden im Mittel bei  $26,1 \pm 1,1$  U/l, im Gegensatz zu  $30,1 \pm 1,2$  U/l bei der Gruppe der Überlebenden ( $p=0,0476$ ).

### 3.1.2 Plauefläche

Die vorzeitig ausgeschiedenen Tiere wiesen im Vergleich mit den überlebenden Tieren eine signifikant kleinere Plauefläche bzw. Stenose des Gefäßlumens aller Aortenbogensegmente auf. Im Mittel aller Aortenbögen betrug die Plauefläche in der Gruppe der Nicht-Überlebende  $4,5 \pm 0,6$  mm<sup>2</sup>, in der



Gruppe der Überlebenden  $7,3 \pm 0,6 \text{ mm}^2$  ( $p=0,0062$ ). Die Stenose des Gefäßlumens lag in der Gruppe der Nicht-Überlebenden bei durchschnittlich  $19,6 \pm 2,1 \%$ , bei den Überlebenden betrug sie im Mittel  $31,0 \pm 1,2 \%$  ( $p<0,0001$ ) (**Abb. 7**). Aufgrund dieses Unterschieds, der eindeutig auf die kürzere Versuchsdauer bei der Gruppe der Nicht-Überlebenden zurückzuführen ist, wurden die vorzeitig aus dem Versuch genommenen Tiere von der Auswertung ausgeschlossen.

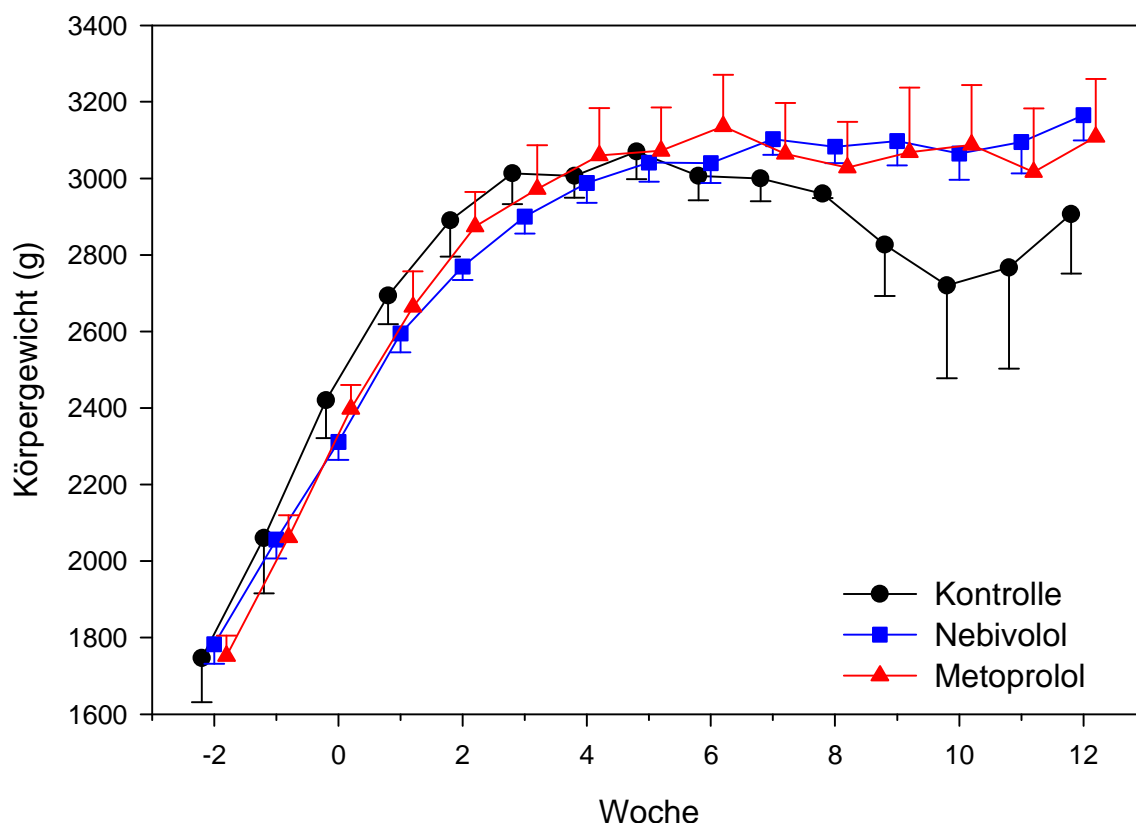


**Abb. 7: Vergleich der Plaquesfläche und der Stenose des Gefäßlumens zwischen den Gruppen „Nicht-Überlebende“ und „Überlebende“** Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Plaquesfläche und der Stenose des Gefäßlumens der vier Aortenbogensegmente. Die Plaquesfläche unterscheidet sich zwischen den Gruppen signifikant voneinander ( $p=0,0062$ ), ebenso die Stenose des Gefäßlumens ( $p<0,0001$ ).

## 3.2 Körpergewicht und Futteraufnahme

### 3.2.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere betrug zu Versuchsbeginn durchschnittlich  $1766 \pm 35$  g. Bis zu Woche 6 erhöhte es sich im Mittel um 162 g pro Woche. In der Kontroll-Gruppe blieb das durchschnittliche Körpergewicht bis Woche 8 nahezu unverändert, nahm dann bis Woche 10 um 240 g ab und stieg bis Woche 12 auf  $2907 \pm 155$  g an. In der Nebivolol-Gruppe lag das Endgewicht bei  $3165 \pm 66$  g, in der Metoprolol-Gruppe bei  $3108 \pm 152$  g. (**Abb. 8**). Bei Anfangs- und Endgewicht war zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied feststellbar ( $p=0,5526$ ).



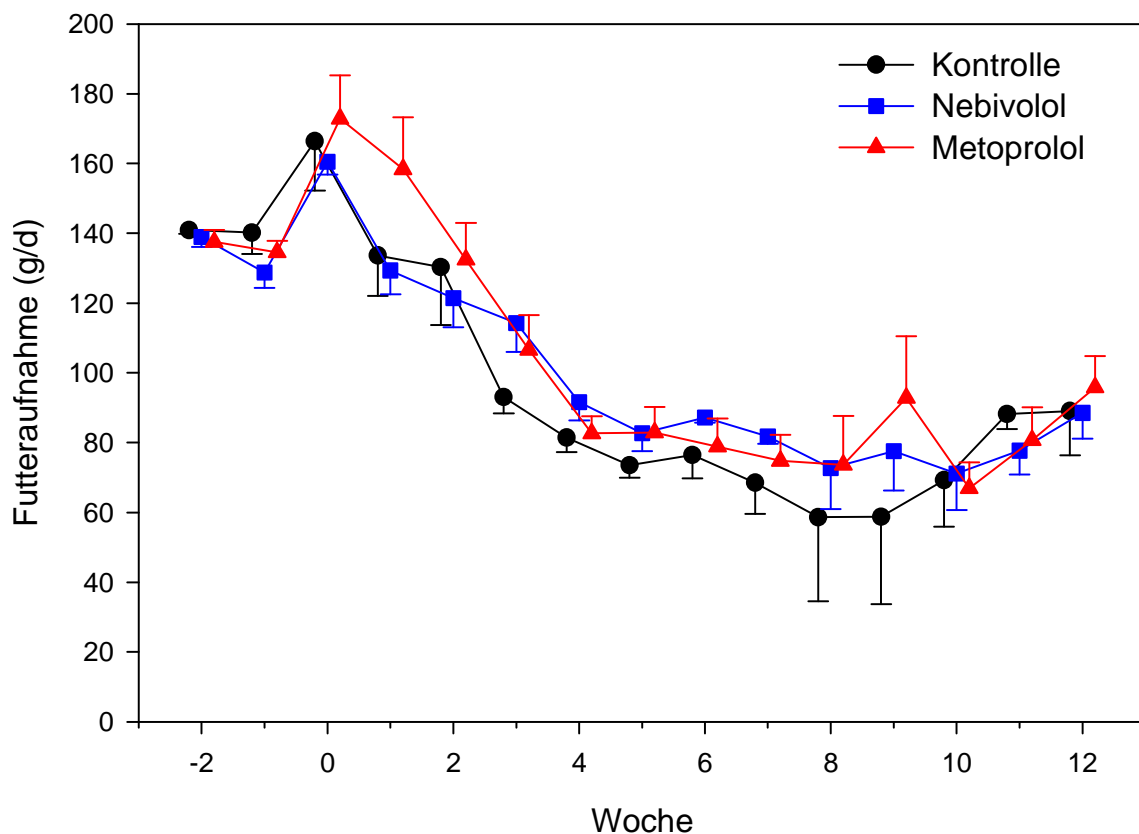
**Abb. 8: Entwicklung des Körpergewichts über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Bei Anfangs- und Endgewicht konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ( $p=0,5526$ ).

### 3.2.2 Futter-, Cholesterin- und Medikamentenaufnahme

Alle angegebenen Werte wurden am Ende jeder Woche ermittelt und auf die durchschnittliche Menge pro Tag rückgerechnet.

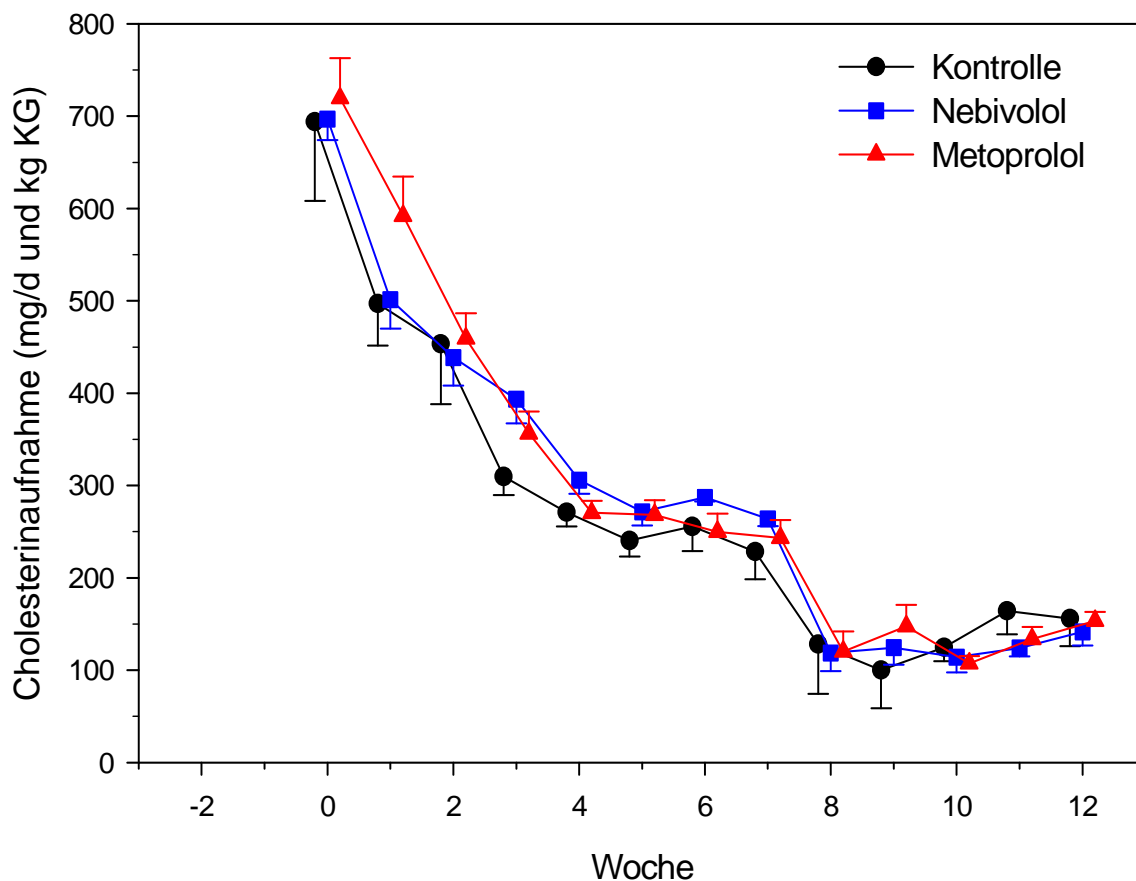
Die Futteraufnahme betrug in den ersten fünf Wochen im Mittel aller Tiere  $141 \pm 3$  g/d. Ab Woche 3 nahm sie bis zur Futterumstellung in Woche 8 ab und stieg bis Woche 12 wieder an. Sie betrug nach Woche 3 im Mittel  $83 \pm 2$  g/d. Zwischen den Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abb. 9).



**Abb. 9: Durchschnittliche tägliche Futteraufnahme über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Bei dem über die gesamte Versuchsdauer berechneten Mittelwert konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ( $p=0,7223$ ).

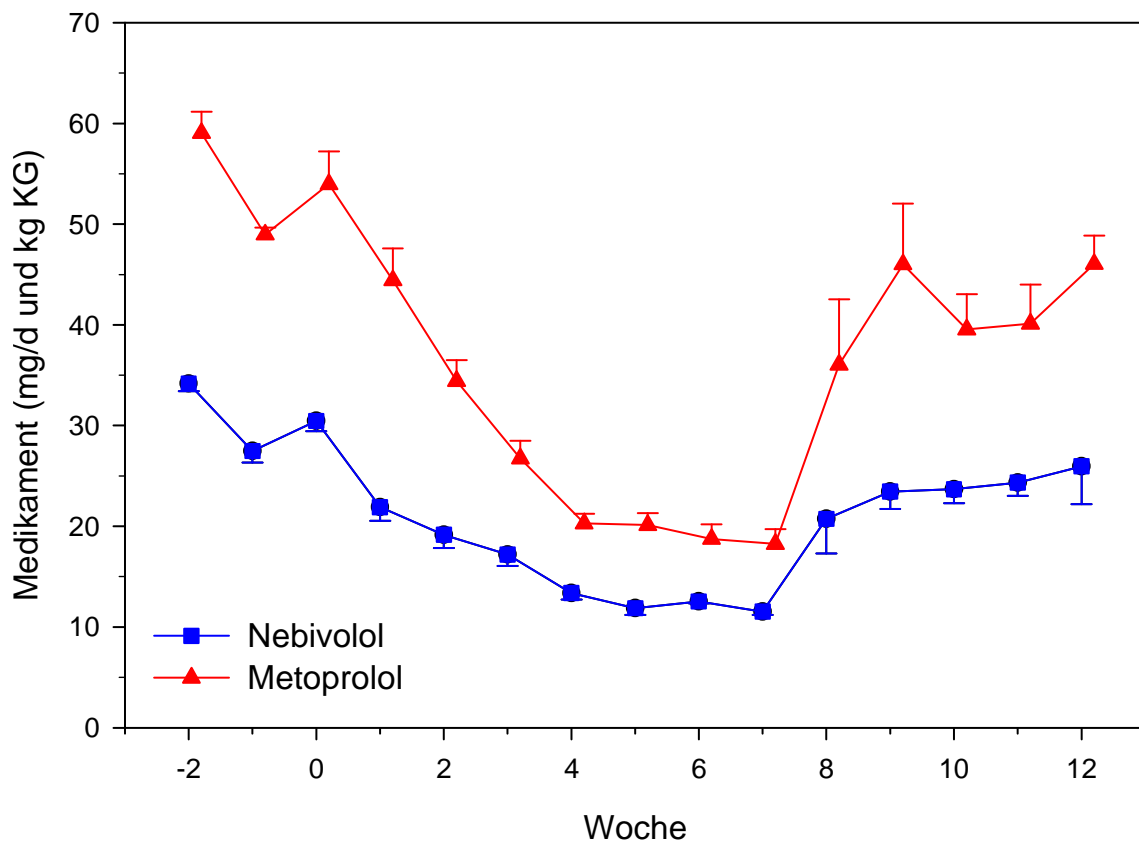
Aus der aufgenommenen Futtermenge wurde die Cholesterinaufnahme pro Tag und kg KG berechnet. Sie nahm im Mittel aller Tiere von ursprünglich  $703,3 \pm 21,6$  auf  $250,8 \pm 9,1$  mg/d und kg KG in Woche 7 ab. Nach der Futterumstellung betrug sie bis Woche 12 durchschnittlich  $128,9 \pm 5,0$  mg/d und kg KG. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht erkennbar (**Abb. 10**).



**Abb. 10: Cholesterinaufnahme pro Tag und kg Körpergewicht (KG) über die Dauer von 13 Wochen**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Bei dem über die Dauer der Cholesterinfütterung berechneten Mittelwert war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar ( $p=0,7457$ ).

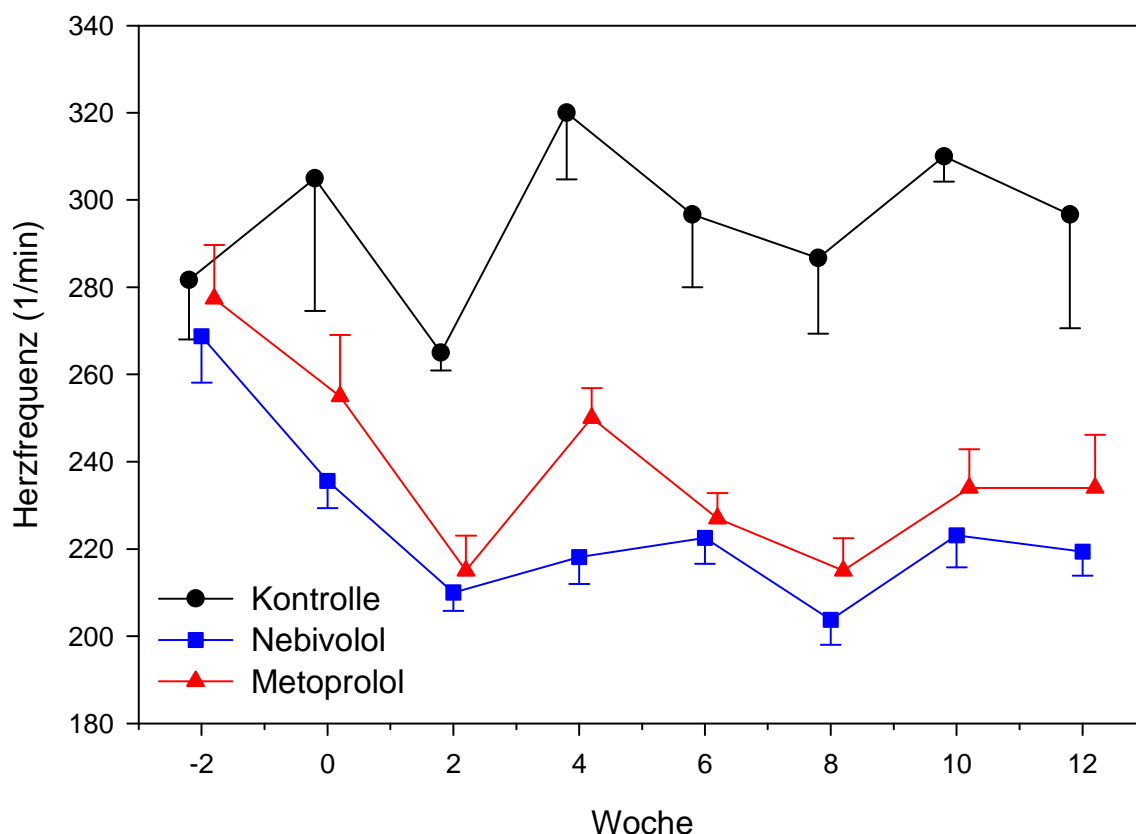
Die durchschnittliche tägliche Medikamentendosis wurde aus der aufgenommenen Futtermenge und den bei Bedarf zusätzlich verabreichten  $\beta$ -Blockern berechnet. Sie nahm in der Nebivolol-Gruppe im Mittel von anfangs  $34,2 \pm 0,8$  auf  $11,5 \pm 0,3$  mg/d und kg KG in Woche 7 ab, nach der Futterumstellung mit der damit verbundenen Dosiserhöhung in Woche 8 lag sie relativ konstant bei  $23,6 \pm 1,1$  mg/d und kg KG. Die Medikamentendosis in der Metoprolol-Gruppe verhielt sich analog, sie fiel von zunächst  $59,1 \pm 2,1$  auf  $18,2 \pm 1,5$  mg/d und kg KG und erreichte nach Woche 8 einen durchschnittlichen Wert von  $41,6 \pm 2,1$  mg/d und kg KG (**Abb. 11**).



**Abb. 11: Medikamentendosis pro Tag und kg Körpergewicht (KG) über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen**  
Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.3 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz betrug zu Versuchsbeginn im Mittel aller Tiere  $274 \pm 7$  /min. In der Kontroll-Gruppe blieb sie relativ konstant und lag während der Versuchsdauer im Mittel bei  $292 \pm 6$  /min. In den medikamentös behandelten Gruppen sank die Herzfrequenz bis Woche 2 ab und blieb dann bis Woche 12 nahezu unverändert. In der Nebivolol-Gruppe lag die mittlere Herzfrequenz bei  $225 \pm 3$  /min und in der Metoprolol-Gruppe bei  $237 \pm 4$  /min (**Abb. 12**). Die AUC der Herzfrequenz unterschied sich zwischen den Gruppen signifikant voneinander ( $p=0,0001$ ). Der Tukey-Kramer-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll-Gruppe und den medikamentös behandelten Gruppen bei einem Signifikanzniveau von  $p=0,0001$ .



**Abb. 12: Verlauf der Herzfrequenz über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Herzfrequenz in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe war gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $p=0,0001$  für den Unterschied bei der area under the curve).

### 3.4 Organgewichte

Die Organgewichte wurden als absolute Werte bestimmt und in Prozent des Körpergewichts bei Versuchende umgerechnet (**Tab. 5**). Signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt. Das durchschnittliche Lebergewicht aller Tiere lag bei  $161,4 \pm 6,7$  g, das Gewicht der Milz bei  $5,4 \pm 0,6$  g.

**Tab. 5:** Organgewichte: Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der absoluten Organgewichte und in Prozent des Körpergewichts (KG).

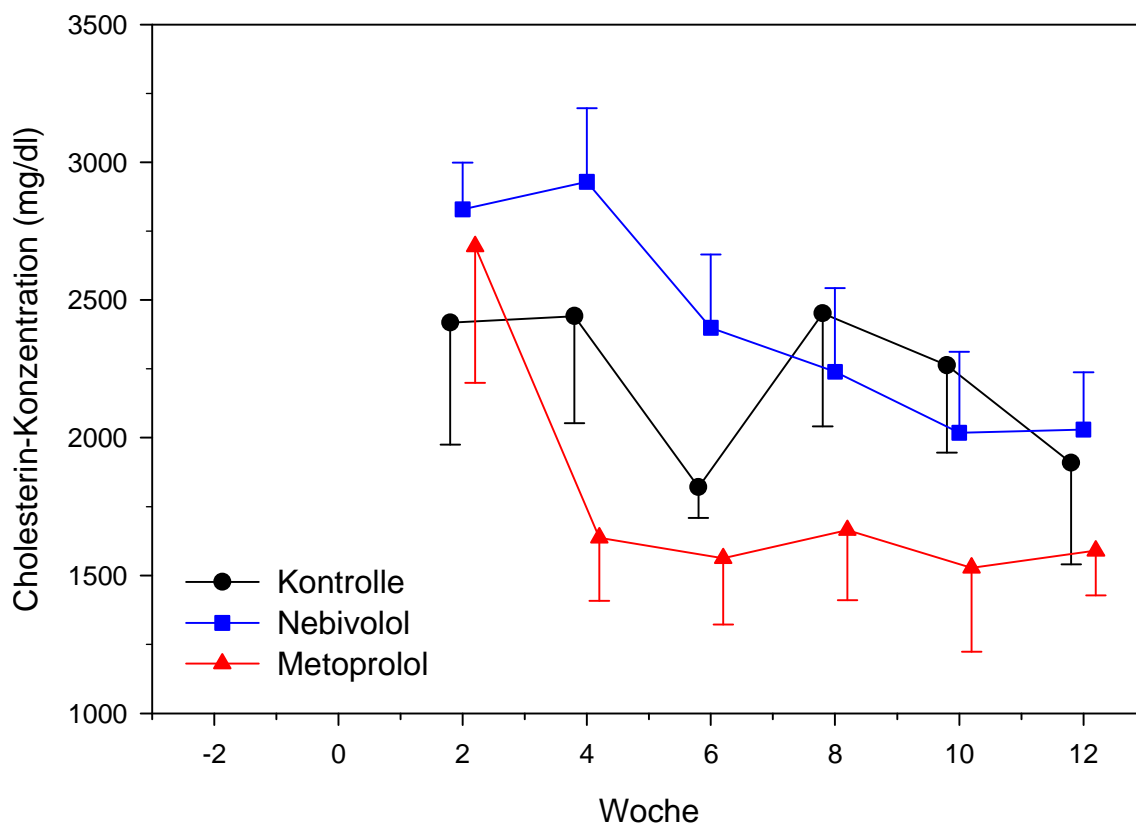
	Kontroll- Gruppe (n=3)	Nebivolol- Gruppe (n=8)	Metoprolol- Gruppe (n=5)	p-Wert
Leber (g)	$159,1 \pm 5,8$	$156,0 \pm 7,1$	$171,4 \pm 18,7$	0,6261
(% des KG)	$5,44 \pm 0,24$	$4,96 \pm 0,20$	$5,44 \pm 0,45$	0,4268
Milz (g)	$6,8 \pm 1,2$	$4,5 \pm 0,7$	$5,8 \pm 1,2$	0,2857
(% des KG)	$0,23 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,05$	0,2082

### 3.5 Blutparameter

#### 3.5.1 Konzentration der Plasmalipide und -lipoproteine

##### 3.5.1.1 Gesamtcholesterin

Die Cholesterin-Konzentration im Plasma wurde alle zwei Wochen gemessen. Sie betrug zu Beginn des Versuchs bei den 16 Tieren im Mittel  $63,9 \pm 3,7$  mg/dl. Nach Verabreichung des cholesterinhaltigen Futters stieg die Plasma-Cholesterin-Konzentration im Mittel aller Tiere auf  $2710,2 \pm 183,1$  mg/dl in Woche 2 an und lag während des Hauptversuchs durchschnittlich bei  $2175,5 \pm 86,7$  mg/dl. Zwischen den drei Gruppen war jedoch für die AUC des Cholesterins keine signifikanten Unterschiede feststellbar (**Abb. 13**).



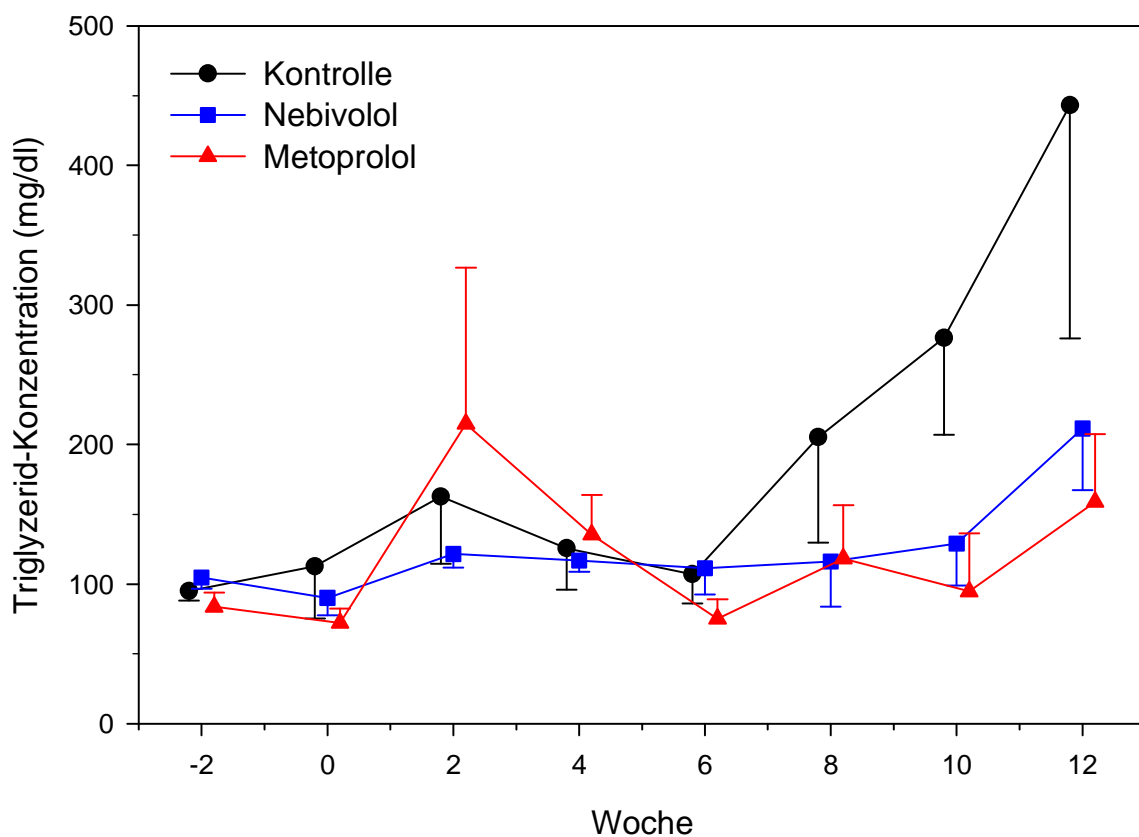
**Abb. 13: Cholesterin-Konzentration im Plasma über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM nach Beginn der Cholesterindiät. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in der area under the curve konnte nicht nachgewiesen werden ( $p=0,1005$ ).



### 3.5.1.2 Triglyzeride

Die Triglyzerid-Konzentration im Plasma wurde zweiwöchentlich bestimmt. Im Mittel der 16 Tieren lag sie zu Untersuchungsbeginn bei  $96,3 \pm 5,5$  mg/dl und bis Woche 6 relativ konstant bei durchschnittlich  $113,4 \pm 8,3$  mg/dl. Die Kontroll-Gruppe zeigte danach bis Woche 12 einen Anstieg auf  $443,0 \pm 167,1$  mg/dl, die Nebivolol-Gruppe auf  $211,5 \pm 44,1$  mg/dl und die Metoprolol-Gruppe auf  $158,8 \pm 48,8$  mg/dl. Für die AUC der Triglyzeride war jedoch kein signifikanter Unterschied nachweisbar (**Abb. 14**).



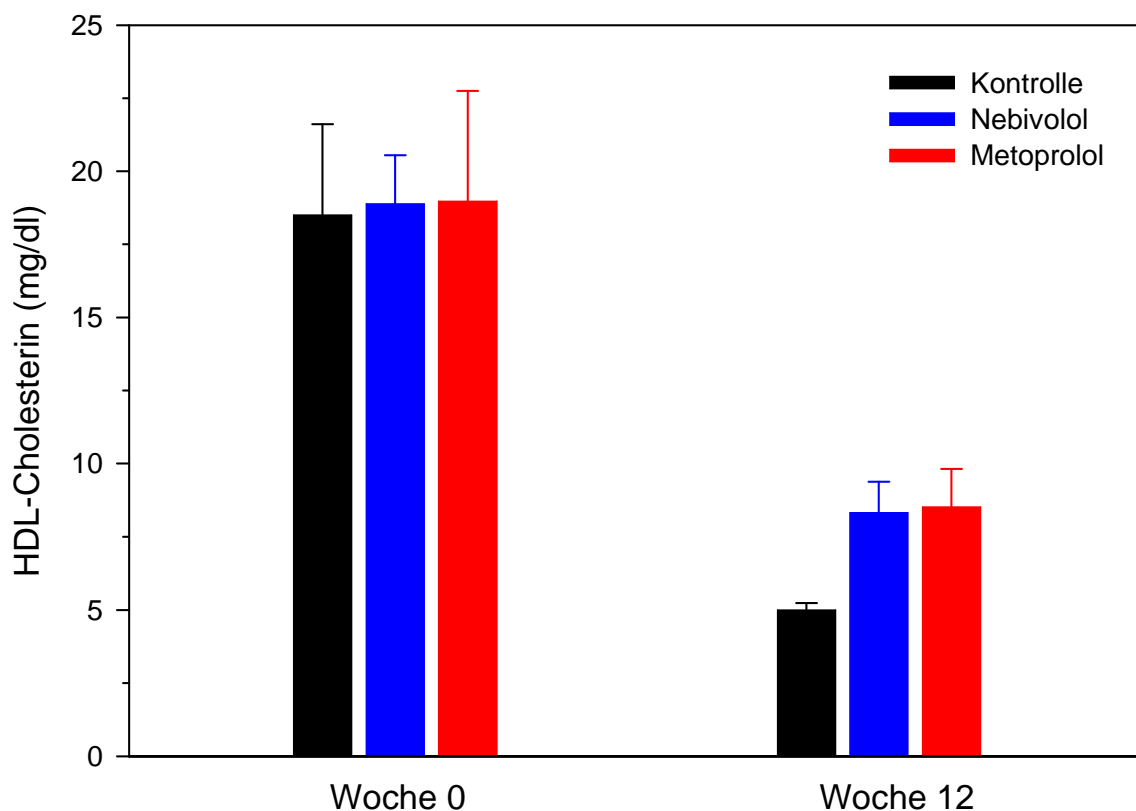
**Abb. 14: Triglyzeridkonzentration im Plasma über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei der area under the curve wurde nicht festgestellt ( $p=0,2703$ ).

### 3.5.1.3 Lipoproteine

Die Konzentration des HDL-, LDL- und VLDL-Cholesterins wurde zu Beginn des Hauptversuchs und bei Versuchsende ermittelt.

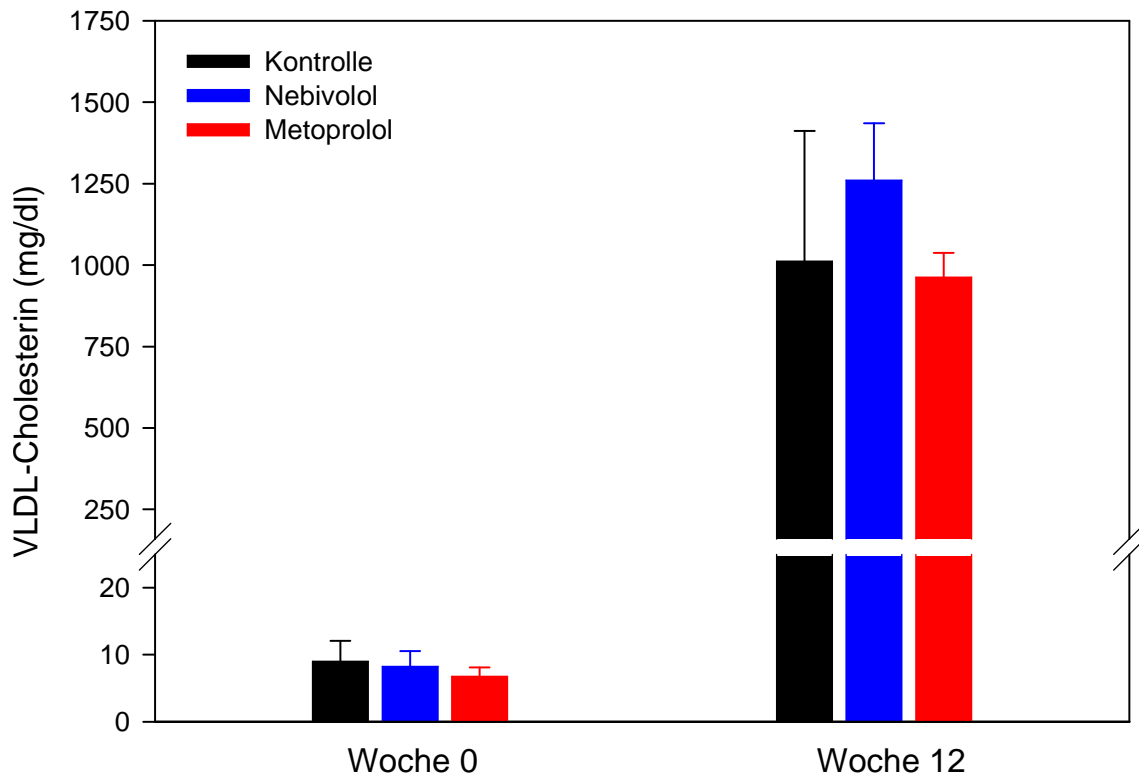
Die **HDL-Cholesterin**-Konzentration betrug in Woche 0 im Mittel aller 16 Tiere  $18,8 \pm 1,4$  mg/dl. In der Kontroll-Gruppe nahm die Konzentration bis Woche 12 um 73 % auf  $5,0 \pm 0,2$  mg/dl ab, in der Nebivolol-Gruppe um 56 % auf  $8,3 \pm 1,1$  mg/dl und in der Metoprolol-Gruppe um 55 % auf  $8,5 \pm 1,3$  mg/dl. Zu keinem Zeitpunkt konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (**Abb. 15**).



**Abb. 15: HDL-Cholesterin-Konzentration im Plasma zu den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 12**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht nachgewiesen ( $p=0,9940$  in Woche 0;  $p=0,1892$  nach Woche 12).

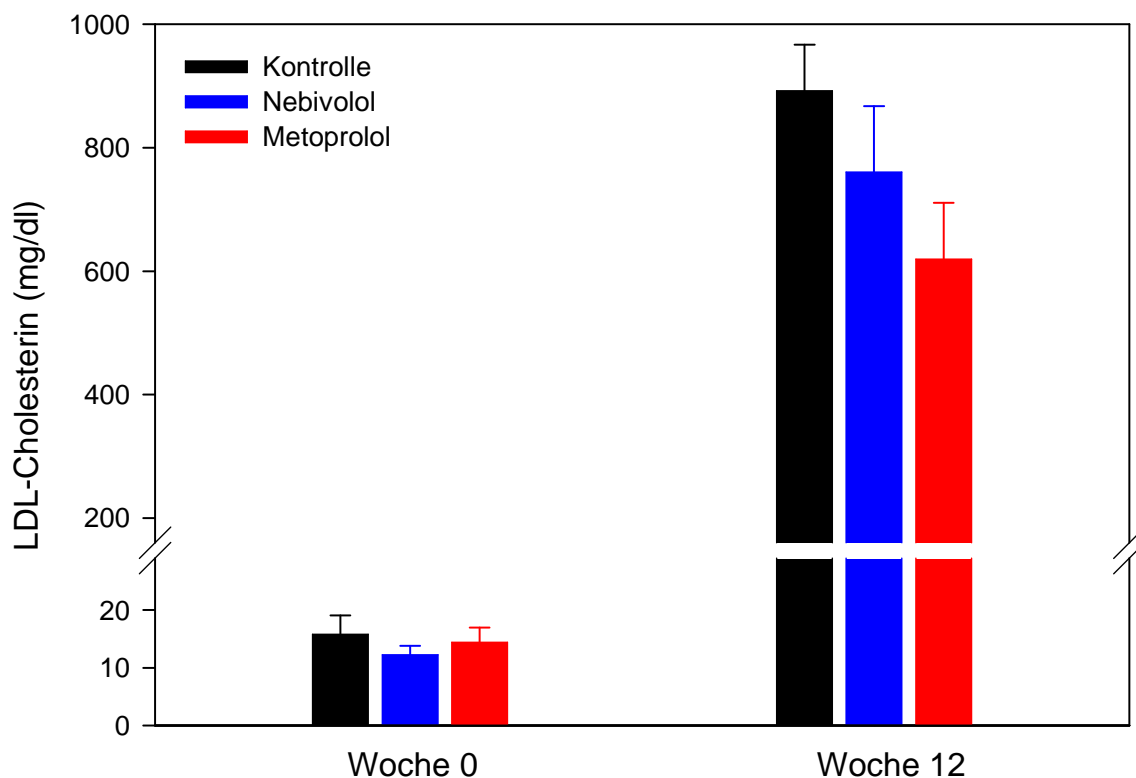
Die **VLDL-Cholesterin**-Konzentration im Plasma lag zu Beginn des Hauptversuches im Mittel bei  $8,0 \pm 1,3$  mg/dl und bei Versuchende bei  $1121,1 \pm 113,6$  mg/dl. Es waren zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar (**Abb. 16**).



**Abb. 16: VLDL-Cholesterin-Konzentration im Plasma zu den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 12.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht nachgewiesen ( $p=0,8570$  in Woche 0;  $p=0,4950$  nach Woche 12)

Bei der **LDL-Cholesterin**-Konzentration im Plasma betrug der Mittelwert der Tiere  $13,6 \pm 1,2$  mg/dl in Woche 0. In Woche 12 lag er in der Kontroll-Gruppe bei  $892,3 \pm 74,6$  mg/dl, in der Nebivolol-Gruppe bei  $760,2 \pm 107,3$  mg/dl und in der Metoprolol-Gruppe bei  $619,1 \pm 91,5$  mg/dl. Zu keinem Zeitpunkt waren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar (**Abb. 17**).



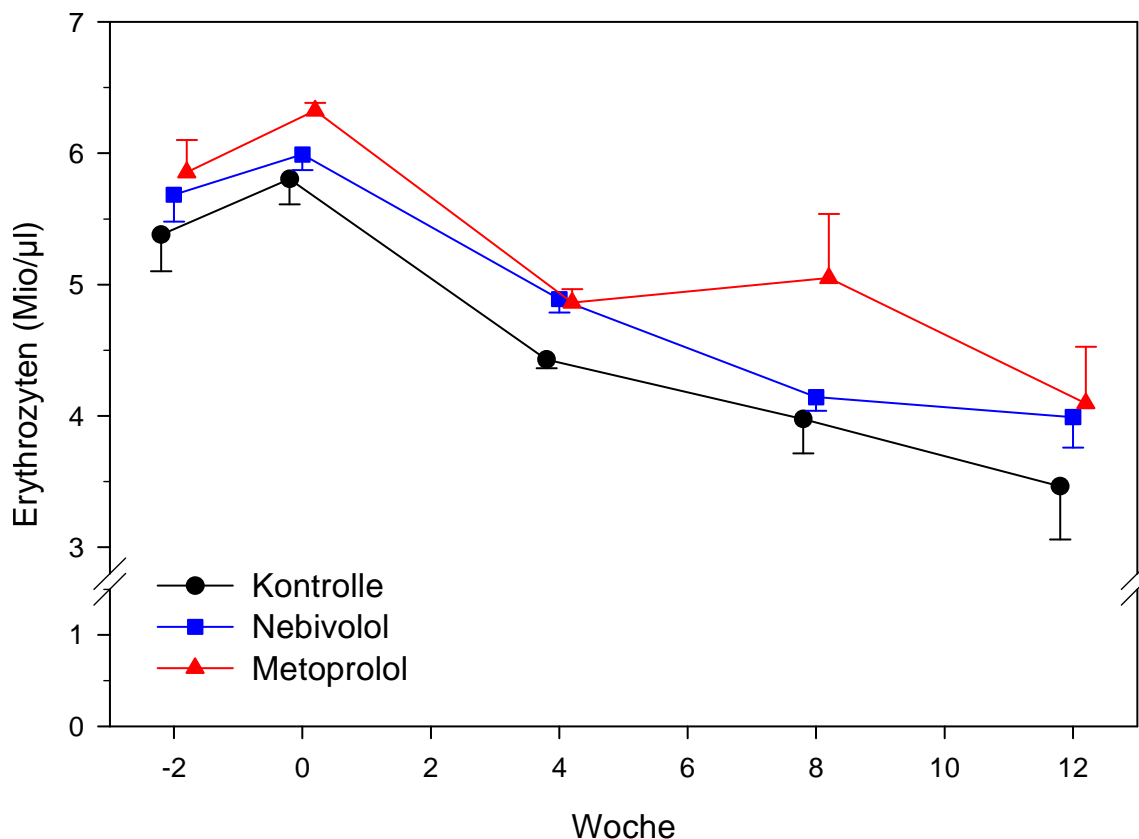
**Abb. 17: LDL-Cholesterin-Konzentration im Plasma zu den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 12.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht nachgewiesen ( $p=0,5388$  in Woche 0;  $p=0,3551$  nach Woche 12;  $p=0,3517$  für die Differenz zwischen Woche 0 und Woche 12).

### 3.5.2 Kleines Blutbild

Die Parameter des kleinen Blutbildes wurden vierwöchentlich bestimmt (Tab. 6).

Während des 15-wöchigen Versuchs verringerte sich die mittlere **Erythrozytenzahl** in allen Versuchsgruppen. Zu Versuchsbeginn in Woche -2 lag sie im Mittel aller Tiere bei  $5,7 \pm 0,1$  Mio/ $\mu$ l. Sie sank in der Kontroll-Gruppe bis Woche 12 um 36 %, in der Nebivolol-Gruppe um 30 % und in der Metoprolol-Gruppe um 30 % (Abb. 18). Die Gruppen unterschieden sich in der AUC der Erythrozytenzahl signifikant voneinander ( $p=0,0066$ ), der Unterschied befand sich zwischen der Kontroll- und Metoprolol-Gruppe.



**Abb. 18: Zahl der Erythrozyten im Vollblut über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Diese lag in der Kontroll-Gruppe signifikant unter der Zahl der Erythrozyten in der Metoprolol-Gruppe ( $p=0,0066$  für den Unterschied bei der area under the curve). Weitere signifikanten Unterschiede waren nicht feststellbar.

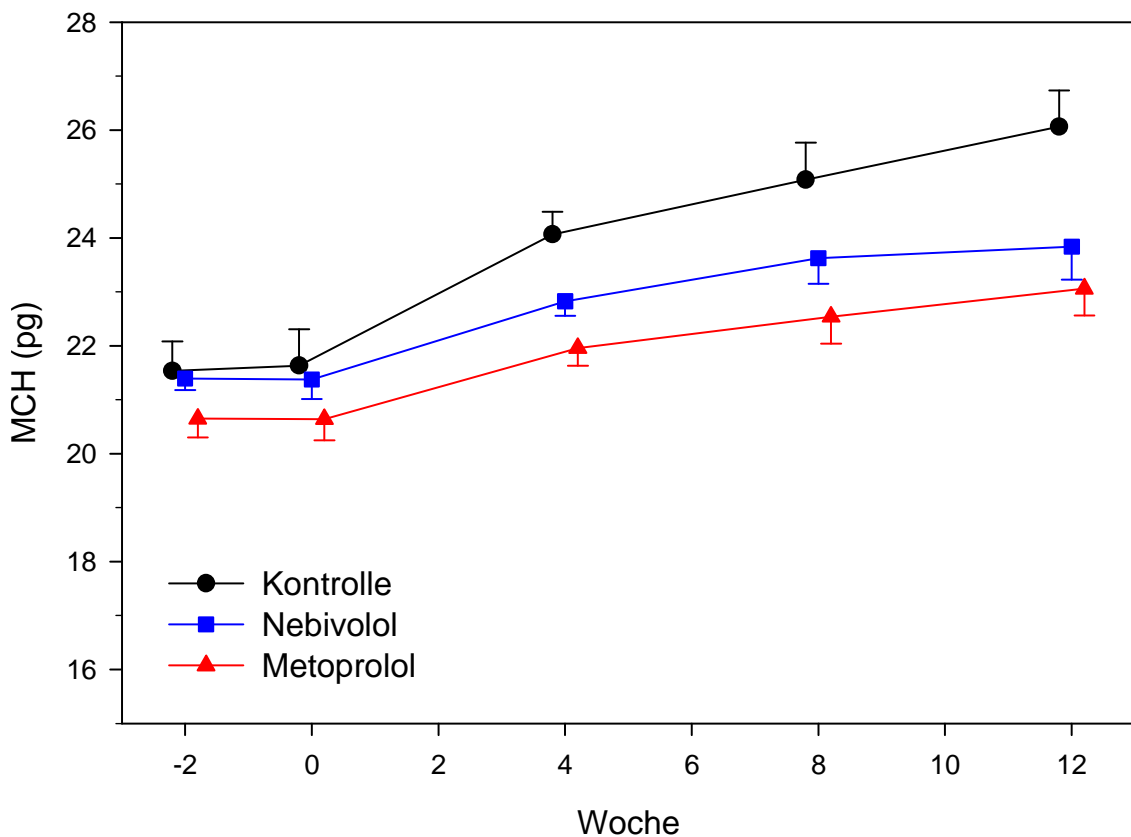
Der **Hämatokrit** verringerte sich von durchschnittlich  $38,1 \pm 0,5$  % in Woche -2 bis Versuchsbeginn auf  $23,4 \pm 1,0$  % in der Kontroll-Gruppe,  $25,8 \pm 0,9$  % in der Nebivolol-Gruppe und  $27,1 \pm 2,3$  % in der Metoprolol-Gruppe. Trotz eines  $p=0,0499$  in der Oneway-ANOVA ließen sich im Anschlusstest keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisen.

Die **Hämoglobinkonzentration** lag zu Versuchsbeginn im Mittel aller 16 Tiere bei  $12,0 \pm 0,3$  g/dl und verringerte sich bis Woche 12 auf durchschnittlich  $9,4 \pm 0,4$  g/dl. Ein signifikanter Unterschied in der AUC des Hämoglobins war zwischen den Gruppen nicht festzustellen ( $p=0,4864$ ).

Das **MCV** (mean corpuscular volume) betrug durchschnittlich  $67,2 \pm 1,1$  fl in Woche -2. Bis Versuchsbeginn fiel es in der Kontroll-Gruppe auf  $65,7 \pm 8,9$  fl ab, in den medikamentös behandelten Gruppen fiel es auf durchschnittlich  $65,9 \pm 1,2$  fl ab. Signifikante Unterschiede in der AUC des MCV waren zwischen den Gruppen nicht festzustellen ( $p=0,6935$ ).

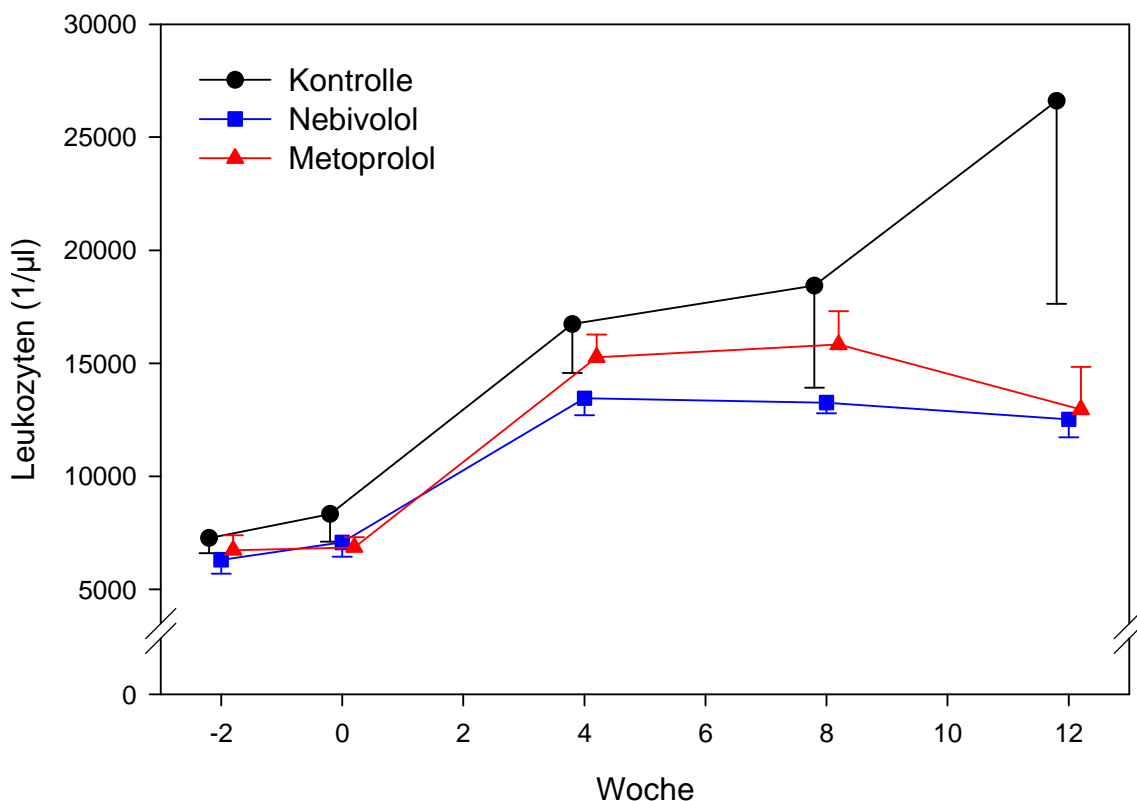
Bei Versuchsbeginn lag die **MCHC** (mean corpuscular haemoglobin concentration) durchschnittlich bei  $31,5 \pm 0,6$  g/dl. Bis Woche 12 stieg sie um 31 % in der Kontroll-Gruppe, um 15 % in der Nebivolol-Gruppe und um 10 % in der Metoprolol-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied in der AUC des MCHC konnte zwischen den Gruppen nicht festgestellt werden ( $p=0,1174$ ).

Das **MCH** (mean corpuscular haemoglobin) stieg im Verlauf bei allen Tieren an. In Woche -2 lag es im Mittel aller Tiere bei  $21,2 \pm 0,2$  pg. Bei Versuchende betrug es in der Kontroll-Gruppe  $26,1 \pm 0,7$  pg, in der Nebivolol-Gruppe  $23,8 \pm 0,6$  pg und in der Metoprolol-Gruppe  $23,1 \pm 0,5$  pg (**Abb. 19**). Ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0206$ ) in der AUC des MCH bestand zwischen der Kontroll- und Metoprolol-Gruppe.



**Abb. 19: MCH im Vollblut über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen**  
Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Dieses lag in der Kontroll-Gruppe signifikant über dem MCH der Metoprolol-Gruppe ( $p=0,0206$  für den Unterschied bei der area under the curve). Weitere signifikanten Unterschiede waren nicht feststellbar.

Die Zahl der **Leukozyten** betrug zu Versuchsbeginn in der Kontroll-Gruppe im Mittel  $7280 \pm 670$   $1/\mu\text{l}$ , in der Nebivolol-Gruppe  $6311 \pm 606$   $1/\mu\text{l}$  und in der Metoprolol-Gruppe  $6745 \pm 654$   $1/\mu\text{l}$ . In allen Gruppen stieg die Leukozytenzahl bis Woche 8 vergleichbar an. Danach zeigte die Kontroll-Gruppe bis zum Versuchsende einen Anstieg auf  $26607 \pm 8972$   $1/\mu\text{l}$ , die Nebivolol-Gruppe auf  $12518 \pm 790$   $1/\mu\text{l}$  und die Metoprolol-Gruppe auf  $12964 \pm 1880$   $1/\mu\text{l}$  (**Abb. 20**). Die Kontroll-Gruppe lag in der AUC der Leukozytenzahl dabei signifikant über der AUC in der Nebivolol-Gruppe ( $p=0,0322$ ).



**Abb. 20: Zahl der Leukozyten im Vollblut über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Diese lag in der Nebivolol-Gruppe signifikant unter der Zahl der Leukozyten in der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0322$  für den Unterschied bei der area under the curve). Ein signifikanter Unterschied zwischen den medikamentös behandelten Gruppen sowie zwischen der Kontroll- und Metoprolol-Gruppe war nicht feststellbar.



Im Verlauf der 15 Untersuchungswochen zeigte die Zahl der **Thrombozyten** bei allen Gruppen einen Anstieg von durchschnittlich  $359 \pm 27$  1/nl in Woche -2 auf im Mittel  $474 \pm 25$  1/nl bei Versuchende. Bei der AUC der Thrombozytenzahl war zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

**Tab. 6:** Parameter des Kleinen Blutbildes: Mittelwerte  $\pm$  SEM zu Versuchsbeginn (Woche -2) und zu Versuchende (Woche 12) mit Angabe des jeweiligen p-Wertes der area under the curve (AUC)

	Kontroll- Gruppe (n=3)	Nebivolol- Gruppe (n=8)	Metoprolol- Gruppe (n=5)	p-Wert AUC
<b>Erythrozyten (Mio/<math>\mu</math>l)</b>				
Woche -2	$5,4 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,2$	
Woche 12	$3,5 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,4$	
AUC	$68,5 \pm 2,5$	$73,2 \pm 1,1$	$78,3 \pm 1,7$	0,0066**
<b>Hämatokrit (%)</b>				
Woche -2	$37,9 \pm 1,2$	$38,0 \pm 0,7$	$38,4 \pm 0,9$	
Woche 12	$23,4 \pm 1,0$	$25,8 \pm 0,9$	$27,1 \pm 2,3$	
AUC	$453,2 \pm 3,6$	$465,7 \pm 6,0$	$492,5 \pm 13,9$	0,0499
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>				
Woche -2	$11,5 \pm 0,5$	$12,2 \pm 0,5$	$12,2 \pm 0,6$	
Woche 12	$9,2 \pm 1,1$	$9,4 \pm 0,4$	$9,4 \pm 0,8$	
AUC	$162,0 \pm 4,5$	$165,0 \pm 3,1$	$169,8 \pm 4,7$	0,4864
<b>MCV (fl)</b>				
Woche -2	$70,7 \pm 2,0$	$67,1 \pm 1,8$	$65,5 \pm 1,6$	
Woche 12	$65,7 \pm 8,9$	$65,4 \pm 1,9$	$66,7 \pm 1,4$	
AUC	$977,8 \pm 59,6$	$943,3 \pm 20,1$	$948,3 \pm 10,5$	0,6935
<b>MCH (pg)</b>				
Woche -2	$21,5 \pm 0,5$	$21,4 \pm 0,2$	$20,7 \pm 0,3$	
Woche 12	$26,1 \pm 0,7$	$23,8 \pm 0,6$	$23,1 \pm 0,5$	
AUC	$358,0 \pm 8,3$	$341,1 \pm 4,8$	$328,0 \pm 4,2$	0,0206**

Tab. 6: Fortsetzung

	Kontroll-Gruppe (n=3)	Nebivolol-Gruppe (n=8)	Metoprolol-Gruppe (n=5)	p-Wert AUC
<b>MCHC (g/dl)</b>				
Woche -2	30,5 ± 0,2	31,9 ± 0,9	31,6 ± 1,1	
Woche 12	40,0 ± 4,6	36,5 ± 0,6	34,6 ± 0,4	
AUC	551,1 ± 25,3	534,4 ± 3,7	519,6 ± 3,8	0,1174
<b>Leukozyten (1/µl)</b>				
Woche -2	7280 ± 670	6311 ± 606	6745 ± 654	
Woche 12	26607 ± 8972	12518 ± 790	12964 ± 1880	
AUC (10 <sup>3</sup> )	238,7 ± 38,6	169,8 ± 6,7	188,7 ± 13,2	0,0322*
<b>Thrombozyten (1/nl)</b>				
Woche -2	312 ± 97	391 ± 40	310 ± 40	
Woche 12	612 ± 73	482 ± 33	461 ± 55	
AUC (10 <sup>3</sup> )	7,3 ± 0,4	7,0 ± 0,4	5,9 ± 0,6	0,1833

\* signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und der Kontroll-Gruppe

\*\* signifikanter Unterschied zwischen der Metoprolol- und der Kontroll-Gruppe

### 3.5.3 Leber- und Pankreaswerte

Leber- und Pankreaswerte wurden in vierwöchentlichem Abstand bestimmt (Tab. 7).

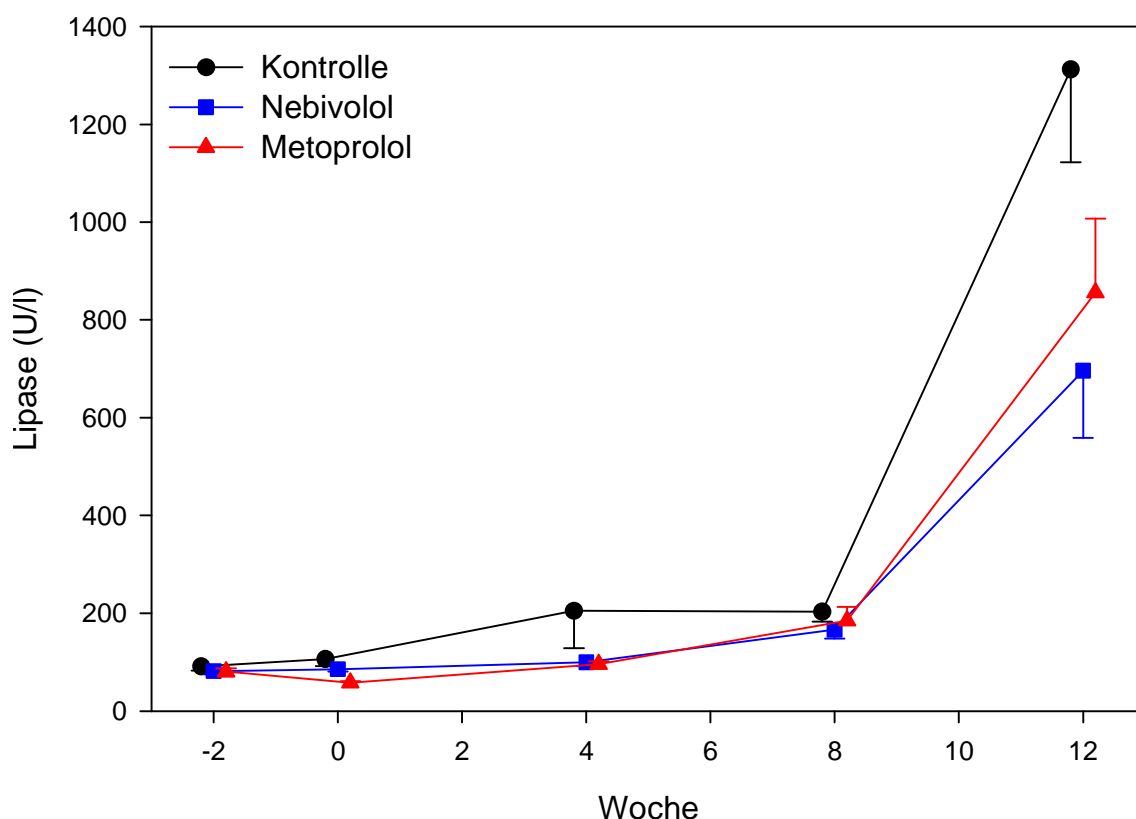
Die **Gesamt-Bilirubin-Konzentration** lag bei allen Tieren zu Beginn des Hauptversuchs im Mittel bei  $0,1 \pm 0,0$  mg/dl. In der Kontroll-Gruppe stieg sie auf einen Endwert von  $3,7 \pm 1,3$  mg/dl, in der Nebivolol-Gruppe auf  $1,3 \pm 0,2$  mg/dl und in der Metoprolol-Gruppe auf  $1,1 \pm 0,3$  mg/dl an. Ein signifikanter Unterschied in der AUC des Gesamt-Bilirubins zwischen den Gruppen war nicht festzustellen ( $p=0,0800$ ).

Die Werte der **Glutamat-Oxalacetat-Transferase (GOT)** verhielten sich in allen drei Gruppen analog, sie stiegen von durchschnittlich  $29,9 \pm 1,3$  U/l in Woche -2 auf einen maximalen Wert von  $60,6 \pm 14,3$  U/l in Woche 8 an und fielen bis Versuchende auf  $39,3 \pm 2,8$  U/l ab. Ein signifikanter Unterschied in der AUC der GOT war zwischen den Gruppen nicht erkennbar ( $p=0,2471$ ).

Ähnlich verhielten sich die Werte der **Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)**. Sie nahmen von im Mittel  $35,9 \pm 2,0$  U/l zu Versuchsbeginn auf  $79,1 \pm 15,5$  U/l in Woche 8 zu und fielen auf  $53,9 \pm 2,7$  U/l in Woche 12 ab. In der AUC der GPT konnte zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,4032$ ).

Die  **$\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT)** betrug zu Beginn im Mittel aller Tiere  $2,0 \pm 0,3$  U/l. Im Versuchsverlauf stieg sie auf einen maximalen Wert von  $131,8 \pm 46,8$  U/l in Woche 4 an und fiel bis Woche 12 auf durchschnittlich  $74,2 \pm 8,8$  U/l. In der AUC der  $\gamma$ -GT war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar ( $p=0,7763$ ).

Die Aktivität der **Lipase** lag in Woche -2 durchschnittlich bei  $82,9 \pm 4,4$  U/l. Bis zum Versuchsende stieg sie in der Kontroll-Gruppe auf  $1312 \pm 190$  U/l, in der Nebivolol-Gruppe auf  $696 \pm 137$  U/l und in der Metoprolol-Gruppe auf  $856 \pm 151$  U/l (**Abb. 21**). Ein signifikanter Unterschied war zwischen der Kontroll- und Nebivolol-Gruppe feststellbar ( $p=0,0182$ ).



**Abb. 21: Aktivität der Lipase im Plasma über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Aktivität der Lipase stieg in allen Gruppen ab Woche 8 an. Sie war in der Nebivolol-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $p=0,0182$  für den Unterschied bei der area under the curve). Ein signifikanter Unterschied zwischen den medikamentös behandelten Gruppen sowie zwischen der Kontroll- und Metoprolol-Gruppe war nicht feststellbar.

**Tab. 7:** Leber- und Pankreaswerte: Mittelwerte  $\pm$  SEM zu Versuchsbeginn (Woche -2 bzw. Woche 0 bei Bilirubin) und zu Versuchende (Woche 12) mit Angabe des jeweiligen p-Wertes der area under the curve (AUC)

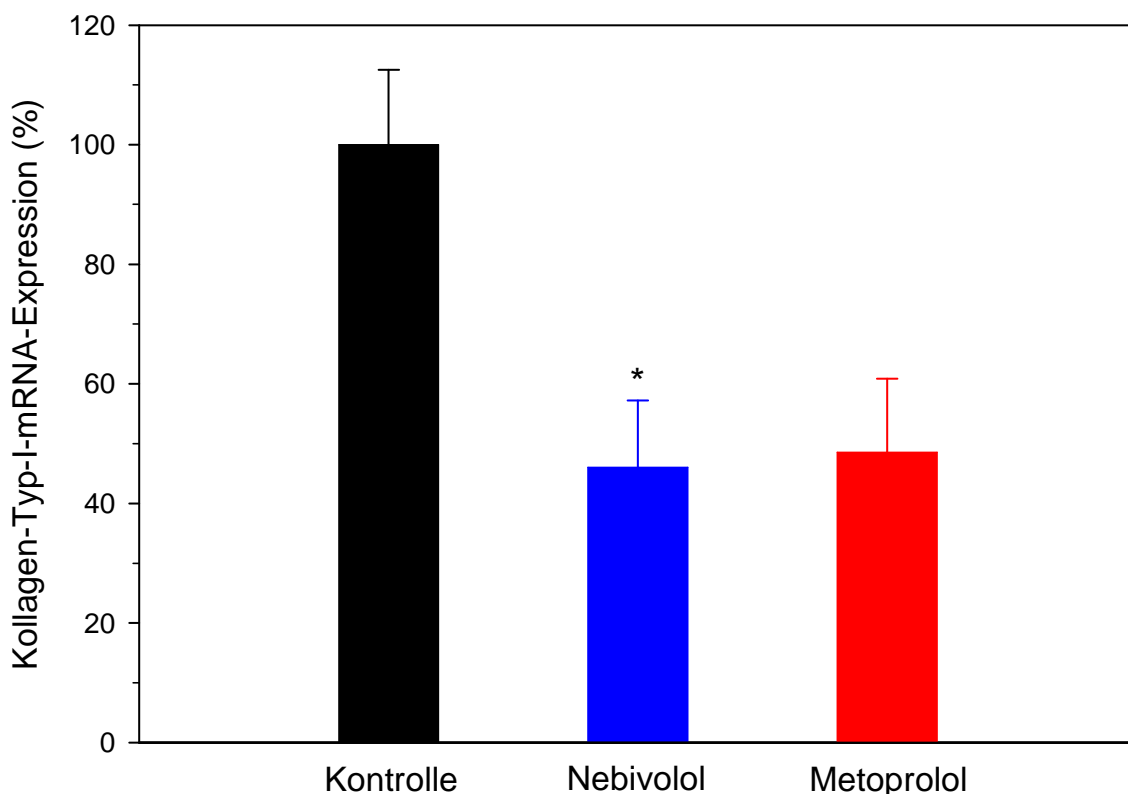
	Kontroll- Gruppe (n=3)	Nebivolol- Gruppe (n=8)	Metoprolol- Gruppe (n=5)	p-Wert AUC
<b>Bilirubin gesamt (mg/dl)</b>				
Woche 0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	
Woche 12	3,7 $\pm$ 1,3	1,3 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,3	
AUC	20,1 $\pm$ 7,8	15,7 $\pm$ 1,8	10,9 $\pm$ 2,5	0,0800
<b>GOT (U/l)</b>				
Woche -2	31,0 $\pm$ 1,5	29,4 $\pm$ 1,8	30,8 $\pm$ 2,7	
Woche 12	45,7 $\pm$ 15,6	40,0 $\pm$ 3,9	38,2 $\pm$ 5,4	
AUC	609,5 $\pm$ 111,9	466,4 $\pm$ 25,9	583,1 $\pm$ 80,6	0,2471
<b>GPT (U/l)</b>				
Woche -2	48,3 $\pm$ 0,9	33,6 $\pm$ 2,9	39,6 $\pm$ 2,9	
Woche 12	64,0 $\pm$ 11,5	55,1 $\pm$ 3,6	52,0 $\pm$ 5,6	
AUC	1025,2 $\pm$ 109,3	774,0 $\pm$ 103,0	923,1 $\pm$ 141,6	0,4032
<b><math>\gamma</math>-GT (U/l)</b>				
Woche -2	2,7 $\pm$ 1,2	2,3 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,6	
Woche 12	77,7 $\pm$ 26,8	65,5 $\pm$ 14,9	88,2 $\pm$ 5,8	
AUC	895,4 $\pm$ 101,2	781,1 $\pm$ 179,5	951,3 $\pm$ 94,8	0,7763
<b>Lipase (U/l)</b>				
Woche -2	91,0 $\pm$ 8,0	81,5 $\pm$ 7,2	80,4 $\pm$ 7,2	
Woche 12	1312 $\pm$ 190	696 $\pm$ 137	856 $\pm$ 151	
AUC (10 <sup>3</sup> )	4,8 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,4	0,0182*

\* signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Kontroll-Gruppe

## 3.6 Real-time-RT-PCR

### 3.6.1 Kollagen-Typ-I

Die Expression von Kollagen-Typ-I-mRNA betrug in der Kontroll-Gruppe  $100,0 \pm 12,5$  %, in der Nebivolol-Gruppe  $46,0 \pm 11,2$  % und in der Metoprolol-Gruppe  $48,6 \pm 12,3$  % (**Abb. 22**). Der Unterschied zwischen der Kontroll- und der Nebivolol-Gruppe war signifikant ( $p=0,0374$ ).



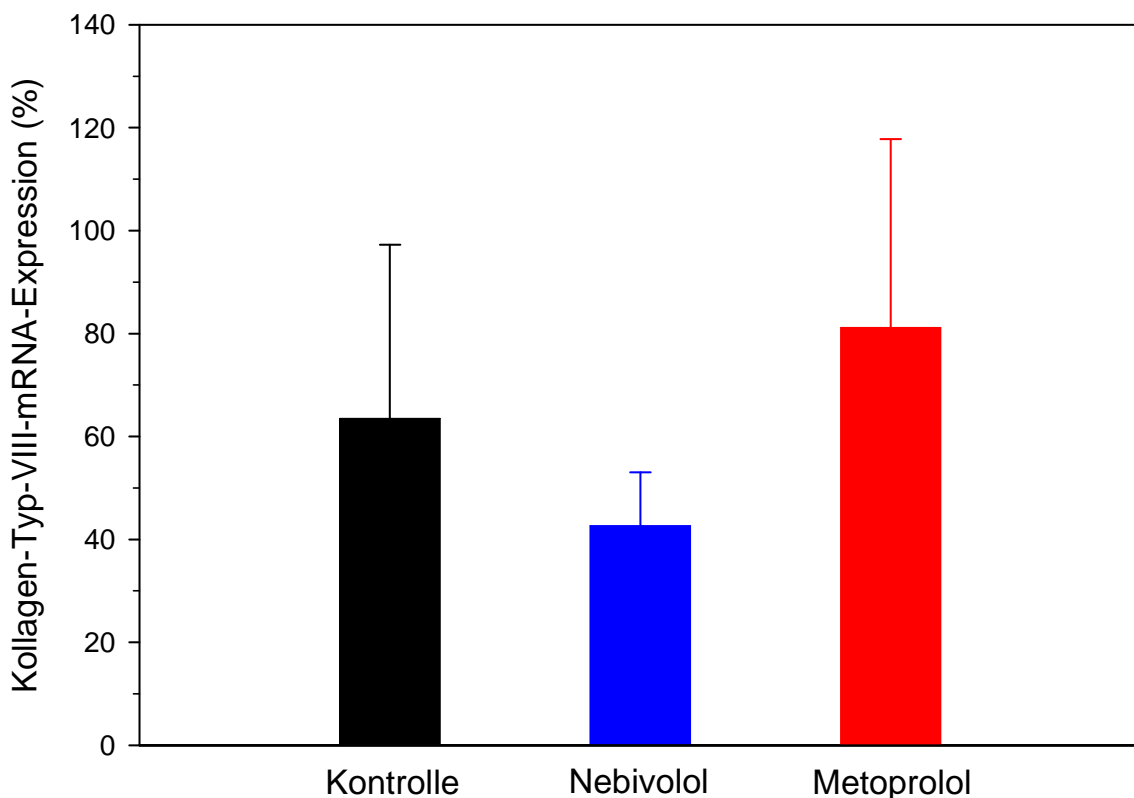
**Abb. 22: Expression von Kollagen-Typ-I-mRNA in schockgefrorenen Karotiden.**

Die Untersuchung der Kollagen-Typ-I-mRNA-Expression an den rechten Karotiden erfolgte mittels Real-time-RT-PCR nach Isolation der Gesamt-RNA und unspezifischer RT-Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA-Expression von jeweils zwei Versuchen an zwei verschiedenen Abschnitten der Karotiden.

Die Kaninchen der Nebivolol-Gruppe(\*) exprimierten signifikant weniger Kollagen-Typ-I-mRNA als die Tiere der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0374$ ;  $n=15$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Metoprolol- und Kontroll-Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden.

### 3.6.2 Kollagen-Typ-VIII

Die Expression von Kollagen-Typ-VIII-mRNA lag in der Kontroll-Gruppe bei  $63,5 \pm 33,8 \%$ , in der Nebivolol-Gruppe bei  $42,7 \pm 10,4 \%$  und in der Metoprolol-Gruppe bei  $81,2 \pm 36,6 \%$  (**Abb. 23**). Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar ( $p=0,5211$ ).

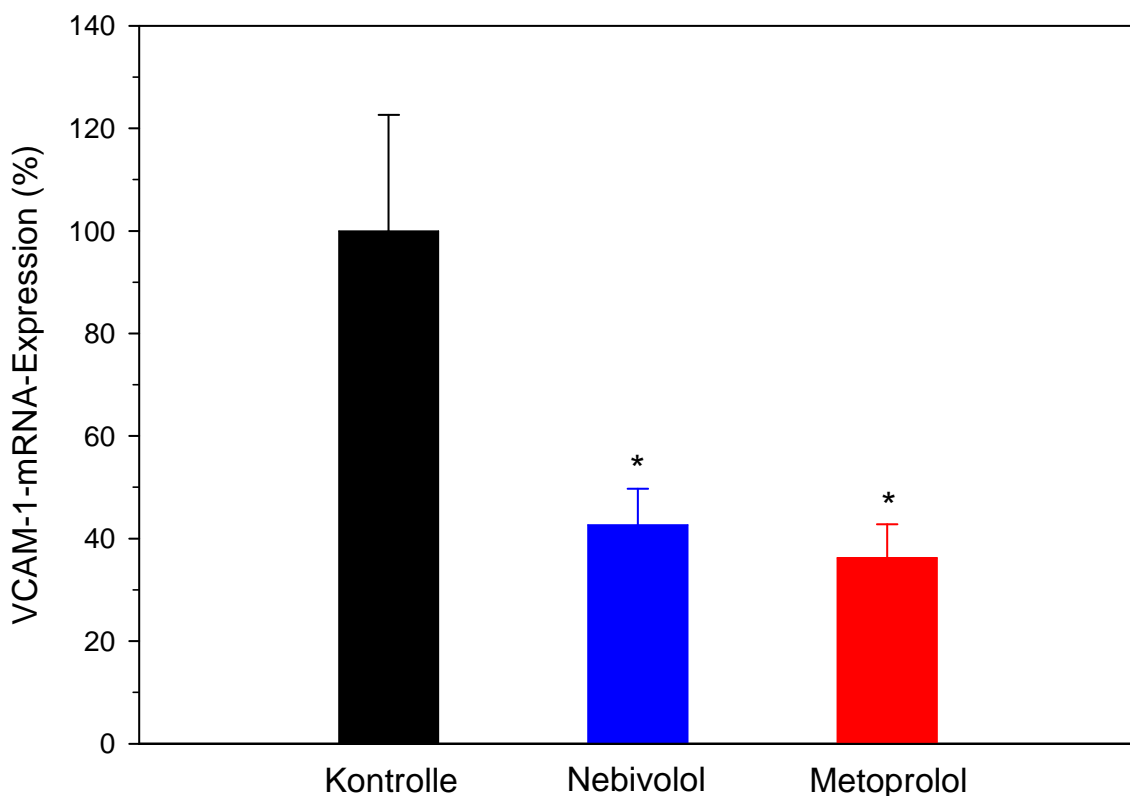


**Abb. 23: Expression von Kollagen-Typ-VIII-mRNA in schockgefrorenen Karotiden.**

Die Untersuchung der Kollagen-Typ-VIII-mRNA-Expression an den rechten und linken Karotiden erfolgte mittels Real-time-RT-PCR nach Isolation der Gesamt-RNA und unspezifischer RT-Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA-Expression von jeweils zwei Versuchen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht feststellbar ( $p=0,5521$ ;  $n=30$ )

### 3.6.3 VCAM-1

In der Kontroll-Gruppe lag die mRNA-Expression bei  $100,0 \pm 22,6$  %, in der Nebivolol-Gruppe bei  $42,7 \pm 7,0$  % und in der Metoprolol-Gruppe bei  $36,3 \pm 6,5$  % (**Abb. 24**). Zwischen den mit  $\beta$ -Blockern behandelten Tieren und der Kontroll-Gruppe konnte eine signifikant verminderte Expression von VCAM-1-mRNA nachgewiesen werden ( $p=0,0017$ ).



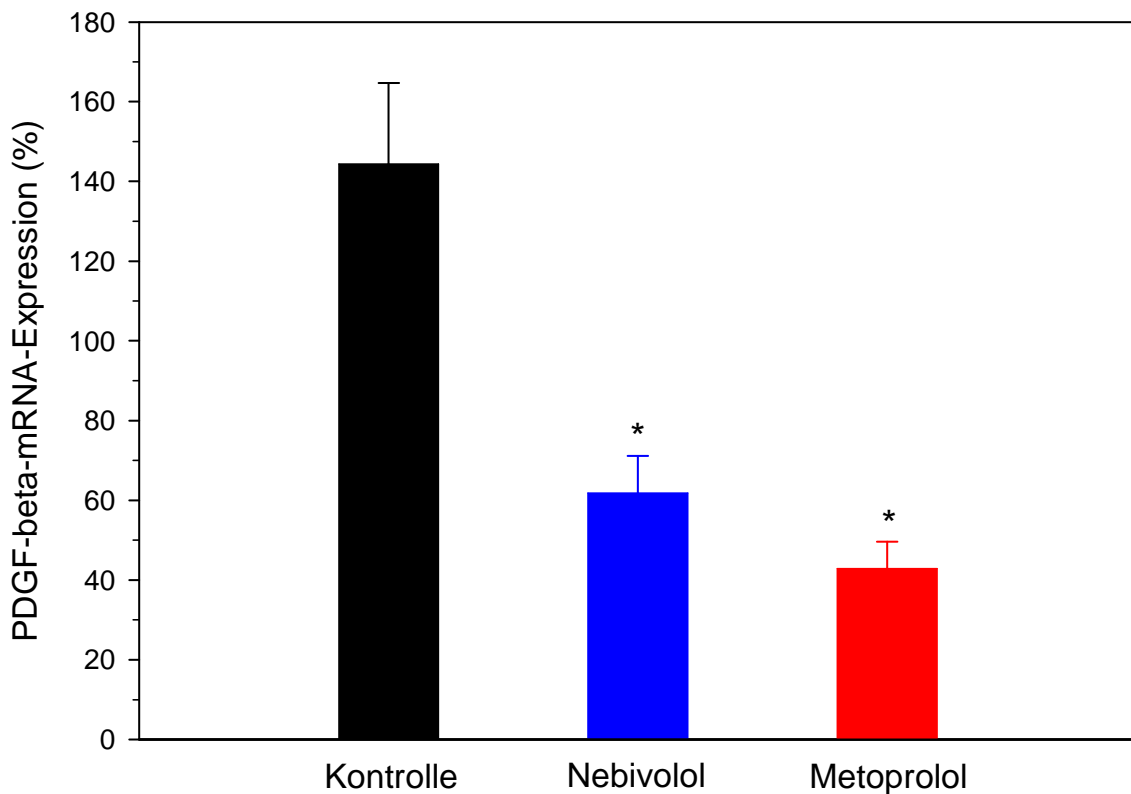
**Abb. 24: Expression von VCAM-1-mRNA in schockgefrorenen Karotiden.**

Die Untersuchung der VCAM-1-mRNA-Expression an den rechten und linken Karotiden erfolgte mittels Real-time-RT-PCR nach Isolation der Gesamt-RNA und unspezifischer RT-Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA-Expression von jeweils zwei Versuchen. Die Expression der VCAM-1-mRNA war in den medikamentös behandelten Gruppen(\*) gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $p=0,001$ ;  $n=30$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden.



### 3.6.4 PDGF- $\beta$

Die Expression der PDGF- $\beta$ -mRNA lag in der Kontroll-Gruppe bei  $144,4 \pm 20,3$  % und war bei den mit  $\beta$ -Blockern behandelten Tieren der Nebivolol- ( $61,8 \pm 9,3\%$ ) und Metoprolol-Gruppe ( $42,0 \pm 6,7$  %) signifikant reduziert ( $p < 0,0001$ ) (**Abb. 25**). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden.

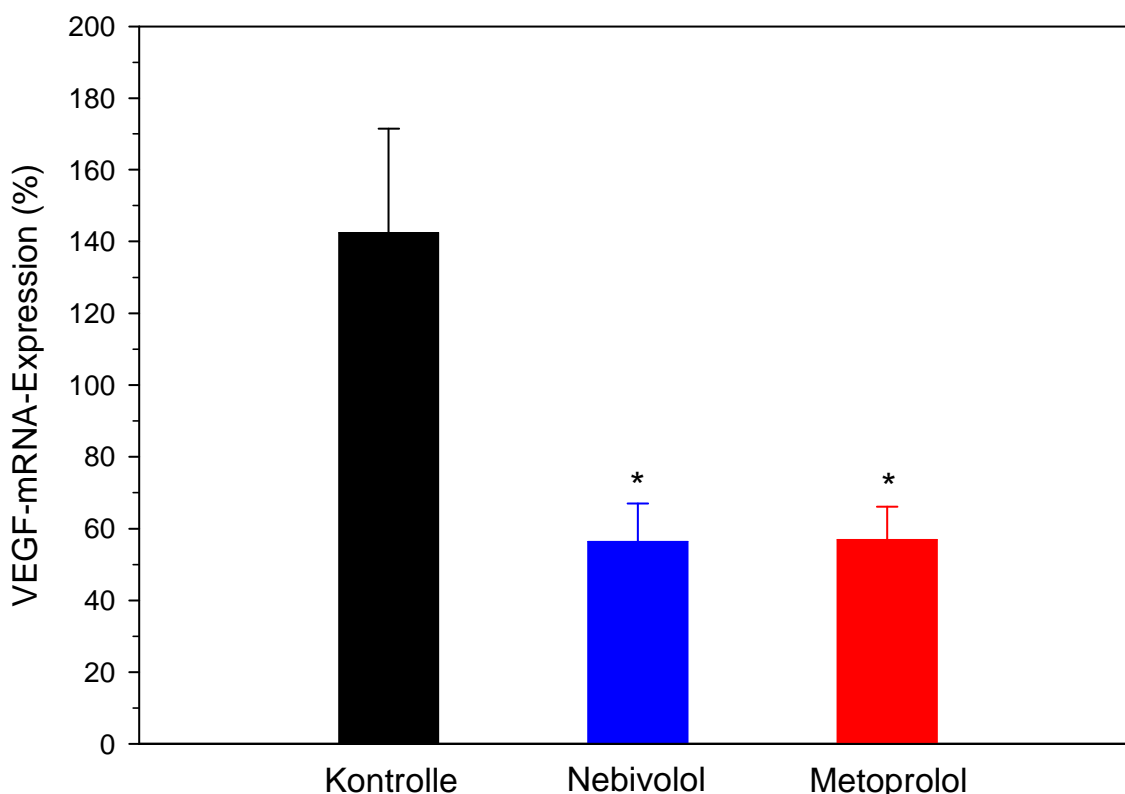


**Abb. 25: Expression von PDGF- $\beta$ -mRNA in schockgefrorenen Karotiden.**

Die Untersuchung der PDGF- $\beta$ -mRNA-Expression an den rechten und linken Karotiden erfolgte mittels Real-time-RT-PCR nach Isolation der Gesamt-RNA und unspezifischer RT-Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA-Expression von jeweils zwei Versuchen. Die Kaninchen der medikamentös behandelten Gruppen(\*) exprimierten signifikant weniger PDGF- $\beta$ -mRNA als die Tiere der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,0001$ ;  $n=27$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden.

### 3.6.5 VEGF

Die Expression von VEGF-mRNA in den Karotiden war in der Kontroll-Gruppe mit  $142,4 \pm 29,1$  % signifikant erhöht gegenüber den medikamentös behandelten Gruppen ( $p=0,0019$ ). In der Nebivolol-Gruppe lag die Expression bei  $56,4 \pm 10,6$  %, in der Metoprolol-Gruppe bei  $57,0 \pm 13,0$  % (**Abb. 26**). Zwischen den medikamentös behandelten Gruppen war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

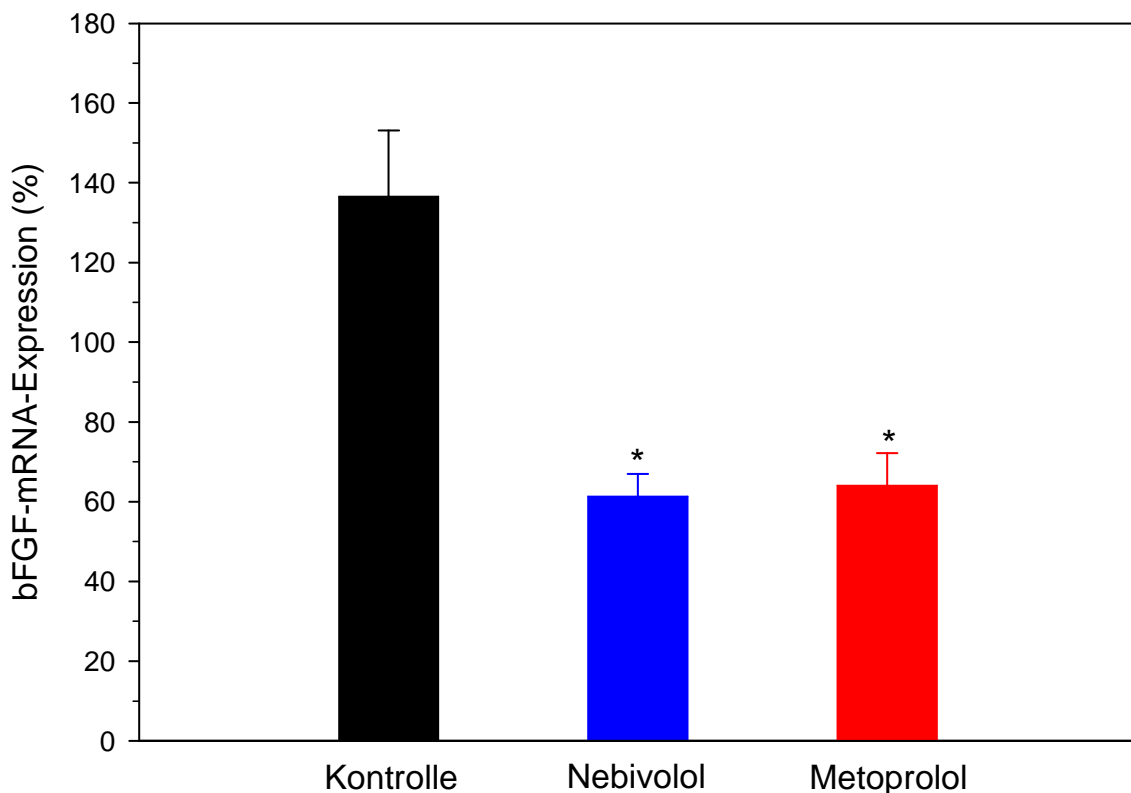


**Abb. 26: Expression von VEGF-mRNA in schockgefrorenen Karotiden.**

Die Untersuchung der VEGF-mRNA-Expression an den rechten und linken Karotiden erfolgte mittels Real-time-RT-PCR nach Isolation der Gesamt-RNA und unspezifischer RT-Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA-Expression von jeweils zwei Versuchen. Die Expression der VEGF-mRNA war in den medikamentös behandelten Gruppen(\*) gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $p=0,0019$ ;  $n=27$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte nicht festgestellt werden.

### 3.6.6 bFGF

In der Kontroll-Gruppe lag die Expression von bFGF-mRNA bei  $136,5 \pm 16,6$  %, in der Nebivolol-Gruppe bei  $61,3 \pm 5,7$ % und in der Metoprolol-Gruppe bei  $64,1 \pm 8,1$ %. Ein signifikanter Unterschied ließ sich zwischen der Kontroll-Gruppe und den medikamentös behandelten Gruppen feststellen ( $p < 0,0001$ ) (**Abb. 27**). Die Nebivolol- und die Metoprolol-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

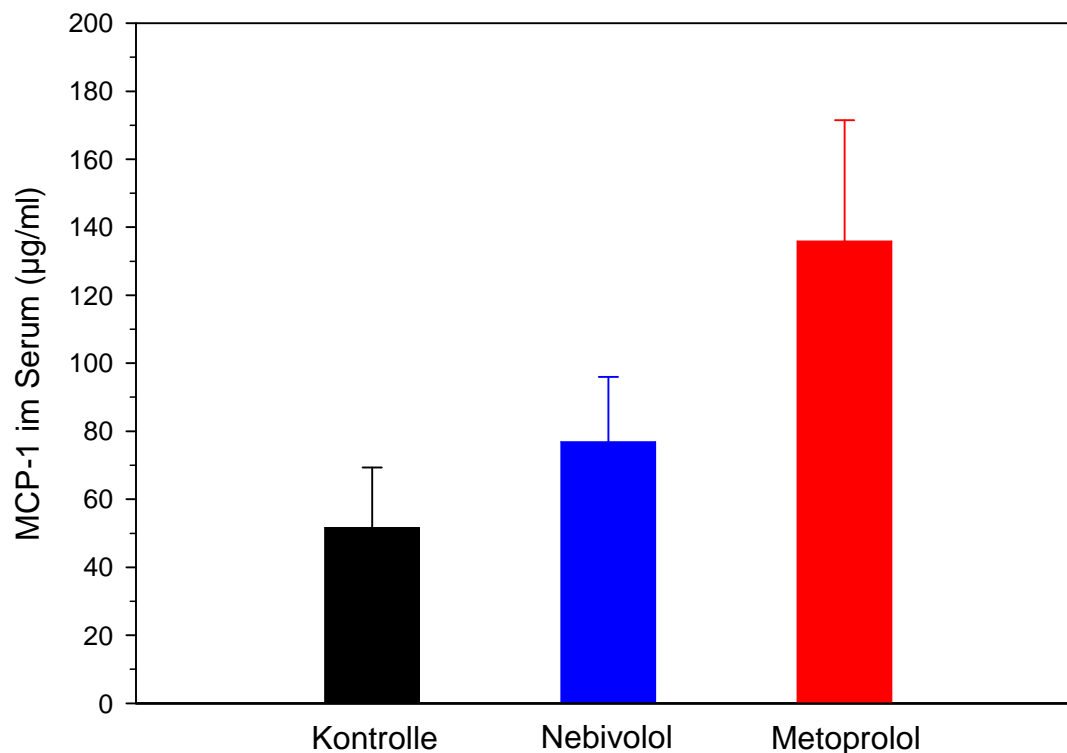


**Abb. 27: Expression von bFGF-mRNA in schockgefrorenen Karotiden.**

Die Untersuchung der bFGF-mRNA-Expression an den rechten und linken Karotiden erfolgte mittels Real-time-RT-PCR nach Isolation der Gesamt-RNA und unspezifischer RT-Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA-Expression von jeweils zwei Versuchen. In den medikamentös behandelten Gruppen(\*) war die Expression der bFGF-mRNA gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $p < 0,0001$ ;  $n=26$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte nicht festgestellt werden.

### 3.6.7 MCP-1

Die Expression von MCP-1-mRNA war in den Karotiden der Nebivolol-Gruppe ( $85,4 \pm 17,8 \%$ ) im Vergleich zur Metoprolol- ( $97,7 \pm 23,0 \%$ ) und Kontroll-Gruppe ( $100,0 \pm 33,2 \%$ ) vermindert (**Abb. 28**). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden.

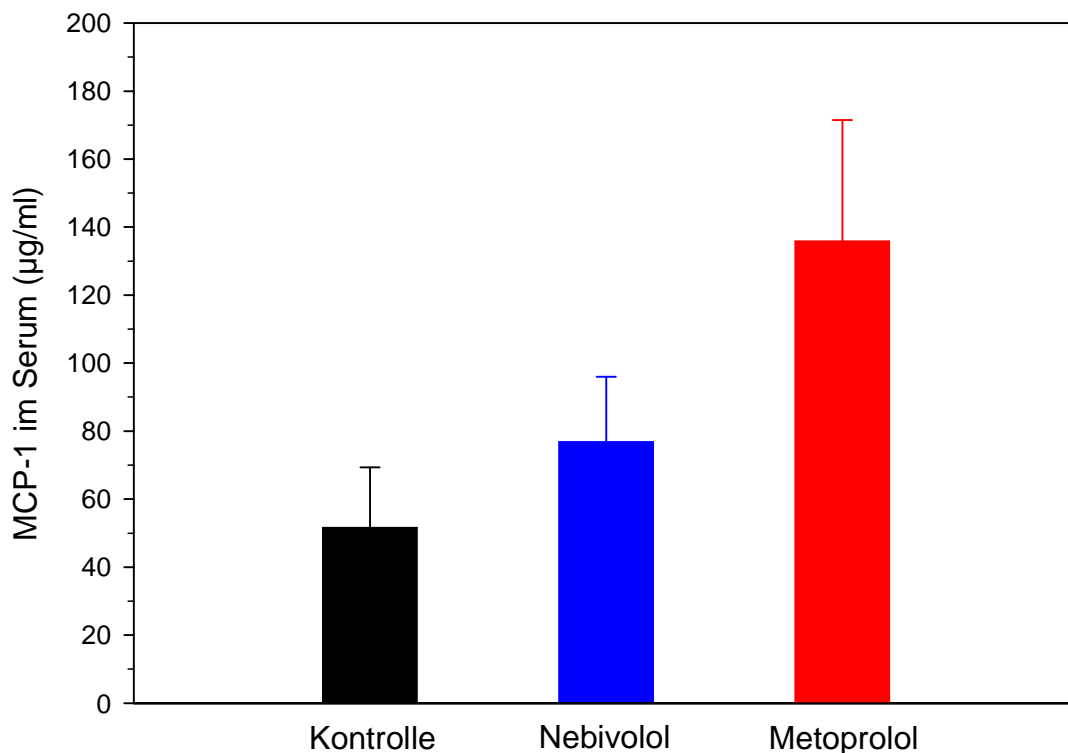


**Abb. 28: Expression von MCP-1-mRNA in schockgefrorenen Karotiden.**

Die Untersuchung der MCP-1-mRNA-Expression an den rechten und linken Karotiden erfolgte mittels Real-time-RT-PCR nach Isolation der Gesamt-RNA und unspezifischer RT-Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA-Expression von jeweils zwei Versuchen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht feststellbar ( $p=0,8790$ ;  $n=31$ ).

### 3.7 MCP-1-ELISA

Die Konzentration von MCP-1 im Serum lag bei Versuchende in der Kontroll-Gruppe im Mittel bei  $51,6 \pm 17,7 \mu\text{g/ml}$ , in der Nebivolol-Gruppe bei  $76,9 \pm 19,1 \mu\text{g/ml}$  und in der Metoprolol-Gruppe bei  $135,9 \pm 35,6 \mu\text{g/ml}$  (**Abb. 29**). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht feststellbar.



**Abb. 29: Konzentration von MCP-1 im Serum bei Versuchende.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Serum-Konzentrationen wurden aus mindestens zwei am ELISA-Reader gemessenen Absorptionswerten berechnet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,1473$ ).

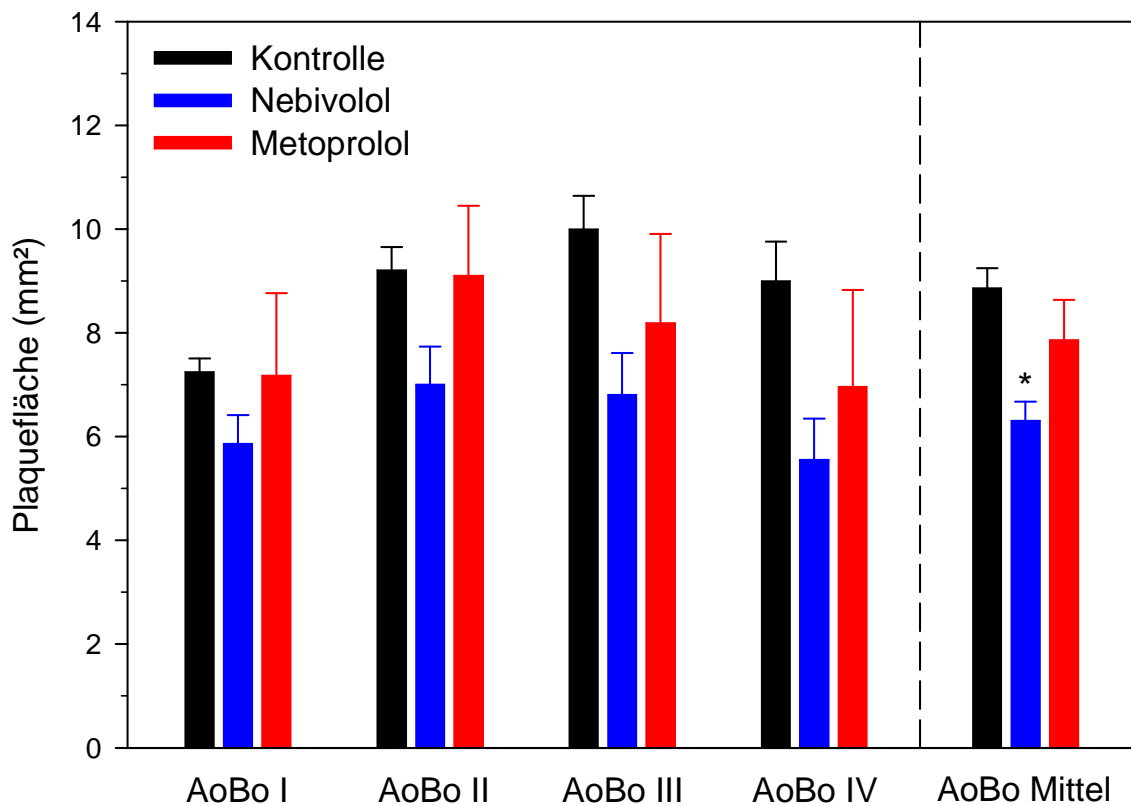
## 3.8 Morphometrie und Histologie

### 3.8.1 Plaquefläche und Stenose des Gefäßlumens

#### 3.8.1.1 Aortenbogen

Die Plaques der Tiere der Kontroll-Gruppe wiesen im Aortenbogen eine durchschnittliche Fläche von  $8,9 \pm 0,4 \text{ mm}^2$  auf. Die Fläche bei den Tieren der Nebivolol-Gruppe war mit  $6,3 \pm 0,4 \text{ mm}^2$  um 29 % geringer. In der Metoprolol-Gruppe war die Plaquefläche mit  $7,9 \pm 0,8 \text{ mm}^2$  um 11 % geringer als in der Kontroll-Gruppe (**Abb. 30**). Die Stenose des Gefäßlumens betrug in der Kontroll-Gruppe  $34 \pm 3 \%$ , in der Nebivolol-Gruppe bei  $30 \pm 1 \%$  und in der Metoprolol-Gruppe  $31 \pm 1 \%$ .

Ein signifikanter Unterschied in der Plauefläche zeigte sich zwischen der Kontroll- und Nebivolol-Gruppe ( $p=0,0068$ ). Die Metoprolol-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von anderen Gruppen. Ein signifikanter Unterschied der Stenose des Gefäßlumens war zwischen den Gruppen nicht feststellbar ( $p=0,2185$ ). Mit Ausnahme der Stenose im Aortenbogensegment IV ( $p=0,0492$ ) konnten in den einzelnen Segmenten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (**Tab. 8**)



**Abb. 30: Plauefläche in den Segmenten des Aortenbogens (AoBo I-IV) und im Mittel aller Segmente (AoBo Mittel)**

Die Plauefläche wurde an 64 EvG-gefärbten Präparaten morphometrisch bestimmt. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  SEM. In der Nebivolol-Gruppe konnte im Mittel aller Segmente eine signifikant kleinere Plauefläche im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden ( $p=0,0068$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den medikamentös behandelten Gruppen sowie zwischen der Kontroll- und Metoprolol-Gruppe war nicht feststellbar.

**Tab. 8:** Plaquefläche und Stenose des Gefäßlumens: Zusammenfassung aller Mittelwerte  $\pm$  SEM in den Segmenten des Aortenbogens

	Kontroll- Gruppe (n=3)	Nebivolol Gruppe (n=8)	Metoprolol Gruppe (n=5)	p-Wert
<b>Plaquefläche (mm<sup>2</sup>)</b>				
AoBo I	7,2 $\pm$ 0,3	5,9 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 1,6	0,5162
AoBo II	9,2 $\pm$ 0,4	7,0 $\pm$ 0,7	9,1 $\pm$ 1,3	0,2077
AoBo III	10,0 $\pm$ 0,6	6,8 $\pm$ 0,8	8,2 $\pm$ 1,7	0,2491
AoBo IV	9,0 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 0,8	7,0 $\pm$ 1,9	0,2385
AoBo Mittel	8,9 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,4	7,9 $\pm$ 0,8	0,0068*
<b>Stenose des Gefäßlumens (%)</b>				
AoBo I	27,1 $\pm$ 4,5	28,6 $\pm$ 1,4	27,3 $\pm$ 4,1	0,9156
AoBo II	31,3 $\pm$ 5,2	29,0 $\pm$ 2,1	30,2 $\pm$ 0,6	0,8215
AoBo III	34,5 $\pm$ 6,2	31,7 $\pm$ 2,1	32,5 $\pm$ 1,6	0,8120
AoBo IV	42,4 $\pm$ 3,1	30,4 $\pm$ 2,4	34,0 $\pm$ 2,9	0,0492*
AoBo Mittel	33,8 $\pm$ 2,7	30,0 $\pm$ 1,0	31,0 $\pm$ 1,3	0,2185

\* signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und der Kontroll-Gruppe

### 3.8.1.2 Aorta thoracalis

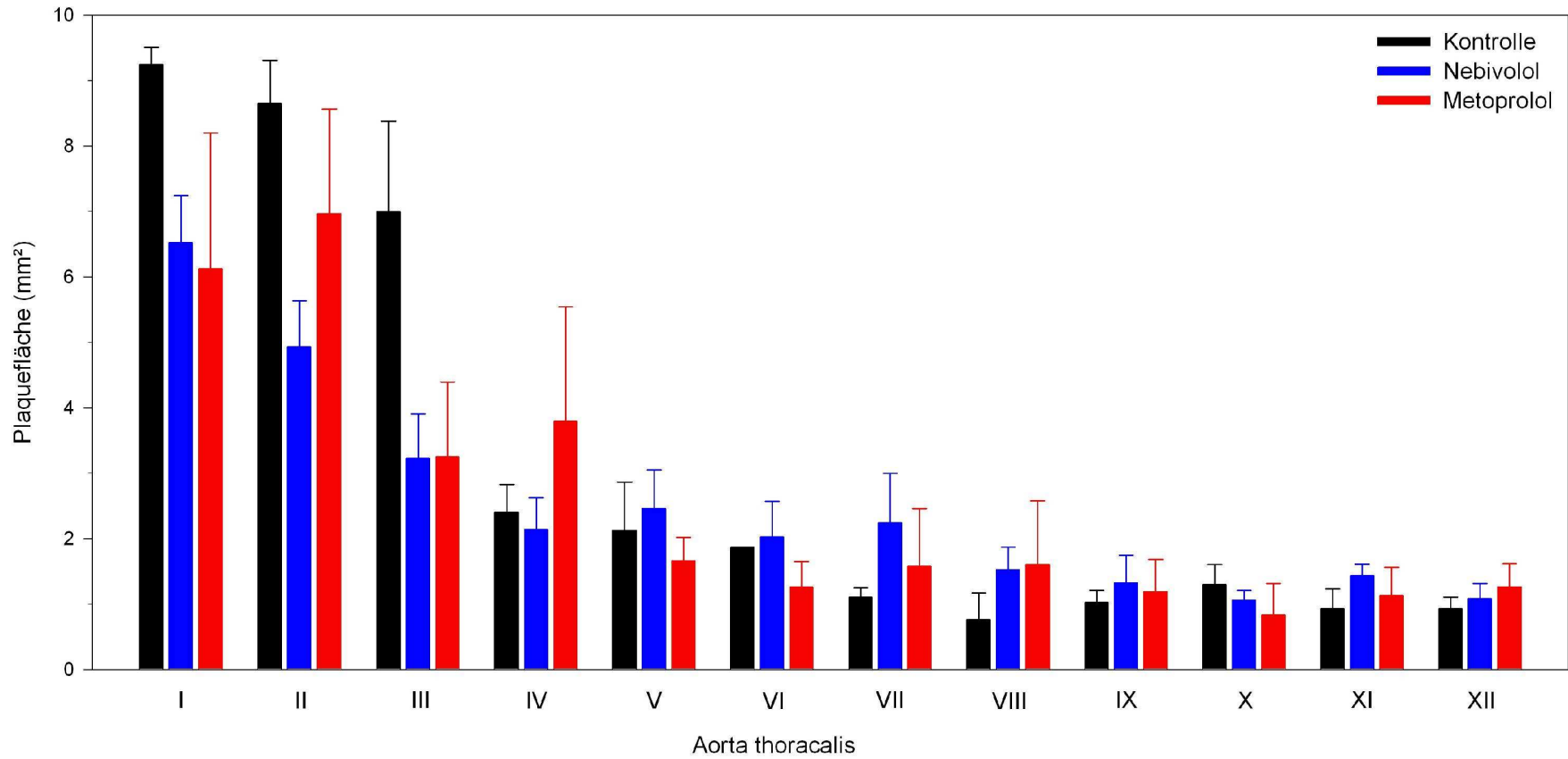
Aus den Werten der zwölf Segmente der Aorta thoracalis wurde je Tier ein Mittelwert gebildet (**Abb. 31**). Durchschnittlich lag die Plaquefläche in der Kontroll-Gruppe bei  $3,3 \pm 0,6$  mm<sup>2</sup>, in der Nebivolol-Gruppe bei  $2,5 \pm 0,2$  mm<sup>2</sup> und in der Metoprolol-Gruppe bei  $2,5 \pm 0,4$  mm<sup>2</sup>. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,3766$ ). Die Stenose des Gefäßlumens betrug in der Kontroll-Gruppe  $20 \pm 2$  %, in der Nebivolol-Gruppe  $19 \pm 1$  % und in der Metoprolol-Gruppe  $19 \pm 2$  ( $p=0,9143$ ).



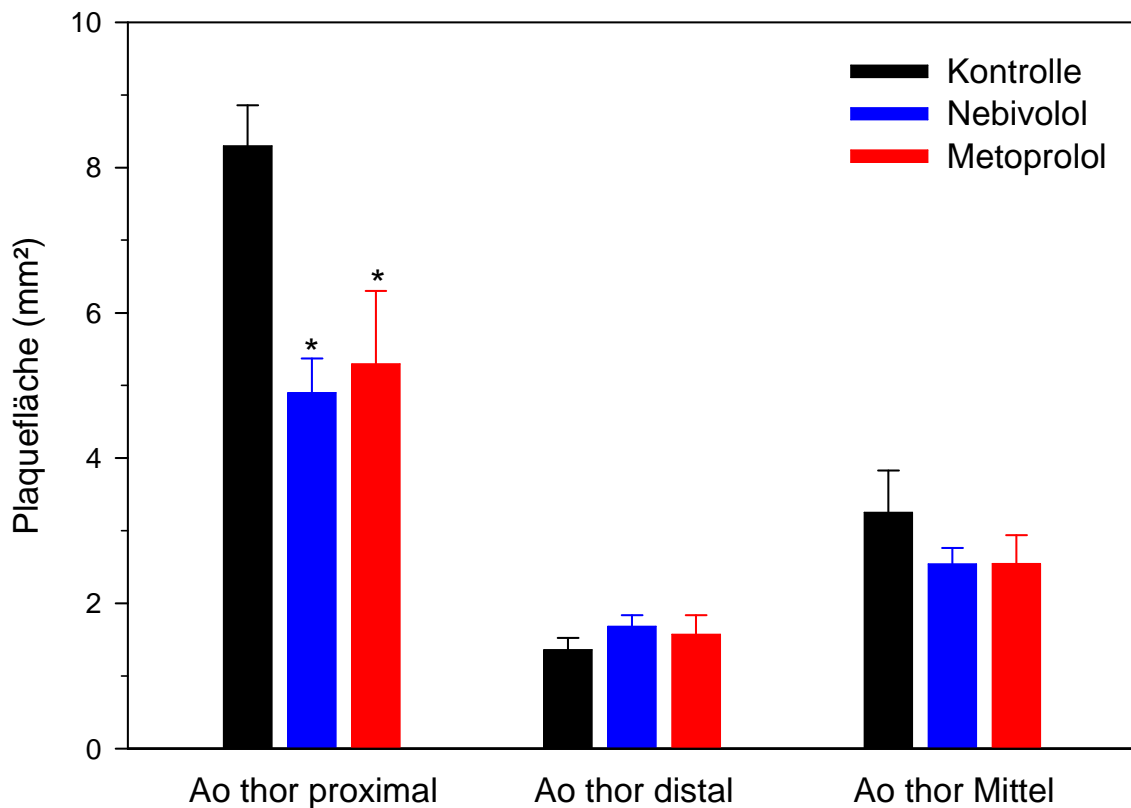
Nach dem Abgang der A. renalis dextra im Segment Ao thor III nahm die mittlere Plaquerfläche vor allem in der Kontroll-Gruppe stark ab (**Abb. 31**). Es wurde deshalb eine weitere Unterteilung in einen proximalen, aortenbogennahen Abschnitt (Ao thor proximal, Segment I-III) und einen distalen Abschnitt (Ao thor distal, Segment IV-XII) vorgenommen.

Im proximalen Abschnitt lag die mittlere Plaquerfläche in der Kontroll-Gruppe bei  $8,3 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ . In der Nebivolol-Gruppe war sie um 41 % kleiner und betrug  $4,9 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ . In der Metoprolol-Gruppe lag sie bei  $5,3 \pm 1,0 \text{ mm}^2$  und war damit um 39 % kleiner als in der Kontroll-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied war zwischen der Nebivolol- und Metoprolol- und der Kontroll-Gruppe vorhanden ( $p=0,0089$ ) (**Abb. 32**). In der Kontroll-Gruppe betrug die Stenose des Gefäßlumens  $39 \pm 1 \%$ , in der Nebivolol-Gruppe lag sie bei  $31 \pm 2 \%$  und in der Metoprolol-Gruppe bei  $31 \pm 3 \%$ . Dieser Unterschied war nicht signifikant ( $p=0,0651$ ).

Die durchschnittliche Plaquerfläche der distalen, aortenbogenfernen Segmente lag in der Kontroll-Gruppe bei  $1,4 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ , in der Nebivolol-Gruppe bei  $1,7 \pm 0,2 \text{ mm}^2$  und in der Metoprolol-Gruppe bei  $1,6 \pm 0,3 \text{ mm}^2$  ( $p=0,5909$ ). Die Stenose des Gefäßlumens betrug im Mittel aller Tiere  $15 \pm 1 \%$ . Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt ( $p=0,6327$ ) (**Tab. 9**).



**Abb. 31:** Plaquetfläche in den zwölf Segmenten der Aorta thoracalis (Ao thor I-XII)



**Abb. 32: Plaquesfläche in den Segmenten der Aorta thoracalis I-III (Ao thor proximal) und IV-XII (Ao thor distal) sowie im Mittel aller Segmente (Ao thor Mittel).**

Die Plaquesfläche wurde an insgesamt 177 EvG-gefärbten Präparaten der Aorta thoracalis morphometrisch bestimmt. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Im Mittel aller Segmente (Ao thor Mittel) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Nach dem Abgang der A. renalis dextra im Segment Ao thor III nahm die mittlere Plaquesfläche vor allem in der Kontroll-Gruppe stark ab, deshalb wurde eine Unterteilung der Segmente in einen proximalen (Ao thor proximal) und distalen Abschnitt (Ao thor distal) vorgenommen. Im proximalen Abschnitt wurde in den medikamentös behandelten Gruppen eine signifikant kleinere Plaquesfläche im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen ( $p=0,0089$ ). In den distal gelegenen Segmenten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

**Tab. 9:** Plaquefläche und Stenose des Gefäßlumens: Zusammenfassung aller Mittelwerte  $\pm$  SEM in den Segmenten der Aorta thoracalis I-III (Ao thor proximal) und IV-XII (Ao thor distal) sowie im Mittel aller Segmente (Ao thor Mittel).

	Kontrolle (n=3)	Nebivolol (n=8)	Metoprolol (n=5)	p-Wert
<b>Plaquefläche (mm<sup>2</sup>)</b>				
Ao thor proximal	8,3 $\pm$ 0,6	4,9 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 1,0	0,0089*
Ao thor distal	1,4 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,3	0,5909
Ao thor Mittel	3,3 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,4	0,3766
<b>Stenose des Gefäßlumens (%)</b>				
Ao thor proximal	38,8 $\pm$ 1,1	30,6 $\pm$ 1,9	31,3 $\pm$ 2,9	0,0651
Ao thor distal	13,0 $\pm$ 1,4	15,1 $\pm$ 1,1	14,6 $\pm$ 1,7	0,6327
Ao thor Mittel	20,1 $\pm$ 2,3	19,3 $\pm$ 1,2	19,0 $\pm$ 1,8	0,9143

\* signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll-Gruppe und den medikamentös behandelten Gruppen

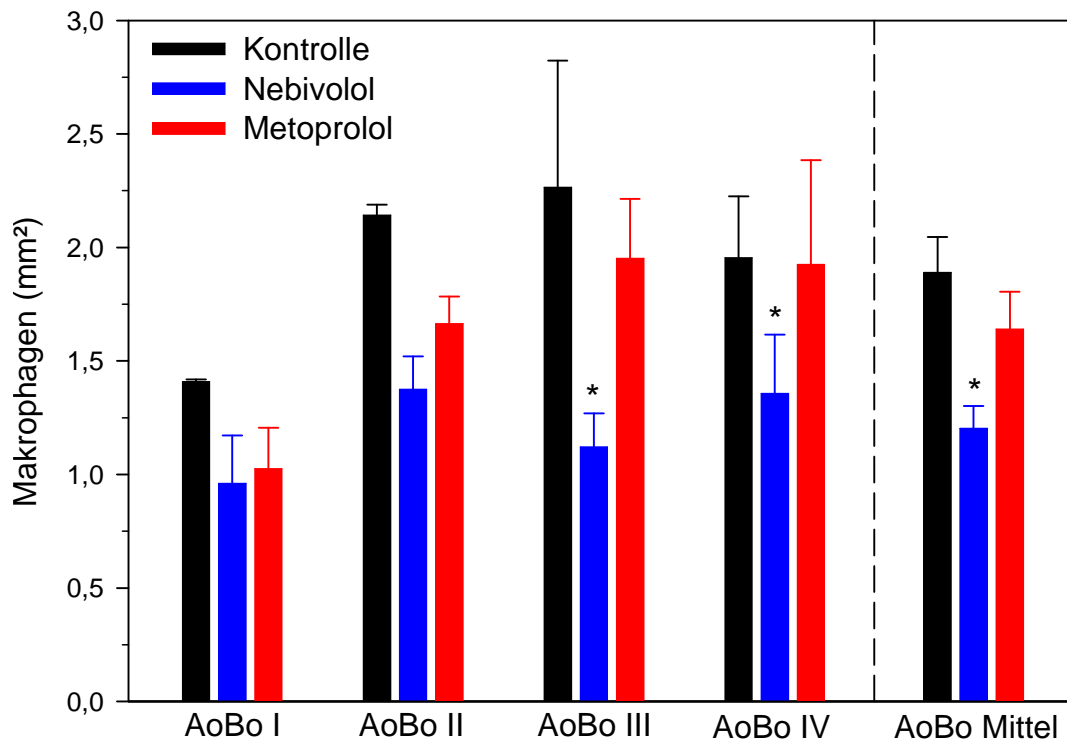
### 3.8.2 Plaquezusammensetzung

#### 3.8.2.1 Makrophagen im Aortenbogen

Die Fläche der Makrophagen lag im Mittel aller Aortenbogensegmente in der Nebivolol-Gruppe bei  $1,2 \pm 0,1$  mm<sup>2</sup> und war gegenüber der Kontroll-Gruppe mit  $1,9 \pm 0,2$  mm<sup>2</sup> und der Metoprolol-Gruppe mit  $1,6 \pm 0,2$  mm<sup>2</sup> signifikant vermindert ( $p=0,0034$ ) (**Abb. 33**, **Tab. 10**, **Abb. 37**).

Im Segment II lag die Fläche der Makrophagen in der Kontroll-Gruppe bei  $2,1 \pm 0,0$  mm<sup>2</sup>, in der Nebivolol-Gruppe bei  $1,4 \pm 0,1$  mm<sup>2</sup> und in der Metoprolol-Gruppe bei  $1,7 \pm 0,1$  mm<sup>2</sup>. Signifikant vermindert war die Fläche in der Nebivolol- gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0482$ ). Auch in Segment III ließ sich bei den Tieren der Nebivolol-Gruppe ( $1,1 \pm 0,1$  mm<sup>2</sup>) eine signifikant

verminderte Fläche der Makrophagen im Vergleich zur Kontroll- ( $2,3 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ ) und zur Metoprolol-Gruppe ( $2,0 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ ) nachweisen ( $p=0,0148$ ) (**Abb. 33**). In den Segmenten AoBo I und AoBo IV konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (**Tab. 10**).



**Abb. 33: Fläche der Makrophagen in den Segmenten des Aortenbogens (AoBo I-IV) und im Mittel aller Segmente (AoBo Mittel)**

Die Fläche der Makrophagen wurde an 61 RAM-11-gefärbten Präparaten bestimmt. Der prozentuale Anteil der Makrophagen wurde dabei in Bezug zur Plaquerfläche gesetzt und daraus die Fläche der Makrophagen berechnet. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  SEM. In der Nebivolol-Gruppe(\*) konnte eine signifikant kleinere Fläche der Makrophagen im Vergleich zur Kontroll- und Metoprolol-Gruppe im Mittel aller Segmente ( $p=0,0034$ ) nachgewiesen werden. In Segment AoBo II ( $p=0,0482$ ) und Segment AoBo III ( $p=0,0148$ ) wurde eine signifikant kleinere Fläche der Nebivolol-Gruppe(\*) im Vergleich zur Kontroll- bzw. zur Kontroll- und Metoprolol-Gruppe festgestellt. Weitere signifikante Unterschiede waren nicht nachweisbar.

**Tab. 10:** Fläche der Makrophagen in den Segmenten des Aortenbogens: Dargestellt ist die Anzahl der Präparate, die Mittelwerte  $\pm$  SEM in den einzelnen Segmenten (AoBo I-IV) und im Mittel aller Segmente (AoBo Mittel) mit Angabe des jeweiligen p-Werts.

	Anzahl	Kontrolle (mm <sup>2</sup> )	Nebivolol (mm <sup>2</sup> )	Metoprolol (mm <sup>2</sup> )	p-Wert
<b>AoBo I</b>	16	1,4 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2	0,4235
<b>AoBo II</b>	14	2,1 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	0,0482*
<b>AoBo III</b>	15	2,3 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,3	0,0148**
<b>AoBo IV</b>	16	2,0 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,5	0,3827
<b>AoBo Mittel</b>	61	1,9 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	0,0034**

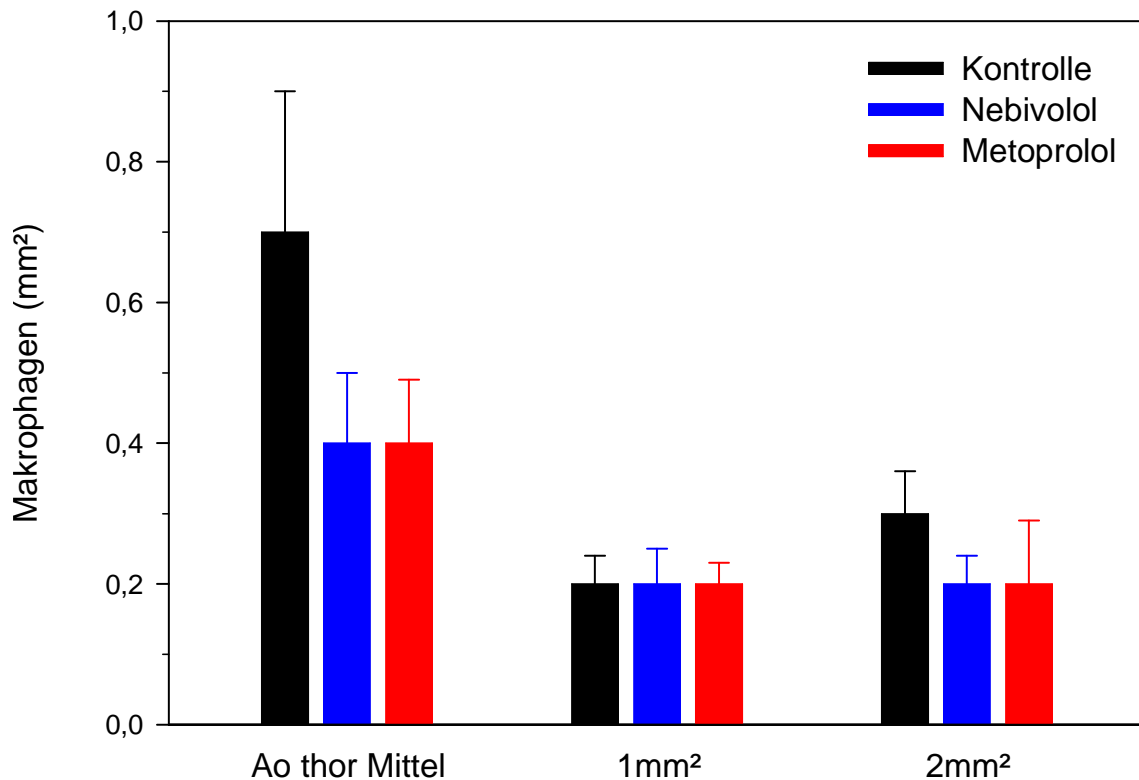
\* signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und der Kontroll-Gruppe

\*\* signifikanter Unterschied wurde der Nebivolol-Gruppe und der Kontroll- und Metoprolol-Gruppe

### 3.8.2.2 Makrophagen in der Aorta thoracalis

In den Segmenten der Aorta thoracalis lag das Mittel der Fläche der Makrophagen in der Kontroll-Gruppe bei  $0,7 \pm 0,2$  mm<sup>2</sup>, in der Nebivolol-Gruppe bei  $0,4 \pm 0,1$  mm<sup>2</sup> und in der Metoprolol-Gruppe bei  $0,4 \pm 0,1$  mm<sup>2</sup>. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht feststellbar ( $p=0,2785$ ).

Auch in den Segmenten der Aorta thoracalis mit 1 mm<sup>2</sup> und 2 mm<sup>2</sup> großen Plaques ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei den 1 mm<sup>2</sup> großen Plaques lag die Fläche der Makrophagen in allen Gruppen bei durchschnittlich  $0,2 \pm 0,04$  mm (p=0,7916). In den 2 mm<sup>2</sup> großen Plaques betrug sie in der Kontroll-Gruppe  $0,3 \pm 0,06$  mm<sup>2</sup>, in den medikamentös behandelten Gruppen lag sie bei durchschnittlich  $0,2 \pm 0,06$  mm<sup>2</sup> (p=0,4581) (**Abb. 34**).



**Abb. 34: Anteil der Makrophagen in Segmenten der Aorta thoracalis II, V und X im Mittel (Ao thor Mittel) und in Segmenten mit 1 mm<sup>2</sup> und 2 mm<sup>2</sup> großen Plaques**

Die Fläche der Makrophagen wurde an 48 RAM-11-gefärbten Präparaten bestimmt. Der prozentuale Anteil der Makrophagen wurde dabei in Bezug zur Plaquerfläche gesetzt und daraus die Fläche der Makrophagen berechnet. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  SEM im Mittel aller gefärbten Segmente und an Segmenten mit 1 mm<sup>2</sup> und 2 mm<sup>2</sup> großen Plaques. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

### 3.8.2.3 Kalzium, Lipide, glatte Muskelzellen, Endothelin-1, Kollagen Typ I und Typ III, NFκB-positive Zellen

Die **Kalzium**-Fläche lag im Mittel aller Tiere bei  $0,07 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ . Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht feststellbar (**Tab. 11, Abb. 37**).

Die Tiere der Kontroll-Gruppe zeigten im Segment AoBo I eine **Lipid**-Fläche von  $0,7 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ . Bei den Tieren der Nebivolol- ( $0,4 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ ) und Metoprolol-Gruppe ( $0,5 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ) war sie geringer (**Tab. 11, Abb. 37**). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch nicht feststellbar.

Im Segment V der Aorta thoracalis lag die durchschnittliche Fläche der **Lipide** bei  $0,19 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ . Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar (**Tab. 11**).

Im Mittel aller Tiere lag die Fläche der **glatten Muskelzellen** bei  $0,4 \pm 0,1 \text{ mm}^2$  (**Tab.11, Abb. 38**). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden.

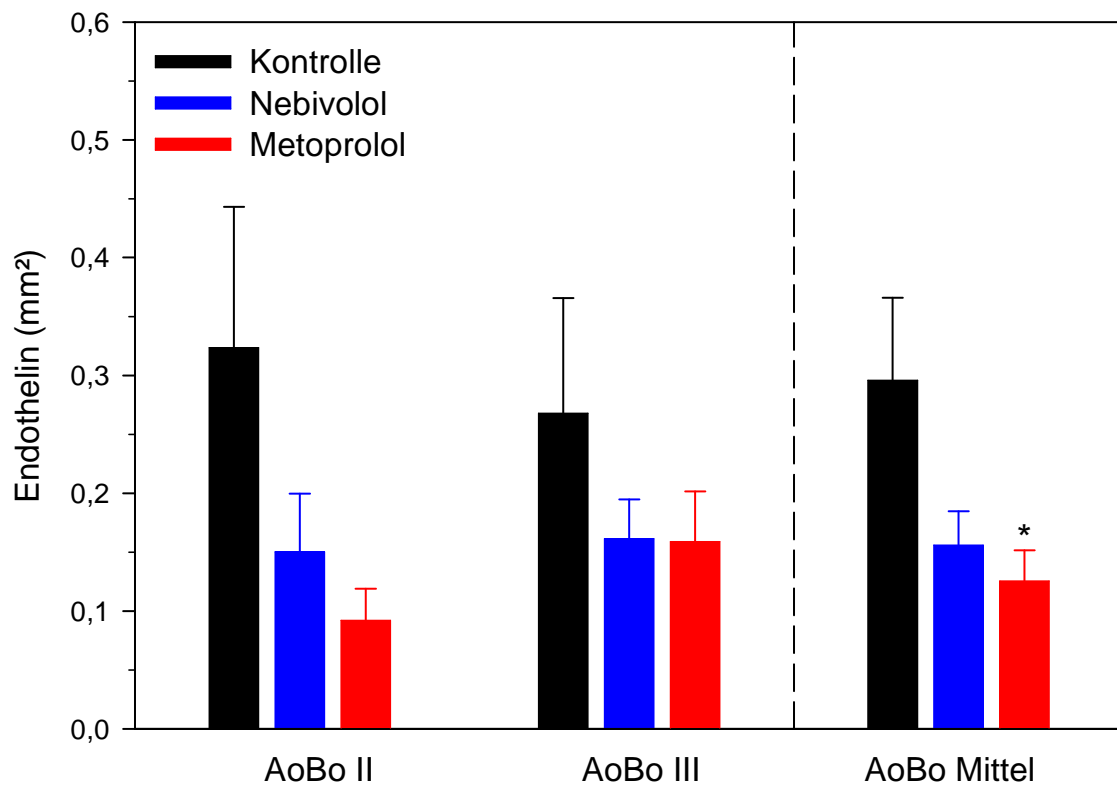
Die Metoprolol-Gruppe zeigte im Mittel der beiden Segmente AoBo II und AoBo III eine signifikant kleinere Fläche von **Endothelin-1** ( $0,13 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ ) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ( $0,30 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ ) ( $p=0,0256$ ). Ein signifikanter Unterschied zur Nebivolol-Gruppe ( $0,16 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ ) war nicht erkennbar (**Abb. 35, Tab. 11, Abb. 38**).

Die Fläche von **Kollagen Typ I** lag im Mittel aller Tiere bei  $0,52 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ . Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht feststellbar (**Tab. 11, Abb. 38**).

Die medikamentös behandelten Gruppen zeigten mit  $0,09 \pm 0,02 \text{ mm}^2$  in der Nebivolol- und  $0,07 \pm 0,02 \text{ mm}^2$  in der Metoprolol-Gruppe eine signifikant verminderte Fläche von **Kollagen Typ III** im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit  $0,20 \pm 0,04 \text{ mm}^2$  ( $p=0,0018$ ) (**Abb. 36, Tab. 11, Abb. 39**).

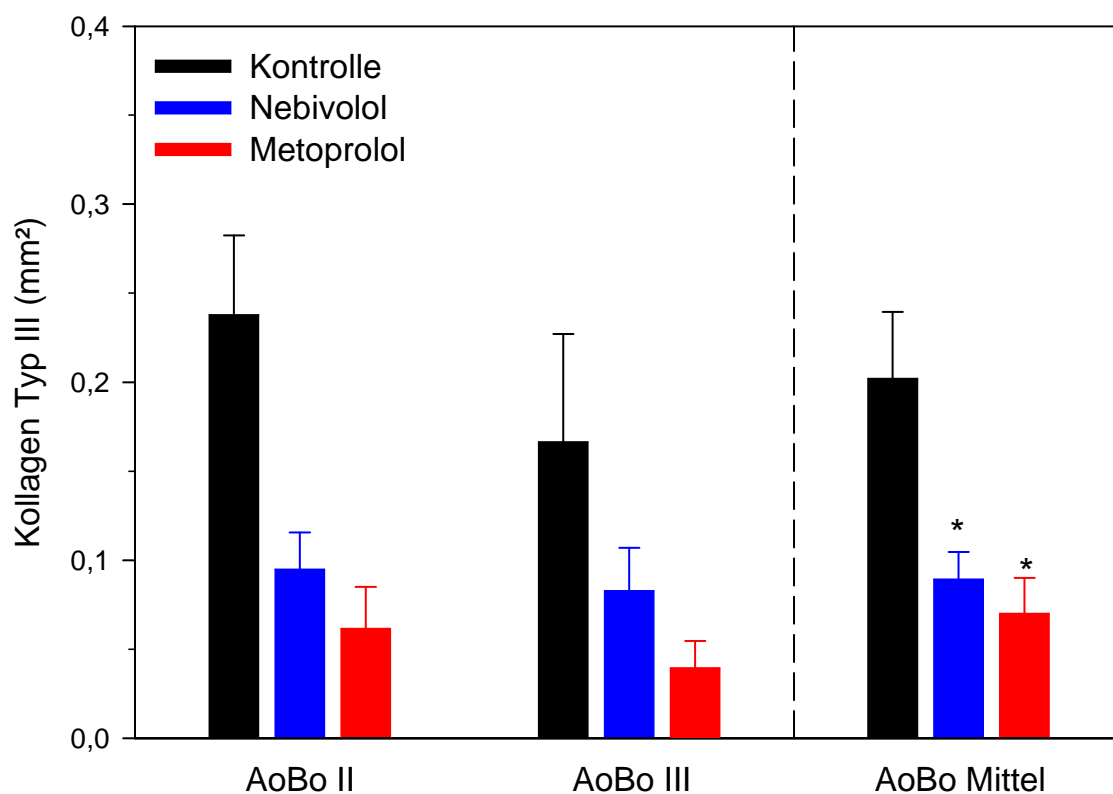


Die Fläche an **NFκB-positiven Zellen** lag durchschnittlich bei  $4 \cdot 10^{-5} \pm <0,1 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2$  (Tab. 11, Abb. 39). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht feststellbar.



**Abb. 35: Fläche von Endothelin-1 in den Segmenten des Aortenbogens (AoBo II-III) und im Mittel der Präparate (AoBo Mittel)**

Der prozentuale Anteil der jeweiligen Plauebestandteile wurde mittels digitaler Auswertung bestimmt und dieser in Bezug zur Plauefläche gesetzt. Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Metoprolol-Gruppe(\*) zeigte im Mittel aller Segmente eine signifikant kleinere Fläche von Endothelin-1 im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ( $p=0,0256$ ). Weitere signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt.



**Abb. 36: Fläche von Kollagen Typ III in den Segmenten des Aortenbogens (AoBo II-III) und im Mittel der Präparate (AoBo Mittel).**

Der prozentuale Anteil der jeweiligen Plauebestandteile wurde mittels digitaler Auswertung bestimmt und dieser in Bezug zur Plauefläche gesetzt. Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM. In den medikamentös behandelten Gruppen(\*) konnte im Mittel aller Segmente eine signifikant kleinere Fläche an Kollagen Typ III ( $p=0,0018$ ) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. Weitere signifikanten Unterschiede wurden nicht festgestellt.

**Tab. 11:** Fläche der Plauebestandteile im Mittel der Segmente AoBo II und III (AoBo I und Ao thor V für Lipide).

Der prozentuale Anteil der jeweiligen Plauebestandteile wurde dabei in Bezug zur Plauefläche gesetzt und daraus die Fläche berechnet. Gezeigt wird die Gesamtzahl der Präparate je Gruppe sowie der jeweilige Mittelwert  $\pm$  SEM (mm<sup>2</sup>) mit Angabe des p-Werts.

	Anzahl	Kontroll-Gruppe	Nebivolol-Gruppe	Metoprolol-Gruppe	p-Wert
<b>Kalzium</b>	32	0,15 $\pm$ 0,10	0,06 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,02	0,2523
<b>Lipide AoBo I</b>	15	0,67 $\pm$ 0,23	0,39 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,21	0,5105
<b>Lipide Ao thor V</b>	13	0,18 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,08	0,2934
<b>glatte Muskelzellen</b>	32	0,54 $\pm$ 0,18	0,39 $\pm$ 0,08	0,45 $\pm$ 0,05	0,5824
<b>Endothelin-1</b>	32	0,30 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,03	0,0256*
<b>Kollagen Typ I</b>	32	0,59 $\pm$ 0,14	0,39 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,16	0,1970
<b>Kollagen Typ III</b>	30	0,20 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,02	0,0018* *
<b>NFκB (10<sup>-4</sup>)</b>	31	3,9 $\pm$ 1,0	3,9 $\pm$ 1,0	3,6 $\pm$ 1,0	0,4919

\* signifikanter Unterschied zwischen der Metoprolol- und der Kontroll-Gruppe

\*\* signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und den medikamentös behandelten Gruppen

### 3.8.2.4 Proliferationsrate, Zelldichte und Gesamtzellzahl

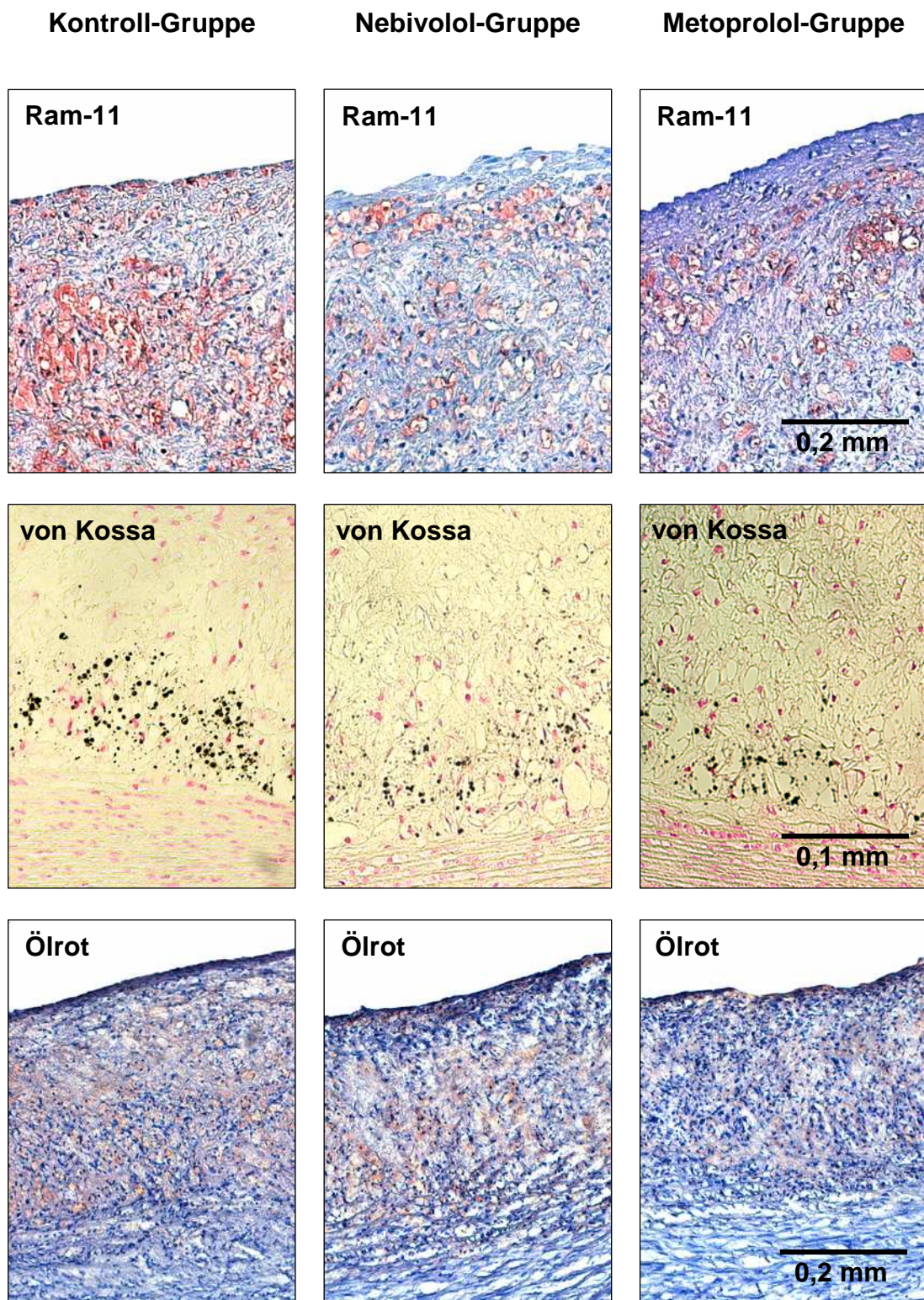
Bei der Proliferationsrate lag die Nebivolol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe um 13 % und die Metoprolol-Gruppe um 28 % höher. Die Zelldichte war mit  $2101 \pm 89$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  in der Metoprolol-Gruppe am höchsten, in der Nebivolol-Gruppe lag sie um 5 % und in der Kontroll-Gruppe um 6 % niedriger (**Tab. 12, Abb. 39**). Die Gruppen unterschieden sich in keinem der Parameter signifikant voneinander.

Die Gesamtzellzahl lag in der Kontroll-Gruppe bei  $19,1 \pm 0,14$  ( $\cdot 10^3$ ) Zellen und war im Vergleich zur Nebivolol-Gruppe ( $13,7 \pm 0,10$  ( $\cdot 10^3$ ) Zellen) signifikant erhöht ( $p=0,0190$ ). Die Gesamtzellzahl in der Metoprolol-Gruppe lag bei  $17,7 \pm 0,17$  ( $\cdot 10^3$ ) Zellen und unterschied sich nicht signifikant von den anderen Gruppen (**Tab. 12**).

**Tab. 12:** Proliferationsrate, Zelldichte und Gesamtzellzahl der Plaques im Mittel der Aortenbogensegmente AoBo II und AoBo III.  
Gezeigt sind Gesamtzahl der Präparat und die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM mit Angabe des p-Werts.

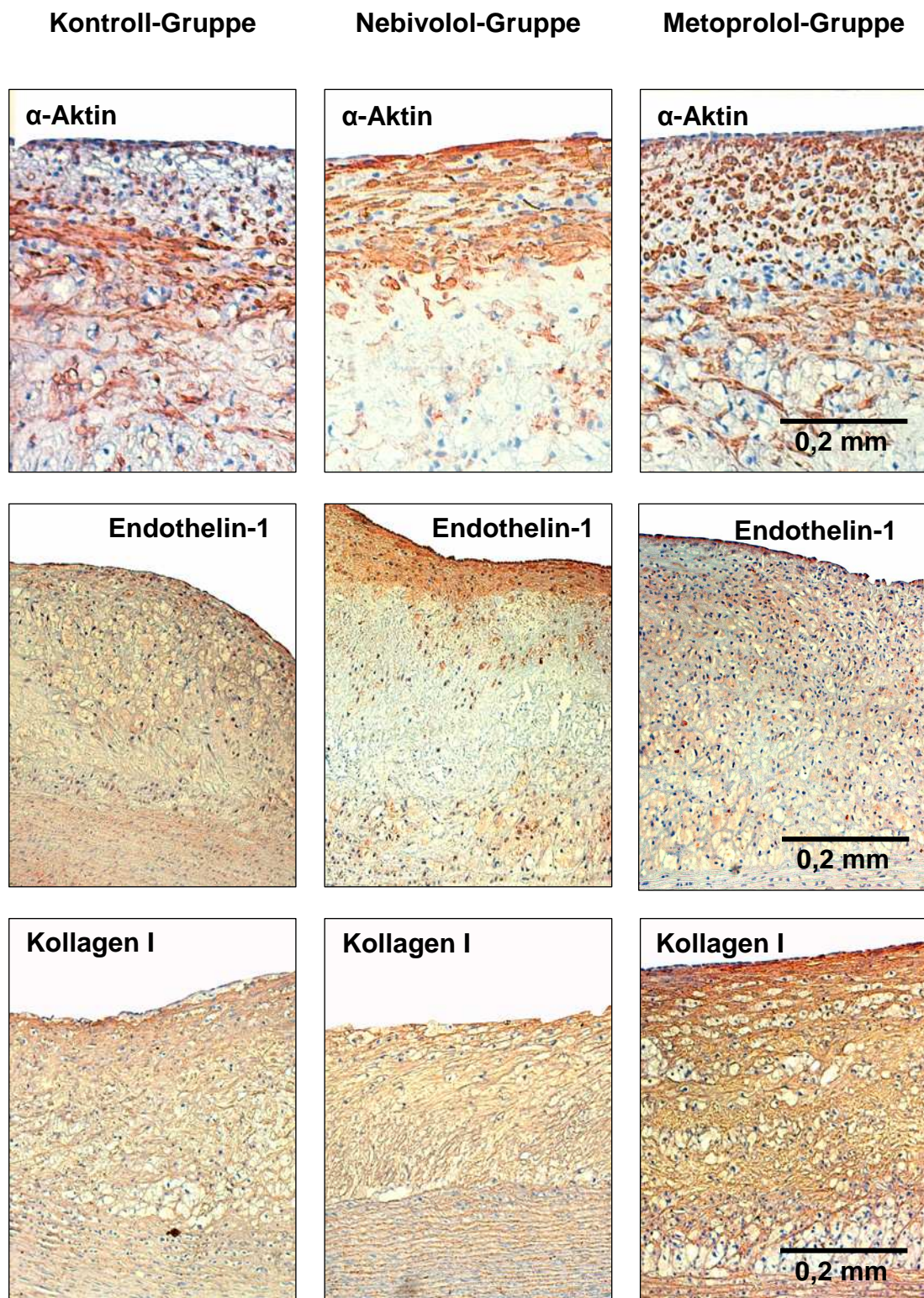
	Anzahl	Kontroll-Gruppe	Nebivolol-Gruppe	Metoprolol-Gruppe	p-Wert
<b>Proliferations-rate (%)</b>	32	$16,5 \pm 2,0$	$18,7 \pm 2,0$	$21,1 \pm 2,2$	0,4559
<b>Zelldichte (1/<math>\text{mm}^2</math>)</b>	32	$1983 \pm 89$	$1995 \pm 67$	$2101 \pm 83$	0,5527
<b>Zellzahl (<math>10^3</math>)</b>	32	$19,1 \pm 0,14$	$13,7 \pm 0,10$	$17,7 \pm 0,17$	0,0190 *

\* signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und der Kontroll-Gruppe



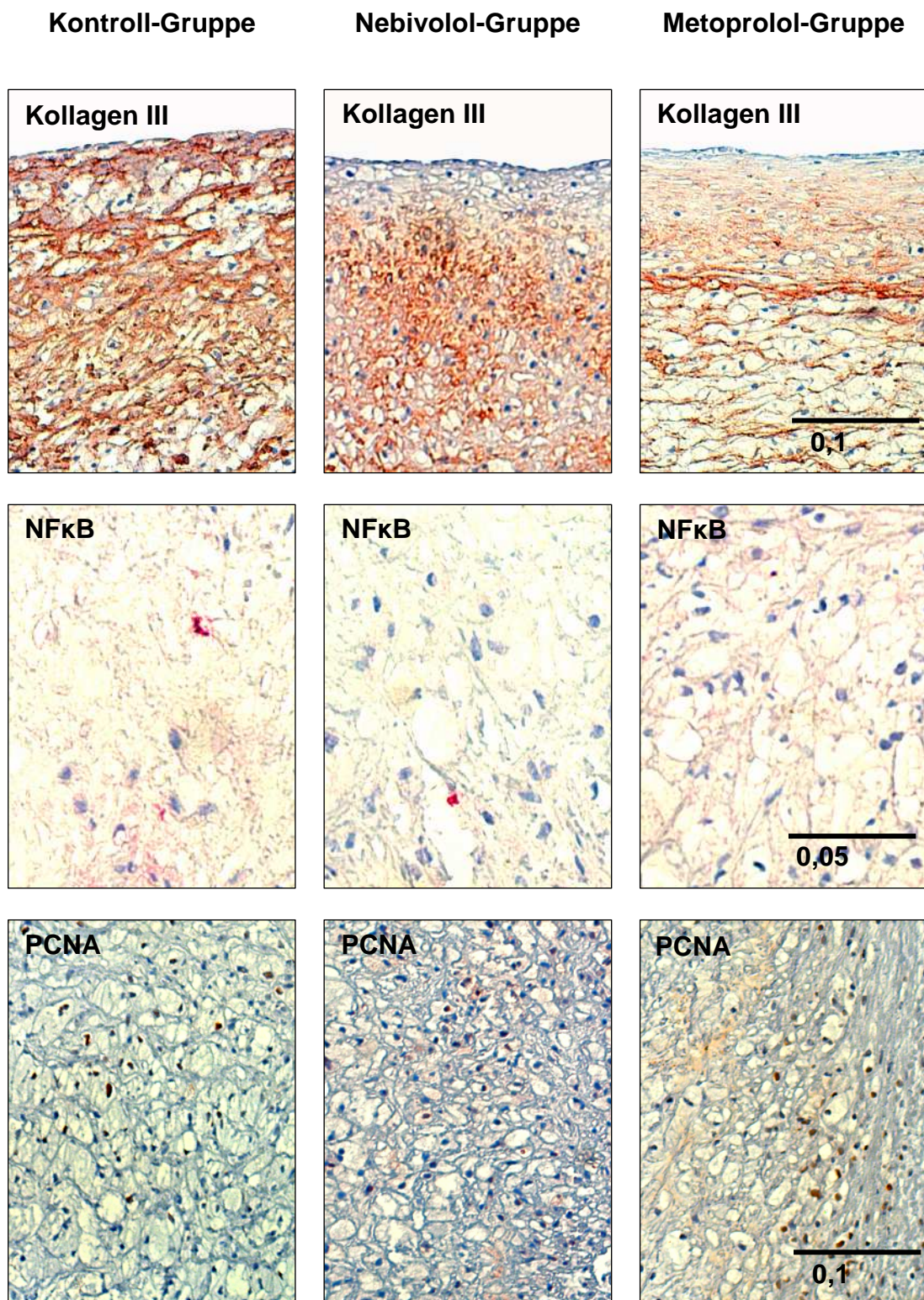
**Abb. 37:** Histologische bzw. immunohistochemische Anfärbung von Makrophagen (Ram-11), Kalzium (von Kossa) und Lipiden (Ölrot) in Segmenten des Aortenbogens der drei Versuchsgruppen





**Abb. 38:** Immunhistochemische Anfärbung von glatten Muskelzellen ( $\alpha$ -Aktin), Endothelin-1 und Kollagen Typ I (Kollagen I) in Segmenten des Aortenbogens der drei Versuchsgruppen





**Abb. 39:** Immunhistochemische Anfärbung von Kollagen Typ III (Kollagen III), NFκB- und PCNA-positiven Zellen (PCNA) in Segmenten des Aortenbogens der drei Versuchsgruppen

### 3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Über die Gesamtversuchsdauer von 105 Tagen wurden acht von 24 Tieren wegen Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes vorzeitig aus dem Versuch genommen, fünf aus der Kontroll- und drei aus der Metoprolol-Gruppe. Das **Überleben** der Tiere unterschied sich zwischen den Gruppen signifikant voneinander ( $p=0,0473$ ). Im Einzelvergleich war ein Unterschied zwischen der Nebivolol-Gruppe der Kontroll-Gruppe feststellbar ( $p=0,0097$ ).

Retrospektiv betrachtet lassen sich zwischen den aus dem Versuch genommenen Tieren („Nicht-Überlebende“) und den „Überlebenden“ bei den Parametern Körpergewicht, Futteraufnahme und Herzfrequenz zum Zeitpunkt Woche -2 keine signifikanten Unterschiede feststellen. Auch bei den Blutparametern waren keine wesentlichen Unterschiede feststellbar. Die Gruppen wurden also homogen randomisiert, ein vorzeitiges Ausscheiden war nicht vorhersehbar. Da die Tiere aus der Gruppe der Nicht-Überlebenden eine signifikant kleinere Plaqueläche ( $p=0,0062$ ) bzw. Stenose des Gefäßlumens ( $p<0,0001$ ) aller Aortenbogensegmente aufwiesen, wurden sie von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Das **Körpergewicht** nahm bei allen Tieren in den ersten fünf Wochen kontinuierlich zu und blieb ab Woche 6 mit etwa 1300 g Gewichtsunterschied zum Versuchsbeginn bis zum Versuchsende konstant. Lediglich die Tiere der Kontroll-Gruppe hatten geringe Gewichtsschwankungen von Woche 8 bis 12 und wogen zu Versuchsende etwas weniger als die Tiere der medikamentös behandelten Gruppen. Die **Futter- und Cholesterinaufnahme** war in allen Gruppen vergleichbar. Nach Beimengung von Cholesterin in Woche 0 nahm die Futteraufnahme und entsprechend die Cholesterinaufnahme bis zur Dosisreduktion in Woche 8 ab und stieg danach wieder etwas an. Auch bei den Medikamenten gab es im Aufnahmeverhalten zwischen den Gruppen Nebivolol und Metoprolol keinen Unterschied.

Die **Herzfrequenz** von anfänglich 274 /min im Mittel aller Tiere sank in den medikamentös behandelten Gruppen im Vergleich zu der nicht behandelten



Kontroll-Gruppe bis etwa Woche 2 signifikant ( $p=0,0001$ ) um etwa 16 % ab und blieb danach konstant. Die Herzfrequenz der Tiere der Kontroll-Gruppe war mit 292 / min über die Dauer des Versuches stabil.

Bei den **Organgewichten** waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Die Lebergewicht betrug bei Entnahme durchschnittlich 161,4 g, das Milzgewicht 5,4 g.

Die Plasmalipide nahmen während der Dauer des Versuches infolge der Cholesterindiät stark zu. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede in der AUC zwischen den Gruppen. Die **Gesamtcholesterin**-Konzentration stieg von durchschnittlich etwa 64 mg/dl während der Vorfütterungsphase auf 2176 mg/dl während des Hauptversuches an. Auch die **Triglyzerid**-Konzentration stieg von anfänglich etwa 96 mg/dl auf durchschnittlich 113 mg/dl in Woche 6 an.

Die Konzentrationen der Plasmalipoproteine wurden in Woche 0 und in Woche 12 ermittelt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden. Die **HDL**-Cholesterin-Konzentration nahm von durchschnittlich 19 mg/dl in Woche 0 um 73 % in der Kontroll-Gruppe, um 56 % in der Nebivolol-Gruppe und um 55 % in der Metoprolol-Gruppe ab. Die **VLDL**-Cholesterin-Konzentration nahm im Mittel aller Tiere von etwa 8 mg/dl auf 1121 mg/dl zu. Die **LDL**-Cholesterin-Konzentration lag in Woche 0 bei durchschnittlich 14 mg/dl und nahm auf etwa 757 mg/dl zu.

Beim **Kleinen Blutbild** waren bei allen Tieren Abnahmen bei der Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobin und MCV sowie Zunahmen der Leukozyten- und Thrombozytenzahl, MCH und MCHC festzustellen. Bei mehreren Parametern gab es signifikante Unterschiede in der AUC zwischen den Gruppen (**Tab. 15**, Seite 138): die **Erythrozytenzahl** verringerte sich von anfangs 5,7 Mio/ $\mu$ l im Mittel in der Kontroll-Gruppe um 36 % und in den medikamentös behandelten Gruppen um jeweils 30 %. Signifikant war der Unterschied zwischen der Kontroll- und der Metoprolol-Gruppe ( $p=0,0066$ ). Der **Hämatokrit** sank von durchschnittlich 38 % bei Versuchsbeginn auf 23 % in der Kontroll-, 26 % in der Nebivolol- und 27 % in der Metoprolol-Gruppe

( $p=0,0499$ ). In der AUC unterschieden sich die Gruppen im Anschlussstest an die Oneway-ANOVA jedoch nicht signifikant voneinander. Das **MCH** stieg in allen drei Gruppen von 21 pg in Woche -2 auf durchschnittlich 25 pg in Woche 12 an, dabei unterschied sich die Kontroll- signifikant von der Metoprolol-Gruppe ( $p=0,0206$ ). Die Zahl der **Leukozyten** lag bei Versuchsbeginn bei durchschnittlich ca. 6628  $1/\mu\text{l}$ . Im Verlauf stieg sie in der Kontroll-Gruppe um 265 % und in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe um 98 % bzw. 92 %. Die Kontroll-Gruppe ist in der AUC der Leukozyten signifikant erhöht gegenüber der Nebivolol-Gruppe ( $p=0,0322$ ).

Als Zeichen einer Leber- und Pankreasschädigung entwickelten die Tiere im Lauf des Versuches erhöhte **Gesamt-Bilirubin-**, **GOT-**, **GPT-**,  **$\gamma$ -GT** und Lipase-Werte mit Maximalwerten um Woche 8. Signifikante Unterschiede fanden sich bei der **Lipase**: von durchschnittlich 83 U/l in Woche -2 stieg die Lipasekonzentration in der Kontroll-Gruppe auf 1312 U/l, in der Nebivolol-Gruppe auf 696 U/l und in der Metoprolol-Gruppe auf 856 U/l. Die Kontroll-Gruppe unterschied sich signifikant von der Nebivolol-Gruppe ( $p=0,0182$ ).

In der Real-time-RT-PCR der Karotiden zeigte sich bei der Expression von **Kollagen-Typ-I**-mRNA ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Nebivolol-Gruppe ( $p=0,0374$ ), in der Nebivolol-Gruppe war Kollagen-Typ-I um 54 % geringer exprimiert. **Kollagen-Typ-VIII**-mRNA wurde in den drei Gruppen nicht signifikant unterschiedlich exprimiert. Die Expression von **VCAM-1**-mRNA war in den medikamentös behandelten Gruppen mit 43 % bei Nebivolol und 36 % bei Metoprolol signifikant reduziert gegenüber der Kontroll-Gruppe (100 %) ( $p=0,0017$ ). **PDGF- $\beta$** -mRNA wurde in der Nebivolol- zu 62 % und zu 42 % in der Metoprolol-Gruppe gegenüber 144 % in der Kontroll-Gruppe exprimiert und war in den medikamentös behandelten Gruppen gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt ( $p<0,0001$ ). Auch die Expression von **VEGF**-mRNA war in den medikamentös behandelten Gruppen mit 56 % und 57 % signifikant erniedrigt gegenüber der Kontroll-Gruppe mit 142 % ( $p=0,0019$ ). Die **bFGF**-mRNA wurde in den Karotiden der medikamentös

behandelten Gruppen mit ca. 63 % um etwa die Hälfte geringer als in den Karotiden der Kontroll-Gruppe exprimiert. Die Kontroll-Gruppe unterschied sich somit signifikant von den mit Betablocker behandelten Gruppen ( $p < 0,0001$ ). In der Expression von **MCP-1**-mRNA ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen.

Auch im ELISA war in der Konzentration von **MCP-1** im Serum der Kaninchen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar.

In der Größe der **Plauefläche** in den vier einzelnen Segmenten des **Aortenbogens** zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Im Mittel aller Aortenbogensegmente unterschied sich jedoch die Nebivolol-Gruppe mit einer 29 % geringeren Plauefläche signifikant von der Kontroll-Gruppe ( $p = 0,0068$ ). In der **Stenose des Gefäßlumens** gab es in den Aortenbogensegmenten außer im Segment IV ( $p = 0,0492$ ) keine signifikanten Unterschiede.

In der **Aorta thoracalis** waren bei Betrachtung der zwölf Einzelsegmente keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Plauefläche und Stenose des Gefäßlumens feststellbar. Nach Unterteilung der Segmente in einen aortenbogennahen, proximalen (Ao thor proximal, Segment I-III) und einen aortenbogenfernen, distalen Abschnitt (Ao thor distal, Segment IV-XII) fand sich im proximalen Abschnitt mit 41 % und 39 % eine signifikante Verminderung der Plauefläche der medikamentös behandelten Gruppen gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p = 0,0089$ ). Bei der Stenose des Gefäßlumens sowie im distalen Abschnitt der Aorta thoracalis waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar.

Die Fläche der **Makrophagen** im **Aortenbogen** war in der Nebivolol-Gruppe im Mittel aller vier Segmente mit durchschnittlich  $1,2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$  signifikant erniedrigt im Vergleich zu der Kontroll- ( $1,9 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ) und der Metoprolol-Gruppe ( $1,6 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ) ( $p = 0,0034$ ). Vergleicht man die Gruppen untereinander bezüglich der einzelnen Segmente des Aortenbogens, so lässt sich ein signifikant erniedrigter Wert der Makrophagen-Fläche der Nebivolol-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe im Aortenbogensegment II ( $p = 0,0482$ ) und

gegenüber der Kontroll- und Metoprolol-Gruppe im Segment III ( $p=0,0148$ ) feststellen. In den Aortenbogensegmenten I und IV waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar.

Die **Makrophagen**-Fläche in der **Aorta thoracalis** war weder im Mittel der einzelnen Segmente noch in den Segmenten mit 1 mm<sup>2</sup> und 2 mm<sup>2</sup> großen Plaques signifikant unterschiedlich zwischen den drei Versuchsgruppen.

Bei den Flächen der Plaquebestandteilen **Kalzium**, **glatte Muskelzellen**, **Kollagen Typ I** und **NFκB-positiven Zellen** in den Aortenbogensegmenten II und III sowie bei der Fläche der **Lipide** im Aortenbogensegment I und im Segment Aorta thoracalis V waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Die **Endothelin-1**-positive Fläche war mit  $0,13 \pm 0,03$  mm<sup>2</sup> in der Metoprolol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit  $0,30 \pm 0,07$  mm<sup>2</sup> signifikant erniedrigt ( $p=0,0256$ ). Die Nebivolol-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von den anderen Gruppen. Die Fläche an **Kollagen Typ III** war bei den medikamentös behandelten Gruppen mit durchschnittlich  $0,08 \pm 0,01$  mm<sup>2</sup> signifikant erniedrigt gegenüber der Kontroll-Gruppe mit einer Fläche von  $0,20 \pm 0,04$  mm<sup>2</sup> ( $p=0,0018$ ).

Die **Proliferationsrate** und die **Zelldichte** in den Aortenbogensegmenten II und III unterschieden sich nicht signifikant voneinander zwischen den Versuchsgruppen. Die mittlere **Gesamtzellzahl** in den Plaqueflächen der Segmente II und III des Aortenbogens war in der Nebivolol-Gruppe mit  $13,7 \pm 0,10$  (\*10<sup>3</sup>) signifikant niedriger als die Zellzahl in der Kontroll-Gruppe mit  $19,1 \pm 0,14$  (\*10<sup>3</sup>) ( $p=0,0190$ ). Die Metoprolol-Gruppe unterschied sich in der Gesamtzellzahl nicht signifikant von den anderen Gruppen.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Literaturübersicht**

#### **4.1.1 Atherosklerose**

##### **4.1.1.1 Bedeutung und Definition**

Die Atherosklerose ist die Hauptursache bedeutender Herzkreislauf-erkrankungen wie die Koronaren Herzkrankheit (KHK), dem Myokardinfarkt oder der pAVK der unterem Extremität und der zerebrovaskulären Erkrankungen.<sup>5</sup> Diese sind weltweit (30 %) und insbesondere in westlichen Industrienationen wie Deutschland (44,2 %) an erster Stelle der Todesursachenstatistik.<sup>1,3</sup>

Unter Atherosklerose versteht man wörtlich übersetzt die bindegewebige Verhärtung der Schlagadern. Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) definierte sie 1959 als eine variable Kombination von Intimaveränderungen mit fokaler Akkumulation von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutablagerungsprodukten, fibrösem Gewebe und Kalziumablagerung mit Veränderungen der Media in großen und mittleren, elastischen und muskulären Arterien.<sup>24</sup> Viele Autoren betrachteten den Prozess der Atherogenese hauptsächlich als Ansammlung von Lipiden. Die Hypercholesterinämie als Ursache der Atherosklerose dominierte als Hypothese bis in die 1970er Jahre.<sup>25</sup> Doch obwohl man neue pharmakologische Substanzen zur Reduktion der Plasmacholesterinspiegel einsetzte, blieben kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache in den USA, Europa und großen Teilen Asiens.<sup>4</sup> Selbst hochwirksame cholesterinsenkende Therapien konnten koronare Ereignisse um bestenfalls ein Drittel innerhalb einer fünfjährigen Behandlungsphase reduzieren.<sup>25</sup> Ross<sup>4</sup> postulierte, dass die Atherosklerose ein Wechselspiel aus hochspezifischen zellulären und molekularen Reaktionen sei und als inflammatorische Erkrankung bezeichnet werden sollte. Er stellte die „Response-to-injury“ Hypothese auf,<sup>26</sup> die besagt, dass die Verletzung des Gefäßendothels der erste Schritt in der Entstehung von Atherosklerose ist.

Atherosklerotische Läsionen, sogenannte Atherome, sind fokale, asymmetrische Verdickungen der innersten Arterienwand, der Intima. Sie bestehen aus verschiedenen Zellarten, fibrösem Gewebe und Lipiden. Inflammatorische und immunologische Zellen aus der Blutbahn stellen einen bedeutenden Teil des Atheroms dar, weitere Bestandteile sind vaskuläres Endothel und glatte Muskelzellen.<sup>20</sup> Dem Atherom gehen sogenannte fatty streaks voraus, eine Ansammlung von lipid-gefüllten Zellen, meist Makrophagen und wenige T-Zellen.<sup>27</sup> Fatty streaks kommen vor allem bei jungen Menschen vor, sind asymptomatisch und prinzipiell reversibel, sie können sich aber auch zu Atheromen weiterentwickeln.<sup>20</sup>

Im Zentrum eines Atheroms bilden Schaumzellen, das sind fettgefüllte Makrophagen oder glatte Muskelzellen, und extrazelluläre Lipidtropfen eine Kernregion, die mit einer Kappe aus glatten Muskelzellen<sup>28</sup> und kollagenreichem Material vom Blutstrom abgegrenzt ist. T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen wandern in die Läsion ein und finden sich hauptsächlich im Randbereich, der Schulterregion, von wo aus das Atherom wächst.<sup>29,28,30</sup>

Im Falle einer Plaqueruptur oder endothelialen Erosion wird prothrombotisches Material aus dem Kern eines Atheroms dem Blut ausgesetzt und es kommt über Bindung von Faktor VIIa und folglich Stimulation des extrinsischen Gerinnungssystems zur Formation eines Thrombus.<sup>20,31</sup> Ist dieser groß genug eine Arterie zu blockieren, kommt es beispielsweise im Falle der Herzkranzgefäße zum Myokardinfarkt. Plaquerupturen treten vor allem an Stellen auf, an denen die fibröse Kappe dünn und teilweise zerstört ist und wo aktivierte Immunzellen vorhanden sind.<sup>32</sup> Diese Immunzellen sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine, proteolytische Enzyme und prothrombotische Faktoren zu produzieren, die die Kappe schwächen und die eine stabile Plaque zu einer vulnerablen, rupturgefährdeten Plaque verändern.<sup>20</sup>

Bevorzugte Manifestations- und Komplikationsorte der Atherosklerose sind Herz, Gehirn und die Extremitäten versorgenden Arterien.<sup>4,33</sup> In experimentellen und autopsischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass athero-

sklerotische Läsionen zuerst an Gefäßabgängen und -bifurkationen auftreten, insbesondere in den außen liegenden Wandabschnitten, da dort eine besondere Wirbelbildung und Beanspruchung durch Zug- und Scherkräfte vorherrscht.<sup>25,33</sup>

Es sind verschiedene Risikofaktoren bekannt, die das Auftreten atherosklerotisch bedingter Erkrankungen begünstigen: Alter, männliches Geschlecht, persönliche und familiäre kardiale Vorerkrankungen sind nicht beeinflussbare Faktoren. Hypercholesterinämie, Hypertonie sowie Nikotinabusus sind die wichtigsten beeinflussbaren Parameter.<sup>34</sup> Ergebnisse aus prospektiven Kohortenstudien und tierexperimentellen Versuchen haben gezeigt, dass das Gesamtcholesterin bzw. das LDL-Cholesterin der wichtigste Risikofaktor der KHK ist.<sup>35,36</sup> Neben diesem klassischen Risikofaktor werden heute zahlreiche andere Faktoren diskutiert, beispielsweise Lipoprotein(a), Homozystein, infektiöse Agenzien wie das Herpesvirus und das proinflammatorische, prooxidative, blutdrucksteigernde Hormon Angiotensin II.<sup>25</sup> Auch erniedrigte HDL-Cholesterinspiegel, wie sie beim metabolischen Syndrom vorkommen begünstigen die Atherogenese, da der atheroprotektive, antiinflammatorische Effekt des HDL-Cholesterins reduziert ist.<sup>37,38</sup>

#### **4.1.1.2 Klassifikation histopathologischer Plaquetypen**

Die von der WHO zur Vereinheitlichung der Terminologie vorgeschlagenen Begriffe „fatty streak“, „fibröse Plaque“, „Atherom“ sowie „komplizierte Läsion“<sup>24</sup> sind eine eher makroskopische Beschreibung der atherosklerotischen Plaquetypen und im Rahmen der aktuellen Fragestellung nicht mehr ausreichend.<sup>33</sup> So hat Stary<sup>39,27,29,40</sup> ein Modell mit acht verschiedenen Läsionstypen entworfen, welches verschiedene histologische Stadien mit Stadien der bildlichen Darstellung aus klinischen Studien und klinischen Symptomen korreliert (**Tab. 13**). Diese Klassifikation wurde von der American Heart Association (AHA)<sup>27,29</sup> übernommen und gilt seither als Referenz in der Bezeichnung atherosklerotischer Plaquetypen.

**Tab. 13:** Schematische Darstellung atherosklerotischer Läsionen Typ I-VI nach Stary<sup>40</sup> und nach der Klassifikation der American Heart Association (AHA)<sup>27</sup>

Läsionsstyp	Histologisches Bild	Wachstum	Auftreten	Klinik
<b>Typ I (Initialläsion)</b> intimale Ansammlung von Lipidenproteine und Makrophagen; erste Schaumzellen		Wachstum hauptsächlich durch Akkumulation von Lipiden	ab dem 1. Lebensjahr	stumm
<b>Typ II (fatty streak)</b> Makrophagen akkumulieren und konfluieren zu Schaumzellbeeten (intrazellulärer Lipidpool)				
<b>Typ III (Präatherom)</b> Akkumulation extrazellulärer Lipide (extrazelluläre Lipidpool)				
<b>Typ IV (Atherom)</b> lipidreicher Kern der durch den Zusammenschluss der extrazellulären Lipidpools entsteht			ab dem 3. Lebensjahrzehnt	auf-fällig oder stumm
<b>Typ V (Fibroatherom)</b> fibröse Kappe, die den Lipidkern zum Lumen hin abgrenzt				
<b>Typ VI (Atherothrombose)</b> thrombohämorrhagische Komplikation durch Einriß der fibrösen Kappe			Ruptur Blutung Thrombus	ab dem 4. Lebensjahrzehnt



#### 4.1.1.3 Endotheliale Dysfunktion und Stickstoffmonoxid (NO)

Das Endothel besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel und bildet als innerste Schicht der Arterien eine natürliche Barriere zwischen Blutbahn und Gewebe. Es ist an verschiedenen physiologischen, immunologischen, inflammatorischen und gerinnungsbeeinflussenden Prozessen beteiligt und dient als autokrines, parakrines und endokrines Organ.<sup>41,42,43</sup> Es reguliert den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe, produziert für die Blutdruckregulation wichtige Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Bradykinin, Prostazyklin (Vasodilatoren) oder Endothelin und Angiotensin II (Vasokonstriktoren) und reguliert somit den Tonus der glatten Gefäßmuskelzellen, wirkt also vasodilatatorisch bzw. -kontraktorisch. Des Weiteren kontrolliert das Endothel die Produktion pro- und antithrombotischer sowie pro- und antifibrinolytischer Substanzen. Es ist an der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, der Leukozytenadhäsion und an der Aktivierung und Inhibition von Thrombozyten beteiligt.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Hypertonie, erhöhte Cholesterinspiegel und Diabetes mellitus<sup>4</sup> erzeugen oxidativen Stress, welcher die Funktion der Zellen beeinträchtigt.<sup>41,44</sup> Wird das Endothel geschädigt, resultiert eine Dysbalance zwischen Vasokonstriktion und -dilatation und vielerlei Prozesse, die die Entstehung, Progression und Förderung der Komplikationen von Atherosklerose begünstigen, werden verstärkt:<sup>45</sup> die endotheliale Permeabilität wird erhöht, die Thrombozytenaggregation, Leukozytenadhäsion und Produktion verschiedener Zytokine gesteigert und die Verfügbarkeit und Aktivität von NO reduziert.<sup>4,46</sup> Diese Schädigung wird als „endotheliale Dysfunktion“ bezeichnet, die Funktionsstörung des Endothels. Sie ist ein grundlegender Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose.<sup>47,44</sup>

Die bedeutendste, vom Endothel freigesetzte vasoaktive Substanz ist das Stickstoffmonoxid (NO). Dessen reduzierte Verfügbarkeit ist möglicherweise eines der frühesten Zeichen der Atherosklerose und ein Charakteristikum der endothelialen Dysfunktion.<sup>46,44</sup> NO, früher als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) bezeichnet,<sup>43</sup> ist die potenteste vom Endothel synthetisierte

gefäßerweiternde Substanz und ein Zeichen für dessen Integrität.<sup>43,48</sup> Anorganische Nitrate wie Natriumnitroprussid sind in ihrer Wirkung als Vasodilatoren hingegen unabhängig von der Gefäßintegrität.<sup>49</sup> Neben dieser gefäßdilatierenden Eigenschaft, hat NO auch antiatherosklerotische Wirkungen. Es inhibiert die Thrombozytenaggregation und -adhäsion, die Leukozyten-adhäsion und -migration in die Gefäßwand und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen.<sup>46,47,44</sup> Zudem verringert es die Entstehung von oxidiertem LDL (oxLDL),<sup>50</sup> dem eine wichtige Rolle in der Atherogenese zugeschrieben wird.<sup>51</sup> Die Hauptursache der verminderten Bioverfügbarkeit von NO ist ein Ungleichgewicht zwischen NO und oxidativen Stressfaktoren, welches durch Reaktion von NO mit Hyperoxid-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) zu verstärkter Freisetzung von Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), einem hochtoxischen freien Sauerstoffradikal, führt.<sup>44</sup>

#### **4.1.1.4 Atherogenese**

Die Atherogenese ist nach Ross<sup>4</sup> kein degenerativer, sondern ein aktiver Prozess, dem ein multifaktorielles Geschehen zugrunde liegt. Jede charakteristische Läsion der Atherosklerose repräsentiert ein unterschiedliches Stadium eines chronisch inflammatorischen Prozesses in der Arterienwand, an dem eine Vielzahl inflammatorischer Mediatoren beteiligt ist. Die endotheliale Dysfunktion ist der erste grundlegende Schritt in der Atherogenese.<sup>4</sup>

#### **Endothelaktivierung und Leukozytenadhäsion**

An Gefäßabschnitten mit besonderer hämodynamischer Belastung wird die Endothelfunktion gestört, so dass bei pathologisch erhöhten Cholesterin-Plasmakonzentrationen Lipoproteine, vor allem LDL-Cholesterin gebunden und in die intimale Schicht der Gefäßwand eingelagert werden können.<sup>52,53</sup> Dies führt zur einer erhöhten lokalen Konzentration und zu einer verlängerten Retentionszeit von Lipoproteinen,<sup>54</sup> wodurch die oxidative und enzymatische Modifikation von LDL zu oxLDL begünstigt wird.<sup>20,55,56</sup> Gleichzeitig werden Phospholipide freigesetzt, die das Endothel aktivieren.<sup>20</sup> Thrombozyten können mittels ihrer Glykoproteine Ib und IIb/IIIa dazu beitragen.<sup>57</sup> Das aktivierte Endothel beginnt nun, spezifische inflammatorische

Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, die bestimmte Blutzellen an die aktivierte Oberfläche binden.<sup>20</sup> Das Anhaften und die Aufnahme von Leukozyten, vor allem Monozyten und T-Lymphozyten, in die Intima ist der erste Schritt der Entzündungsreaktion. Das Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1), das Monozyten chemotaktische Protein-1 (MCP-1) und andere Substanzen sind wichtige Mediatoren in der Rekrutierung von Leukozyten.<sup>54,58,59</sup> Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  oder Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sind in der Lage, die Expression von VCAM-1 im Endothel zu steigern, indem die Transkriptionsaktivität des VCAM-1-Gens über den Transkriptionsfaktor Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) erhöht wird.<sup>60</sup>

### **Schaumzellformation und Makrophagenaktivierung**

Unter dem Einfluss des hämatopoetischen Zytokins Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) werden in die Arterienwand aufgenommene Monozyten in Makrophagen umgewandelt.<sup>54,20</sup> Diese Differenzierung ist mit der Hochregulation bestimmter Rezeptortypen auf der Oberfläche der Makrophagen, den Scavenger und Toll-like Rezeptoren, assoziiert.<sup>20</sup> Scavenger-Rezeptoren sind unter anderem am Lipid-Metabolismus beteiligt und binden oxLDL. Dieses akkumuliert im Zytosol der Makrophagen und es entstehen die für die fatty streak-Läsion typischen Schaumzellen.<sup>61</sup> Toll-like Rezeptoren binden ebenfalls pathogene Moleküle und führen über die Initiierung von Signalkaskaden zur Aktivierung der Makrophagen.<sup>62</sup>

Aktivierte Makrophagen produzieren eine Reihe inflammatorischer Zytokine und Moleküle, Proteasen, Chemokine und Radikale wie beispielsweise Endothelin-1, Metalloproteinasen, MCP-1, M-CSF, TNF oder Platelet-derived Growth Factor (PDGF), die die Inflammation und Zerstörung des Gewebes und die Progression der Atherosklerose vorantreiben.<sup>54,20,46</sup>

### **Plaquetprogression**

Die Ausbildung einer fibrösen Kappe ist eines der wichtigsten Kennzeichen im Umbau von fatty streaks zu fortgeschrittenen Läsionen.<sup>27,29</sup> Bei der Bildung der fibrösen Kappe handelt es sich um ein lokales Wachstum von glatten

Muskelzellen und fibrösem Bindegewebe. Dafür müssen glatte Muskelzellen von der Media in die Intima einwandern und einen phänotypischen Wandel von der kontraktile zur Bindegewebe-produzierenden Zelle durchlaufen.<sup>63,64,65</sup> PDGF, Fibroblast Growth Factor (FGF) und andere Wachstumsfaktoren werden durch aktivierte Makrophagen in der atherosklerotischen Läsion gebildet und haben wichtige Effekte auf die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen sowie die Synthese von Bindegewebe.<sup>54</sup> Die vom Endothel gebildeten Vasokonstriktoren Angiotensin II und Endothelin-1 stimulieren ebenfalls die Proliferation der glatten Muskelzellen sowie die Bildung der extrazellulären Matrix.<sup>46,66</sup>

Ein weiterer wichtiger Marker eines fortgeschrittenerer Atheroms ist die Ausbildung eines lipidreichen, nekrotischen Kerns, der auch über einen hohen Gehalt an Kalzium und extrazellulärer Lipide verfügt.<sup>27,29</sup> Als Ursache werden apoptotische Vorgänge sowie erhöhter oxidativer Stress in der Umgebung des Kerns vermutet.<sup>67,68,69</sup> Auch die Dysregulation des Gefäßtonus ist kennzeichnend für das Atherom.<sup>70</sup> Die wahrscheinlichste Ursache hierfür ist die reduzierte Verfügbarkeit von NO (vgl. Kap. 4.1.1.3).

### **Plaquedestabilisation und Plaqueruptur**

Zum klinisch bedeutenden Ereignis wie einem Myokardinfarkt oder Schlaganfall kommt es durch Bildung eines gefäßverschließenden Thrombus. Meist entsteht dieser nicht durch Expansion der stabilen Plaque und Reduktion des Lumendiameters, sondern durch Neuf ormation eines Thrombus an erodierter oder rupturierter Gefäßoberfläche (vgl. Kap. 4.1.1.1).<sup>54</sup> Im Vorfeld einer Plaqueruptur muss die Läsion zunächst weiter wachsen und destabilisiert werden. In den meisten Fällen ist eine instabile Plaque weniger als 50 % stenotisch, reich an lipidhaltigen und Entzündungszellen und besitzt einen großen nekrotischen Kern.<sup>71</sup> Zur Expansion des Kerns müssen Schaumzellen zugrunde gehen und extrazelluläre Lipide miteinander verschmelzen. Dieser Vorgang geht in der Regel mit der Ausdünnung der fibrösen Kappe und der unterhalb liegenden Media einher.<sup>71,72</sup> Dabei gehen glatte Muskelzellen zugrunde und das festigende, kollagenhaltige Bindegewebe wird proteolytisch

zersetzt und geschwächt.<sup>73,68</sup> Auch verliert die ausgedünnte Media die Fähigkeit des sogenannten kompensatorischen Remodellings, das heißt, das zunehmende Plaquewachstum und die damit verbundene Lumeneinengung kann nicht mehr mit verstärktem Mediawachstum und chronischer Gefäßdilatation ausgeglichen werden.<sup>4,54</sup>

Die Angiogenesefaktoren VEGF und bFGF stimulieren die Einsprossung kleiner Gefäße in die Plaque.<sup>25</sup> Dabei handelt es sich um ein Kapillarsystem, welches von den adventitialen Vasa vasorum ausgeht und bis in intimale Schichten der Läsionen vordringt. Neben der nutritiven Versorgung der neu gewonnenen Zellschichten und somit der Aufrechterhaltung und Progression der Plaqueentstehung sind diese eingewachsenen Kapillaren ebenfalls für eine Destabilisierung der Plaque verantwortlich.<sup>74</sup>

#### **4.1.2 Betarezeptorenblocker**

Betarezeptorenblocker ( $\beta$ -Blocker) sind eine der am häufigsten eingesetzten Gruppe von Medikamenten in der Kardiologie und sind in der medikamentösen Behandlung von Herzkreislauferkrankungen unerlässlich. Randomisierte kontrollierte klinische Studien haben ergeben, dass die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Hypertension, Herzinsuffizienz und nach Myokardinfarkt durch Einsatz von Betablockern signifikant gesenkt werden kann.<sup>7,8,9</sup> Die Gabe eines  $\beta$ -Blocker ist heutzutage bei Herzinsuffizienz, Hypertension, Angina pectoris oder nach Myokardinfarkt Therapie der ersten Wahl.<sup>6</sup>

Betarezeptorenblocker haben neben antihypertensiven, antiarrhythmischen und antiischämischen<sup>8</sup> auch antiatherosklerotische Eigenschaften.<sup>75,76,77</sup> Mehrere Effekte der Betablockertherapie tragen zur Verhinderung von Atherosklerosebildung bei: die  $\beta$ -Blockade im zentralen Nervensystem reduziert die sympathische Aktivität in der Peripherie, die  $\beta$ -Blockade am Herzen sowie an verschiedenen biochemischen Systemen verbessert durch Senkung der

Herzfrequenz, des Blutdrucks und der Herzmuskelkontraktilität die Hämodynamik, was unter anderem zum Schutz des Gefäßendothels beiträgt.<sup>75</sup> Eine über Betaadrenorezeptoren vermittelte endotheliale Dysfunktion begünstigt die Entstehung von Atherosklerose und kann mittels Betablockade signifikant reduziert werden.<sup>76,77,78,79</sup>

#### **4.1.2.1 Betaadrenorezeptoren**

Betaadrenorezeptoren ( $\beta$ -Rezeptoren) gehören neben den Alphaadreno- und anderen weniger bedeutenden Subtypen zur Gruppe der adrenergen Rezeptoren, der Zielorgane der Katecholamine. Sie sind aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, deren Stimulation eine Aktivitätssteigerung der Adenylatcyclase und damit eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt.<sup>80</sup> Unter physiologischen Bedingungen wird die körperliche Leistung über Regulation von hämodynamischen und metabolischen Komponenten durch das sympathische Nervensystem vor allem über  $\beta$ -Rezeptoren gesteuert.<sup>81</sup>

Die  $\beta$ -Rezeptoren werden unterteilt in drei Subtypen:  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und wahrscheinlich  $\beta_3$ -Rezeptoren.  $\beta_3$ -Rezeptoren gibt es vermutlich in menschlichen Fettzellen, sie haben jedoch ein anderes Verhalten gegenüber Agonisten und Antagonisten der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren und derzeit keine therapeutische Bedeutung.<sup>82</sup>

Der  $\beta_1$ -Rezeptorsubtyp ist der vorherrschende Typ an den Herzmuskelzellen. Er wird gleichermaßen von Adrenalin und Noradrenalin aktiviert.<sup>80</sup> Eine sympathische Stimulation bewirkt die Steigerung der myokardialen Kontraktilität (positive Inotropie), der Herzfrequenz (positive Chronotropie) und verringert die Überleitungszeit vom Vorhof zur Kammer (positive Dromotropie). In der Niere wird über die Stimulation des  $\beta_1$ -Rezeptors die Reninfreisetzung erhöht, im Fettgewebe wird die Lipolyse gesteigert.<sup>83</sup>

Mit  $\beta_2$ -Rezeptoren ausgestattet ist die glatte Muskulatur anderer Organe wie Gefäße, Bronchien oder Uterus. Auch metabolisch aktive Zellen sind mit diesen besetzt und dienen bei Stimulation der Energiebereitstellung.<sup>81</sup> Die

$\beta_2$ -Rezeptoren werden vor allem von zirkulierendem Adrenalin aus dem Nebennierenmark und weniger von Noradrenalin beeinflusst. Über eine Verringerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es bei Stimulation der  $\beta_2$ -Rezeptoren zur Erschlaffung der glatten Muskulatur, beispielsweise zu Vaso- oder Bronchodilatation.<sup>80</sup> In bestimmten Fällen wie bei arterieller Verschlusskrankheit oder Hypertonie in der Schwangerschaft sollte daher eine selektive  $\beta_1$ -Blockade einer  $\beta_2$ -Blockade vorgezogen werden. Obstruktive Ventilationsstörungen wie Asthma bronchiale, bradykarde Herzrhythmusstörungen, Atrioventrikuläre Block II-III und akute, instabile Herzinsuffizienz sind Kontraindikationen für eine generelle Betablockade.<sup>83</sup>

Bei der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen ist hauptsächlich die Blockade von kardialen und renalen  $\beta_1$ -Rezeptoren von Bedeutung, eine zusätzliche  $\beta_2$ -Blockade ist nicht nötig und steigert das Nebenwirkungsprofil.<sup>83</sup>

#### **4.1.2.2 Substanzklassen und einzelne Vertreter**

$\beta$ -Blocker können unterschieden werden nach physikalisch chemischen (Lipophilie) und rezeptorspezifischen Eigenschaften: es gibt kardioselektive  $\beta$ -Blocker wie beispielsweise Atenolol, Metoprolol oder Nebivolol, die nur die  $\beta_1$ -Rezeptoren besetzen und somit weniger nicht-kardiale Nebenwirkungen erzeugen. Daneben gibt es nicht selektive Betarezeptorinhibitoren, die gleichermaßen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren besetzen, zum Beispiel Propranolol oder Nadolol. Die Rezeptorspezifität ist jedoch dosisabhängig, in hoher Dosierung können  $\beta_1$ -selektive Blocker auch  $\beta_2$ -Rezeptoren besetzen.<sup>8</sup> Andere  $\beta$ -Blocker wie Carvedilol haben neben einer  $\beta$ -inhibierenden auch die Eigenschaft,  $\alpha_1$ -Rezeptoren zu blockieren, was eine peripheren Vasodilatation zur Folge hat. Einige Substanzen wie Acebutolol oder Pindolol besitzen so genannte intrinsisch sympathomimetische Aktivität (ISA), was dazu führt, dass sie neben einer blockierenden Wirkung gegenüber Katecholaminen gleichzeitig selbst über eine schwach stimulierende Wirkung auf  $\beta$ -Rezeptoren verfügen.<sup>8</sup>  $\beta$ -Blocker mit ISA haben jedoch eine geringere kardioprotektive Wirkung als solche ohne ISA, da sie die Herzfrequenz nicht gleichermaßen senken können.<sup>8,81</sup> Sie sollten daher bei Patienten mit chronischem Herzversagen und

nach Myokardinfarkt nicht eingesetzt werden.<sup>8</sup> Eine weitere Eigenschaft mancher  $\beta$ -Blocker wie zum Beispiel Nebivolol ist die direkte Vasodilatation.<sup>6,83</sup>

In der klinischen Praxis stellen gegenwärtig aufgrund ihres geringen Nebenwirkungsprofils und der vorteilhafteren Kardioprotektion überwiegend  $\beta_1$ -selektive Rezeptorenblocker ohne ISA die Therapie der Wahl dar.<sup>81</sup> Nicht-selektive Blocker werden nur noch für wenige, spezielle Indikationen verwendet, beispielsweise in der Therapie der portalen Hypertension und des peripheren Tremors oder als Notfallmedikament in der thyreotoxischen Krise.<sup>83</sup>

#### **4.1.2.2.1 Metoprolol**

Metoprolol ist ein schwach lipophiler,  $\beta_1$ -selektiver Betablocker ohne ISA.<sup>11,83</sup> Er wird standardmäßig in der Therapie von Hypertonie, KHK, supraventrikulären Herzrhythmusstörungen, chronischer Herzinsuffizienz und anderen Indikationen verwendet und dient aufgrund seiner in der Praxis bewährten Art auch in der Forschung häufig als Vergleichsmedikament in der Erprobung neuer Substanzen. Die Richtdosis für Metoprolol liegt bei 50 bis 200 mg/d je nach Indikation, die maximale Tagesdosis beträgt 200 mg/d.<sup>84</sup>

#### **4.1.2.2.2 Nebivolol**

Nebivolol, ein  $\beta$ -Blocker der dritten Generation, ist ein kompetitiver und hochselektiver  $\beta_1$ -Rezeptorenblocker ohne ISA und in pharmakologischen Dosen ohne membranstabilisierende Wirkung.<sup>10,11,12</sup> Seine Affinität zu  $\beta_1$ -Rezeptoren ist 321-fach höher als zu  $\beta_2$ -Rezeptoren und er ist unter den derzeit klinisch gebräuchlichen Betablockern derjenige mit der höchsten  $\beta_1$ -Selektivität.<sup>85</sup> Ein  $\alpha$ -adrenerger Antagonismus tritt in therapeutischer Dosierung nicht auf. Die tägliche Dosierung beträgt 5 mg.<sup>12</sup> Die hochlipophile Substanz ist ein Razemat aus zwei Enantiomeren, dem SRRR-Nebivolol (oder D-Nebivolol), welchem die Betaselektivität zugeschrieben wird und dem RSSS-Nebivolol (oder L-Nebivolol).<sup>12</sup> Eine besondere und für die Behandlung von Patienten mit endothelialer Dysfunktion günstige Eigenschaft von Nebivolol ist die Freisetzung des peripheren Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) aus



dem Gefäßendothel.<sup>10,16,86,13,14</sup> Vermittelt wird der vasodilatierende Effekt über den endothelialen L-Arginin/Stickoxid-Stoffwechselweg.<sup>16,87</sup> Der hämodynamische, kardioprotektive Effekt von Nebivolol beruht also neben der Senkung der Herzfrequenz (negative Chronotropie) über direkte Betablockade auch auf Reduktion des Blutdrucks, indem der periphere Widerstand gesenkt wird und somit die kardiale Auswurfleistung durch Senkung der Nachlast erhalten bleibt (keine negative Inotropie) oder sogar gesteigert wird.<sup>10,16,86</sup>

Vielerlei experimentelle und klinische Studien haben die NO-vermittelte Vasodilatation durch Nebivolol bestätigt.<sup>88,48,87,15</sup> Es scheint zwei Mechanismen zu geben, wie Nebivolol die Bioverfügbarkeit des endothelialen NO erhöht: zum einen steigert es die Synthese von NO in den glatten Muskelzellen der Gefäßwände, zum anderen besitzt es antioxidative Eigenschaften und vermindert die Senkung der NO-Konzentration durch oxidativen Stress im Endothel.<sup>89,90,91,92,93</sup> Diese antioxidativen Mechanismen sind unabhängig von der  $\beta_1$ -Rezeptorenblockade, Mason et al.<sup>94</sup> vermuten eine Interaktion mit der Endothelmembran. Ein wichtiges Enzym in der endothelialen Synthese von NO ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS), welche Kalzium/Calmodulin-abhängig aktiviert wird und den Umbau von L-Arginin zu L-Citrullin und NO katalysiert. Vasodilatatorische Agonisten und oberflächliche Scherkräfte bewirken den initialen Kalziumeinstrom. Nach der Synthese diffundiert das NO in die unterhalb liegende glatten Gefäßmuskelzellen, wo es über Aktivierung von Guanylatzyklase zu einem Anstieg von zyklischem Guanosin-3,5'-monophosphat (cGMP) und zur Gefäßrelaxation kommt.<sup>46,95</sup> Nebivolol steigert die Aktivität von NOS sowohl im Endothel als auch in Thrombozyten.<sup>89</sup> Der genaue molekulare Mechanismus, der zur NO-vermittelten Vasorelaxation führt und die daran beteiligten Rezeptoren sind im einzelnen noch nicht eindeutig geklärt. Die Ergebnisse einer experimentellen Studie von de Groot et al.<sup>96</sup> weisen auf die Beteiligung von  $\beta_3$ -Rezeptoren hin. Broeders et al.<sup>97</sup> konnten nachweisen, dass Nebivololmetaboliten über Bindung an  $\beta_2$ -Rezeptoren endotheliales  $\text{Ca}^{2+}$  steigern und somit die NO-Produktion stimulieren. Garban et al.<sup>98</sup> postulierten, dass die endothelabhängige Gefäßreaktion auf Nebivolol teilweise auf eine Interaktion mit dem Östrogen-

Rezeptor basiert. Einen NO-vermittelten vasodilatatorischen Effekt von Nebivolol durch die Adenosin-Triphosphat (ATP) bedingte Stimulation von Purinorezeptoren konnten Kalinowski et al. an glomerulären Endothelzellen von Ratten feststellen.<sup>14</sup> Parenti et al.<sup>99</sup> fanden Hinweise auf die Phospholipase-C-vermittelte Freisetzung von Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) als second messenger in der Aktivierung der NOS.

Neben der Bereitstellung von NO und seiner antioxidativen Mechanismen, besitzt Nebivolol weitere Eigenschaften, die die Entstehung von Atherosklerose auf antiproliferativer<sup>17,18</sup> und antiinflammatorischer<sup>19</sup> Ebene verhindern. Falciani et al.<sup>100</sup> bewiesen, dass Nebivolol einen größeren Effekt auf Hemmung der Thrombozytenaggregation hat als die Betablocker Carvedilol und Propranolol. Zudem ist die Inhibition im Gegensatz zu den anderen Substanzen NO-abhängig. Einen antiproliferativen Effekt auf das Wachstum von humanen koronararteriellen glatten Muskel- (hcaSMC) und Endothelzellen bei gesteigerter Apoptose sowie reduzierte Freisetzung von Endothelin-1 konnten Brehm et al.<sup>17,18</sup> in vitro beobachten. Wolf et al.<sup>19</sup> zeigten, dass in hcaSMC-Zellkulturen unter Inkubation mit Nebivolol verschiedene Gene, die an inflammatorischen Prozessen, oxidativen Stressprozessen oder an der Proliferation von glatten Muskelzellen beteiligt sind, herunterreguliert werden können. Die CRP-vermittelte Hochregulation proinflammatorischer und proatherosklerotischer Adhäsionsmoleküle und Zytokine wie VCAM-1 oder Interleukin-8 (IL-8) konnten in kultivierten koronararteriellen glatten Muskel- oder Endothelzellen durch Vorbehandlung mit Nebivolol signifikant reduziert werden.<sup>101,102</sup> Im in-vivo-Modell an der Ratte zeigte sich nach Ballondilatation und Vorbehandlung mit Nebivolol eine Reduktion der Neointima-Bildung und der Mediaregion, eine reduzierte Proliferation glatter Muskelzellen und eine verminderte Makrophagenakkumulation.<sup>101</sup>

### 4.1.3 Wahl eines geeigneten Tiermodells

Die Untersuchung der Pathogenese der Atherosklerose am Menschen stellt sich schwierig dar, da sich die Entstehung von atherosklerotischen Plaques über einen langen Zeitraum erstreckt und multifaktoriell bedingt ist. Auch die Forschung anhand von Zellkulturen ist aufgrund der fehlenden Komplexität des realen Krankheitsbildes begrenzt.<sup>103</sup> Im Tiermodell hingegen kann die Bildung von atherosklerotischen Plaques mit relativ einfachen Mitteln und auf schnellem Wege induziert werden. Mittels einer hypercholesterinämischen Diät lassen sich beispielsweise im Kaninchenmodell innerhalb weniger Wochen menschenähnliche atherosklerotische Läsionen in der Aorta erzeugen.<sup>103</sup> Unser heutiges Verständnis über die Atherosklerose basiert auf einer Kombination von Forschung an Tieren und Zellkulturen, Analysen menschlicher Läsionen, klinischen Untersuchungen von Patienten mit akutem Koronarsyndrom und epidemiologischen Studien über Herz-Kreislauf-erkrankungen.<sup>20</sup>

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden zahlreiche tierexperimentelle Studien zur Ätiologie und Pathogenese der Atherosklerose an Kleintieren wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, aber auch an Schweinen und anderen größeren Säugern durchgeführt. Bis zum heutigen Tag hat sich in der Atheroskleroseforschung großflächig allerdings nur die Verwendung von Mäusen und Kaninchen durchgesetzt. Der Vorteil an der Arbeit mit Mäusen als Versuchstiere ist die einfache genetische Manipulation, Kaninchen hingegen eignen sich für die radiologische oder histologische Darstellung atheromatöser Plaques.<sup>104</sup> Der Fokus der Wissenschaftler lag früher eher auf der Erforschung der Effekte von Ernährung und Medikamenten auf die Entstehung und Lokalisation der Atherosklerose. Heutzutage rückt verstärkt die Frage nach Progressions- und Regressionsfaktoren, in vivo Darstellungsmethoden und der histopathologischen Beschaffenheit der Plaques in den Mittelpunkt des Interesses.<sup>104</sup> Transgene Tiere, sowohl Mäuse als auch Kaninchen, tragen dazu bei, einzelne Schritte in der Pathogenese und molekulare Zusammenhänge der Erkrankung im Detail klären zu können.<sup>105</sup>

Ignatowski<sup>103</sup> erwähnte 1908 erstmals den Gebrauch von Kaninchen in der Forschung. Anitschkow et al.<sup>106</sup> demonstrierten 1913, dass allein die Verabreichung eines hochdosierten cholesterinhaltigen Futters atherosklerotische Veränderungen in der Gefäßintima von Kaninchen erzeugen kann, deren Ausmaß direkt proportional zur Cholesterinaufnahme war. Bocan et al.<sup>107</sup> bestätigten gegen Ende des letzten Jahrhunderts, dass die Zusammensetzung, das Ausmaß und der Typ der Läsion abhängig vom Gesamtplasmacholesterin sowie der LDL- und VLDL-Konzentration ist. Anitschkow und Chaladow<sup>108</sup> beschrieben schon damals in der Plaque vorkommende Zelltypen und Formationen, die dem heutigen charakteristischen Bild von mikro- und makroskopischen atherosklerotischen Läsionen entsprechen.

Die meisten Kaninchenstudien werden mit Weißen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Es gibt einige genetisch veränderten Linien dieser NZW-Kaninchen wie die WHHL- (Watanabe Heritable Hyperlipidemic), Houston RT- und St. Thomas-Kaninchen, die einen gesteigerten Lipidmetabolismus haben. Die am häufigsten eingesetzten Tiere dieser Art sind die 1973 entdeckten WHHL-Kaninchen, welche einen erblichen Defekt des LDL-Rezeptors haben. Daraus resultieren erhöhte Plasma-Cholesterin-Konzentrationen ähnlich derer der Hyperlipoproteinämie vom Fredrickson-Typ IIA des Menschen sowie die spontane Entwicklung von Atherosklerose in der Aorta bereits im Alter von fünf Monaten.<sup>104,109</sup> Im Gegensatz zu den von NZW-Kaninchen entwickelten atheromatösen Plaques, die viele Schaumzellen enthalten, sind die Plaques der WHHL-Tiere komplizierter aufgebaut und ähneln dem Läsionstyp, den der Mensch über Jahrzehnte entwickelt.<sup>104,110</sup>

NZW-Kaninchen haben unter normalen Bedingungen eine mit etwa 23 mg/dl niedrige Plasma-Cholesterin-Konzentration, die jedoch dosisabhängig unter Zufuhr eines cholesterinhaltigen Futters von 0,1-2 % Konzentration innerhalb weniger Wochen um das zwei- bis achtfache ansteigen kann.<sup>107</sup> Normalerweise dauert es etwa sechs Wochen, bis die Cholesterindiät bei einem terminalen Plasma-Cholesterinspiegel von etwa 230-320 mg/dl zur Entwicklung von initial

atheromatösen Läsionen, den fatty streaks, führt.<sup>111</sup> Unter Fütterung von mindestens 0,5 % Cholesterin kommt es hauptsächlich zur Infiltration von Monozyten/Makrophagen in die Gefäßintima,<sup>107</sup> vergleichbar den frühen Läsionen beim Menschen.<sup>111</sup> Ein Cholesteringehalt im Futter von weniger als 0,5 % führt hingegen zu fibromuskulären Veränderungen, welche mit fortgeschritteneren Veränderungen in der menschlichen Atherogenese zu vergleichen sind.<sup>107</sup>

Langzeitstudien mit Kaninchen unter hypercholesterinämischer Diät sind aufgrund der hohen Hepatotoxizität und der begleitenden Inflammation, die nicht der humanen Pathophysiologie entspricht, nicht möglich, da die Tiere früh an den Folgen der Diät versterben.<sup>103</sup> Die innerhalb der kurzen Zeit entstandenen Läsionen entsprechen daher nur den Vorstufen menschlicher atherosklerotischer Plaques,<sup>112</sup> werden aber dennoch häufig für die Forschung über Medikamenteneinfluss auf die Entwicklung von Atherosklerose verwendet.<sup>103</sup> Fortgeschrittenere Stadien erreicht man, indem man die arterielle Gefäßwand zusätzlich zur Cholesterindiät mechanisch verletzt.<sup>113,114</sup>

Neben den bereits genannten Eigenschaften liegen die Vorteile der NZW-Kaninchen in ihrer praktischen Größe, der kostengünstigen Anschaffung, der einfachen Haltung und im unkomplizierten Umgang mit den ruhigen Tieren. Die großen Ohren bieten eine gute Erreichbarkeit großer Gefäße zur Blutentnahme. Die Forschung an männlichen Tieren ist darüber hinaus günstig, da weibliche Tiere bei diätetischer Induktion von Atherosklerose bei intaktem Gefäßendothel weniger anfällig für die Entstehung von Plaques sind als männliche Artgenossen.<sup>115</sup>

## 4.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war, an einem tierexperimentellen Modell den Einfluss der selektiven Beta-1-Rezeptorenblocker Nebivolol und Metoprolol auf die Entstehung und Zusammensetzung cholesterininduzierter atheromatöser Plaques in der Aorta von Weißen Neuseelandkaninchen morphologisch und histologisch zu untersuchen. Begleitend wurden diverse klinisch-chemische Laborparameter ermittelt und mittels RT-PCR und ELISA die Expression verschiedener an der Atherogenese beteiligten Zytokine sowie Kollagene bestimmt.

### 4.2.1 Überlebenszeit

In der vorliegenden Studie schieden acht von 24 Tieren vorzeitig aus dem Versuch aus, fünf Tiere aus der nicht medikamentös behandelten Kontroll-Gruppe und drei Tiere aus der Metoprolol-Gruppe. Alle Tiere der Nebivolol-Gruppe erreichten hingegen das geplante Versuchsende. Das Überleben der Tiere unterschied sich zwischen den Gruppen signifikant voneinander ( $p=0,0473$ ). Im Einzelvergleich war jedoch nur das Überleben der Nebivolol-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant unterschiedlich, die Metoprolol-Gruppe wies keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p=0,4668$ ) und der Nebivolol-Gruppe ( $p=0,0637$ ) auf.

Eine signifikante Reduktion der Gesamtmortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen durch Betarezeptorenblocker wurde in großen klinischen Studien nachgewiesen.<sup>7,8,9</sup> Das Vorhandensein zusätzlicher vasoprotektiver und antiatherosklerotischer Fähigkeiten von Nebivolol wie die Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit<sup>10,86,88,48</sup> oder zahlreiche antiproliferative<sup>101,17,18</sup> und antiinflammatorische<sup>101,19,102</sup> Eigenschaften, lassen in Anbetracht der Ergebnisse dieser Studie vermuten, dass Nebivolol im Vergleich zu Metoprolol einen zusätzlichen günstigen Einfluss auf das Überleben der Kaninchen gehabt haben könnte.

Um sicherstellen zu können, dass die Gruppen von Beginn an homogen randomisiert waren, wurden retrospektiv die Gruppen „Nicht-Überlebende“ und „Überlebende“, bestehend aus den acht vorzeitig aus dem Versuch genommenen bzw. den 16 bis zu Versuchende verbleibenden Tieren, gebildet. Die Parameter aus Woche -2 wurden zwischen diesen beiden Gruppen statistisch verglichen. Bei Körpergewicht, Futteraufnahme und Herzfrequenz waren keine signifikante Unterschiede feststellbar. Auch bei den Blutparametern waren keine wesentlichen Unterschiede feststellbar. Hb, Hämatokrit und das Leberenzym GOT waren zwar signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen, sie wiesen jedoch bei den Nicht-Überlebenden einen günstigeren Ausgangswert auf. Das frühe Ausscheiden war somit aufgrund der Werte bei Versuchsbeginn nicht vorhersehbar und die Gruppen waren homogen randomisiert worden.

Die signifikant kleinere Plaqueläche ( $p=0,0062$ ) sowie die geringere Stenose des Gefäßlumens ( $p<0,0001$ ) bei den vorzeitig ausgeschiedenen Tieren war der Grund, die Tiere aus der Gruppe der „Nicht-Überlebenden“ von der Wertung auszuschließen, da ein Vergleich dieser Plaques mit den wesentlich fortgeschritteneren Plaques der Tiere der „Überlebenden“-Gruppe unverhältnismäßig gewesen wäre und zu verzerrten Ergebnissen hätte führen können.

#### **4.2.2 Versuchsverlauf**

Bei der Entwicklung des Körpergewichtes, der Futter- und entsprechend der Cholesterin- und Medikamentenaufnahme waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar. Lediglich bei den Tieren der Kontroll-Gruppe war eine geringe Gewichtsschwankung von Woche 8 bis 12 erkennbar, sie wogen zu Versuchende etwas weniger als die Tiere aus den medikamentös behandelten Gruppen. Allgemein wurde das 1%ige Cholesterinfutter schlecht vertragen und die Tiere fraßen nahmen zunehmend weniger Futter, so dass die Dosis in Woche 8 auf 0,5 % reduziert werden musste; daraufhin stieg sowohl die Futter- als auch die Cholesterinaufnahme

wieder etwas an. Diese Reaktion auf cholesterinhaltiges Futter ist bekannt. Diäten mit 1-2%igem Cholesterinfutter über einen langen Zeitraum führen bei den Tieren zu einer hohen Mortalitätsrate.<sup>103</sup> Für die Morphologie der atherosklerotischen Läsionen ist jedoch Dauer und Intensität der Cholesterindiät ausschlaggebend.<sup>106,107,112</sup> Kurze, hochdosierte Diäten mit mehr als 2 % Cholesterin verursachen eine Hypercholesterinämie und Läsionen, die reich an Schaumzellen sind. Eine niedrigdosierte, aber lang andauernde Fütterung führt zu Läsionen, die vermehrt glatte Muskelzellen und Cholesterinansammlungen enthalten, menschenähnlicheren Plaques entsprechen.<sup>112</sup> Für diese Studie wurde mit der Versuchsdauer von 15 Wochen und einer Cholesterindiät von 1 % bzw. 0,5 % ein Mittelweg gewählt. Mit einem ähnlichen Versuchsaufbau (1 % Cholesterin über 12 Wochen) erhielten Böger et al.<sup>116</sup> Läsionen mit Schaumzellen und glatten Muskelzellen, einem Stadium der Atherogenese, welches am ehesten dem fatty streak entspricht und sich für die Erforschung von Atherosklerose-beeinflussenden Faktoren eignet.

Die Medikamentenaufnahme zwischen den Gruppen Nebivolol und Metoprolol verlief parallel zur Futteraufnahme. Gleichzeitig mit der Umstellung der Cholesterindosis in Woche 8 wurde die Medikamentendosis verdoppelt, um die reduzierte Futter- und damit Medikamentenaufnahme auszugleichen. Die aufgenommene Medikamentendosis in der Nebivolol-Gruppe lag bei durchschnittlich 21 mg/d und kg KG. Auch in einer anderen tierexperimentellen Studien wurden ähnlich hohe Werte erreicht,<sup>93</sup> sie liegen jedoch weit über der beim Menschen üblichen therapeutischen Dosis von 5 mg/d.<sup>12</sup> Die durchschnittliche Aufnahmedosis von Metoprolol betrug 37 mg/d und kg KG, auch diese liegt, bezogen auf das Körpergewicht, über der beim Menschen üblicherweise verabreichten Tagesdosis von 50-200 mg.<sup>84</sup>

Die Herzfrequenz sank in den medikamentös behandelten Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe um etwa 16 % signifikant ab ( $p=0,0001$ ). Die Behandlung mit den verschiedenen Betablockern wirkte sich im Vergleich der zwei Gruppen vergleichbar aus. Es ist daher von einer ausreichenden enteralen Resorption



und einer im therapeutischen Bereich liegenden Plasmakonzentration von Nebivolol bzw. Metoprolol auszugehen.

#### **4.2.3 Plasmalipide, Plasmalipoproteine und Parameter des kleinen Blutbilds**

Es ist bekannt, dass die Fütterung mit einer cholesterinreichen Diät bei NZW-Kaninchen innerhalb weniger Wochen zu einer Hypercholesterinämie und Hyperlipoproteinämie führt.<sup>103,107,117,118</sup> Auch in dieser Studie gab es einen wesentlichen Anstieg in der Konzentration der Plasmalipide und Plasmalipoproteine.

Die Gesamtcholesterin-Konzentration stieg von durchschnittlich 64 mg/dl in der Vorfütterungsphase ohne Cholesterindiät bis auf 2176 mg/dl in der Hauptversuchsphase an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht feststellbar. Die Behandlung mit Betablockern hatte folglich keinen Einfluss auf die Gesamtcholesterin-Konzentration, ebenso wenig eine reduzierte Cholesterinfütterung ab Woche 8, wie auch die Studie von Sun et al.<sup>117</sup> belegt. Auch bei der Triglyzerid-Konzentration gab es keine signifikanten Unterschiede, bis Woche 6 war die Anfangskonzentration von ca. 96 mg/dl in etwa gleich bleibend, danach stieg sie an. Auffällig war der doppelt so hohe Anstieg in der Kontroll-Gruppe auf das etwa vierfache vom Ausgangswert im Vergleich zu den Betablocker-Gruppen, bei denen sich der Wert nur verdoppelte. In der Konzentration der Lipoproteine, die jeweils einmal in Woche 0 und zum Versuchende gemessen wurde, gab es weder zwischen den Gruppen noch in der Differenz zwischen Woche 0 und 12 signifikante Unterschiede. In allen Gruppen stieg der Anteil des VLDL- und LDL-Cholesterins. Die HDL-Cholesterin-Konzentration nahm ab, in der Kontroll-Gruppe mit 73 % etwas stärker als in der Nebivolol- (56 %) und der Metoprolol-Gruppe (55 %).

Dass das Verhalten der Plasmalipide und Plasmalipoproteine durch Therapie mit Betablockern nicht wesentlich beeinflusst wird, ist auch Ergebnis anderer Studien. Mehrere Gruppen fanden zwar heraus, dass durch Betablockertherapie am Menschen die HDL-Cholesterin- und Triglyzerid-Konzentrationen etwas ab- bzw. zunehmen,<sup>119,120</sup> der Großteil der Blutfette aber unbeeinflusst bleibt. Dimmitt et al.<sup>120</sup> konnten nach Gabe von Metoprolol und dem Betablocker Propanolol über vier Wochen an 42 gesunden Männern keine Veränderung des LDL-Cholesterins sowie des Lipoproteins(a) feststellen. Östlund-Lindqvist et al.<sup>77</sup> fanden keinen signifikanten Einfluss von Metoprolol gegenüber einer Placebogruppe auf das Gesamtcholesterin, Triglyzeride und Lipoproteine in einer experimentellen Tierstudie an hypercholesterinämischen Kaninchen. Auch eine Studie mit Nebivolol an WHHL-Kaninchen<sup>93</sup> und klinische Studien an Diabetikern<sup>121</sup> und Hypertonikern<sup>122</sup> kamen zu dem Ergebnis, dass Nebivolol lipidneutral ist und keinen Einfluss auf Gesamtcholesterin, Triglyzeride und LDL-Cholesterin hat.

Bei allen Parametern des kleinen Blutbildes gab es im Laufe des Versuches Veränderungen. Am bedeutendsten sind die Entwicklung einer normozytären, hyperchromen Anämie und einer Leukozytose in allen drei Versuchsgruppen.

Die Zahl der Erythrozyten sank in allen Versuchsgruppen ab, in den medikamentös behandelten Gruppen um 30 % und in der Kontroll-Gruppe um 36 %. Ein signifikanter Unterschied in der AUC der Erythrozytenzahl fand sich zwischen der Kontroll- und der Metroprolol-Gruppe ( $p=0,0066$ ). Entsprechend fiel auch der Hämatokrit und die Hämoglobin-Konzentration ab, wobei in diesen Parametern keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Diese anämischen Werte liegen deutlich unterhalb der vom Züchter angegebenen Referenzwerte (**Tab. 16**, Seite 140). Beim MCV war allgemein ein diskreter Abfall zu verzeichnen, da jedoch bereits die Anfangswerte über der vom Züchter angegebenen Referenz lagen, ist am ehesten von einer normozytären Situation auszugehen. Das MCH und die MCHC stiegen in allen drei Versuchsgruppen an. Ein signifikanter Unterschied fand sich lediglich beim MCH zwischen der Kontroll- und der Metroprolol-Gruppe feststellbar ( $p=0,0206$ ),

wie auch bei der Zahl der Erythrozyten ist dieses Ergebnis für diese Arbeit allerdings nicht von Bedeutung. Die Entwicklung einer Anämie ist am ehesten als Reaktion auf die stark cholesterinhaltige Diät zu werten. Auch Feldman et al.<sup>123</sup> sowie Pescador et al.<sup>124</sup> konnten an NZW-Kaninchen die Ausbildung einer Anämie ca. sechs bis acht Wochen nach Beginn der Fütterung einer Cholesterindiät beobachten.

Die Zahl der Leukozyten lag bei Versuchsbeginn bei durchschnittlich 6628 1/ $\mu$ l. Nach Beigabe des Cholesterins zum Futter in Woche 0 stieg sie in allen drei Gruppen vergleichbar an. Auch Feldman et al.<sup>123</sup> beobachteten in mehreren aufeinander folgenden tierexperimentellen Studie mit NZW-Kaninchen den Langzeiteffekt verschieden dosierter Cholesterindiäten auf die Entwicklung einer Leukozytose sowie eine mögliche Reversibilität und genaue Differenzierung der Leukozyten. Bereits eine Woche nach Beginn der Fütterung war eine Leukozytose messbar, die für mindestens 30 Wochen anhielt. Auch bei Menschen wurde das Vorhandensein einer Leukozytose im Zusammenhang mit familiärer Hypercholesterinämie beschrieben.<sup>125</sup> In der vorliegenden Studie war die Leukozytenzahl nach der Umstellung des Futters auf 0,5 % Cholesterinzusatz in den medikamentös behandelten Gruppen etwa gleich bleibend, in der Kontroll-Gruppe stieg sie jedoch weiterhin an und erreichte eine letztendliche Steigerung um 265 % zum Ausgangswert. Die Behandlung mit Nebivolol senkte die AUC der Leukozytenzahl signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0322$ ). Auch die Therapie mit Metoprolol zeigte eine Tendenz zu niedrigeren Leukozytenwerten, ein signifikanter Unterschied zu der Nebivolol- oder der Kontroll-Gruppe war jedoch nicht feststellbar. Die protektive Wirkung auf Entwicklung einer Leukozytose könnte also eine mögliche antiinflammatorische Eigenschaft von Nebivolol sein.

Die Zahl der Thrombozyten stieg in allen Gruppen über die Dauer des Versuches an, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht feststellbar. Feldman et al.<sup>123</sup> konnten eine statistisch signifikante Thrombozytose beim cholesteringefütterten Kaninchen nachweisen.

#### 4.2.4 Leberschädigung

In vielen experimentellen Studien am hypercholesterinämischen Kaninchen wurde eine cholesterininduzierte Leberschädigung beobachtet. Langzeitstudien mit hochdosierten Cholesterindiäten sind aufgrund der Hepatotoxizität des Cholesterins generell nicht möglich.<sup>103</sup> In einer Studie von Sun et al.<sup>117</sup> entwickelten zwei von 17 NZW-Kaninchen nach zehnwöchiger Fütterung mit 1%igem Cholesterinfutter einen Ikterus in Folge der fortgeschrittenen Leberschädigung. Auch Feldman et al.<sup>123</sup> berichten in einer Studie mit cholesteringefütterten NZW-Kaninchen von Symptomen eines Leberversagens. Sie stellten nach etwa 18 Wochen Fütterung mit 0,25 % Cholesterin einen zweiten starken Anstieg von Leukozyten fest, den sie aber nicht wie einem ersten Anstieg nach sieben Wochen auf die Diät zurückführten, sondern auf eine Leberschädigung, da parallel zur Leukozytose eine Hyperbilirubinämie auftrat. Balkan et al.<sup>126</sup> berichten über Ergebnisse ihrer Studie an Kaninchen, die über einen Zeitraum von zwei Monaten eine 1%ige Cholesterindiät erhielten, von erhöhtem Lipidgehalt sowie erhöhter Lipidperoxidation und verstärkter Aktivität antioxidativer Enzyme in der Leber der Tiere.

Auch im vorliegenden Versuch gab es deutliche Hinweise auf eine cholesterininduzierte Leberschädigung. Ein Großteil der Tiere entwickelte gegen Ende des Versuchs eine Gelbfärbung des weißen Fells, einige Tiere zeigten ikterische Veränderungen in den Skleren. Die entnommenen Lebern waren mit einem durchschnittlichen Gewicht von etwa 161 g deutlich schwerer gegenüber dem vom Züchter angegebenen Normalwert von  $104 \pm 14$  g (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Charles River, Kißleg). Auch makroskopisch waren die Organe groß, pathologisch gelblich verfärbt und inhomogen verändert, was auf eine starke Leberschädigung und Verfettung schließen lässt. Bocan et al.<sup>107</sup> beobachteten bei einer vergleichbaren Cholesterinbelastung einen Anstieg des relativen Cholesteringehalts der Leber auf das mehr als Dreifache.

Der Grund für die ikterischen Veränderungen bei den Kaninchen im vorliegenden Versuch ist der starke Anstieg des Gesamt-Bilirubins von anfänglich <0,1 mg/dl im Mittel aller Tiere auf 3,7 mg/dl in der Kontroll-Gruppe und etwa 1,2 mg/dl in den medikamentös behandelten Gruppen (Referenzwerte siehe **Tab. 16**, Seite 140). Ursächlich für diesen Anstieg ist die Leberschädigung durch das zugefütterte Cholesterin. In allen Versuchsgruppen gab es einen Anstieg der Transaminasen GOT und GPT und der  $\gamma$ -GT auf das bis zu Dreifache der Referenzwerte. Die maximalen Werte der Transaminasen waren in Woche 8 zu messen, nach der Dosisreduktion des Cholesterinfutters reduzierten sich die Werte ein wenig. Zwar ist für alle Leberwerte außer der  $\gamma$ -GT, insbesondere für die Gesamt-Bilirubin-Konzentration, eine Tendenz zu niedrigeren Werten in den medikamentös behandelten Gruppen zu beobachten, jedoch gibt es in der AUC der Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Aktivität der Pankreaslipase stieg von durchschnittlich 83 U/l bei Versuchsbeginn in der Kontroll-Gruppe auf 1312 U/l, in der Nebivolol-Gruppe auf 696 U/l und in der Metoprolol-Gruppe auf 856 U/l an. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen der Nebivolol- und der Kontroll-Gruppe festgestellt ( $p=0,0182$ ).

## **4.2.5 Einfluss der Betablockertherapie auf Plaquebeschaffenheit und Atherogenese**

### **4.2.5.1 Plaqueentwicklung**

Die Fütterung einer cholesterinreichen Diät führt im Kaninchenmodell rasch zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques. Diese sind hauptsächlich im Aortenbogen, aber auch in der Aorta thoracalis am Abgang der Interkostalararterien und weniger ausgeprägt in der Aorta abdominalis zu finden.<sup>103,77,103,127</sup> Auch in der vorliegenden Studie kam es in allen drei Versuchsgruppen zur Entwicklung atherosklerotischer Plaques bis in die Aorta thoracalis; die Aorta abdominalis wurde nicht untersucht.

Im Aortenbogen betrug die Plaquefläche im Mittel der vier in dieser Studie betrachteten Segmente in der Kontroll-Gruppe 8,9 mm<sup>2</sup>. Die Fläche bei den Tieren der Nebivolol-Gruppe war um 29 % und in der Metoprolol-Gruppe um 11 % geringer als in der Kontroll-Gruppe. Die Behandlung mit Nebivolol führte demnach zu einer signifikant kleineren Plaquefläche im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0068$ ). Auch die Therapie mit Metoprolol scheint sich günstig auf eine geringere Plaqueentstehung auszuwirken, signifikante Unterschiede wurden jedoch nicht gefunden. Im Aortenbogen betrug die durch die Plaque entstandene Gefäßstenose in den medikamentös behandelten Gruppen 30 % des Gesamtlumens, in der Kontroll-Gruppe war sie mit 34 % höher, jedoch nicht signifikant.

In der Aorta thoracalis waren bei Betrachtung der zwölf Einzelsegmente keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Plaquefläche und Stenose des Gefäßlumens feststellbar. Nach Unterteilung der Segmente in einen aortenbogennahen, proximalen (Segment I-III) und einen aortenbogenfernen, distalen Abschnitt (Segment IV-XII), fand sich im proximalen Abschnitt eine um 41% (Nebivolol-Gruppe) und um 39% (Metoprolol-Gruppe) signifikante verminderte Plaquefläche nach medikamentöser Behandlung gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0089$ ). Bei der Stenose des Gefäßlumens sowie im distalen Abschnitt der Aorta thoracalis waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar.

Eine Reduktion atherosklerotischer Läsionen durch Betablockertherapie konnten bereits andere Gruppen in tierexperimentellen Studien beobachten. Für Metoprolol gibt es mehrere Studien am cholesteringefütterten Kaninchen,<sup>76,77,128,129</sup> die alle zu dem Ergebnis führen, dass die mit Metoprolol behandelten Tiere signifikant weniger Plaques entwickelten. Wolf et al.<sup>101</sup> konnten an mit Nebivolol behandelten Ratten nach Ballondilatation der Karotiden eine signifikant verminderte Plaqueentstehung sowie reduzierte Proliferation glatter Muskelzellen und Akkumulation von Makrophagen nachweisen. Für die antiproliferative Eigenschaft von Betablockern gibt es mehrere Begründungen (vgl. Kap. 4.1.2): reduzierte sympathische Aktivität,

verbesserte Hämodynamik und direkte Effekte auf das Endothel sind unter anderen wichtige durch die  $\beta$ -Blockade vermittelte Einflussfaktoren.<sup>75</sup> Biochemische Effekte wie die erhöhte Biosynthese von Prostazyklinen, eine Modifikation von LDL sowie verminderte Thrombozytenaggregation sind weitere für die Atherosklerose relevante Auswirkungen der  $\beta$ -Blockertherapie.<sup>76</sup> Der Einfluss auf die Thrombozytenaggregation wird allerdings kontrovers diskutiert. Während in einer Studie von Pettersson et al.<sup>130</sup> die Plättchenaggregation in Aorten von Kaninchen durch eine Vorbehandlung mit Metoprolol signifikant gesenkt wurde, konnte in einer klinischen Studie an zehn gesunden Männern unter sympatho-adrenaler Stresstimulation kein Einfluss des Medikamentes nachgewiesen werden.<sup>131</sup> Celik et al.<sup>132</sup> verglichen in einer größeren klinischen Studie den Einfluss von Nebivolol und Metoprolol auf die Plättchenaggregation. Nach einer sechsmonatigen Verabreichung der Medikamente kamen sie zu dem Ergebnis, dass zwar beide Betablocker einen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung haben, jedoch nur Nebivolol zu einer signifikanten Reduzierung führte. Auch Falciani et al.<sup>100</sup> konnten die potentere inhibierende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation von Nebivolol im Vergleich zum  $\beta$ -Blocker Propranolol festhalten. Diese Erkenntnisse könnten auch in der vorliegenden Arbeit eine Ursache für die tendenziell stärkere Plaquereduktion der Betablocker, und insbesondere für Nebivolol sein.

#### **4.2.5.2 Plaquezusammensetzung**

Die Zusammensetzung der Plaques in der vorliegenden Arbeit war in allen drei Versuchsgruppen ähnlich. Von den erstellten histologischen Färbungen, anhand derer die gefärbte Fläche in mm<sup>2</sup> berechnet wurde, nahmen die Makrophagen gefolgt von Lipiden und glatten Muskelzellen und Kollagenen den größten Anteil ein. Nach Stary<sup>40</sup> entspricht diese Zusammensetzung mit Makrophagen als wichtigster Plaquekomponente am ehesten einer atherosklerotischen Typ II (fatty streak) bis Typ III (Präatherom) Läsion. Böger et al.<sup>116</sup> erhielten bei einem ähnlichen Versuchsaufbau (1 % Cholesterin über 12 Wochen) ebenfalls fatty streak-Läsionen. Bestandteile fortgeschrittenerer

Läsionen wie Kalzium nehmen im hier erreichten Plaquestadium noch keine große Fläche ein.

Bezüglich der einzelnen, in dieser Arbeit ermittelten Plaquebestandteile gab es wenig signifikante Unterschiede. Bei der Fläche der glatten Muskelzellen sowie kalziumhaltiger Zellen und der Fläche der Lipide gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, ebenso wenig bei der Zelldichte und der Proliferationsrate. Die Gesamtzellzahl war jedoch in der Kontroll-Gruppe gegenüber der Nebivolol-Gruppe signifikant erhöht ( $p=0,0190$ ).

Ein bedeutender signifikanter Unterschied konnte in der Fläche der Makrophagen festgestellt werden. Makrophagen entstehen aus in die Gefäßintima eingewanderten Monozyten unter Einfluss diverser Zytokine und Wachstumsfaktoren wie VCAM-1 oder MCP-1 (vgl. Kap. 4.1.1.4).<sup>54,58,59</sup> Sie fördern lokale inflammatorische Prozesse durch Freisetzung inflammatorischer Zytokine, Chemokine, Radikale und Proteasen, die die Stabilität der Plaque durch Zerstörung extrazellulärer Matrix mindern und tragen dadurch wesentlich zur Progression und Komplikation der Atherosklerose bei.<sup>133,134,135</sup>

Die Stellen in einer Plaque, die zu Rupturen neigen, sind in der Regel stark makrophagenhaltig.<sup>32</sup> Im Aortenbogen unterschied sich in dieser Arbeit im Mittel aller vier RAM-11-gefärbten Segmente die mit Nebivolol behandelte Gruppe signifikant von den anderen zwei Gruppen ( $p=0,0034$ ). Bei der Betrachtung der Einzelsegmente des Aortenbogens konnte dieses Ergebnis im Segment III bestätigt werden, wo sich die Nebivolol-Gruppe ebenfalls signifikant von beiden anderen Gruppen unterschied ( $p=0,0148$ ), im Segment II ist der Unterschied jedoch nur zur Kontroll-Gruppe erkennbar ( $p=0,0482$ ). In den Einzelsegmenten I und IV sowie in den Plaques der Aorta thoracalis sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Es ist daher anzunehmen, dass eine Behandlung mit Nebivolol die Zahl der Makrophagen in atherosklerotischen Plaques im Vergleich mit nicht-behandelten Tieren reduziert. Wolf et al.<sup>101</sup> konnten zeigen, dass bei Ratten nach Vorbehandlung mit Nebivolol signifikant weniger Makrophagen in vorher per Ballondilatation verletzten Karotiden akkumulierten. Auch Mollnau et al.<sup>93</sup> beobachteten in einer



Studie mit hyperlipidämischen WHHL-Kaninchen eine signifikant verminderte Makrophagen-Infiltration in die Aorta nach achtwöchiger Vorbehandlung mit Nebivolol.

Die gefärbte Fläche an Kollagen Typ III war in den medikamentös behandelten Flächen signifikant niedriger als in der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0018$ ). Die mittels RT-PCR ermittelte Expression von Kollagen-Typ I-mRNA in den Karotiden der Kaninchen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe war ebenfalls um mehr als die Hälfte geringer als in der Kontroll-Gruppe, ein signifikanter Unterschied bestand allerdings nur zwischen der Nebivolol- und der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0374$ ). In der histologischen Färbung im Aortenbogen ergab sich für Kollagen Typ I jedoch kein signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, auch die Kollagen-Typ VIII-mRNA Expression wurde nicht wesentlich durch die Betablockertherapie beeinflusst. Diese Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich gegenüber anderen Ergebnissen dieser Studie. Kollagene dienen neben anderen Substanzen zur Stabilisierung der fibrösen Kappe und schützen die Plaque vor Rupturen. Glatte Muskelzellen spielen eine zentrale Rolle in der Synthese von Kollagenen, Makrophagen hingegen zerstören extrazelluläre Matrix, so auch Kollagene.<sup>136,137,138</sup> Ein erhöhtes Vorkommen glatter Muskelzellen oder eine gesteigerte Apoptoserate von Makrophagen könnten demnach zur Plaquestabilisierung durch Kollagene beitragen. In dieser Arbeit gibt es jedoch in der Kontroll-Gruppe gegenüber den anderen Versuchsgruppen weder einen signifikanten Unterschiede bezüglich des Vorkommens glatter Muskelzellen, noch ist die Fläche der Makrophagen vermindert. Eine dennoch mögliche Erklärung für das vermehrte Vorkommen von Kollagen Typ I und III in der Kontroll-Gruppe könnte sein, dass die Plaques ohne die antiatherosklerotische Wirkung der Betablockertherapie ein bereits fortgeschrittenes Plaquestadium erreicht haben. Manche Autoren konnten demonstrieren, dass der absolute Gehalt an Kollagenen in experimentell induzierten atherosklerotischen Läsionen mit zunehmender Plaqueprogression anstieg.<sup>133</sup> Zwar waren die Tiere der Kontroll-Gruppe zeitlich nicht länger der proatherosklerotischen Cholesterindiät ausgesetzt als die Tiere der Betablockerguppen, jedoch waren die entwickelten Plaques größer, enthielten

mehr Kalzium (aber nicht signifikant mehr) und waren somit eventuell auch in einem fortgeschrittenerem Stadium.

#### **4.2.5.3 Einfluss auf inflammatorische Mediatoren**

Die Expression der mRNA des von Endothelzellen exprimierten<sup>54</sup> Adhäsionsmoleküls VCAM-1 war in der vorliegenden Arbeit durch Behandlung mit den Betablockern Nebivolol und Metoprolol in den Karotiden der Tiere signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ( $p=0,0017$ ). VCAM-1 begünstigt die Adhäsion und die Transmigration von Leukozyten, insbesondere Monozyten und T-Lymphozyten, durch das Endothel und ist in der frühen Atherogenese von großer Bedeutung.<sup>54,25</sup> In cholesterininduzierten Läsionen steigt die VCAM-1-Expression noch vor der Leukozyteninfiltration in die Gefäßwand an.<sup>139</sup> Eine experimentelle Inaktivierung des VCAM-1-Rezeptors in hypercholesterinämischen Mäusen reduzierte die Progression der Atherosklerose.<sup>139</sup> In mehreren tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von VCAM-1 hauptsächlich an für atherosklerotische Läsionen prädestinierten Stellen hochreguliert wird und vor allem in frühen Atherosklerosestadien vom Endothel, später von intimalen Zellen produziert wird.<sup>58,59</sup> Wahrscheinlich beruht die schnelle Hochregulation von VCAM-1 nach Beginn einer Cholesterindiät auf einer Entzündungsreaktion, die von in der Intima akkumulierten modifizierten Lipoproteinpartikeln stimuliert wird. Diese können die Aktivität des VCAM-1-Gens über den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B steigern.<sup>25</sup> Dass die Therapie mit bestimmten Betarezeptorenblockern die Expression von VCAM-1 signifikant beeinflussen kann, zeigten Sauter et al.<sup>102</sup> in einer in vitro Studie an humanen koronararteriellen Endothelzellen. Eine 72-stündige Vorbehandlung mit den Drittgenerations-Betablockern Nebivolol und Carvedilol reduzierte die durch Beigabe von CRP bedingte Steigerung der VCAM-1-mRNA-Expression neben anderen proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen signifikant, durch Vorbehandlung mit Metoprolol konnte dieses Ergebnis nicht erzielt werden. Auch Wolf et al.<sup>101</sup> konnten in einer kürzlich publizierten umfangreichen Studie an humanen koronararteriellen Endothel- und glatten

Muskelzellen einen positiven antiatherosklerotischen Effekt einer Vorbehandlung mit Nebivolol bezüglich der VCAM-1-mRNA-Expression nachweisen. Metoprolol wiederum hatte keinen senkenden Effekt auf VCAM-1-mRNA-Transkripte. In derselben Studie wurde auch der Einfluss von Nebivolol auf die Makrophagenakkumulation in Karotiden von Ratten nach vorheriger Verletzung mittels Ballondilatation untersucht. Eine analog verminderte Makrophagenakkumulation in den Plaques der Nebivolol-behandelten Tiere wie bei Wolf et al.<sup>101</sup> wurde auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt (vgl. Kap. 4.2.5.2). Dieses Ergebnis könnte teilweise durch die verminderte VCAM-1-Expression bedingt sein.

Das Chemokin MCP-1 trägt neben VCAM-1 in der Atherogenese wesentlich zur Rekrutierung von Leukozyten und vor allem zu deren Aufnahme in die Gefäßwand bei.<sup>25</sup> Es wird von diversen Zellen der Gefäßwand und von aktivierten Makrophagen produziert.<sup>54</sup> MCP-1 wird bereits in frühen atherosklerotischen Läsionen von Menschen und NZW-Kaninchen exprimiert.<sup>140</sup> In Studien mit Atherosklerose-anfälligen mutanten Mäusen mit fehlender MCP-1-Produktion bzw. fehlendem -Rezeptor konnte eine auffallend niedrige Akkumulation von Makrophagen und Lipiden beobachtet werden.<sup>141,142</sup>(175,176) Die experimentelle Blockade von MCP-1 an hypercholesterinämischen Mäusen führt zu einer Reduktion der Atherogenese, zu einer veränderten Plaquezusammensetzung und damit zu einer höheren Plaquestabilität.<sup>143</sup> Wolf et al.<sup>101</sup> konnten in der oben genannten in-vitro-Studie eine signifikant reduzierte Expression von MCP-1-mRNA in humanen koronaren Endothel- sowie glatten Muskelzellen für mit Nebivolol vorbehandelten Zellkulturen im Gegensatz zur Behandlung mit Metoprolol nachweisen. Die Messung von MCP-1 per ELISA im Zellkulturüberstand bestätigte dieses Ergebnis. Die vorteilhaften Ergebnisse der Therapie mit Nebivolol konnte in der vorliegenden Studie nicht signifikant nachvollzogen werden. Zwar war die MCP-1-mRNA-Expression in der Nebivolol-Gruppe im Vergleich mit den anderen Gruppen tendenziell reduziert, die per ELISA ermittelte Serumkonzentration konnte diese Tendenz jedoch nicht aufweisen.

Die vom Endothel und von aktivierten Makrophagen gebildeten<sup>54,25,66</sup> Wachstums- und Angiogenesefaktoren PDGF, bFGF und VEGF spielen in der fortgeschritteneren Atherogenese eine wichtige Rolle. Sowohl PDGF als auch bFGF sind an der Ausbildung der fibrösen Kappe beteiligt. Sie stimulieren die Proliferation glatter Muskelzellen und deren Migration in die Intima, ebenso wird die Synthese von festigendem, extrazellulärem Bindegewebe angeregt.<sup>54,66,144</sup> Böhm et al.<sup>145</sup> konnten in vivo an humanen Gefäßabschnitten zeigen, dass PDGF in allen Stadien der Atherosklerose sowohl von Endothelzellen als auch von Makrophagen produziert wird, als Mitogen auf glatte Muskelzellen wirkt und deren Proliferation stimuliert. Die Expression des zugehörigen Rezeptors von glatten Muskelzellen wurde ab dem Stadium infiltrierender Makrophagen an verdickten intimalen Stellen gefunden. Edelman et al.<sup>146</sup> wiesen die mitogene Wirkung von bFGF auf glatte Muskelzellen in per Ballondilatation verletzten Rattenkarotiden nach. Die Zellproliferation und intimale Hyperplasie konnte nach Verabreichung von bFGF um das bis zu Vierfache im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe gesteigert werden. bFGF hat neben dem Einfluss auf glatte Muskelzellen auch eine angiogenetische Komponente und zählt neben VEGF zu den klassischen Angiogenesefaktoren.<sup>25,147,144</sup> Edelman et al.<sup>146</sup> konnten in oben geschilderter Studie eine linear zur Zellproliferation gesteigerte Angiogenese in mit bFGF behandelten Ratten nachweisen. Sie schließen daraus auf einen gekoppelten Effekt von bFGF bezüglich der Proliferation glatter Muskelzellen und Neovaskularisation in der Plaque. In einer tierexperimentellen Studie mit Atherosklerose-anfälligen Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch Verabreichung von Angiogeneseinhibitoren die intimale Neovaskularisation und das Plaqueswachstum reduziert wird.<sup>148</sup> Die Beteiligung von VEGF, einem hochpotenten Regulator physiologischer und pathologischer Angiogenese<sup>149</sup> an der Neovaskularisation während der Atherogenese wurde von mehreren Autoren beobachtet. Ruff et al.<sup>150</sup> demonstrierten das verstärkte Vorkommen von VEGF in der Neointima von zuvor verletzten Pavianaorten mittels immunhistochemischer Färbung. In derselben Studie bewiesen sie außerdem an humanen und von Ratten stammenden glatten Gefäßmuskelzellen, dass unter oxidativem Stress die

Expression von VEGF-mRNA bis auf das Vierfache anstieg und analog dazu die VEGF-Protein-Sekretion verstärkt wurde. Celletti et al.<sup>151</sup> verabreichten cholesteringefütterten, mutanten Atherosklerose-anfälligen Mäusen niedrige Dosen von VEGF. Im Gegensatz zu Kontrolltieren konnten sie nach Behandlung mit VEGF ein signifikant erhöhtes Vorkommen von Makrophagen im Knochenmark und peripheren Blut sowie eine bis vierzehnfach verstärkte Plaqueeentwicklung feststellen, auch der Gehalt an Makrophagen in der Plaque war überproportional vermehrt. Zur Bestätigung ihrer Ergebnisse wiederholten sie den Versuch an cholesteringefütterten Kaninchen und erhielten nach drei Wochen eine vergleichbare VEGF-vermittelte Plaueprogression.

In der vorliegenden Arbeit konnte für diese drei proinflammatorischen Mediatoren PDGF, bFGF und VEGF der fortgeschrittenen Atherosklerose ein signifikant reduzierender Einfluss der Betablockertherapie beobachtet werden. Die Expression der PDGF- $\beta$ -mRNA ( $p < 0,0001$ ), die der bFGF-mRNA ( $p < 0,0001$ ) als auch der VEGF-mRNA ( $p = 0,0019$ ) war in Karotiden der medikamentös behandelten Tiere im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt. Ähnliche Ergebnisse erhielten Wolf et al.<sup>101</sup> in bereits erwähntem Versuch. Sie konnten eine verringerte Expression von PDGF-B- und PDGF-BB-mRNA in humanen koronararteriellen Endothel- und glatten Muskelzellen nach Inkubation mit Nebivolol nachweisen, wohingegen die Behandlung mit Metoprolol nur eine tendenzielle Verminderung zeigte. Auch die Expression von bFGF-mRNA und dem zugehörigen Protein konnte nur nach Inkubation mit Nebivolol, nicht mit Metoprolol signifikant gesenkt werden. In einem anderen Zellkulturversuch mit ähnlichem Versuchsaufbau wiesen Wolf et al.<sup>19</sup> die Downregulation des PDGF-A-Gens durch Behandlung mit Nebivolol nach, wiederum im Gegensatz zu Metoprolol. Dieser Vorteil von Nebivolol gegenüber Metoprolol konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, beide medikamentös behandelten Gruppen unterschieden sich signifikant von der Kontroll-Gruppe, untereinander waren sie jedoch nicht signifikant verschieden. Für den Einfluss von Nebivolol auf VEGF gibt es bisher keine vergleichbaren Ergebnisse.

Auf die reduzierte endotheliale Freisetzung des Vasokonstriktors Endothelin-1 scheint die medikamentöse Behandlung ebenfalls einen positiven Einfluss zu haben. Die Fläche von Endothelin-1 gefärbten Zellen ist in der Metoprolol-Gruppe signifikant erniedrigt gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0256$ ). Mehrere klinische Studien konnten einen Einfluss einer Betablockertherapie auf Endothelin-1 aufzeigen. Garlichs et al.<sup>152</sup> wiesen in einer Studie an menschlichen Endothelzellen aus der Umbilikalvene mit mehreren  $\beta$ -Blockern, unter anderem Metoprolol, nach, dass diese einen direkten Einfluss auf das Endothel haben und die dortige Biosynthese von Endothelin-1 reduzieren. Xu et al.<sup>153</sup> beobachteten in einer klinischen Studie an 24 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz eine deutliche Minderung der Endothelin-1-Plasmakonzentration nach zusätzlicher Verabreichung von Metoprolol zur Standardtherapie im Vergleich mit einer Kontroll-Gruppe. Brehm et al.<sup>17,18</sup> konnten in Zellkulturversuchen mit humanen koronaren glatten Muskel- und Endothelzellen auch für Nebivolol eine signifikante Minderung der Endothelin-1 Sekretion, eine reduzierte Expression von Präproendothelin-1-mRNA sowie eine Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen, sogar bei gleichzeitigem Vorkommen von Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1 oder PDGF-BB, nachweisen. Diesen hemmenden Effekt hatten andere Betablocker wie Metoprolol nicht. In der vorliegenden Studie konnte für Nebivolol keine signifikante Minderung der Endothelin-1 gefärbten Fläche (0,16 mm<sup>2</sup>) gegenüber den anderen Gruppen festgestellt werden, eine Tendenz zu einer niedrigeren Endothelin-1-Freisetzung im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe war jedoch erkennbar.

Wolf et al.<sup>101</sup> erklären die Downregulation proinflammatorischer Mediatoren durch Behandlung mit dem Betarezeptorblocker Nebivolol mit einer möglicherweise erniedrigten Aktivierung von NF $\kappa$ B. Dieser Transkriptionsfaktor spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation einer Reihe von Genen, die an inflammatorischen und proliferativen Zellprozessen beteiligt sind.<sup>154</sup> Brand et al.<sup>154</sup> konnten Ende der 1990er Jahre erstmals mittels Immunfluoreszenz und immunhistochemischen Methoden das Vorhandensein von aktiviertem NF $\kappa$ B in menschlichem atherosklerotischen Gewebe nachweisen. Eine Aktivität von

NFκB wurde in glatten Muskelzellen, Makrophagen und endothelialen Zellen entdeckt, selbst in frühen Plaquestadien. Die Aktivierung von NFκB selbst wird unter anderem über oxidativen Stress reguliert.<sup>60</sup> Da Nebivolol antioxidative Eigenschaften besitzt,<sup>91</sup> ist eine Downregulation bestimmter vom Endothel oder glatter Muskelzellen gebildeter Substanzen wie VCAM-1, MCP-1 oder PDGF über NFκB nicht auszuschliessen. Wolf et al.<sup>19</sup> konnten in einem Zellkulturversuch mit humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen einen signifikant verminderten basalen Gehalt an NFκB nach Behandlung mit Nebivolol, nicht aber mit Metoprolol, beobachten. In der vorliegenden Arbeit wurde kein Vorteil der Betablockertherapie auf die verminderte Aktivität von NFκB gefunden. Immunhistochemisch wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für die NFκB-gefärbten Flächen in den Plaques der Aortenbögen gefunden, was eventuell an der ohnehin nur geringen Anfärbung liegen könnte.

### 4.3 Material- und Methodenkritik

Das cholesteringefütterte Kaninchen ist zwar unter den tierexperimentellen Modellen der Atheroskleroseforschung ein etabliertes Verfahren, dennoch spiegelt es das komplexe Zusammenspiel umfangreicher Prozesse in der menschlichen Atherogenese nur teilweise wider. Die Ausbildung von atherosklerotischen Gefäßveränderungen beim Menschen dauert mehrere Jahrzehnte. Innerhalb der kurzen Versuchszeit dieser Arbeit von nur 15 Wochen können die komplizierten, chronischen Veränderungen daher nur in Ansätzen reproduziert werden. Um komplexere, den humanen Läsionen ähnlichere Plaques zu erhalten, hätten statt NZW-Kaninchen WHHL-Kaninchen, die schon im Alter von wenigen Monaten spontan dem Menschen ähnlichere atherosklerotische Läsionen entwickeln,<sup>110</sup> eingesetzt werden müssen. Allgemein beeinflussen Dauer und Intensität der Cholesterindiät die morphologische Ausprägung der Plaques.<sup>107,112</sup> Es wäre daher möglich gewesen, die Versuchsdauer zu erweitern, um fortgeschrittenere Plaquestadien zu erreichen. Eine intensivere Cholesterindiät wäre aufgrund der hohen Hepatotoxizität<sup>103</sup> und der ohnehin bereits schlechten Verträglichkeit des Futters nicht möglich gewesen. Auch eine zusätzliche mechanische Verletzung der Gefäße beispielsweise mittels Ballondilatation hätte zu progressiveren Läsionen geführt.<sup>114</sup>

Ein weiterer Limitationsfaktor dieser Studie ist die geringe Anzahl von Versuchstieren, zumal acht der 24 NZW-Kaninchen vorzeitig aus dem Versuch ausschieden und von der Wertung ausgeschlossen wurden. Die damit verbundene kleine Gruppengröße kann dazu führen, dass möglicherweise vorhandene Unterschiede nicht nachgewiesen werden können.

Um detailliertere Erkenntnisse über den Einfluss der Betablockertherapie auf den Lipidmetabolismus des cholesteringefütterten Kaninchens zu gewinnen, hätte man die Plasmalipoproteine häufiger bestimmen müssen, nicht nur zu Beginn des Hauptversuches und bei Versuchende. Auch die Plasmakonzentration der  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Metoprolol wurde nicht bestimmt. Die signifikant reduzierte Herzfrequenz in den regelmäßigen



EKG-Kontrollen lässt jedoch auf eine ausreichende enterale Resorption und eine im therapeutischen Bereich liegende Plasmakonzentration schließen.

Des Weiteren besteht eine Diskrepanz zwischen dem für morphometrische, histologische und immunhistochemische Untersuchung verwendeten Material und dem für die RT-PCR benutzten Gefäßabschnitte. Die Expression der verschiedenen Gene mittels RT-PCR konnte nicht wie alle anderen Untersuchungen an Abschnitten des Aortenbogens und der Aorta thoracalis vorgenommen werden, da diese aufgrund der Perfusionsfixierung der Aorta mit Formalin versetzt waren. Stattdessen wurden die sofort nach Entnahme schockgefrorenen Karotiden der Tiere verwendet. Ein morphometrischer Nachweis der atherosklerotischen Läsionen erfolgte jedoch nur an der Aorta. Aufgrund des morphologischen Eindrucks der Gefäße bei Entnahme und der allgemeinen raschen Progression der Atherosklerose im cholesteringefütterten NZW-Kaninchen ist allerdings davon auszugehen, dass es auch in den Karotiden zur Plaquebildung kam.

Ein Kritikpunkt an der Ermittlung der MCP-1-Konzentration im Serum mittels ELISA ist die Verwendung eines primär für humane Proben konzipierten Assays. Nach Angaben des Herstellers eignet sich dieser jedoch auch zur Messung des Kaninchen-MCP-1-Antigens.

Das für die vorliegende Arbeit verwendete Studiendesign ist trotz der Kritikpunkte ein angemessenes Tiermodell für die Erforschung von pathologischen Prozessen und therapeutischen Ansätzen in der frühen Atherosklerose. So konnten in diesem Versuch für die Atherogenese grundlegende inflammatorische Prozesse und der Einfluss einer Betablockertherapie auf die Entstehung und Beschaffenheit früher atherosklerotischer Plaques *in vivo* gut untersucht werden.

#### 4.4 Abschließende Beurteilung und Ausblick

Die Behandlung der hypercholesterinämischen NZW-Kaninchen mit den  $\beta$ -Blockern Nebivolol und Metoprolol führte in der vorliegenden Studie zu positiven antiatherosklerotischen Wirkungen im Gegensatz zu einer unbehandelten Kontroll-Gruppe. Besonders die Therapie mit dem hochselektiven  $\beta_1$ -Rezeptorenblocker Nebivolol, der über die  $\beta$ -Blockade hinaus NO-vermittelte vasodilatierende,<sup>10,86</sup> antioxidative<sup>92</sup> und antiproliferative<sup>17,19</sup> Eigenschaften besitzt, scheint einen günstigen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität der Tiere, die reduzierte Entstehung und Zusammensetzung atherosklerotischer Plaques und die verminderte Freisetzung proatherosklerotischer inflammatorischer Substanzen zu haben.

Beide Betablocker bewirkten gleichermaßen eine reduzierte Expression proinflammatorischer, an der Atherogenese beteiligter Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle. Das Überleben der Tiere war jedoch nur in der mit Nebivolol behandelten Gruppe signifikant erhöht, in der alle Tiere das geplante Versuchsende erreichten. Die Größe der Plaques und der Gehalt an Makrophagen im Aortenbogen waren ebenfalls in der Nebivolol-Gruppe am geringsten. Auch die Leukozytenzahl war nur in der Nebivolol-Gruppe signifikant vermindert.

Eine Therapie mit Nebivolol scheint daher gegenüber der Anwendung von Metoprolol Vorteile in der Behandlung und Prävention von Atherosklerose zu haben. Weitere Untersuchungen werden jedoch notwendig sein, um die vorteilhafte antiatherogene Wirkung von Nebivolol gegenüber Metoprolol auch klinisch bestätigen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie die chronisch ischämische Herzkrankheit oder der Myokardinfarkt zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen und sind in der deutschen Todesursachenstatistik führend. Atherosklerose ist die Hauptursache dieser Gruppe von Erkrankungen. In der medikamentösen Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen ist der Einsatz von Betarezeptorenblocker unerlässlich, sie senken die Morbidität und Mortalität nachweislich und haben eine antiatherogene Wirkung. Nebivolol, ein hochselektiver  $\beta_1$ -Rezeptorenblocker der dritten Generation, besitzt darüber hinaus NO-vermittelte vasodilatierende, antioxidative, antiproliferative und antiinflammatorische Eigenschaften und könnte daher in der Therapie und Prävention von Atherosklerose-bedingten Erkrankungen von Vorteil gegenüber anderen  $\beta$ -Blockern sein.

Das Ziel der vorliegenden Studie war, den Einfluss der beiden  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Metoprolol auf Entstehung und Zusammensetzung atherosklerotischer Plaques sowie auf beteiligte inflammatorische Prozesse am cholesteringefütterten, atherosklerotischen Kaninchen in-vivo zu untersuchen. Dazu wurden 24 NZW-Kaninchen in drei Gruppen (Kontroll-, Nebivolol-, Metoprolol-Gruppe) unterteilt. Während der 15-wöchigen Versuchsphase wurde den Tieren nach einer zweiwöchigen Vorfütterungsphase mit Standardfutter über acht bzw. fünf Wochen eine Diät mit 1 % bzw. 0,5 % Cholesteringehalt verabreicht. Die Kaninchen der medikamentös behandelten Gruppen erhielten zudem von Beginn an die  $\beta$ -Blocker Nebivolol bzw. Metoprolol. In zweiwöchigem Abstand wurde mittels EKG die Herzfrequenz der Tiere gemessen. Eine signifikant verminderte Frequenz bei den Tieren der Nebivolol- und der Metoprolol-Gruppe ließ auf eine ausreichende Dosierung der Medikamente schließen. Plasmalipide, Parameter des kleinen Blutbildes sowie Leber- und Pankreaswerte wurden in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die Plasmalipide wurden zu Beginn des Hauptversuches und bei Versuchende ermittelt. Bei Versuchende wurden den Tieren die Karotiden und die Aorta sowie Organe entnommen. Die entstandenen Plaques des Aortenbogens und

der Aorta thoracalis wurden auf Größe und ihren Gehalt an Makrophagen, Kalzium, Lipiden, glatte Muskelzellen, Kollagene und Endothelin-1 morphologisch, histologisch und immunhistochemisch untersucht. Begleitend dazu wurde an den schockgefrorenen Karotiden der Kaninchen mittels real-time-RT-PCR und ELISA die mRNA-Expression bzw. Konzentration der an der Atherogenese beteiligten inflammatorischen Adhäsionsmoleküle (VCAM-1), Wachstums- (MCP-1, PDGF- $\beta$ , bFGF, VEGF) und des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B sowie verschiedene Kollagene (Typ I und Typ VIII) bestimmt.

Alle Tiere reagierten gegen Ende des Versuches mit einer zunehmenden Leberschädigung auf die Cholesterindiät. Ikterische Veränderungen an den Skleren und am Fell der Tiere, ein erhöhtes Lebergewicht sowie ein starker Anstieg der Leber- und Pankreasparameter waren deutliche Hinweise auf die Hepatotoxizität des Futters. Zudem führte die Cholesterindiät bei allen Tieren innerhalb weniger Wochen zur Entwicklung einer Hypercholesterinämie und Hyperlipoproteinämie, einer normozytären, hyperchromen Anämie und einer Leukozytose. Bei der Leukozytenzahl hatte die Behandlung mit Nebivolol einen signifikant verminderten Einfluss im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe. Auf alle anderen Blutparameter, die Organgewichte sowie das Körpergewicht, die Futter- und Cholesterinaufnahme hatte die medikamentöse Behandlung keinen wesentlich günstigeren bzw. keinen signifikanten Einfluss. Acht der 24 Tiere mussten wegen zunehmender Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes vorzeitig aus dem Versuch genommen und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden. Das Überleben der Tiere war in der mit Nebivolol behandelten Gruppe, in der alle Tiere das geplante Versuchsende erreichten, gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant höher.

Auch auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques hatte die Behandlung mit Nebivolol protektive Auswirkungen. Die Plauegröße im Aortenbogen war in der Nebivolol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant vermindert. Auch der Gehalt an Makrophagen in den Plaques der Aortenbögen war in der Nebivolol-Gruppe im Vergleich mit den beiden anderen Gruppen signifikant reduziert. Auf andere Plauebestandteile wie Kalzium, glatte Muskelzellen oder

Kollagen Typ I hatte weder Nebivolol noch Metoprolol einen signifikanten Einfluss. Kollagen Typ III war in beiden medikamentös behandelten Gruppen im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt, das mittels RT-PCR gemessene Kollagen Typ I nur in der Nebivolol-Gruppe.

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Plaqueentwicklung und den erniedrigten Makrophagengehalt der Plaques in der Nebivolol-Gruppe könnte die verminderte Expression der verschiedenen proatherosklerotischen inflammatorischen Mediatoren sein, die in den Karotiden der Kaninchen gemessen wurden. Sowohl die Expression der VCAM-1-, als auch PDGF- $\beta$ -, bFGF- und VEGF-mRNA waren in den Betablockerguppen gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant reduziert. Eine verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B als mögliche Ursache der Downregulation dieser Gene konnte jedoch nicht bestätigt werden. Für die MCP-1-mRNA konnte keine erniedrigte Expression gefunden werden, ebenso wenig für die MCP-1-Serumkonzentration.

Metoprolol reduzierte das Vorkommens von Endothelin-1 in den Plaques des Aortenbogens signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe. In den übrigen Parametern konnte für Metoprolol außer bei der Erythrozytenzahl und dem MCH jedoch keine Vorteile gegenüber der Behandlung mit Nebivolol gefunden werden.

Die Behandlung mit Nebivolol zeigte eine vorteilhafte Reduktion inflammatorischer Prozesse und im Vergleich mit Metoprolol eine verminderte atherosklerotische Gefäßveränderungen im Kaninchenmodell. Diese Eigenschaften lassen eine Anwendung von Nebivolol in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, denen eine Atherosklerose zugrunde liegt, sinnvoll erscheinen. Es werden jedoch weitere Untersuchungen notwendig sein, um die antiatherogenen Vorteile von Nebivolol gegenüber Metoprolol klinisch bestätigen zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. World Health Organisation: Ten statistical highlights in global public health. *Geneva* 2006;  
[http://www.who.int/whosis/whostat2006\\_10highlights.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat2006_10highlights.pdf)  
(eingesehen September 2007)
2. World Health Organisation: Preventing chronic diseases: a vital investment. *Geneva* 2005;  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241563001\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241563001_eng.pdf)  
(eingesehen September 2007)
3. Statistisches Bundesamt: Herzkreislauferkrankung bleibt häufigste Todesursache. Pressemitteilung Nr 383 vom 15.9.2006;  
[http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2006/09/PD06\\_\\_383\\_\\_232,templateId=renderPrint.psml](http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2006/09/PD06__383__232,templateId=renderPrint.psml)  
(eingesehen September 2007)
4. Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;**340**:115-126
5. Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature* 2000;**407**:233-241
6. Shin J, Johnson JA: Pharmacogenetics of beta-blockers. *Pharmacotherapy* 2007;**27**:874-887
7. Gottlieb SS, McCarter RJ, Vogel RA: Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;**339**:489-497
8. Egan BM, Basile J, Chilton RJ, Cohen JD: Cardioprotection: the role of beta-blocker therapy. *J Clin Hypertens* 2005;**7**:409-416
9. Kennedy HL: Current utilization trends for beta-blockers in cardiovascular disease. *Am J Med* 2001;**110 Suppl 5A**:2S-6S
10. Gielen W, Cleophas TJ, Agrawal R: Nebivolol: a review of its clinical and pharmacological characteristics. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2006;**44**:344-357
11. Brixius K, Bundkirchen A, Bolck B, Mehlhorn U, Schwinger RH: Nebivolol, bucindolol, metoprolol and carvedilol are devoid of intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium. *Br J Pharmacol* 2001;**133**:1330-1338
12. Berlin-Chemie Menarini: Fachinformation zu Nebilet®, Stand: November 2004. Berlin 2004

13. Sule SS, Frishman W: Nebivolol: new therapy update. *Cardiol Rev* 2006;**14**:259-264
14. Kalinowski L, Dobrucki LW, Szczepanska-Konkel M, Jankowski M, Martyniec L, Angielski S, Malinski T: Third-generation beta-blockers stimulate nitric oxide release from endothelial cells through ATP efflux: a novel mechanism for antihypertensive action. *Circulation* 2003;**107**:2747-2752
15. Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM: Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation* 2001;**104**:511-514
16. Cockcroft J: Nebivolol: a review. *Expert Opin Pharmacother* 2004;**5**:893-899
17. Brehm BR, Bertsch D, von Fallois J, Wolf SC: Beta-blockers of the third generation inhibit endothelin-1 liberation, mRNA production and proliferation of human coronary smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;**36**:S401-S403
18. Brehm BR, Wolf SC, Bertsch D, Klausner M, Wesselborg S, Schuler S, Schulze-Osthoff K: Effects of nebivolol on proliferation and apoptosis of human coronary artery smooth muscle and endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2001;**49**:430-439
19. Wolf SC, Sauter G, Jobst J, Kempf VA, Risler T, Brehm BR: Major differences in gene expression in human coronary smooth muscle cells after nebivolol or metoprolol treatment. *Int J Cardiol* 2007; in press
20. Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**352**:1685-1695
21. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG: Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002;**8**:1249-1256
22. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402-408
23. Bewick V, Cheek L, Ball J: Statistics review 13: receiver operating characteristic curves. *Crit Care* 2004;**8**:508-512
24. World Health Organisation Technical Report Series: The classification of atherosclerotic lesions. Report of a study group. *WHO Tech Rep Ser* 1958;**143**:1-20
25. Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;**420**:868-874

26. Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973;**180**:1332-1339
27. Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;**89**:2462-2478
28. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK: Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986;**6**:131-138
29. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**:1512-1531
30. Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T: Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* 1995;**92**:1084-1088
31. Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmur JD, Nemerson Y: Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1997;**78**:200-204
32. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK: Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;**89**:36-44
33. Bräsen JH, Niendorf A: [Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance]. *Pathologe* 1997;**18**:218-227
34. Assmann G, Carmena R, Cullen P, Fruchart JC, Jossa F, Lewis B, Mancini M, Paoletti R: Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. *Circulation* 1999;**100**:1930-1938
35. Keil U: Prävention der klassischen Risikofaktoren. Eine bevölkerungsmedizinische und gesundheitspolitische Aufgabe. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1990;**40**:388-394
36. Grundy SM: Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin Chem* 1995;**41**:139-146



37. Navab M, Hama SY, Hough GP, Hedrick CC, Sorenson R, La Du BN, Kobashigawa JA, Fonarow GC, Berliner JA, Laks H, Fogelman AM: High density associated enzymes: their role in vascular biology. *Curr Opin Lipidol* 1998;**9**:449-456
38. Goldschmidt-Clermont PJ, Creager MA, Losordo DW, Lam GK, Wassef M, Dzau VJ: Atherosclerosis 2005: recent discoveries and novel hypotheses. *Circulation* 2005;**112**:3348-3353
39. Stary HC: Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;**421**:277-290
40. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;**92**:1355-1374
41. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA: Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006;**5**:4
42. Luscher TF, Barton M: Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997;**20**:II-10
43. Fleming I, Busse R: NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol* 1999;**31**:5-14
44. Mason RP: Nitric oxide mechanisms in the pathogenesis of global risk. *J Clin Hypertens* 2006;**8**:31-38
45. Libby P, Aikawa M, Jain MK: Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol* 2006;285-306
46. Davignon J, Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;**109**:III27-III32
47. Endemann DH, Schiffrin EL: Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;**15**:1983-1992
48. Cockcroft J: Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. *Am J Hypertens* 2005;**18**:117S-183S
49. Sainz JM, Reche C, Rabano MA, Mondillo C, Patrignani ZJ, Macarulla JM, Pignataro OP, Trueba M: Effects of nitric oxide on aldosterone synthesis and nitric oxide synthase activity in glomerulosa cells from bovine adrenal gland. *Endocrine* 2004;**24**:61-71

50. Rubbo H, Trostchansky A, Botti H, Batthyany C: Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein. *Biol Chem* 2002;**383**:547-552
51. Steinberg D, Witztum JL: Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 2002;**105**:2107-2111
52. Schwenke DC, Carew TE: Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis* 1989;**9**:895-907
53. Schwenke DC, Carew TE: Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis* 1989;**9**:908-918
54. Rosenfeld ME: An overview of the evolution of the atherosclerotic plaque: from fatty streak to plaque rupture and thrombosis. *Z Kardiol* 2000;**89 Suppl 7**:2-6
55. Steinberg D: Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;**272**:20963-20966
56. Heinecke JW: Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med* 1999;**133**:321-325
57. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M: A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002;**196**:887-896
58. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R: Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;**18**:842-851
59. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI: Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 1999;**85**:199-207
60. Collins T, Cybulsky MI: NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 2001;**107**:255-264
61. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S: Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002;**14**:123-128

62. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:197-216
63. Newby AC, Zaltsman AB: Fibrous cap formation or destruction-the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 1999;**41**:345-360
64. Campbell GR, Campbell JH: Macrophage influence on smooth muscle phenotype in atherogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1990;**273**:147-159
65. Campbell GR, Campbell JH: The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma. *Ann N Y Acad Sci* 1990;**598**:143-158
66. Drexler H: Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol* 1998;**82**:3S-4S
67. Frostegård J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK: Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999;**145**:33-43
68. Kockx MM: Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;**18**:1519-1522
69. Bjorkerud S, Bjorkerud B: Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996;**149**:367-380
70. Mombouli JV, Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999;**31**:61-74
71. Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD: Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased. *Atherosclerosis* 1991;**87**:87-90
72. Falk E: Why do plaques rupture? *Circulation* 1992;**86**:III30-III42
73. Rosenfeld ME: Inflammation, lipids, and free radicals: lessons learned from the atherogenic process. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;**16**:249-261
74. Moulton KS: Plaque angiogenesis and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001;**3**:225-233
75. Wikstrand J, Berglund G, Hedblad B, Hulthe J: Antiatherosclerotic effects of beta-blockers. *Am J Cardiol* 2003;**91**:25H-29H

76. Ablad B, Bjorkman JA, Gustafsson D, Hansson G, Ostlund-Lindqvist AM, Pettersson K: The role of sympathetic activity in atherogenesis: effects of beta-blockade. *Am Heart J* 1988;**116**:322-327
77. Ostlund-Lindqvist AM, Lindqvist P, Bräutigam J, Olsson G, Bondjers G, Nordborg C: Effect of metoprolol on diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis* 1988;**8**:40-45
78. Skantze HB, Kaplan J, Pettersson K, Manuck S, Blomqvist N, Kyes R, Williams K, Bondjers G: Psychosocial stress causes endothelial injury in cynomolgus monkeys via beta1-adrenoceptor activation. *Atherosclerosis* 1998;**136**:153-161
79. Pettersson K, Bejne B, Bjork H, Strawn WB, Bondjers G: Experimental sympathetic activation causes endothelial injury in the rabbit thoracic aorta via beta 1-adrenoceptor activation. *Circ Res* 1990;**67**:1027-1034
80. Deetjen P, Speckmann EJ: Physiologie. 3. Aufl. Urban & Fischer, München, 1999; S. 551
81. Lohmann FW, Loesment WA, Kaehler H: Beta-receptor blockade, physical activity, and metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;**16 Suppl 5**:S45-S52
82. Lüllmann H, Mohr K: Pharmakologie und Toxikologie. 14. Aufl. Georg Thieme, Stuttgart, 1999; S. 70
83. Lohmann FW: Stellenwert der Betablocker in der Inneren Medizin. *Internist prax* 2003;**43**:472-488
84. Karow T, Lang-Roth R: Allgemeine und Spezielle Toxikologie und Pharmakologie 2005. 13. Aufl., Köln, 2005
85. Bristow MR, Nelson P, Minobe W, Johnson C: Characterization of beta1-adrenergic receptor selectivity of nebivolol and various other beta-blockers in human myocardium. *Am J Hypertens* 2005;**18**:51A-52A (Abstract P-121)
86. Veverka A, Nuzum DS, Jolly JL: Nebivolol: a third-generation beta-adrenergic blocker. *Ann Pharmacother* 2006;**40**:1353-1360
87. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, Chen CP, Dupont AG, Van Nueten L, Wooding SJ, Ritter JM: Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;**274**:1067-1071
88. Gao YS, Nagao T, Bond RA, Janssens WJ, Vanhoutte PM: Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;**17**:964-969

89. Ignarro LJ: Experimental evidences of nitric oxide-dependent vasodilatory activity of nebivolol, a third-generation beta-blocker. *Blood Press Suppl* 2004;**1**:2-16
90. Zanchetti A: Clinical pharmacodynamics of nebivolol: new evidence of nitric oxide-mediated vasodilating activity and peculiar haemodynamic properties in hypertensive patients. *Blood Press Suppl* 2004;**1**:17-32
91. de Groot AA, Mathy MJ, van Zwieten PA, Peters SL: Antioxidant activity of nebivolol in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;**43**:148-153
92. Mason RP, Kalinowski L, Jacob RF, Jacoby AM, Malinski T: Nebivolol reduces nitroxidative stress and restores nitric oxide bioavailability in endothelium of black Americans. *Circulation* 2005;**112**:3795-3801
93. Mollnau H, Schulz E, Daiber A, Baldus S, Oelze M, August M, Wendt M, Walter U, Geiger C, Agrawal R, Kleschyov AL, Meinertz T, Munzel T: Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**23**:615-621
94. Mason RP, Kubant R, Jacob RF, Walter MF, Boychuk B, Malinski T: Effect of nebivolol on endothelial nitric oxide and peroxynitrite release in hypertensive animals: Role of antioxidant activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;**48**:862-869
95. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;**329**:2002-2012
96. de Groot AA, Mathy MJ, van Zwieten PA, Peters SL: Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;**42**:232-236
97. Broeders MA, Doevendans PA, Bekkers BC, Bronsaer R, van Gorsel E, Heemskerk JW, Egbrink MG, van Breda E, Reneman RS, van Der ZR: Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation* 2000;**102**:677-684
98. Garban HJ, Buga GM, Ignarro LJ: Estrogen receptor-mediated vascular responsiveness to nebivolol: a novel endothelium-related mechanism of therapeutic vasorelaxation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;**43**:638-644
99. Parenti A, Filippi S, Amerini S, Granger HJ, Fazzini A, Ledda F: Inositol phosphate metabolism and nitric-oxide synthase activity in endothelial cells are involved in the vasorelaxant activity of nebivolol. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;**292**:698-703

100. Falciani M, Rinaldi B, D'Agostino B, Mazzeo F, Rossi S, Nobili B, Rossi F, Filippelli A: Effects of nebivolol on human platelet aggregation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;**38**:922-929
101. Wolf SC, Sauter G, Preyer M, Poerner T, Kempf VA, Risler T, Brehm BR: Influence of nebivolol and metoprolol on inflammatory mediators in human coronary endothelial or smooth muscle cells. Effects on neointima formation after balloon denudation in carotid arteries of rats treated with nebivolol. *Cell Physiol Biochem* 2007;**19**:129-136
102. Sauter G, Kreutzer U, Risler T, Brehm BR, Wolf SC: Effekte von Beta-Rezeptor-Antagonisten auf die durch das C-reaktive-Protein vermittelte Expression von Entzündungsmarkern. *Perfusion* 2005;**18**:236-240
103. Yanni AE: The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim* 2004;**38**:246-256
104. McMahon AC, Kritharides L, Lowe HC: Animal models of atherosclerosis progression: current concepts. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005;**5**:433-440
105. Fan J, Watanabe T: Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2000;**7**:26-32
106. Finking G, Hanke H: Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis* 1997;**135**:1-7
107. Bocan TM, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA: The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis* 1993;**102**:9-22
108. Anitschkow N, Chalатов S: Über experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Centralbl f Allg Pathologie u Pathol Anatomie* 1913;**24**:1-9
109. Watanabe Y: Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* 1980;**36**:261-268
110. Atkinson JB, Hoover RL, Berry KK, Swift LL: Cholesterol-fed heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: a new model for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1989;**78**:123-136
111. Constantinides P: The role of arterial wall injury in atherogenesis and arterial thrombogenesis. *Zentralbl Allg Pathol* 1989;**135**:517-530

112. Kolodgie FD, Katocs AS, Jr., Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, Lee SJ, Virmani R: Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;**16**:1454-1464
113. Aikawa M, Rabkin E, Voglic SJ, Shing H, Nagai R, Schoen FJ, Libby P: Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res* 1998;**83**:1015-1026
114. Constantinides P, Gutmann-Auersperg N, Hospes D: Acceleration of intimal atherogenesis through prior medial injury. *AMA Arch Pathol* 1958;**66**:247-254
115. Holm P, Andersen HL, Arroe G, Stender S: Gender gap in aortic cholesterol accumulation in cholesterol-clamped rabbits: role of the endothelium and mononuclear-endothelial cell interaction. *Circulation* 1998;**98**:2731-2737
116. Böger RH, Bode-Böger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R, Frölich JC: Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1998;**136**:67-77
117. Sun YP, Lu NC, Parmley WW, Hollenbeck CB: Effects of cholesterol diets on vascular function and atherogenesis in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;**224**:166-171
118. Wong KK: Effect of a cholesterol-rich diet on the excitability of rabbit aorta. *Biochem Mol Biol Int* 1996;**40**:389-393
119. Kuster GM, Amann FW, Neuenschwander C, Drexel H: High density-lipoprotein subfractions of patients using cardio-selective beta-blockers. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;**16**:127-131
120. Dimmitt SB, Williams PD, Croft KD, Beilin LJ: Effects of beta-blockers on the concentration and oxidizability of plasma lipids. *Clin Sci* 1998;**94**:573-578
121. Peter P, Martin U, Sharma A, Dunne F: Effect of treatment with nebivolol on parameters of oxidative stress in type 2 diabetics with mild to moderate hypertension. *J Clin Pharm Ther* 2006;**31**:153-159
122. Lacourciere Y, Arnott W: Placebo-controlled comparison of the effects of nebivolol and low-dose hydrochlorothiazide as monotherapies and in combination on blood pressure and lipid profile in hypertensive patients. *J Hum Hypertens* 1994;**8**:283-288

123. Feldman DL, Mogelesky TC, Liptak BF, Gerrity RG: Leukocytosis in rabbits with diet-induced atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1991;**11**:985-994
124. Pescador R, Tettamanti R, Salvetti L, Conto A, Barone D, Porta R, Mantovani M, Ferro L: Effects of defibrotide on leukocytosis in rabbits with diet-induced atherosclerosis. *Life Sci* 1995;**57**:579-589
125. Dresel HA, Via DP, Stohr M, Elchner U, Gnasso A, Postiglione A, Blin N, Augustin J, Schettler G: Observations on leukocytes from patients with severe familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1986;**6**:259-264
126. Balkan J, Dogru-Abbasoglu S, Aykac-Toker G, Uysal M: The effect of a high cholesterol diet on lipids and oxidative stress in plasma, liver and aorta of rabbits and rats. *Nutr Res*. 2004;**24**:229-234
127. Restori G, Boiardi L, Barbagallo M, Novo S, Passeri M, Strano A: Progression of induced aortic atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Int Angiol* 1990;**9**:263-265
128. Lindqvist P, Olsson G, Nordborg C, Bondjers G, Bräutigam J, Ostlund-Lindqvist AM: Atherosclerosis in rabbits identified as high and low responders to an atherogenic diet and the effect of treatment with a beta 1-blocker. *Atherosclerosis* 1988;**72**:163-172
129. Sun YP, Zhu BQ, Sievers RE, Glantz SA, Parmley WW: Metoprolol does not attenuate atherosclerosis in lipid-fed rabbits exposed to environmental tobacco smoke. *Circulation* 1994;**89**:2260-2265
130. Pettersson K, Bjork H: Inhibition of platelet accumulation by beta 1-adrenoceptor blockade in the thoracic aorta of rabbits subjected to experimental sympathetic activation. *Cardiovasc Drugs Ther* 1992;**6**:505-511
131. Larsson PT, Olsson G, Angelin B, Granstrom E, Hansson G, Hjemdahl P: Metoprolol does not reduce platelet aggregability during sympatho-adrenal stimulation. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;**42**:413-421
132. Celik T, Yuksel UC, Iyisoy A, Kursaklioglu H, Ozcan O, Kilic S, Ozmen N, Isik E: Effects of nebivolol on platelet activation in hypertensive patients: a comparative study with metoprolol. *Int J Cardiol* 2007;**116**:206-211
133. Kockx MM, De Meyer GR, Buysens N, Knaapen MW, Bult H, Herman AG: Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ Res* 1998;**83**:378-387
134. Boyle JJ: Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;**3**:63-68



- 
135. Davies MJ: Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996;**94**:2013-2020
  136. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P: Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 1998;**97**:2433-2444
  137. Bult H, Herman AG, Matthys KE: Antiatherosclerotic activity of drugs in relation to nitric oxide function. *Eur J Pharmacol* 1999;**375**:157-176
  138. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V: Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995;**92**:1565-1569
  139. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS: A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;**107**:1255-1262
  140. Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D: Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;**88**:5252-5256
  141. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ: Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998;**2**:275-281
  142. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF: Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;**394**:894-897
  143. Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, Takeshita A: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2002;**106**:2700-2706

144. Brogi E, Winkles JA, Underwood R, Clinton SK, Alberts GF, Libby P: Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages. *J Clin Invest* 1993;**92**:2408-2418
145. Bohm M, Blasius S, Roessner A: Immunohistochemical localization of PDGF B, PDGF beta receptors and IGF I receptors during atherogenesis. *Zentralbl Pathol* 1994;**140**:357-362
146. Edelman ER, Nugent MA, Smith LT, Karnovsky MJ: Basic fibroblast growth factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries. *J Clin Invest* 1992;**89**:465-473
147. Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG: Nonclassic endogenous regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2007;**59**:185-205
148. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J: Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999;**99**:1726-1732
149. Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, Levy AP, Fuster V: Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation* 2006;**113**:2245-2252
150. Ruef J, Hu ZY, Yin LY, Wu Y, Hanson SR, Kelly AB, Harker LA, Rao GN, Runge MS, Patterson C: Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circ Res* 1997;**81**:24-33
151. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD: Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001;**7**:425-429
152. Garlich CD, Zhang H, Mugge A, Daniel WG: Beta-blockers reduce the release and synthesis of endothelin-1 in human endothelial cells. *Eur J Clin Invest* 1999;**29**:12-16
153. Xu H, Sun M, Zhou H: [Changes of plasma endothelin-1 in patients with congestive heart failure and the influence of metoprolol]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1998;**23**:467-469
154. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D: Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996;**97**:1715-1722

## 7 Anhang

**Tab. 14:** Klinisch-chemische Parameter bei Versuchsbeginn: Vergleich zwischen den Gruppen „Nicht-Überlebende“ (n=8) und „Überlebende“ (n=16) mit jeweiligem p-Wert

	Mittelwert ± SEM	p-Wert
<b>Cholesterin im Plasma (mg/dl)</b>		
Nicht-Überlebende	69,1 ± 6,1	0,4555
Überlebende	63,9 ± 3,7	
<b>Triglyzeride (mg/dl)</b>		
Nicht-Überlebende	108,5 ± 11,4	0,2859
Überlebende	96,3 ± 5,5	
<b>Leukozyten (1/µl)</b>		
Nicht-Überlebende	6198 ± 402	0,9414
Überlebende	6247 ± 338	
<b>Erythrozyten (Mio/µl)</b>		
Nicht-Überlebende	5,7 ± 0,2	0,2456
Überlebende	5,4 ± 0,1	
<b>Hämatokrit (%)</b>		
Nicht-Überlebende	40,5 ± 0,8	0,0130
Überlebende	37,6 ± 0,5	
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>		
Nicht-Überlebende	12,1 ± 0,3	0,0265
Überlebende	11,3 ± 0,1	
<b>MCH (pg)</b>		
Nicht-Überlebende	21,5 ± 0,5	0,3815
Überlebende	21,1 ± 0,2	
<b>MCHC (g/dl)</b>		
Nicht-Überlebende	30,0 ± 0,2	0,5756
Überlebende	30,2 ± 0,2	

Tab. 14: Fortsetzung

	Mittelwert $\pm$ SEM	p-Wert
<b>MCV (fl)</b>		
Nicht-Überlebende	71,8 $\pm$ 1,4	0,2291
Überlebende	69,8 $\pm$ 0,6	
<b>Thrombozyten (1/nl)</b>		
Nicht-Überlebende	371 $\pm$ 31	0,5512
Überlebende	338 $\pm$ 29	
<b>GOT (U/l)</b>		
Nicht-Überlebende	26,1 $\pm$ 1,1	0,0476
Überlebende	30,1 $\pm$ 1,2	
<b>GPT (U/l)</b>		
Nicht-Überlebende	36,8 $\pm$ 3,0	0,6902
Überlebende	38,3 $\pm$ 2,2	
<b><math>\gamma</math>-GT (U/l)</b>		
Nicht-Überlebende	1,9 $\pm$ 0,4	0,6823
Überlebende	2,1 $\pm$ 0,4	
<b>Lipase (U/l)</b>		
Nicht-Überlebende	76,9 $\pm$ 5,5	0,1691
Überlebende	85,8 $\pm$ 3,4	

**Tab. 15:** Area under the curve (AUC)–Werte aller über den Zeitraum der Versuchsdauer erhobenen Parameter mit jeweiligem Mittelwert  $\pm$  SEM und p-Wert

	<b>Kontroll- Gruppe (n=3)</b>	<b>Nebivolol- Gruppe (n=8)</b>	<b>Metoprolol- Gruppe (n=5)</b>	<b>p-Wert</b>
Herzfrequenz (1/min*Wochen)	4687 $\pm$ 19	3558 $\pm$ 62	3755 $\pm$ 88	0,0001****
Cholesterin (mg/dl*Wochen)	22282 $\pm$ 1364	24028 $\pm$ 2088	17070 $\pm$ 2248	0,1005
Triglyzeride (mg/dl*Wochen)	2517 $\pm$ 506	1686 $\pm$ 229	1664 $\pm$ 403	0,2073
Erythrozyten (Mio/ $\mu$ l*Wochen)	68,5 $\pm$ 2,5	73,2 $\pm$ 1,1	78,3 $\pm$ 1,7	0,0066**
Hämatokrit (%*Wochen)	453 $\pm$ 4	465 $\pm$ 6	493 $\pm$ 14	0,0499
Hb (g/dl*Wochen)	162 $\pm$ 5	165 $\pm$ 3	170 $\pm$ 5	0,4864
MCV (fl*Wochen)	977 $\pm$ 60	943 $\pm$ 20	948 $\pm$ 11	0,6935
MCH (pg*Wochen)	358 $\pm$ 8	341 $\pm$ 5	328 $\pm$ 4	0,0206**
MCHC (g/dl*Wochen)	551 $\pm$ 25	534 $\pm$ 4	519 $\pm$ 4	0,1174
Leukozyten (1/ $\mu$ l*Wochen)	238705 $\pm$ 38539	169774 $\pm$ 6679	188739 $\pm$ 13171	0,0322*
Thrombozyten (1/nl*Wochen)	7280 $\pm$ 378	7049 $\pm$ 419	5905 $\pm$ 570	0,1883
Gesamt- Bilirubin (mg/dl*Wochen)	20,1 $\pm$ 7,8	15,7 $\pm$ 1,8	11,0 $\pm$ 2,5	0,0800

Tab. 15: Fortsetzung

	<b>Kontroll-Gruppe (n=3)</b>	<b>Nebivolol-Gruppe (n=8)</b>	<b>Metoprolol-Gruppe (n=5)</b>	<b>p-Wert</b>
GOT (U/l*Wochen)	610 ± 112	466 ± 26	583 ± 81	0,2471
GPT (U/l*Wochen)	1025 ± 109	774 ± 103	923 ± 142	0,4032
γ-GT (U/l*Wochen)	895 ± 101	781 ± 180	1791 ± 843	0,7763
Lipase (U/l*Wochen)	4821 ± 250	2887 ± 337	3166 ± 394	0,0182*

\* signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und der Kontroll-Gruppe

\*\* signifikanter Unterschied zwischen der Metoprolol- und der Kontroll-Gruppe

\*\*\*\* signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll-Gruppe und den medikamentös behandelten Gruppen

**Tab. 16:** Vom Züchter (Charles River, Kißleg) angegebene Referenzwerte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für in der Arbeit verwendete Blutparameter; Werte wurden ermittelt an 15 Wochen alten, männlichen Weißen Neuseelandkaninchen

<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>	<b>Normalwert</b>
Leukozyten	1/ $\mu$ l	6340 $\pm$ 1520
Erythrozyten	Mio/ $\mu$ l	6,92 $\pm$ 0,5
Hämatokrit	%	43 $\pm$ 3
Hämoglobin	g/dl	14,7 $\pm$ 0,8
MCH	pg	21,3 $\pm$ 0,8
MCHC	g/dl	34,0 $\pm$ 0,7
MCV	fl	62,7 $\pm$ 0,3
Thrombozyten	1000/ $\mu$ l	419 $\pm$ 87,5
Bilirubin gesamt	mg/dl	0,05 $\pm$ 0,02
GOT (ASAT)	U/l	15,9 $\pm$ 5,3
GPT (ALAT)	U/l	25,0 $\pm$ 10,3
$\gamma$ -GT	U/l	nicht angegeben
Lipase	U/l	nicht angegeben
Gesamtcholesterin	mg/dl	65,35 $\pm$ 28,62
Triglyzeride	mg/dl	nicht angegeben
HDL-Cholesterin	mg/dl	nicht angegeben
VLDL-Cholesterin	mg/dl	nicht angegeben
LDL-Cholesterin	mg/dl	nicht angegeben

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die zum Gelingen und zur Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen haben. Zuallererst sei mein Doktorvater Herr Prof. Dr. B. Brehm genannt, dem ich die freundliche Überlassung des Themas danke.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Brehme, die wesentlich dafür verantwortlich ist, dass diese Arbeit zu dem geworden ist, was sie ist. Ihr Engagement, ihre Unermüdlichkeit und ihr großes Wissen waren mir in jeder Phase des Entstehens der Arbeit eine wertvolle Unterstützung. Zwei weiteren Personen möchte ich von Herzen dafür danken, dass sie mir tatkräftig zur Seite standen: zum einen Frau Dr. G. Sauter, die mir stets eine große Hilfe war und mir mit guten Tipps weiterhalf.

Zum anderen und ganz besonders danke ich Herrn Dr. H. Haas, neben dem ich viele lange Stunden über dem Mikroskop und am Computer saß und ohne den ich so manchmal verzweifelt wäre.

Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. F. W. Schmahl für die Bereitstellung der technischen Mittel und der Räumlichkeiten und den MitarbeiterInnen des Instituts für Arbeits- und Sozialmedizin, Frau Dr. V. Röder, Frau A. Glückman, Frau M. Holz, Frau G. Kaletta, Frau J. Schatz und Herrn K. Drysch für ihre wertvolle Hilfe bei den histologischen, immunhistochemischen und laborchemischen Untersuchungen und für viele Antworten auf technische Fragen bedanken. Frau Dr. E. M. Decker aus dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Tübingen danke ich herzlich für die Bereitstellung und die Hilfe am Mikroskop.

Ein besonderer Dank gilt Dr. J. Grundgeiger und meiner Familie, die mich all die Jahre des Studiums und während der Erstellung dieser Arbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt und motiviert haben.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Carolin Grundgeiger, geb. Lorenz  
Geburtsdatum 14. August 1980  
Geburtsort Ludwigsburg

## Schulischer Werdegang

1987-1991 Grundschule Großbottwar  
1991-1995 Herzog-Christoph-Gymnasium in Beilstein  
1995-2000 Friedrich-Schiller-Gymnasium in Marbach a. N.

## Studium

April 2001 Beginn Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen  
31. März 2003 Ärztliche Vorprüfung (alte ÄAppO)  
2006-2007 Praktisches Jahr am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart  
27. Mai 2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (neue ÄAppO)

## Famulaturen

August 2004 Klinikum am Steinenberg, Reutlingen (Gynäkologie)  
Oktober 2005 Centro de Salud, Antigua, Guatemala (Allgemeinmedizin)  
November 2005 Tauranga Hospital, Neuseeland (Innere Medizin)  
Dezember 2005 Tweed Heads District Hospital, Australien (Innere Medizin)

## Beruflicher Werdegang

ab Juli 2008 Assistenzärztin an der Klinik für Frauenheilkunde und  
Geburtshilfe, Klinikum Sindelfingen-Böblingen