

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

# **Einfluss der Betarezeptorenblocker Nebivolol und Metoprolol auf inflammatorische Prozesse im Kaninchenmodell der Atherosklerose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Hansjörg Haas  
aus  
Immenstadt i. Allgäu

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. B. Brehm

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Luippold

*meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Atherosklerose, eine inflammatorische Erkrankung</b>	<b>1</b>
1.1.1	Endotheliale Dysfunktion und Stickstoffmonoxid (NO)	2
1.1.2	Adhäsionsmoleküle und Chemokine	3
1.1.3	Hitze-Schock-Proteine (HSP)	4
1.1.4	C-reaktives Protein (CRP)	5
<b>1.2</b>	<b>Therapeutische Beeinflussung der Atherosklerose durch Betarezeptorenblocker</b>	<b>7</b>
1.2.1	Beta-Adrenorezeptoren	7
1.2.2	Betarezeptorenblocker	8
1.2.2.1	Metoprolol	8
1.2.2.2	Nebivolol	9
<b>1.3</b>	<b>Tiermodell</b>	<b>10</b>
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Tiermodell</b>	<b>13</b>
2.1.1	Versuchstiere und Tierhaltung	13
2.1.2	Gruppeneinteilung und Behandlungsschema	13
2.1.3	Blutentnahme und Messung der Herzfrequenz	16
2.1.4	Versuchsende	16
2.1.4.1	Narkose	16
2.1.4.2	Entnahme und Präparation der Karotiden	16
2.1.4.3	Perfusionsfixierung mit Formalin	17
2.1.4.4	Organ- und Gefäßentnahme	17
<b>2.2</b>	<b>Analyse der Blutparameter</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Ermittlung der Gefäßfunktion der Karotiden</b>	<b>19</b>
2.3.1	Unbehandelte Versuchstiere	19
2.3.2	Substanzen, Lösungen und Medikamente	19
2.3.3	Versuchsaufbau	20
2.3.4	Versuchsdurchführung	20
2.3.4.1	Konzentrationswirkungskurve auf Acetylcholin	21
2.3.4.2	Konzentrationswirkungskurve auf Nitroprussidnatrium	21
2.3.4.3	Gemessene und berechnete Größen	22

---

<b>2.4</b>	<b>Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Gene in den Karotiden</b> .....	<b>23</b>
2.4.1	RNA-Isolierung.....	23
2.4.2	Reverse Transkription.....	23
2.4.3	Polymerasekettenreaktion .....	24
<b>2.5</b>	<b>Untersuchung verschiedener Faktoren im Serum mittels ELISA</b> .....	<b>26</b>
2.5.1	Quantitative Bestimmung des C-reaktiven Proteins.....	26
2.5.2	Quantitative Bestimmung von Interleukin-8 .....	26
<b>2.6</b>	<b>Histologische und immunhistochemische Präparate</b> .....	<b>27</b>
2.6.1	Herstellung von Paraffinpräparaten .....	27
2.6.2	Herstellung von Kryostatpräparaten.....	28
2.6.3	Histologische Färbungen .....	28
2.6.3.1	Elastica van Gieson-Färbung (EvG-Färbung) .....	28
2.6.3.2	Ölrot-Färbung .....	28
2.6.4	Immunhistochemische Färbungen .....	29
<b>2.7</b>	<b>Auswertung der Gefäßpräparate</b> .....	<b>31</b>
2.7.1	Für die Auswertung der Gefäßpräparate verwendete Geräte .....	31
2.7.2	Morphometrische Auswertung .....	32
2.7.2.1	Bestimmung der Plaquerfläche und des Intima-Media-Verhältnisses	32
2.7.3	Digitale Auswertung .....	33
2.7.3.1	Prinzipielles Vorgehen .....	33
2.7.3.2	Bestimmung der Plaquezusammensetzung .....	34
<b>2.8</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Überlebenszeit</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Körpergewicht und Futteraufnahme</b> .....	<b>38</b>
3.2.1	Körpergewicht .....	38
3.2.2	Futter-, Cholesterin- und Medikamentenaufnahme.....	39
<b>3.3</b>	<b>Herzfrequenz</b> .....	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>Organgewichte</b> .....	<b>43</b>
<b>3.5</b>	<b>Blutparameter</b> .....	<b>44</b>
3.5.1	Konzentration der Plasmalipide und -lipoproteine.....	44
3.5.1.1	Gesamtcholesterin .....	44
3.5.1.2	Lipoproteine .....	45
3.5.1.3	Triglyzeride .....	46
3.5.2	Weitere Blutparameter .....	47
3.5.2.1	Kleines Blutbild .....	47
3.5.2.2	Leber- und Pankreaswerte.....	50

<b>3.6</b>	<b>Kontraktions- und Relaxationsmessungen .....</b>	<b>52</b>
3.6.1	Endothelabhängige Relaxation auf Acetylcholin .....	52
3.6.2	Endothelunabhängige Relaxation auf Nitroprussidnatrium .....	54
<b>3.7</b>	<b>mRNA-Expression von VCAM-1, MCP-1 und CRP in den Karotiden .....</b>	<b>56</b>
3.7.1	Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1).....	56
3.7.2	Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) .....	57
3.7.3	C-reaktives Protein (CRP) .....	58
<b>3.8</b>	<b>CRP- und IL-8-Konzentrationen im Serum.....</b>	<b>59</b>
3.8.1	C-reaktives Protein (CRP) .....	59
3.8.2	Interleukin-8 (IL-8).....	60
<b>3.9</b>	<b>Morphometrie und Histologie des Aortenbogens .....</b>	<b>61</b>
3.9.1	Plaquefläche und Intima-Media-Verhältnis .....	61
3.9.2	Plaquebestandteile .....	64
3.9.2.1	Makrophagen.....	64
3.9.2.2	Hitze-Schock-Proteine (HSP).....	66
3.9.2.3	Glatte Muskelzellen, Endothelin-1, NFκB, Lipide.....	68
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Versuchsverlauf .....</b>	<b>71</b>
4.1.1	Hypercholesterinämie und Hyperlipoproteinämie.....	72
4.1.2	Anämie und Leukozytose.....	73
4.1.3	Leberschädigung .....	74
4.1.4	Überlebenszeit.....	75
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von Nebivolol und Metoprolol auf die Atherogenese .....</b>	<b>76</b>
4.2.1	Endotheliale Dysfunktion .....	76
4.2.2	Inflammatorische Prozesse.....	79
4.2.3	Plaqueeentwicklung .....	84
<b>4.3</b>	<b>Grenzen der Studie .....</b>	<b>85</b>
<b>4.4</b>	<b>Gesamtbeurteilung und Schlussfolgerung.....</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>98</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AoBo	Aortenbogen
AUC	area under the curve
CRP	C-reaktives Protein
EC	effective concentration
EDR	endothelial derived relaxation
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Nitritoxidsynthase
ET-1	Endothelin-1
EVG	Elastica van Gieson
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HDL	high density lipoprotein
hsCRP	high sensitivity C-reactive protein
HSP	Hitze-Schock-Protein
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
KG	Körpergewicht
LDL	low density lipoprotein
MCH	mean corpuscular haemoglobin
MCHC	mean corpuscular haemoglobin concentration
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MCV	mean corpuscular volume
mRNA	messenger ribonucleid acid
NA	Noradrenalin
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NEDR	non endothelial derived relaxation
NFκB	nuclear factor-κB
NO	Stickstoffmonoxid
NZW	New Zealand White
oxLDL	oxidized low density lipoprotein
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SEM	Standardfehler
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	very low density lipoprotein
WHHL	Watanabe heretitable hyperlipidemic
β-Blocker	Betarezeptorenblocker
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase





# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Atherosklerose, eine inflammatorische Erkrankung

Herzkreislauferkrankungen sind die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen. So war in Deutschland im Jahr 2006 nahezu jeder zweite Todesfall (43,7 %) die Folge einer Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems.<sup>1</sup> Dazu zählen unter anderem Angina pectoris, Myokardinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheit der unteren Extremitäten und zerebrovaskuläre Erkrankungen. Die Hauptursache dieser Erkrankungen ist die Atherosklerose.<sup>2</sup>

Die Atherosklerose ist eine chronische, entzündliche Erkrankung.<sup>3</sup> Während sie früher überwiegend als pathologische Ansammlung von Lipiden und Lipoproteinen in der Arterienwand verstanden wurde, haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass Immunzellen und deren Effektormoleküle in allen Stadien der Atherogenese eine wichtige Rolle spielen.<sup>2,4</sup> Die traditionellen Haupt-Risikofaktoren der Atherogenese wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen und Übergewicht begünstigen entzündliche Prozesse und tragen so zur Progression der Atherosklerose bei.<sup>2</sup>

Atherosklerotische Läsionen (Atheromata oder Plaques) sind asymmetrische und fokale Verdickungen der Intima, der innersten Schicht der Arterien.<sup>2</sup> Sie bestehen hauptsächlich aus Zellen, fibrösem Gewebe und Lipiden.<sup>5</sup> Dem Atherom gehen sogenannte „fatty streaks“ voraus, eine Ansammlung von Schaumzellen unter dem Endothel.<sup>6</sup> Schaumzellen sind überwiegend Makrophagen und T-Zellen mit fein verteilten Lipiden im Zytoplasma. Diese fatty streaks sind noch vollständig reversibel, können sich aber zu einem Atherom entwickeln. Der Kern eines Atheroms setzt sich aus Schaumzellen und extrazellulären Lipidablagerungen zusammen. Umgeben wird dieser zentrale Bereich von glatten Muskelzellen und einer Kollagen-reichen Matrix, der sogenannten fibrösen Kappe. T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen wandern in diese Läsionen ein und finden sich vor allem in den Randbereichen, wo das Atherom an Größe zunimmt.<sup>5,7</sup> Viele dieser Immunzellen produzieren

inflammatorische Zytokine und Proteasen, die zur Progression der Plaque beitragen und die Stabilität der fibrösen Kappe verringern.<sup>2</sup>

Kommt es zur Ruptur der Plaque oder zu einer Erosion des Endothels, wird prothrombotisches Material aus den zentralen Bereichen des Atheroms dem Blut ausgesetzt. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade führt zu einer Formation eines Thrombus. Wird dadurch der Blutfluss durch die Koronararterie verhindert, führt dies zum Herzinfarkt.<sup>2</sup>

### 1.1.1 Endotheliale Dysfunktion und Stickstoffmonoxid (NO)

Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel. Es bildet die innerste Zellschicht der Arterien und damit eine natürliche Barriere zwischen Blutbahn und Gewebe. Die Endothelzellen ermöglichen einen bidirektionalen Austausch von Makromolekülen und Blutgasen. Neben dieser Barrierefunktion reagieren sie auf hämodynamische Veränderungen oder Signale aus der Blutbahn mit einer Ausschüttung von autokrin und parakrin wirkenden Substanzen.<sup>8,9</sup> Das Endothel reguliert unter anderem den Gefäßtonus, die Leukozytenadhäsion, die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen sowie die Aktivierung von Thrombozyten.<sup>10</sup> Endotheliale Signalmoleküle sind an immunologischen und inflammatorischen Prozessen beteiligt.

Ein intaktes Endothel reguliert den Gefäßtonus über eine Vielzahl von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren. Die bedeutendste gefäßerweiternde Substanz ist das Stickstoffmonoxid (NO), ursprünglich als Endothelium-derived-relaxing-Factor (EDRF) beschrieben.<sup>11</sup> Furchgott, Ignarro und Murad erhielten im Jahr 1998 für die Entdeckung von NO als Botenstoff im kardiovaskulären System den Nobelpreis für Physiologie.<sup>12</sup>

NO wird aus der Aminosäure L-Arginin von drei Isoformen der Nitritoxidsynthase (NOS) synthetisiert: der induzierbaren (iNOS), endothelialen (eNOS) und neuronalen NO-Synthase (nNOS). In den Endothelzellen wird NO überwiegend von der eNOS hergestellt. NO diffundiert aufgrund seines relativ kleinen Molekulargewichts und seines lipophilen Charakters leicht durch die Zellmembran.<sup>9</sup> An den glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt NO über eine

Aktivierung der Guanylatzyklase und einer damit verbundenen Erhöhung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) die Relaxation der Gefäßmuskulatur. Es wirkt antagonistisch zu den endothelialen Vasokonstriktoren Endothelin-1, Angiotensin II und den freien Sauerstoffradikalen.<sup>8</sup>

Neben seiner vasodilatierenden Eigenschaft wirkt NO gefäßprotektiv und antiatherogen, indem es die Gefäßpermeabilität, die Thrombozytenaggregation, die Leukozyten-Adhäsion und -Infiltration, die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und entzündliche Prozesse reduziert.<sup>13</sup> Außerdem verringert NO die Entstehung von oxidiertem LDL (oxLDL), dem eine wichtige Rolle in der Atherogenese zugeschrieben wird.<sup>14</sup>

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonie, Rauchen, Hyperlipoproteinämie oder Diabetes mellitus führen zu einer Schädigung des Endothels.<sup>3</sup> Dadurch wird das Gleichgewicht von agonistisch und antagonistisch wirkenden Substanzen am Endothel gestört und es kommt zur so genannten „Endothelialen Dysfunktion“, dem ersten Schritt in der Entstehung der Atherosklerose.<sup>8,9,10</sup> Für diese Bezeichnung gibt es keine allgemein akzeptierte Definition. Die Endotheliale Dysfunktion führt durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit zu einer verringerten Vasodilatation auf spezifische Stimuli sowie zu proinflammatorischen und prothrombotischen Reaktionen.<sup>15</sup> Die Pathophysiologie der Endothelialen Dysfunktion ist komplex und beinhaltet verschiedene Mechanismen. Die Hauptursache der verminderten endothelialen NO-Bioverfügbarkeit ist die Reaktion von NO mit dem Hyperoxid-Anion ( $O^{2-}$ ) zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), einem hoch toxischen Sauerstoff-Radikal.<sup>9,15,16</sup>

### **1.1.2 Adhäsionsmoleküle und Chemokine**

Die Endotheliale Dysfunktion führt zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche der Endothelzellen, die verschiedene Leukozyten binden können. Der spezifische Rezeptor „Vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) bindet hauptsächlich Monozyten und T-Lymphozyten, die im Frühstadium der Atherosklerose auftreten.<sup>4</sup> Die direkte

Migration dieser rezeptorgebundenen Monozyten in die Intima wird durch das Chemokin „Monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) vermittelt. Inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren in der Gefäßintima führen unter anderem zu einer Differenzierung der eingewanderten Monozyten in Makrophagen. Dieser grundlegende Schritt in der Entstehung der Atherosklerose ist assoziiert mit einer Hochregulation von Scavenger- und Toll-like-Rezeptoren an den Makrophagen.<sup>2,17,18</sup>

Die Scavenger-Rezeptoren sind am Lipid-Metabolismus beteiligt und binden modifizierte oxLDL.<sup>17</sup> Diese akkumulieren im Zytosol der Makrophagen und es entstehen die für die Atherosklerose typischen Schaumzellen.

Toll-like-Rezeptoren binden ebenfalls pathogene Moleküle, wie Endotoxine, Hitze-Schock-Proteine (heat shock protein, HSP) und oxLDL. Im Gegensatz zu den Scavenger-Rezeptoren initiieren sie Signalkaskaden, die zu einer Aktivierung der Makrophagen führen.<sup>18</sup> Diese produzieren inflammatorische Zytokine, Proteasen und Radikale. Extrazelluläre Matrix wird dadurch zerstört und die Stabilität der Plaque vermindert.<sup>19</sup>

### 1.1.3 Hitze-Schock-Proteine (HSP)

Hitze-Schock-Proteine (HSPs), früher auch Stress-Proteine genannt, kommen in den meisten Zellen vor. Sie dienen als molekulare Chaperone, d. h. sie sorgen für einen korrekten Aufbau, Faltung und Transport von Proteinen. Außerdem schützen sie die Zellen vor Stress-Stimuli, wie beispielsweise oxLDL, mechanischem Stress, Infektionen, Radikalen und Zytokinen. Zu den HSPs zählen rund 24 Proteine. Aufgrund ihres Molekulargewichtes von 10 bis 150 kDa werden sie in mehrere Gruppen unterteilt. Die Familien HSP 40, HSP 60 und HSP 70 sind an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt.<sup>20,21</sup>

Die Expression von HSP 70 ist im Kern eines Atheroms im Bereich von Nekrosen, Lipidansammlungen und Makrophagen erhöht.<sup>21,22</sup> HSP 60 wird in atherosklerotischen Plaques überwiegend im Endothel, in glatten Muskelzellen und mononukleären Zellen exprimiert. Dabei korreliert der Grad der Expression positiv mit der Schwere der Atherosklerose.<sup>23</sup> In der Familie der HSP 40 ist das

HSP 47 an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt.<sup>24</sup> HSP 47 agiert als Chaperon für Pro-Kollagen Typ I. Es überwiegt in kollagenreichen Regionen der Plaque und ist daher besonders prominent in der fibrösen Kappe eines Atheroms. Damit ist HSP 47 ein möglicher Indikator für die Stabilität der Plaque.<sup>21,25</sup>

#### **1.1.4 C-reaktives Protein (CRP)**

Das C-reaktive Protein (CRP) ist im klinischen Alltag ein sensitiver, aber unspezifischer Entzündungsmarker. Es wurde im Jahr 1930 von Tillet und Frances im Plasma von Patienten mit einer akuten Pneumokokken-Infektion entdeckt.<sup>26</sup> CRP reagierte mit den C-Polysacchariden der Pneumokokken. Hauptsächlich wird es von Hepatozyten synthetisiert und infolge von Infektionen, akuten Verletzungen, malignen Tumoren oder anderen entzündlichen Stimuli freigesetzt.<sup>27</sup>

Neben seiner Eigenschaft als Akut-Phase-Protein wurde das CRP, im speziellen das high-sensitivity-C-reaktive-protein (hsCRP), als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor identifiziert.<sup>28,29,30</sup> Außerdem konnten in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen zeigen, dass CRP aktiv an allen Stadien der Atherogenese beteiligt ist. Es trägt bei zur endothelialen Dysfunktion, zur Formation und Reifung der Plaque sowie zu deren Destabilisierung und Ruptur.<sup>31,32</sup> CRP findet sich in der atherosklerotischen Plaque vor allem im Bereich von Monozyten-Makrophagen und Lipoproteinen.<sup>33</sup>

In-vitro-Untersuchungen wurden vor allem an Monozyten-Makrophagen, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführt.<sup>31</sup>

Pasceri et al.<sup>34,35</sup> beobachteten an Endothelzellen unter anderem eine CRP-induzierte Hochregulation von VCAM-1 und MCP-1. Außerdem führt CRP an Endothelzellen über eine verminderte Aktivität der eNOS zu einer verringerten Produktion von NO und damit zur endothelialen Dysfunktion.<sup>31,36,37</sup> CRP-Plasmaspiegel korrelieren invers mit der endothelialen Gefäßreagibilität.<sup>38</sup> Verma et al.<sup>39</sup> konnten an Endothelzellen durch Zugabe von CRP eine vermehrte Ausschüttung des NO-Antagonisten Endothelin-1 (ET-1)

nachweisen. ET-1 ist ein endothelspezifischer Faktor, der zur Gefäßkontraktion führt. Dabei scheint ET-1 auch als Mediator für die CRP-induzierte Hochregulation von VCAM-1 und MCP-1 an Endothelzellen zu dienen.<sup>31,39</sup> Zudem wurde ein Einfluss von CRP auf eine gesteigerte Expression des Chemokins Interleukin-8 (IL-8) an Endothelzellen gezeigt.<sup>40</sup> CRP führt zunächst zu einer gesteigerten Aktivität von Nuclear-Factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), einem im Zellkern vorkommenden proinflammatorischen Transkriptionsfaktor.<sup>41</sup> NF- $\kappa$ B kontrolliert unter anderem die Expression inflammatorischer Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Diese Hochregulation führt zu einer verstärkten Synthese des Chemokins IL-8 in Endothelzellen.<sup>40</sup> IL-8 hat proinflammatorische und proatherogene Eigenschaften und fördert unter anderem die Adhäsion von Monozyten an das Endothel.<sup>33</sup> Eine genetische Inaktivierung des homologen IL-8-Rezeptors am Endothel verringert die Akkumulation von Makrophagen und eine Progression der Atherosklerose.<sup>42</sup>

CRP wirkt an Monozyten-Makrophagen prothrombotisch und proinflammatorisch.<sup>31</sup> Es führt an Monozyten zu einer vermehrten Expression von Thromboplastin, einem maßgeblich an der Formation des Thrombus beteiligten Proteins.<sup>43</sup> Außerdem fördert es die Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten an das Endothel.<sup>33</sup> CRP begünstigt die Aufnahme von oxLDL und führt somit zu einer vermehrten Bildung von Schaumzellen.<sup>44</sup> Es fördert die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen und inflammatorischen Zytokinen aus Monozyten-Makrophagen.<sup>45</sup>

Auch an glatten Gefäßmuskelzellen konnten nach Inkubation mit CRP proatherogene Effekte nachgewiesen werden.<sup>31</sup> CRP führt zu einer Hochregulation des Angiotensin-Typ-1-Rezeptors.<sup>46</sup> Dadurch kommt es unter anderem zu einer vermehrten Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen, einer Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen sowie zu einer vermehrten Kollagen-Produktion.<sup>31</sup>

## 1.2 Therapeutische Beeinflussung der Atherosklerose durch Betarezeptorenblocker

Betarezeptorenblocker ( $\beta$ -Blocker) sind in der Therapie von Herz-Kreislauf-erkrankungen unverzichtbar.  $\beta$ -Blocker führen zu einer signifikanten Reduktion von Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Hypertonie, Herzfehler oder Myokardinfarkt.<sup>47,48,49</sup> Sie haben antihypertensive, antiarrhythmische, antiischämische und antiatherogene Eigenschaften.<sup>48</sup>

$\beta$ -Blocker antagonisieren die Wirkungen des sympathischen Nervensystems an den  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren. Eine Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren führt unter anderem zur endothelialen Dysfunktion und begünstigt die Entstehung der Atherosklerose.<sup>50,51,52</sup> Daher sind  $\beta$ -Blocker auch ein wichtiges Therapieprinzip in der Prävention der Atherosklerose.

### 1.2.1 Beta-Adrenorezeptoren

Am Herzen finden sich hauptsächlich  $\beta_1$ -Rezeptoren, die unter physiologischen Bedingungen der Leistungsanpassung dienen.<sup>53</sup> Eine sympathische Stimulation steigert die myokardiale Kontraktilität (positive Inotropie), erhöht die Herzfrequenz (positive Chronotropie) und verringert die Überleitungszeit von Vorhof zu Ventrikel (positive Dromotropie). In der Niere führt die Stimulation von  $\beta_1$ -Rezeptoren zu einer vermehrten Reninfreisetzung und im Fettgewebe zur gesteigerten Lipolyse. Bei der Behandlung der kardiovaskulären Erkrankungen ist vor allem die Blockade der kardialen und renalen  $\beta_1$ -Rezeptoren von Bedeutung.<sup>54</sup> Die zusätzliche Blockade der  $\beta_2$ -Rezeptoren ist für diese Zielindikation unnötig, schränkt aber die Verträglichkeit der Therapie ein.<sup>54</sup>

Eine Stimulation der  $\beta_2$ -Rezeptoren führt unter anderem zur Broncho- und Vasodilatation. Im Pankreas führt sie zur Insulinsekretion und im Skelettmuskel zur Glykogenolyse, zum Kalium-Transport in die Zellen sowie zum Tremor. Außerdem bewirkt eine Stimulation der  $\beta_2$ -Rezeptoren eine Dilatation des Uterus. Daher sollte eine ausschließlich  $\beta_1$ -selektive Rezeptorenblockade erfolgen beim Metabolischen Syndrom, der arteriellen Verschlusskrankheit oder bei Hypertonie in der Schwangerschaft. Kontraindikationen für eine

$\beta$ -Rezeptorblockade sind Bronchospasmen und Asthma bronchiale, bradykarde Herzrhythmusstörungen, ein Atrioventrikulärer-Block II-III und eine akute, instabile Herzinsuffizienz.<sup>54</sup>

### 1.2.2 Betarezeptorenblocker

$\beta$ -Blocker werden eingeteilt in  $\beta_1$ -selektive (beispielsweise Nebivolol oder Metoprolol) und nicht-selektive Inhibitoren (beispielsweise Propranolol). Bestimmte  $\beta$ -Blocker haben zudem vasodilatierende Eigenschaften, entweder durch  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Blockade (Carvedilol),  $\beta_2$ -Stimulation (Celiprolol) oder durch NO-Freisetzung (Nebivolol).

In der klinischen Praxis werden überwiegend  $\beta_1$ -selektive Rezeptorenblocker angewendet, während die nicht-selektiven Inhibitoren nur noch wenige, eng begrenzte Indikationen haben (**Tab. 1**).<sup>54</sup>

**Tab. 1: Indikationen für eine Betarezeptorenblockade nach Lohmann<sup>54</sup>**

<b><math>\beta_1</math>-selektive Blocker (Beispiel Metoprolol)</b>	<b>Nicht selektive <math>\beta</math>-Blocker (Beispiel Propranolol)</b>
Arterielle Hypertonie	Portale Hypertension
Koronare Herzkrankheit	Thyreotoxische Krise
Stabile, chronische Herzinsuffizienz	Peripherer Tremor
Hyperkinetisches Herzsyndrom	
Tachykarde Herzrhythmusstörungen	
Reinfarktprophylaxe	
Migräneprophylaxe	
Glaukom (lokal)	

#### 1.2.2.1 Metoprolol

Metoprolol ist ein schwach lipophiler  $\beta$ -Blocker mit einer relativen  $\beta_1$ -Selektivität, ohne intrinsische sympathomimetische Aktivität und nur schwach ausgeprägter membranstabilisierender Wirkung.<sup>54,55</sup> Die Richtdosis von Metoprolol für die arterielle Hypertonie und die koronare Herzkrankheit beträgt 50 bis 100 mg/d, die Maximaldosis 190 mg/d.



### 1.2.2.2 Nebivolol

Nebivolol ist ein neuerer  $\beta_1$ -Rezeptorenblocker mit vasodilatierenden Eigenschaften.<sup>56,57</sup> Die hochlipophile Substanz ist ein Razemat aus den zwei Enantiomeren SRRR-Nebivolol (oder D-Nebivolol) und RSSS-Nebivolol (oder L-Nebivolol). Die pharmakologische Wirkung der selektiven  $\beta_1$ -Rezeptorblockade geht hauptsächlich auf D-Nebivolol zurück, während die vasodilatierende Komponente dem L-Nebivolol zugeschrieben wird.<sup>58</sup> Nebivolol ist in einer therapeutischen Dosierung von 5 bis 10 mg/d ein hochselektiver  $\beta_1$ -Rezeptorenblocker.<sup>58</sup> Es hat eine 321fach höhere Affinität zu  $\beta_1$ -Rezeptoren als zu  $\beta_2$ -Rezeptoren im menschlichen Myokard und besitzt daher die höchste  $\beta_1$ -Selektivität aller gebräuchlichen  $\beta$ -Blocker.<sup>56</sup> Dies führt nur zu minimalen Nebenwirkungen am Bronchialsystem und bei der Insulinsekretion.<sup>57</sup> Außerdem besitzt Nebivolol keine intrinsisch sympathomimetische Aktivität und keine membranstabilisierende Wirkung.<sup>55</sup> Nebivolol führt zu einer Reduktion von Herzfrequenz und Blutdruck in Ruhe und bei Belastung.<sup>57,59</sup> Es wirkt nicht negativ inotrop und erhöht die Auswurfleistung des Herzens.<sup>60</sup>

Im Gegensatz zu anderen  $\beta_1$ -selektiven-Blockern wie beispielsweise Metoprolol hat Nebivolol NO-vermittelte vasodilatierende Eigenschaften.<sup>61,62</sup> Dies führt zu einer Abnahme des systemischen Gefäßwiderstands und zu einer Reduktion des systemischen Blutdrucks.<sup>60</sup> Zahlreiche experimentelle und klinische Studien konnten eine durch Nebivolol verursachte NO-abhängige Vasodilatation bestätigen.<sup>63,64</sup> Dabei scheint Nebivolol über zwei verschiedene Mechanismen das endotheliale NO zu erhöhen: Zum einen steigert es die NOS-Aktivität in Endothelzellen und Thrombozyten, zum anderen wirkt es antioxidativ. Es reduziert die Inaktivierung von NO durch freie Sauerstoffradikale.<sup>63,65</sup> Die molekularen Mechanismen und beteiligten Rezeptoren, die zu einer erhöhten eNOS-Aktivität führen, sind nicht eindeutig geklärt. Experimentelle Studien konnten eine durch endotheliale  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren vermittelte NO-Produktion zeigen und/oder eine durch Adenosin-Triphosphat (ATP) bedingte Stimulation von Purinorezeptoren, die zu NO-Freisetzung führt.<sup>66,67</sup> Andere in-vitro-Studien postulieren eine durch endotheliale  $\beta_3$ -adrenerge- oder Östrogen-Rezeptoren vermittelte NO-Erhöhung.<sup>68,69</sup> In einer klinischen Studie

reduzierte Nebivolol die Konzentrationen von Superoxid-Anion und Peroxynitrit und erhöhte die NO-Bioverfügbarkeit unabhängig der  $\beta_1$ -selektiven Blockade.<sup>70</sup>

Die durch Nebivolol induzierte erhöhte NO-Bioverfügbarkeit könnte daher ein wichtiges Therapieprinzip in der Prävention der Atherosklerose sein. Zum einen wurde sowohl in Tierversuchen als auch in klinischen Studien bestätigt, dass Nebivolol der Endothelialen Dysfunktion entgegenwirkt.<sup>61,71,72</sup> Zum anderen führt Nebivolol zu einer Reduktion von freien Sauerstoffradikalen am Endothel.<sup>65</sup> Außerdem vermindert Nebivolol die Thrombozytenaggregation.<sup>73</sup> In-vitro-Untersuchungen an Endothelzellen zeigten zudem antiinflammatorische und antiproliferative Effekte. So beobachteten Brehm et al.<sup>74,75</sup> neben einer verminderten Proliferation und einer gesteigerten Apoptose von koronararteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen auch eine verringerte Sekretion von Endothelin-1. Durch Vorbehandlung mit Nebivolol konnte zudem die CRP-vermittelte Hochregulation von IL-8 und VCAM-1 in koronararteriellen Endothelzellen reduziert werden.<sup>76,77</sup> Ratten zeigten nach Ballondilatation und Behandlung mit Nebivolol eine Reduktion der Neointima-Entstehung sowie eine verminderte Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Akkumulation von Makrophagen.<sup>77</sup>

### 1.3 Tiermodell

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden zu Ätiologie und Pathogenese der Atherosklerose zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schweinen und Primaten durchgeführt. Diese interventionellen Studien dienten vor allem dazu, den Effekt einer Diät und/oder eines Medikaments auf die Atherogenese zu untersuchen. Heutzutage wird die tierexperimentellen Atheroskleroseforschung hauptsächlich an Mäusen und in geringerem Ausmaß an Kaninchen durchgeführt.<sup>78</sup> Durch genetische Manipulationen an Mäusen lassen sich einzelne Schritte der Atherogenese gezielt untersuchen. Kaninchen werden vor allem aufgrund der besseren Darstellung von Gefäßen in bildgebenden Verfahren verwendet. Weitere Gründe sind der rasche Anstieg der Plasma-Cholesterin-Konzentration und die relativ schnelle Progression atherosklerotischer Läsionen.<sup>79</sup>

Anitschkow et al.<sup>80</sup> führten 1913 in St. Petersburg erste Versuche an Kaninchen zur diätetisch induzierten Atherosklerose durch. Es wurde gezeigt, dass eine Diät mit Cholesterin atherosklerotische Veränderung in der Intima von Kaninchen verursacht. Die Schwere der Cholesterin bedingten Veränderung an den Gefäßen war proportional zu der mit dem Futter aufgenommenen Menge an Cholesterin.<sup>80</sup> Anitschkow und Chalатов<sup>81</sup> beschrieben damals makro- und mikroskopische Veränderungen, die heute als charakteristisch für atherosklerotische Läsionen beim Menschen gelten.

Die meisten aktuellen Studien werden an den Weißen Neuseelandkaninchen (New Zealand White [NZW] rabbit) durchgeführt.<sup>79</sup> Es gibt einige genetisch veränderte Arten der NZW-Kaninchen wie beispielsweise die WHHL- (Watanabe heretitable hyperlipidemic), Houston RT- und die St. Thomas-Kaninchen. Die WHHL-Kaninchen werden am häufigsten eingesetzt und zeichnen sich durch einen genetisch veränderten LDL-Rezeptor aus, dessen Aktivität im Vergleich zu genetisch nicht veränderten Tieren bei unter 5 % liegt. Dadurch steigt die LDL-Cholesterin-Konzentration im Plasma sehr stark an, ähnlich der Fredrickson Hyperlipoproteinämie Typ IIa beim Menschen.<sup>78</sup>

Weißer Neuseelandkaninchen haben normalerweise eine geringe Plasma-Cholesterin-Konzentration von ungefähr 23 mg/dl. Durch ein cholesterinhaltiges Futter mit Cholesterinkonzentrationen von 0,1 – 2 % steigt die Plasma-Cholesterin-Konzentration innerhalb weniger Wochen proportional um bis das 8-fache an.<sup>82</sup> Die Zufuhr eines cholesterinhaltigen Futters führt innerhalb von etwa 6 Wochen bei einer Plasma-Cholesterin-Konzentration von 230-320 mg/dl zur Entwicklung der initialen atheromatösen Läsionen, den „fatty streaks“.<sup>83</sup> Die Fütterung von mindestens 0,5 % Cholesterin führt überwiegend zur Infiltration von Monozyten-Makrophagen in der Intima, vergleichbar den frühen Läsionen beim Menschen.<sup>82,83</sup> Ein Cholesterin-Gehalt im Futter von unter 0,5 % führt dagegen zu fibromuskulären Veränderungen der Intima, vergleichbar mit fortgeschrittenen Veränderungen in der menschlichen Atherogenese.<sup>82</sup>

Neben den bereits genannten Eigenschaften liegen die Vorteile des NZW außerdem in der kostengünstigen Anschaffung, der einfachen Haltung in Einzelkäfigen und dem unproblematischen Umgang. Vorteilhaft sind überdies die ruhige Art der Tiere und die gute Erreichbarkeit der Gefäße an den großen Ohren.

#### **1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die führende Todesursache in den westlichen Industrienationen.

Die Atherosklerose ist die Hauptursache dieser Erkrankungen.<sup>2</sup> Für  $\beta$ -Rezeptor-Antagonisten konnte in großen klinischen Studien eine signifikante Reduktion der kardiovaskulären und der Gesamt-Mortalität nachgewiesen werden.<sup>47,48,49</sup> Sie sind ein fester Bestandteil in der Therapie der koronaren Herzerkrankung. Nebivolol ist im Gegensatz zu dem klassischen  $\beta_1$ -Rezeptor-Antagonist Metoprolol ein hochselektiver  $\beta_1$ -Rezeptor-Antagonist mit NO-vermittelten vasodilatierenden Eigenschaften.<sup>61,62</sup> Die durch Nebivolol induzierte erhöhte NO-Bioverfügbarkeit wirkt der Endothelialen Dysfunktion entgegen.<sup>61,71,72</sup> Nebivolol könnte daher ein wichtiges Therapieprinzip in der Prävention der Endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose sein.

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss der  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Metoprolol auf die Atherogenese im Tierexperiment an NZW-Kaninchen in-vivo untersucht werden. Nach einer 15-wöchigen Fütterungsphase mit Cholesterin angereichertem Futter wurden die Gefäßfunktion der Karotiden und klinisch-chemische Parameter beurteilt sowie histologische und immunhistochemische Untersuchungen zu Größe und Zusammensetzung der Plaques im Aortenbogen durchgeführt. Außerdem wurde der Einfluss der  $\beta$ -Blocker auf lokale und systemische inflammatorische Prozesse in der Atherosklerose untersucht. Hierzu wurden CRP-, VCAM-1 und MCP-1 Rezeptor-mRNA in den Karotiden sowie die Serum-Konzentrationen von CRP und IL-8 analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell

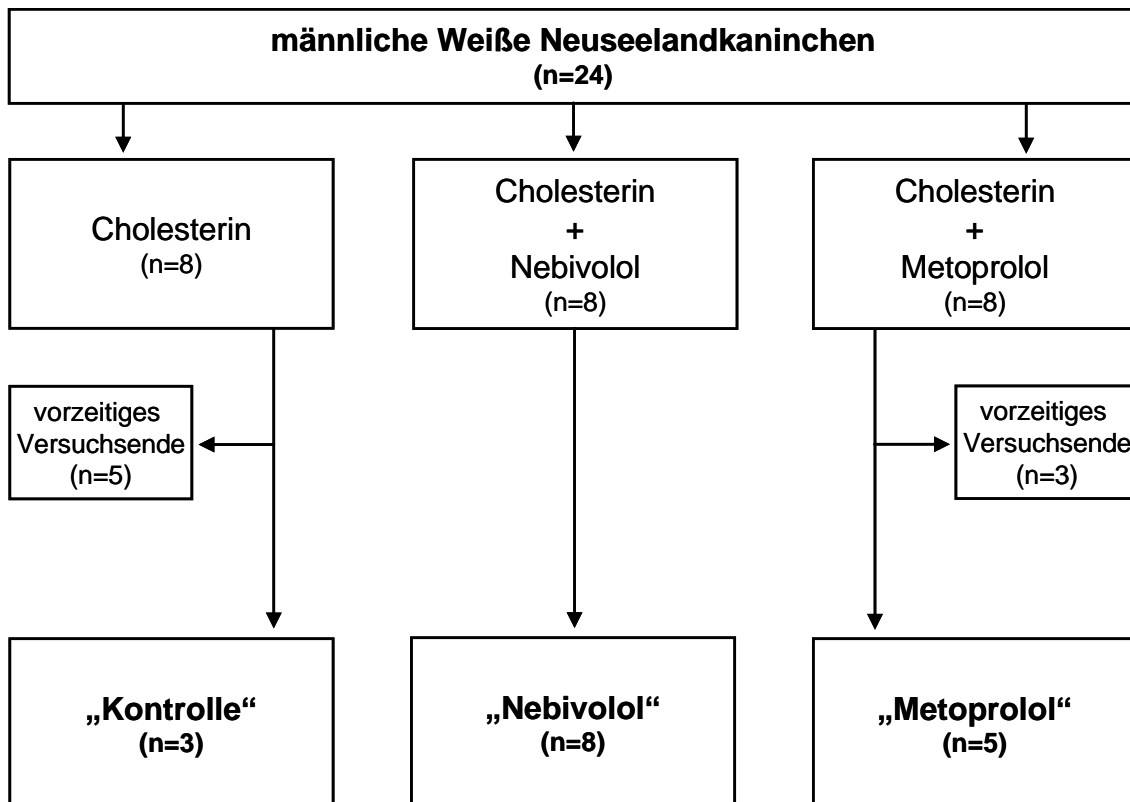
#### 2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 24 männliche Weiße Neuseelandkaninchen (Charles River, Kißlegg). Das Alter der Tiere betrug zu Versuchsbeginn etwa 5 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 12 Stunden gehalten. In einer Eingewöhnungsphase von zwei Wochen erhielten alle Tiere Standardfutter, nach Versuchsbeginn wurde eine spezielle Diät verabreicht (Fa. Altromin, Lage). Während der gesamten Dauer erhielten sie Futter und Wasser ad libitum. Wöchentlich wurde neben der Gewichtsentwicklung auch die Futteraufnahme durch Rückwiegen des restlichen Futters und durch Einwiegen der neuen Menge ermittelt. Aus der aufgenommenen Futtermenge 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 Kontrollgruppe. Sie erhielten in der Vorfütterungsphase Standardfutter und während des Hauptversuches ausschließlich mit Cholesterin angereichertes Futter. Den übrigen Tieren wurde bereits in der Vorfütterungsphase eine medikamentöse Diät verabreicht. Die Gruppe 2 (**Nebivolol**) erhielt den  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Gruppe 3 (**Metoprolol**) den  $\beta$ -Blocker Metoprolol, in der Hauptphase zusätzlich Cholesterin. 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. 2**).



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

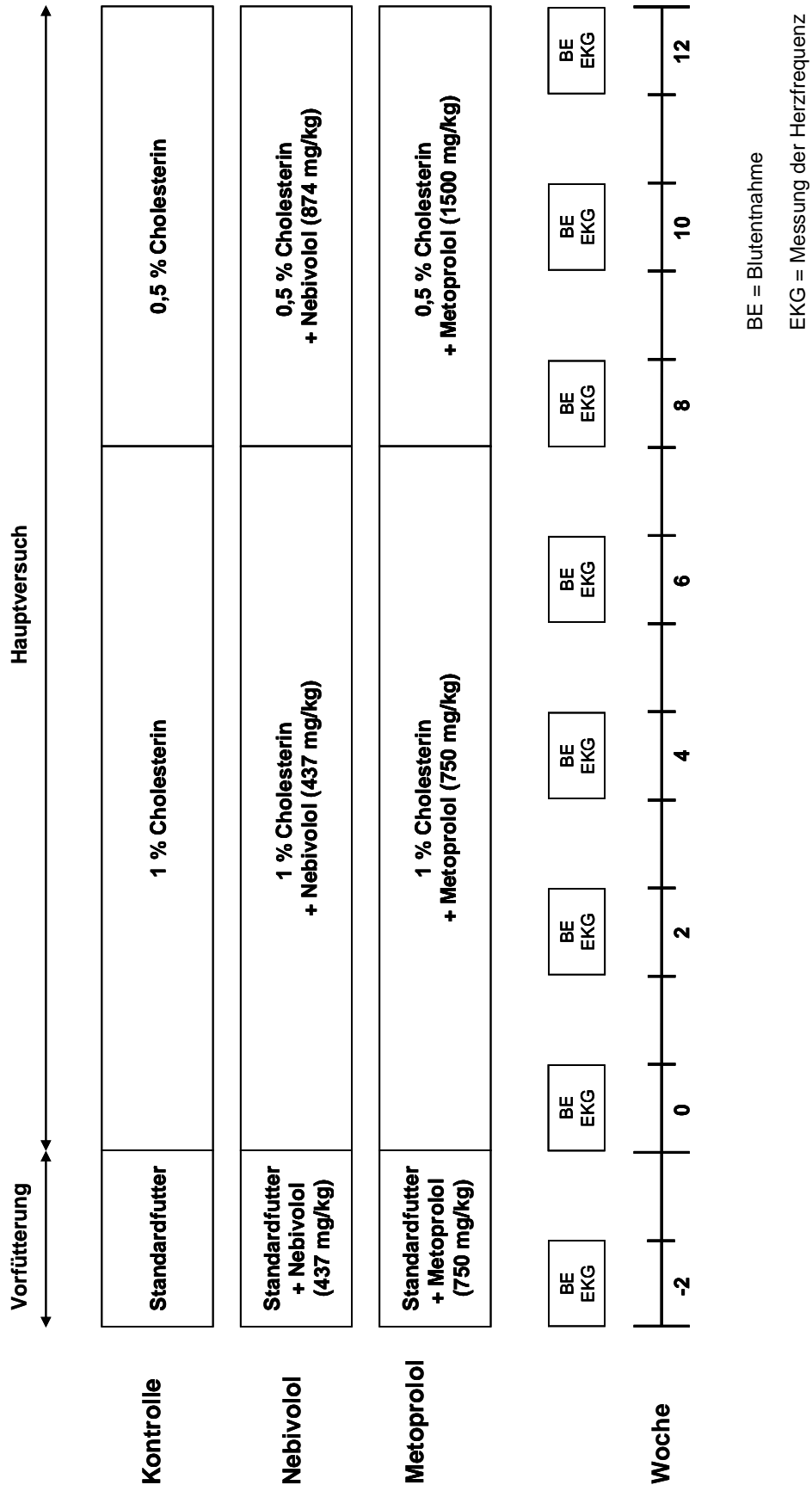


Abb. 2: Behandlungsschema, Zeitpunkte der Untersuchungen sowie Cholesterin- und Medikamentendosis im Futter

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

Zu Beginn der Vorfütterung, zu Beginn des Hauptversuchs, am Ende der Woche 2 und dann in zweiwöchigem 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 Kaninchens angelegt und so eine Ableitung der Herzrätigkeit über mehrere Sekunden aufgezeichnet.

### **2.1.4 Versuchsende**

#### **2.1.4.1 Narkose**

Zu Versuchsende wurden die Kaninchen mit insgesamt ca. 10 ml eines Gemisches aus Esketaminhydrochlorid (Ketanest-S®) 25 mg/ml (Fa. PARKE-DAVIS GmbH, Lage) und Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%) 20 mg/ml (Fa. Bayer Vital GmbH, Lage) im Verhältnis 3:1 narkotisiert. Unter der Narkose wurden die Tiere erst an Thorax und Abdomen rasiert, in Rückenlage zur Gefäßentnahme am Tisch fixiert und anschließend durch direkte Herzpunktion mit einer Monovette®-Kanüle (20 G, Sarstedt, Nümbrecht) Blut entnommen, bis der Tod durch Kreislaufversagen eintrat.

#### **2.1.4.2 Entnahme und Präparation der Karotiden**

Unmittelbar nach dem Exitus der Tiere erfolgte die Entnahme der Karotiden. Nach Rasur des ventralen Halsbereiches und longitudinaler Inzision der Haut, wurde zunächst die Muskulatur dargestellt. Durch stumpfe Präparation mit chirurgischem Besteck 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 äußerst schonende Präparation geachtet, um Schäden am Gefäßendothel zu vermeiden.

Nach der Entnahme wurden die Karotiden in eine Petrischale mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (**Kap. 2.3.2**) gelegt. In diesem Medium wurde zunächst ein Gefäß unter einem binokularen Auflichtmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) mit einer Mikrofeder-Schere vom perivaskulären Fett- und Bindegewebe befreit und die Karotiden vorsichtig in 3 mm lange Ringe geschnitten. Pro Tier wurden nur die vier Ringe für die Organbad-Versuche verwendet, die keine sichtbaren Verletzungen der Gefäßwand aufwiesen. Bei Bedarf wurde daher zusätzlich die zweite Karotide präpariert und diese für die Organbad-Versuche herangezogen.

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

Anschließend wurde das untere Abdomen eröffnet, die Iliacalgefäße und ein Teil der Aorta abdominalis freipräpariert und ein Venenverweilkatheter (Vasofix® Braunüle 18G; Braun, Melsungen) in eine der Iliacalarterien gelegt. Über diesen Katheter wurde ca. 1 l einer 5 %igen Formalinlösung über einen Zeitraum von ca. 1 h mittels eines Infusionssystems (IVAC®; Medical Systems, San Diego, USA) mit dem Druck von 1,5m-Wassersäule in das Gefäßsystem infundiert. Diese Perfusionsfixierung dient 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 Aortenbogen freigelegt, reseziert und von überschüssigem Bindegewebe freipräpariert.

## 2.2 Analyse der Blutparameter

Aus dem Blut der Kaninchen wurden verschiedene Laborparameter in zwei- oder vierwöchigem Rhythmus bzw. nur zu Beginn und zu Ende des Versuches ermittelt (**Tab. 2**).

**Tab. 2:** Ermittelte Laborparameter

Blutprobe	Parameter	Einheit	Entnahmerhythmus
Vollblut	Leukozyten	1/ $\mu$ l	vierwöchig
	Erythrozyten	Mio/ $\mu$ l	
	Hämatokrit	%	
	Hämoglobin	g/dl	
	MCH	pg	
	MCHC	g/dl	
	MCV	fl	
	Thrombozyten	1000/ $\mu$ l	
Plasma	Bilirubin gesamt	mg/dl	vierwöchig
	GOT, GPT, $\gamma$ -GT, Lipase	U/l	
	Gesamtcholesterin	mg/dl	zweiwöchig
	Triglyzeride	mg/dl	
	HDL-, LDL-, VLDL-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 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 Ermittlung der Gefäßfunktion der Karotiden**

### **2.3.1 Unbehandelte Versuchstiere**

Für die Untersuchung der Gefäßfunktion im Organbad wurden als Kontrolle auch Karotiden unbehauelter, nicht cholesteringefütterter Kaninchen verwendet. Sechs weibliche Weiße Neuseelandkaninchen (Charles River, Kißleg) wurden zur Gruppe „Unbehandelt“ zusammengefasst. Das Alter und durchschnittliche Körpergewicht entsprach dem der Versuchstiere. Die Kaninchen wurden in Einzelkäfigen bei künstlicher Beleuchtung mit einem Tag-Nacht-Zyklus von zwölf Stunden gehalten. In einer Eingewöhnungsphase von zwei Tagen erhielten alle Tiere Standardfutter und Wasser ad libitum. Die Gefäßentnahme erfolgte wie in **Kap. 2.1.4.2** beschrieben.

### **2.3.2 Substanzen, Lösungen und Medikamente**

Für die Versuche im Organbad wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung hergestellt (Konzentrationen in mmol/l): 118,0 NaCl, 4,7 KCl, 1,25 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24,9 NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 Glukose (Merck, Darmstadt). Da in-vivo die Hälfte des Ca<sup>2+</sup> im Serum an Proteine gebunden und daher biologisch inaktiv ist, wurde die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in-vitro von 2,5 mmol/l auf 1,25 mmol/l herabgesetzt. Zusätzlich enthielt die Lösung 0,03 mmol/l Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Merck, Darmstadt). Sämtliche Substanzen wurden in Aqua bidest. gelöst.

Acetylcholin, +/- Arterenol und Nitroprussidnatrium (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA) wurden während des Versuches verwendet und bei

Raumtemperatur (22 °C) mit Aqua bidest. in Lösung gebracht. Dem gelösten +/- Arterenol wurde zusätzlich 20 mmol/l EDTA hinzugefügt. Die Stoffe wurden vorsichtig in das Organbad pipetiert.

Alle Lösungen wurden am jeweiligen Versuchstag hergestellt.

### **2.3.3 Versuchsaufbau**

Die Untersuchungen an den isolierten Gefäßringen wurden im Schuler Organbad 4-position (Schuler Organ Bath Type 809, Hugo Sachs Elektronik, March) durchgeführt. Die vier Kammern waren mit jeweils 20 ml modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (37 °C, pH 7,4) gefüllt, welche mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast wurde. Zusätzlich wurde in den vier Organbädern eine Teflontrennwand angebracht, damit die aufsteigenden Bläschen der Begasung die Messungen nicht beeinträchtigten. Die Konvektion in den Behältern wurde dabei nicht gestört.

In jeder Kammer wurde ein Gefäßring eingespannt. Hierzu wurden zwei L-förmige Edelstahlhaken (CrNi 18/8) vorsichtig durch das Lumen der Gefäßringe geführt. Die Haken waren über vertikal eingespannte Schlaufen aus chirurgischer Seide mit dem Boden des Organbades und einem Kraftaufnehmer (HSE Isometric Force Transducer F30 Type 372, Hugo Sachs Elektronik, March) verbunden, um isometrische Spannungsänderungen aufzeichnen zu können. Die Kraftausschläge wurden über einen Zwei-Kanal-Brückenverstärker (HBM AE 3407 B, Hugo Sachs Elektronik, March) auf einen X/Y-Schreiber (Multi-Pen Recorder, Rikadenki, Japan) übertragen. Auf dem Millimeterpapier entsprach ein Ausschlag auf der Y-Achse von 15 cm einer Kraft von 30 mN.

### **2.3.4 Versuchsdurchführung**

Die Gefäßringe wurden während einer einstündigen Äquilibrationszeit auf eine in Vorversuchen ermittelte, optimale Ruhespannung von 3 g vorgedehnt. Die Badlösung wurde während dieser Zeit dreimal vollständig ausgetauscht.

Um die Integrität der glatten Gefäßmuskulatur sicherzustellen, wurden die Gefäßringe anschließend einmalig mit 3 µmol/l Noradrenalin (NA) kontrahiert.

Bei Erreichen der Plateauphase wurde Acetylcholin in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  im Bolus zur Relaxation zugegeben. Nach dem vollständigen Austausch der Badlösung und einer Ruhephase von 15 min wurde mit den Messungen begonnen.

#### **2.3.4.1 Konzentrationswirkungskurve auf Acetylcholin**

Die Gefäßfunktion kann invasiv durch Acetylcholin beurteilt werden. Acetylcholin bewirkt an den Gefäßringen eine endothelabhängige Relaxation und eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen.<sup>84</sup> An gesunden Gefäßen überwiegt die Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation, während beim geschädigten Endothel die Vasokonstriktion überwiegt.<sup>8</sup> Bei der Untersuchung der Konzentrationswirkungskurve auf Acetylcholin wurden die Gefäßringe zunächst mit 3  $\mu\text{mol/l}$  NA auf ca. 85 % der Maximalkontraktion kontrahiert. Nach dem Erreichen eines stabilen Tonus erfolgte dann die Relaxation mit Acetylcholin in kumulativen Endkonzentrationen von 1  $\text{nmol/l}$  ( $10^{-9}$  M) bis 10  $\mu\text{mol/l}$  ( $10^{-5}$  M). Sofort nach dem Übergang der einzelnen Relaxationen in die Plateauphase wurde die nächst höhere Acetylcholinkonzentration hinzugegeben, bis die maximale Relaxation erreicht war. Daraufhin wurde die Badlösung komplett ausgetauscht und die Ringe gespült, bis sich nach 15 min erneut ein Äquilibrium eingestellt hatte. Bei Bedarf wurde die Ruhespannung der Gefäßringe auf 3 g nachjustiert.

#### **2.3.4.2 Konzentrationswirkungskurve auf Nitroprussidnatrium**

Nitroprussidnatrium, ein NO-Donor, stimuliert direkt die Guanylatzyklase in glatten Gefäßmuskelzellen und führt daher zu einer endothelunabhängigen Relaxation (non-endothelial-derived-relaxation, NEDR).<sup>84</sup> Nach einer Kontraktion der Gefäßringe mit 3  $\mu\text{mol/l}$  NA wurde Nitroprussidnatrium in kumulativen Endkonzentrationen von 0,1  $\text{nmol/l}$  ( $10^{-10}$  M) bis 10  $\mu\text{mol/l}$  ( $10^{-5}$  M) in das Organbad pipettiert. Sofort nach dem Übergang der einzelnen Relaxationen in die Plateauphase wurde die nächst höhere Konzentration an Nitroprussidnatrium hinzugegeben, bis die maximale Relaxation erreicht war.

### 2.3.4.3 Gemessene und berechnete Größen

In den einzelnen Versuchen wurden die maximale Kontraktion in mN auf 3  $\mu\text{mol/l}$  NA sowie die Relaxationen in mN auf kumulative Dosen direkt gemessen. Anschließend wurden die Daten der einzelnen Relaxationskurven für jeden Gefäßring einzeln nach einer modifizierten, logistischen Hill-Gleichung angepasst:

$$y = a + \frac{1 - a}{1 + \frac{\text{Konzentration}}{EC_{50}}}$$

Wobei:  $a$  = Asymptote und  $EC_{50}$  (Effective-Concentration<sub>50</sub>) = halbmaximale Relaxation.

Aus den angepassten Dosis-Wirkungs-Kurven wurde für jeden Ring die Zielvariable  $EC_{50}$  geschätzt.

## **2.4 Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Gene in den Karotiden**

### **2.4.1 RNA-Isolierung**

Die Untersuchung der VCAM-1-, MCP-1- und CRP-mRNA-Expression erfolgte an den rechten und linken Karotiden der Kaninchen. Zur RNA-Isolierung wurden die schockgefrorenen Karotiden in 1,5 ml RNA-Bee™ RNA Isolation Solvent (Tel-Test, Friendswood, USA) im Homogenisator (Polytron® PT-MR 3000 Kinematica, Littau, Schweiz) zerkleinert. Nach Zugabe von 300 µl Chloroform und 30-sekündigem Vortexen wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) 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.

### **2.4.2 Reverse Transkription**

Im Anschluss an die spektrophotometrische Messung (Spektrophotometer: DU® 460, Beckman, Fullerton, USA) der isolierten Gesamt-RNA erfolgte die Reverse Transkription mit Hilfe des Applied Biosystems High Capacity cDNA Archive Kit (Nr. 4322171, Applied Biosystems, Foster City, USA). Dabei wurde jeweils 1 µg RNA in einem Reaktionsansatz von 30 µl (1 x RT Puffer, 1 x dNTPs, 1 x Random Hexamers, 0,4 U/µl RNase Inhibitor, 2,5 U/µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase) im Peltier Thermal Cycler DNA Engine PTC-200 (MJ RES., 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.

### 2.4.3 Polymerasekettenreaktion

Die Real-time-PCR wurde in einem ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit SYBR<sup>®</sup> Green als Detektionsfarbstoff durchgeführt. Wie auch die traditionelle Polymerasekettenreaktion beruht das Prinzip der quantitativen Real-time-PCR auf der enzymatischen Vermehrung eines spezifischen DNA-Abschnittes durch Wiederholung der Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation. Dem Reaktionsansatz wird hierbei der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> 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 Houskeeping-Gen 18S rRNA, von dem angenommen wird, dass es in konstanter Menge im Karotisgewebe exprimiert wird.

Die Reaktionen wurden in 96-well-PCR-Platten (Greiner, Frickenhausen) in Ansätzen von 10 µl in Doppelbestimmungen durchgeführt. 3 µl cDNA wurden mit 1 x SYBR<sup>®</sup> Green Mastermix (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), sowie forward- und reverse-Primern (**Tab. 3**, Invitrogen, Karlsruhe; Endkonzentration 300 nmol/l, Primer-Design mit Primer Express<sup>®</sup> Primer Design Software v2.0) mit folgendem Thermoprofil inkubiert: 50 °C für zwei Minuten, 95 °C für zehn Minuten, 40 Zyklen mit 95 °C für 15 Sekunden, gefolgt von einer Minute bei 60 °C.

Zur relativen Quantifizierung wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode angewandt.<sup>85</sup>



**Tab. 3: Primersequenzen.**

---

Gene	Primersequenz
Housekeeping-Gen	
rabbit 18S rRNA forward	TTCGTATTGCGCCGCTAGA
rabbit 18S rRNA reverse	TTGGCA AATGCTTTTCGCTC
rabbit CRP forward	AAGAAGCCACTCAAAGCCTTCA
rabbit CRP reverse	TGTACCCACGAGTCATGGACAG
rabbit VCAM-1 forward	ATATGGCTCATCATTCCGCAAG
rabbit VCAM-1 reverse	CATAGGCAGCCATTTCTTTCCA
rabbit MCP-1 forward	TGATCTTCATGACCAAAGTGGC
rabbit MCP-1 reverse	ATCCTGGACCCACTTCTGCTT

---

## **2.5 Untersuchung verschiedener Faktoren im Serum mittels ELISA**

### **2.5.1 Quantitative Bestimmung des C-reaktiven Proteins**

Die Bestimmung von C-reaktivem Protein erfolgte mit Hilfe des rabbit high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) ELISA-(enzyme-linked immuno-sorbent assay) Kit, K-Assay® (Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA). Das Prinzip dieses kolorimetrischen Verfahrens ist folgendes: Die Serumproben werden in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert, die mit einem Anti-CRP-Antikörper beschichtet ist. In den Proben vorhandenes CRP bindet während einer ca. 10-minütigen Inkubationzeit an die Antikörper. Anschließend werden mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Anti-CRP-Antikörper auf die Platte gegeben und für weitere 10 min 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 wird die Reaktion abgebrochen und es erfolgt ein Farbumschlag zu gelb. Dieses Reaktionsprodukt kann nun durch Absorptionsmessung bei 450 nm im ELISA-Reader (DYNATECH MR 7000, Guernsey, Großbritannien) quantifiziert werden. Die Absorption korreliert mit der Menge an CRP, 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. Die Blutproben wurden mit einer mitgelieferten Verdünnungslösung auf 1:500 verdünnt.

### **2.5.2 Quantitative Bestimmung von Interleukin-8**

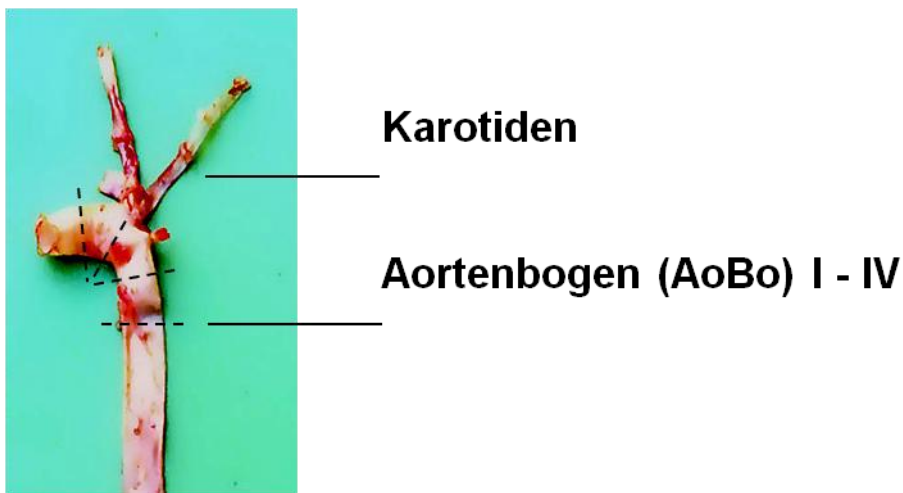
Zur quantitativen Bestimmung von IL-8 wurde der humane Quantikine® ELISA-Kit von R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet. Nach Angaben des Herstellers eignet sich dieses für humane Proben konzipierte Assay auch zur Messung der entsprechenden Kaninchen-Antigene. Alle Arbeitsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Durchführung des ELISAs folgt dem Prinzip, wie in **Kap. 2.5.1** beschrieben.

## 2.6 Histologische und immunhistochemische Präparate

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

### 2.6.1 Herstellung von Paraffinpräparaten

Nach der Entnahme wurden die Gefäßsegmente und Organproben für 24 Stunden (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 Neuseelandkaninchens

## **2.6.2 Herstellung von Kryostatpräparaten**

Das für die Ölrot-Färbung vorgesehene Gefäßsegment AoBo I wurde 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.

## **2.6.3 Histologische Färbungen**

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

Die Elastica van Gieson-Färbung (EvG-Färbung) diente zur morphometrischen Beurteilung der Präparate und zur Bestimmung der Plaquefläche. 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-minütigen 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.

### **2.6.3.2 Ölrot-Färbung**

Mit der Ölrot-Färbung werden Lipide dargestellt. 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 Hämaun-Lösung (Merck, Darmstadt). Unter fließendem Wasser wurden die Schnitte 10 min gebläut und in Mowiol (12 g Mowiol 4-88, Hoechst AG, Frankfurt) eingebettet.

#### 2.6.4 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 spezifischer enzymkonjugierter Sekundärantikörper (**Tab. 4**). Es wurden folgende immunhistochemische Färbungen standardisiert an den Aortenbogen-segmenten AoBo II und III angefertigt: RAM-11;  $\alpha$ -Aktin; ET-1; HSP 40, 60 und 70; Anti-NF $\kappa$ B.

Zunächst wurden die Präparate schrittweise in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (99-70 %) entparaffiniert. 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). 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 Primärantikörper 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 kurzes Eintauchen in Hämalaun-Lösung erfolgte die Gegenfärbung. Eingebettet wurden die Gefäßschnitte in Gelatine (Aquatex, Merck 8562).

<b>Färbung</b>	<b>Normalserum</b>	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Detektionssystem</b>	<b>Färbung</b>
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
ET-1	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
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, D651, DAKO, Glostrup, Denmark	Fast Red Tablets, Roche Mannheim, Deutschland
HSP 40/60/70	Normal Donkey Serum; Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA	HSP Goat polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA	Biotinylated Anti-Goat IgG; Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA	HRP Streptavidin; Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA	Biotinylated horseradish peroxidase; Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA

**Tab. 4: Immunhistochemische Färbungen.**

Dargestellt sind die verwendete Normalseren, Primär- und Sekundärantikörper, sowie die Detektionssysteme.

## 2.7 Auswertung der Gefäßpräparate

### 2.7.1 Für die Auswertung der Gefäßpräparate verwendete Geräte

Für die morphometrischen Messungen an den EvG-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 AG, 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; Aalen)</li><li>– Adobe Photoshop 7.0; Analyze IT</li><li>– Auswertungsprogramm ImageJ 1.32 (NIH, USA)</li></ul>
Drucker	<ul style="list-style-type: none"><li>– Color Laser Jet 4500 (Hewlett Packard, Kalifornien, USA)</li></ul>

## **2.7.2 Morphometrische Auswertung**

### **2.7.2.1 Bestimmung der Plauefläche und des Intima-Media-Verhältnisses**

Die Messung der Plauefläche (mm<sup>2</sup>) erfolgte je Tier morphometrisch an den vier EvG-gefärbten Segmenten des Aortenbogens. Dazu wurden die Lumenfläche und die durch die Lamina elastica interna begrenzte Fläche gemessen und voneinander subtrahiert.

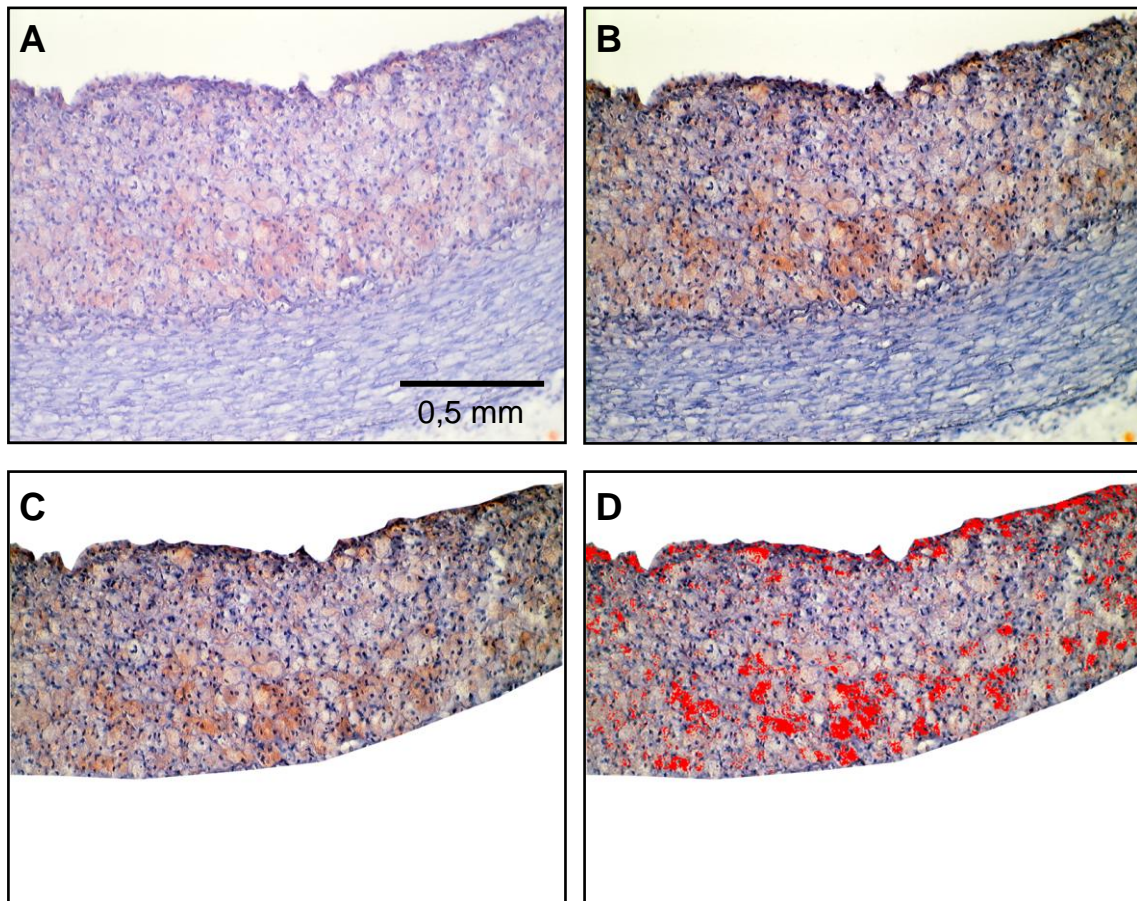
Das Intima-Media-Verhältnis, ein Indikator der Atherosklerose<sup>86</sup>, wurde ebenfalls an den vier EvG-gefärbten Segmenten des Aortenbogens bestimmt. Die Intima wurde definiert als Fläche zwischen der Lamina elastica interna und der Lumenfläche und entspricht der Plauefläche. Die Media ist definiert als die Fläche zwischen der Lamina elastica interna und der Lamina elastica externa. Diese Flächen wurde morphometrisch bestimmt und daraus das Intima-Media-Verhältnis berechnet. Alle gemessenen Parameter sind arithmetische Mittelwerte aus jeweils 2 Messungen am selben Segment.



## 2.7.3 Digitale Auswertung

### 2.7.3.1 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. 4**).



**Abb. 4:** 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“)

Aus den vier Einzelmessungen wurde die Summe aller roten Pixel berechnet und zur Gesamtpixelzahl ins Verhältnis gesetzt. Dieser prozentuale Anteil wurde mit der Plauefläche multipliziert und daraus die Fläche der jeweiligen Plauebestandteile berechnet.

An einem Ölrot-Präparat wurde zunächst das prinzipielle Vorgehen getestet. Dazu wurden jeweils mit einem Objektiv mit 10facher und 20facher Vergrößerung vier diametral gelegene Ausschnitte der Plaue fotografiert. Mit dem 2,5fach Objektiv wurde eine Übersichtsaufnahme der gesamten Plauefläche erstellt. Um zu ermitteln, welchen Anteil an der gesamten Plauefläche die einzelnen Vergrößerungen erfassten, wurden die Bilder ausgedruckt, die darauf abgebildete Plaue morphometrisch vermessen und in Relation zur gesamten Plauefläche gesetzt (vgl. **Kap. 2.7.2.1**). Mit dem 10fach Objektiv wurden so ca. 56 % der Gesamtplaue 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 ergab. Jedoch konnte mit dem 10fach Objektiv ein doppelt so großer Plaueanteil 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 Einzelnen eingegangen.

#### **2.7.3.2 Bestimmung der Plauezusammensetzung**

Die Fläche der **Lipide** wurde an den Ölrot-gefärbten Kryostatpräparaten des Segments AoBo I bestimmt.

Die Bestimmung der Fläche an **Makrophagen** an RAM-11-gefärbten Präparaten erfolgte an den Segmenten AoBo I bis IV.

Die Bestimmung der Flächen an  **$\alpha$ -Aktin**, **ET-1** und **Hitze-Schock-Proteinen** erfolgte an den Segmenten AoBo II und AoBo III des Aortenbogens.

Die **NFκB-positiven Zellen** wurden an den Segmenten AoBo II und AoBo III unter dem Mikroskop mit dem 40fachen Objektiv mit Immersionsöl manuell ausgezählt. Jeweils zwei Zählungen wurden gemittelt. Bereiche mit Artefakten wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Aus der morphometrisch ermittelten Plaquefläche (**Kap. 2.7.2.1**) und der mit dem Analyseprogramm ImageJ automatisch bestimmten Gesamtzellzahl wurde der prozentuale Anteil NFκB-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet.

## **2.8 Statistische Auswertung**

Im Text, in den Tabellen und Abbildungen werden der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben.

Die statistische Auswertung der Verlaufparameter Herzfrequenz und Blutparameter erfolgte anhand der „Area under the curve“ (AUC) wie von Bewick, et al.<sup>87</sup> beschrieben. Dieser Wert erlaubt eine Beurteilung der zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelten Messwerte über die gesamte Versuchsdauer.

Die Analyse aller Daten erfolgte mit dem Programm JMP (Version 5.1.1, 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. Für alle weiteren Parameter diente die „one-way ANOVA“ als statistisches Auswerteverfahren. Als parametrische Anschluss-tests wurden der „Tukey-Kramer-Test“ oder der „Dunnett's-Test“ verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Überlebenszeit

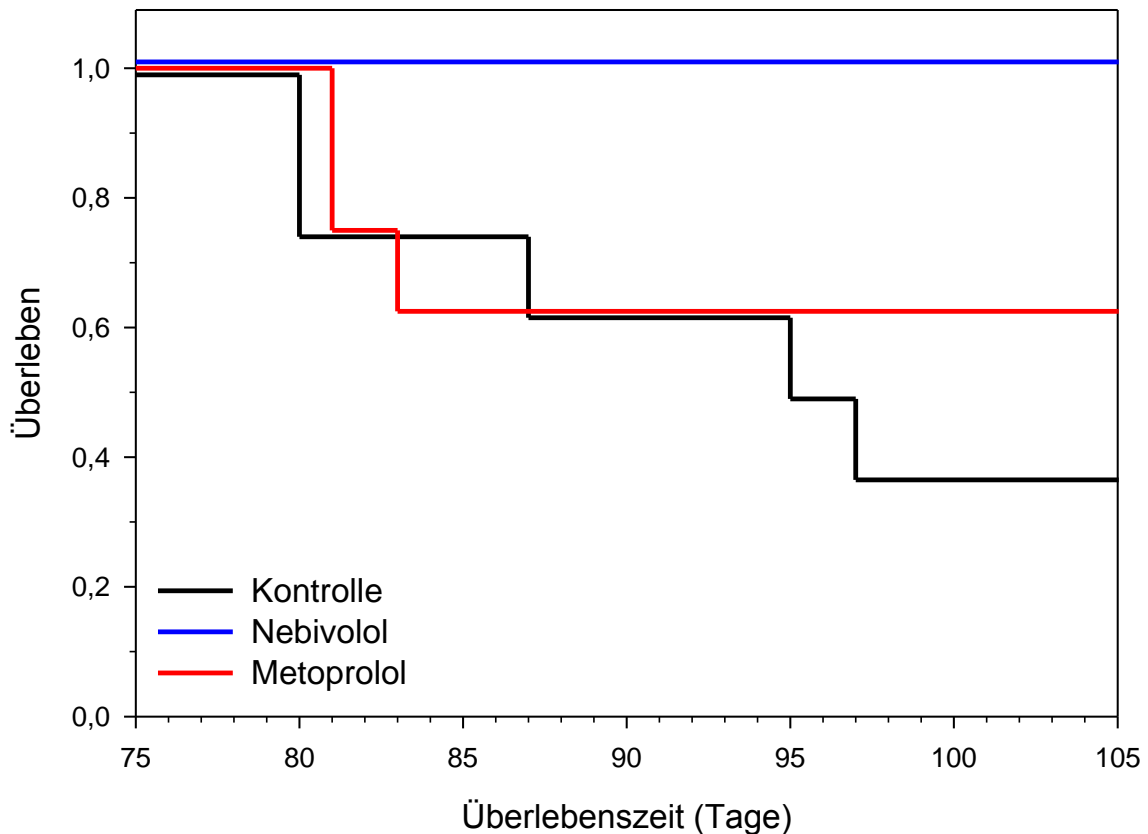
Die Versuchsdauer betrug insgesamt 105 Tage. Von den 24 Tieren erreichten 16 Tiere das Versuchsende. Acht Tiere wurden wegen einer zunehmenden Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes vorzeitig aus dem Versuch genommen. In der Kontroll-Gruppe schieden fünf Tiere und in der Metoprolol-Gruppe drei Tiere aus (**Tab. 5**). In der Nebivolol-Gruppe erreichten alle Tiere das geplante Versuchsende.

**Tab. 5: Übersicht der vorzeitig aus dem Versuch genommenen Tiere**

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

Die Versuchsgruppen wiesen signifikante Unterschiede im Überleben der Tiere auf ( $p=0,0473$ ). Im Einzelvergleich unterschieden sich die Nebivolol- und Kontroll-Gruppe signifikant voneinander ( $p=0,0097$ ). 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. 5**).

Die vorzeitig aus dem Versuch genommenen Tiere werden in den nachfolgend dargestellten Ergebnissen nicht berücksichtigt. Auf Abweichungen wird im einzelnen Kapitel eingegangen.



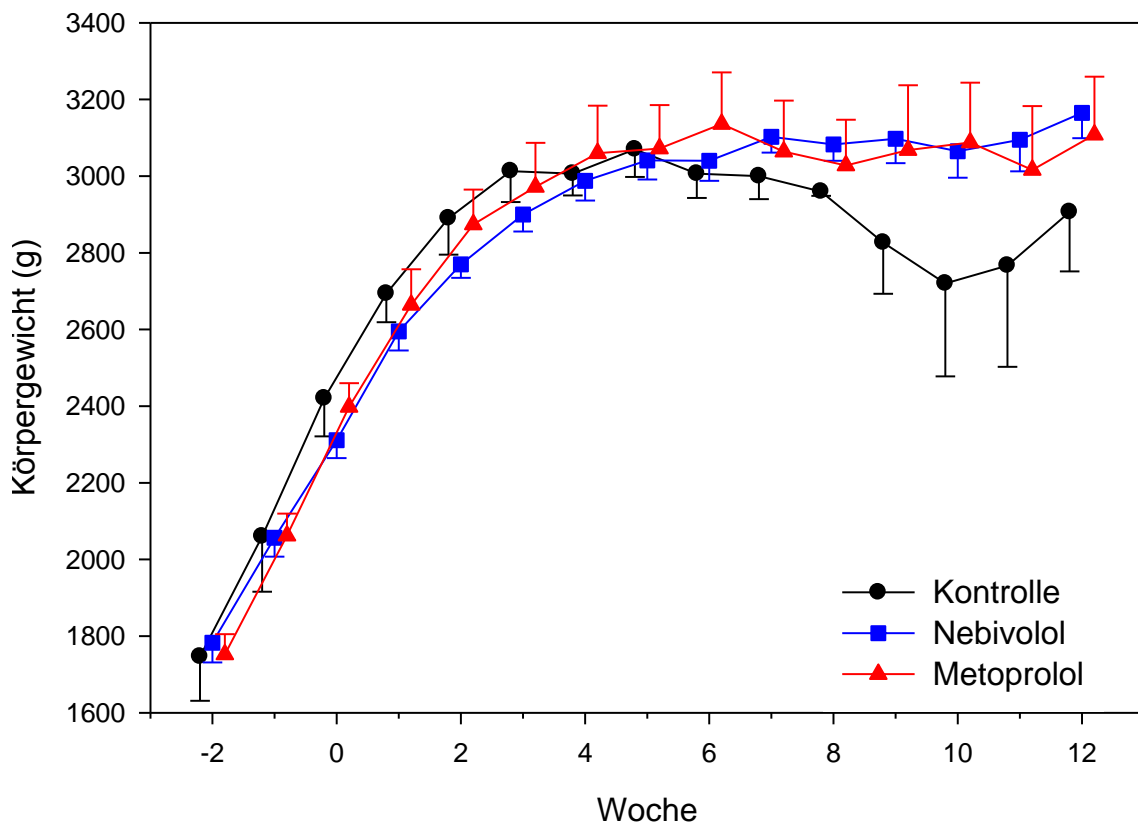
**Abb. 5: Kaplan-Meier-Kurve für die Überlebenszeit ( $p=0,0473$ ).**

Gezeigt ist das Überleben der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit von 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).

## 3.2 Körpergewicht und Futteraufnahme

### 3.2.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere (n=16) betrug zu Versuchsbeginn durchschnittlich  $1766 \pm 35$  g und stieg bis Woche 6 im Mittel um 162 g pro Woche an. Zu diesem Zeitpunkt erreichten die Tiere der medikamentös behandelten Gruppen nahezu ihr Gewicht bei Versuchsende (Endgewicht). Nur in der Kontroll-Gruppe nahm das durchschnittliche Körpergewicht bis Woche 10 um 240 g ab und stieg bis Woche 12 wieder auf ein Endgewicht von  $2967 \pm 155$  g an. In der Nebivolol-Gruppe lag das Endgewicht bei  $3165 \pm 66$  g und in der Metoprolol-Gruppe bei  $3108 \pm 152$  g (**Abb. 6**). Beim Anfangs- und Endgewicht war zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied feststellbar ( $p=0,55$ ).



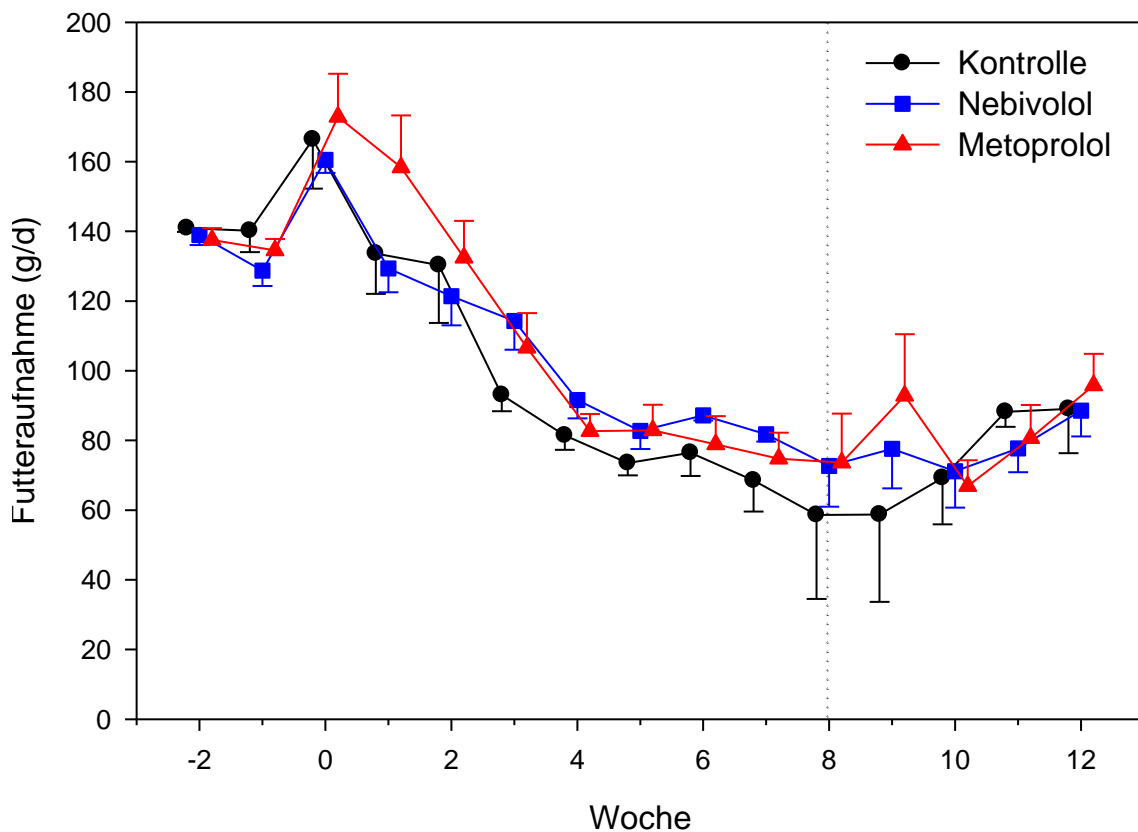
**Abb. 6: Entwicklung des Körpergewichts über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Bei Anfangs- und Endgewicht konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ( $p=0,55$ ).

### 3.2.2 Futter-, Cholesterin- und Medikamentenaufnahme

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

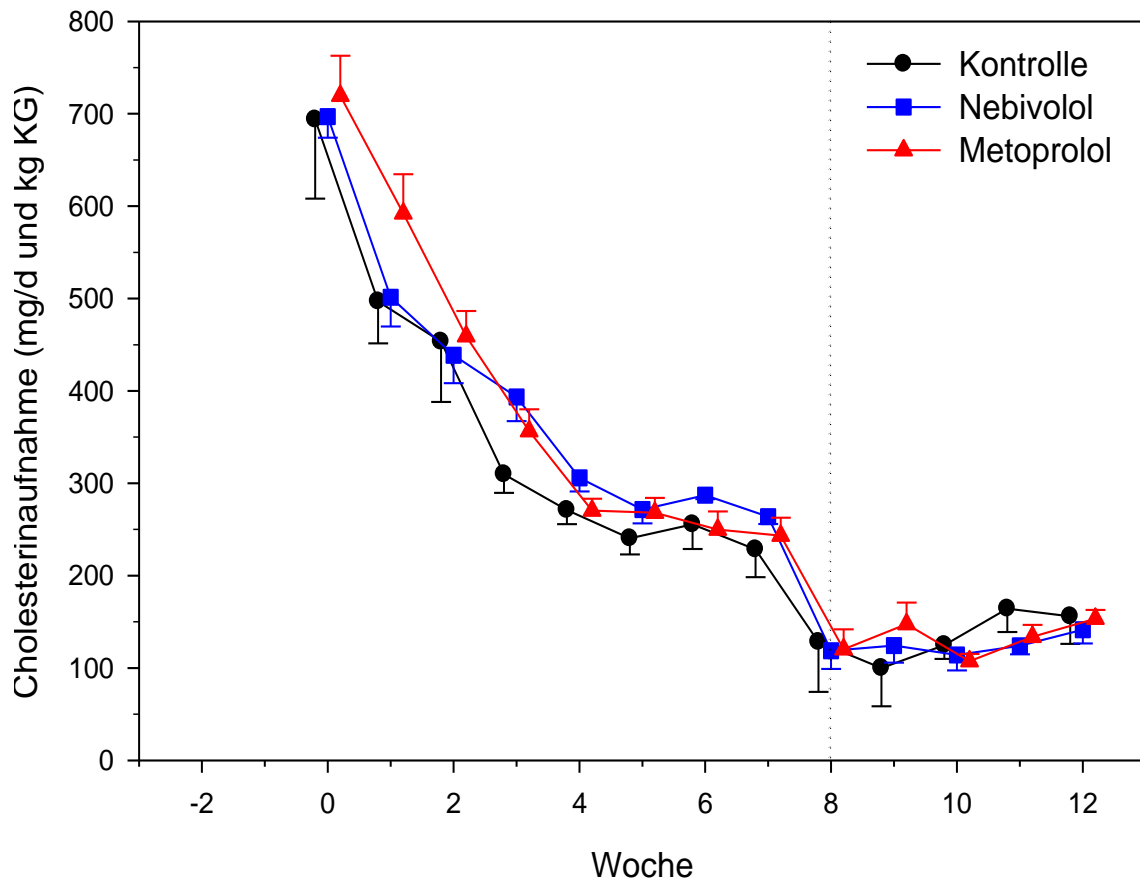
Die Futtermittelaufnahme betrug in den ersten fünf Wochen im Mittel aller Tiere  $141 \pm 3$  g/d. Ab Woche 3 nahm sie bis zur Futterumstellung in Woche 8 ab und stieg bis Woche 12 wieder leicht an. Im Mittel betrug sie  $83 \pm 2$  g/d. Zwischen den Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt ( $p=0,72$ ) (Abb. 7).



**Abb. 7: Durchschnittliche tägliche Futtermittelaufnahme über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Cholesterindosis im Futter wurde in Woche 8 von 1 % auf 0,5 % gesenkt. Bei dem über die gesamte Versuchsdauer berechneten Mittelwert konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ( $p=0,72$ ).

Aus der aufgenommenen Futtermenge wurde die Cholesterinaufnahme pro Tag und kg KG berechnet. Sie nahm im Mittel aller Tiere von ursprünglich  $703 \pm 22$  auf  $251 \pm 9$  mg/d und kg KG in Woche 7 ab. Nach der Futterumstellung betrug sie bis Woche 12 durchschnittlich  $129 \pm 5$  mg/d und kg KG. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war nicht erkennbar ( $p=0,75$ ) (**Abb. 8**).



**Abb. 8: Cholesterinaufnahme pro Tag und kg Körpergewicht (KG) über die Dauer von 13 Wochen.**

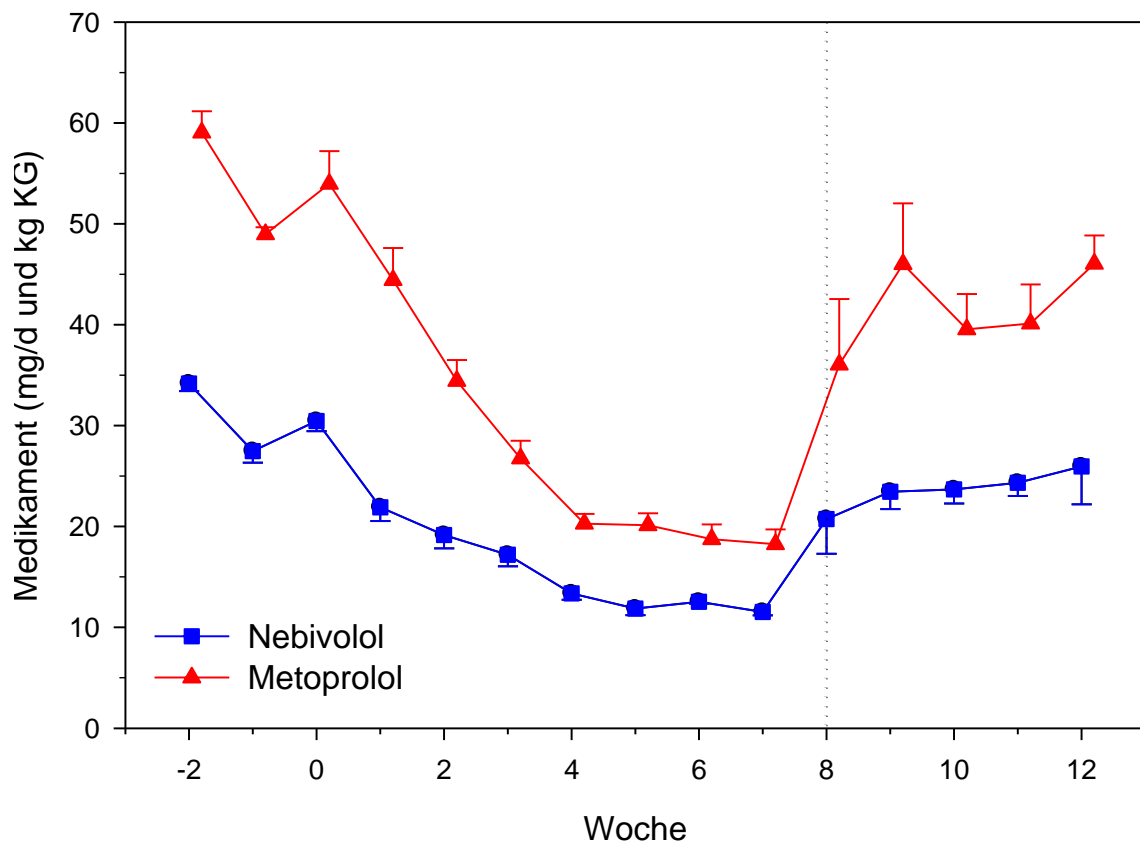
Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Cholesterindosis im Futter wurde in Woche 8 von 1 % auf 0,5 % gesenkt. Bei dem über die Dauer der Cholesterinfütterung berechneten Mittelwert war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar ( $p=0,75$ ).

Die durchschnittliche tägliche Medikamentenaufnahme 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 im Mittel 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. 9**).

Die durchschnittlich während der 15-wöchigen Versuchsphase aufgenommene Medimantendosis im Futter betrug in der Nebivolol-Gruppe  $21,2 \pm 0,5$  mg/d und kg KG und in der Metoprolol-Gruppe  $36,8 \pm 1,3$  mg/d und kg KG.

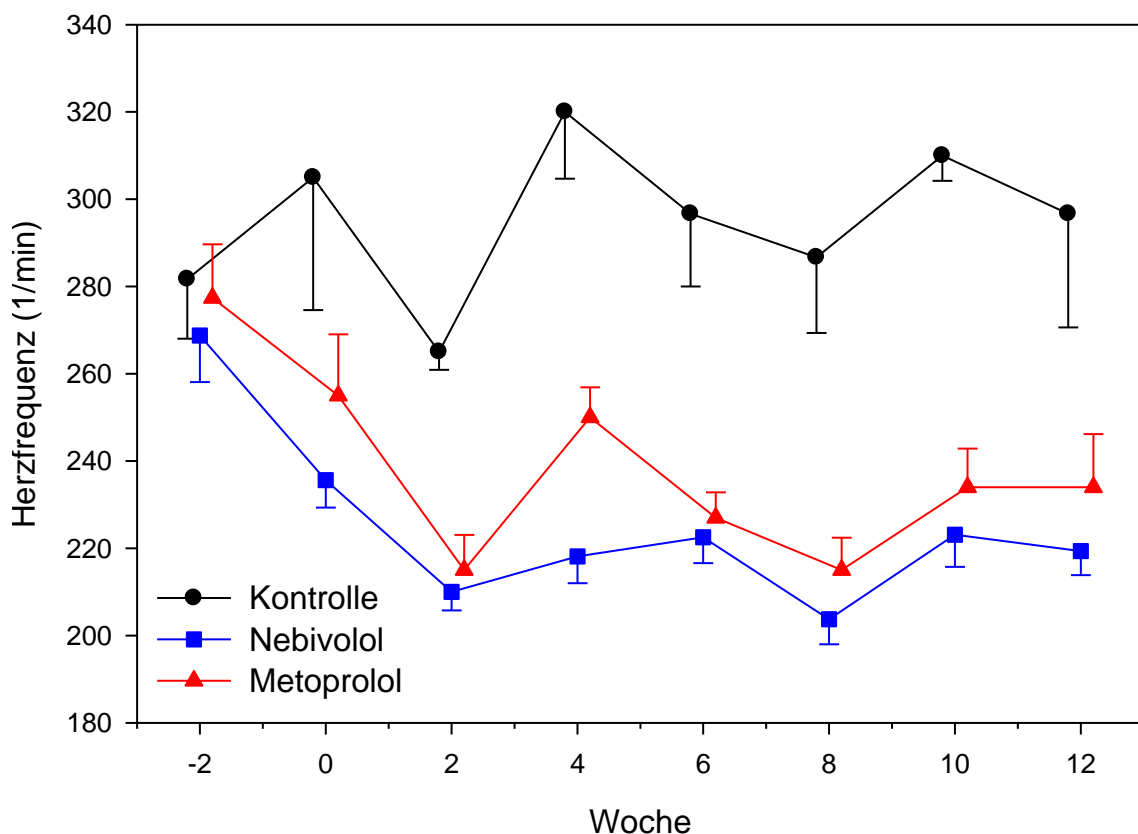


**Abb. 9: Medikamentendosis pro Tag und kg Körpergewicht (KG) über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Medikamentendosis im Futter wurde in Woche 8 verdoppelt.

### 3.3 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz betrug zu Versuchsbeginn im Mittel aller Tiere  $274 \pm 7 \text{ min}^{-1}$ . In der Kontrollgruppe blieb sie relativ konstant und lag während der Versuchsdauer im Mittel bei  $292 \pm 6 \text{ min}^{-1}$  (AUC  $4687 \pm 19 \text{ min}^{-1}$ ). 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  $225 \pm 3 \text{ min}^{-1}$  (AUC  $3558 \pm 62 \text{ min}^{-1}$ ) und in der Metoprolol-Gruppe bei  $237 \pm 4 \text{ min}^{-1}$  (AUC  $3755 \pm 88 \text{ min}^{-1}$ ) (**Abb. 10**). Die Herzfrequenz in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert ( $p=0,0001$  für den Unterschied bei der AUC). Zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.



**Abb. 10: 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 Kontrollgruppe 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 Versuchsende umgerechnet (**Tab. 6**). 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. 6: Organgewichte Leber und Milz**  
Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

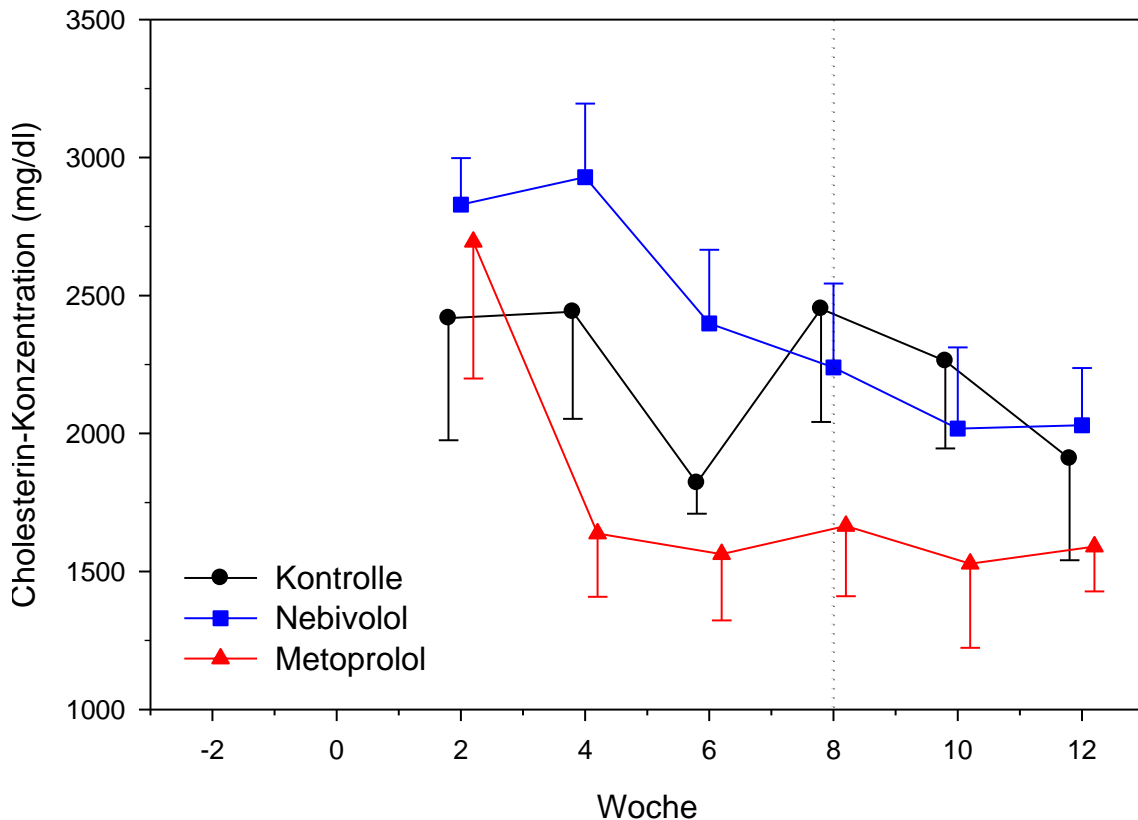
	Kontrolle	Nebivolol	Metoprolol	p-Wert
Leber (g)	$159,1 \pm 5,8$	$156,0 \pm 7,1$	$171,4 \pm 18,7$	0,63
(% des KG)	$5,44 \pm 0,24$	$4,96 \pm 0,20$	$5,44 \pm 0,45$	0,43
Milz (g)	$6,8 \pm 1,2$	$4,5 \pm 0,7$	$5,8 \pm 1,2$	0,29
(% des KG)	$0,23 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,05$	0,21

### 3.5 Blutparameter

#### 3.5.1 Konzentration der Plasmalipide und -lipoproteine

##### 3.5.1.1 Gesamtcholesterin

Die Cholesterin-Konzentration im Plasma betrug zu Beginn der Vorfütterungsphase 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  $2710 \pm 183$  mg/dl in Woche 2 an und lag während des Hauptversuchs durchschnittlich bei  $2176 \pm 87$  mg/dl. Zwischen den drei Gruppen waren bei der AUC des Cholesterin keine signifikanten Unterschiede feststellbar (AUC: Kontrolle  $22,2 \pm 1,4$  g/dl; Nebivolol  $24,0 \pm 2,1$  g/dl; Metoprolol  $17,1 \pm 2,2$  g/dl;  $p=0,10$ ) (**Abb. 11**).



**Abb. 11: Cholesterin-Konzentration im Plasma über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen.**

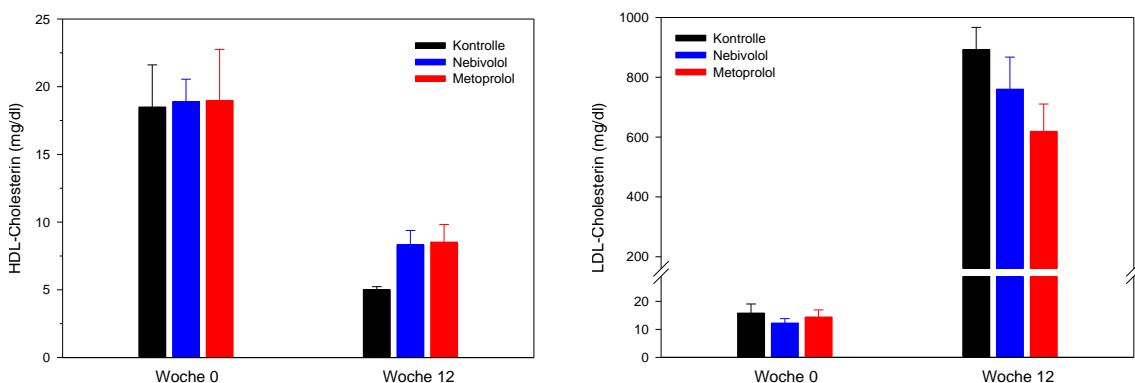
Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Werte der Cholesterinmessungen nach Beginn der Cholesterindiät. Die Cholesterindosis im Futter wurde in Woche 8 von 1 % auf 0,5 % gesenkt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in der area under the curve konnte nicht nachgewiesen werden ( $p=0,10$ ).

### 3.5.1.2 Lipoproteine

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 ( $p=0,99$  in Woche 0;  $p=0,19$  nach Woche 12) (**Abb. 12**).

Die **VLDL-Cholesterin-Konzentration** im Plasma lag zu Beginn des Hauptversuches im Mittel bei  $8,0 \pm 1,3$  mg/dl, bei Versuchsende bei  $1121,1 \pm 113,6$  mg/dl. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren zu keinem Zeitpunkt erkennbar ( $p=0,86$  in Woche 0;  $p=0,50$  nach Woche 12)

In Woche 0 betrug die mittlere **LDL-Cholesterin-Konzentration** im Plasma  $13,6 \pm 1,2$  mg/dl. In Woche 12 lag sie in der Kontroll-Gruppe bei  $892 \pm 75$  mg/dl, in der Nebivolol-Gruppe bei  $760 \pm 107$  mg/dl und in der Metoprolol-Gruppe bei  $619 \pm 92$  mg/dl. Zu keinem Zeitpunkt waren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar ( $p=0,54$  in Woche 0;  $p=0,36$  nach Woche 12) (**Abb. 12**).

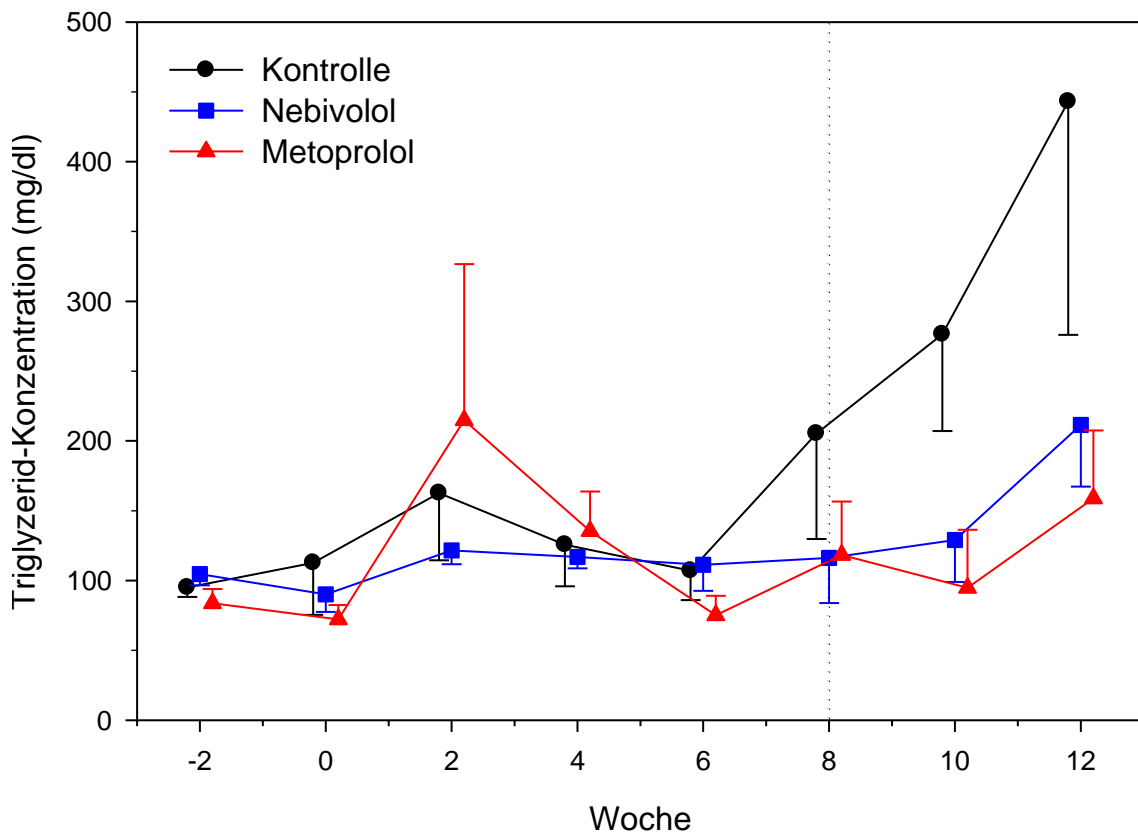


**Abb. 12: HDL- und LDL-Cholesterin-Konzentrationen im Plasma zu den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 12.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht nachgewiesen.

### 3.5.1.3 Triglyzeride

Die Triglyzerid-Konzentration im Plasma lag bei den 16 Tieren zu Untersuchungsbeginn im Mittel bei  $96,3 \pm 5,5$  mg/dl und bis Woche 6 durchschnittlich bei  $113,4 \pm 8,3$  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 kein signifikanter Unterschied nachweisbar (AUC: Kontrolle  $2,5 \pm 0,5$  g/dl; Nebivolol  $1,7 \pm 0,2$  g/dl; Metoprolol  $1,7 \pm 0,4$  g/dl;  $p=0,27$ ) (**Abb. 13**).



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

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Cholesterindosis im Futter wurde in Woche 8 von 1 % auf 0,5 % gesenkt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei der area under the curve wurde nicht festgestellt ( $p=0,27$ ).

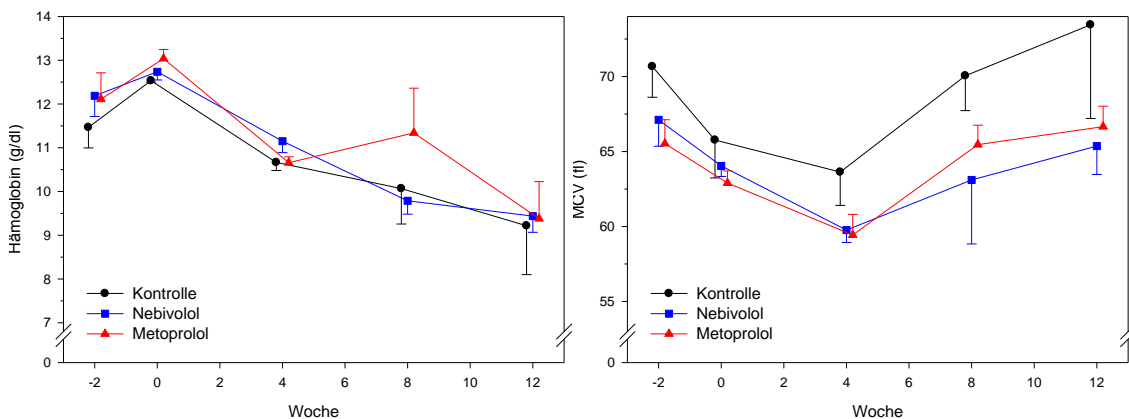
### 3.5.2 Weitere Blutparameter

#### 3.5.2.1 Kleines Blutbild

Die Parameter des kleinen Blutbildes mit Anfangs- und Endwert, AUC und p-Wert der AUC sind in **Tab. 7** im Anhang dargestellt.

Die **Hämoglobin**-Konzentration 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 (**Abb. 14**). 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. Im Versuchsverlauf sank es bis Woche 4 leicht ab und stieg bis Versuchsende in der Kontrollgruppe auf  $65,7 \pm 8,9$  fl, in den mit  $\beta$ -Blocker behandelten Gruppen auf durchschnittlich  $65,9 \pm 1,2$  fl (**Abb. 14**). Signifikante Unterschiede in der AUC des MCV waren zwischen den Gruppen nicht festzustellen ( $p=0,6935$ ).



**Abb. 14: Hämoglobin-Konzentration und MCV über die Untersuchungs-dauer von 15 Wochen.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Hämoglobin-Konzentration und des MCV in den einzelnen Gruppen.

Die Hämoglobin-Konzentration fiel in allen Gruppen ab. Das MCV war bis Woche 4 leicht erniedrigt, stieg aber bis zum Versuchsende wieder an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen wurde nicht festgestellt.

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 Versuchsende 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. Die AUC des MCH der Kontroll-Gruppe lag signifikant über der AUC der Metoprolol-Gruppe ( $p=0,0206$ ).

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 nachgewiesen werden ( $p=0,1174$ ).

Der **Hämatokrit** sank von durchschnittlich  $38,1 \pm 0,5$  % in Woche -2 auf  $23,4 \pm 1,0$  % (Kontroll-Gruppe),  $25,8 \pm 0,9$  % (Nebivolol-Gruppe) und  $27,1 \pm 2,3$  % (Metoprolol-Gruppe) bei Versuchsende. Die AUC des Hämatokrits war in der Metoprolol-Gruppe damit gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant erhöht ( $p=0,0499$ ).

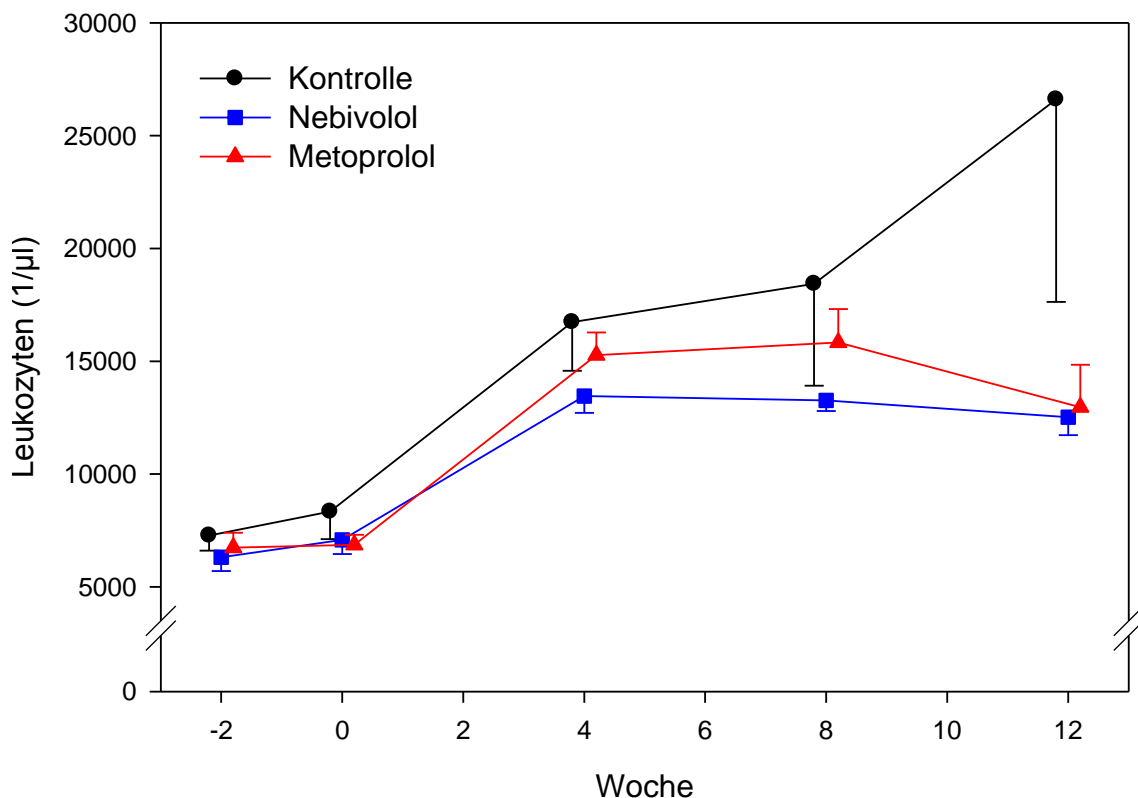
Zu Versuchsbeginn in Woche -2 lag die **Erythrozytenzahl** im Mittel aller Tiere bei  $5,7 \pm 0,1$  Mio/ $\mu$ l. Während des 15-wöchigen Versuchs verringerte sie sich in allen Versuchsgruppen. Sie sank in der Kontroll-Gruppe bis Woche 12 um 36 %, in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe um jeweils 30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

Im Verlauf der gesamten 15 Wochen zeigte die Zahl der **Thrombozyten** bei allen Gruppen einen Anstieg von durchschnittlich  $359 \pm 27$   $\text{nl}^{-1}$  in Woche -2 auf im Mittel  $474 \pm 25$   $\text{nl}^{-1}$  bei Versuchsende. Bei der AUC der Thrombozytenzahl war zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied nachweisbar ( $p=0,1833$ ).

Die Zahl der **Leukozyten** betrug zu Versuchsbeginn in der Kontroll-Gruppe im Mittel  $7280 \pm 670$   $\mu\text{l}^{-1}$ , in der Nebivolol-Gruppe  $6311 \pm 606$   $\mu\text{l}^{-1}$  und in der



Metoprolol-Gruppe  $6745 \pm 654 \mu\text{l}^{-1}$ . In allen Gruppen stieg die Leukozytenzahl direkt nach Beginn der cholesterinreichen Diät bis Woche 8 vergleichbar an. Danach zeigte die Kontroll-Gruppe bis Versuchsende einen Anstieg auf  $26607 \pm 8972 \mu\text{l}^{-1}$ , die Nebivolol-Gruppe auf  $12518 \pm 790 \mu\text{l}^{-1}$  und die Metoprolol-Gruppe auf  $12964 \pm 1880 \mu\text{l}^{-1}$  (**Abb. 15**). Die Kontroll-Gruppe lag in der AUC der Leukozytenzahl dabei signifikant über der AUC in der Nebivolol-Gruppe ( $p=0,0322$ ).



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

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Leukozytenzahl in den einzelnen Gruppen. Diese lag in der Nebivolol-Gruppe signifikant unter der Zahl der Leukozyten in der Kontrollgruppe ( $p=0,0322$  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.

### 3.5.2.2 Leber- und Pankreaswerte

Leber- und Pankreaswerte mit Anfangs- und Endwert, AUC und p-Wert der AUC sind in **Tab. 8** im Anhang dargestellt.

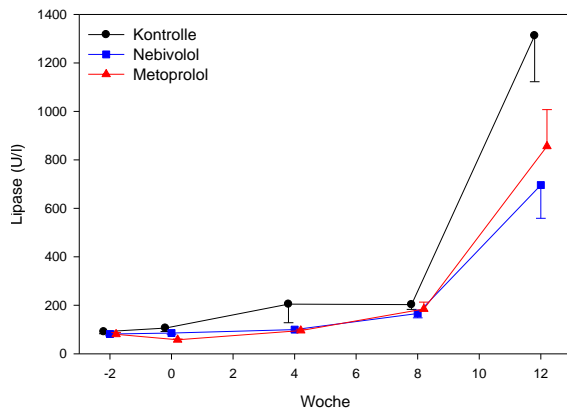
Die **Gesamt-Bilirubin-Konzentration (Abb. 17)** lag bei allen Tieren zu Beginn des Hauptversuchs im Mittel bei  $0,1 \pm 0,0$  mg/dl. In der Kontroll-Gruppe stieg sie auf einen Endwert von  $3,7 \pm 1,3$  mg/dl, in der Nebivolol-Gruppe auf  $1,3 \pm 0,2$  mg/dl und in der Metoprolol-Gruppe auf  $1,1 \pm 0,3$  mg/dl an. Ein signifikanter Unterschied in der AUC des Gesamt-Bilirubins war zwischen den Gruppen nicht festzustellen ( $p=0,0800$ ).

Die Werte der **Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)** (Aspartat-Aminotransferase [ASAT]) (**Abb. 17**) 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 Versuchsende 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)** (Alanin-Aminotransferase [ALAT]) (**Abb. 17**). 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 ( $0,4032$ ).

Die  **$\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT)** (**Abb. 17**) 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 ( $0,7763$ ).

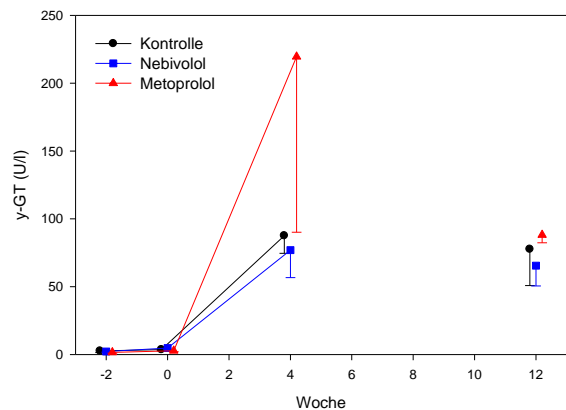
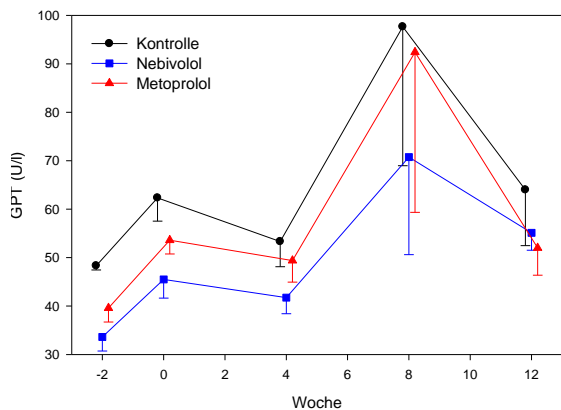
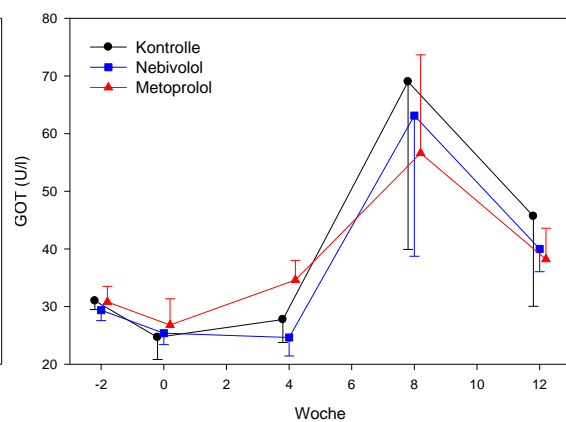
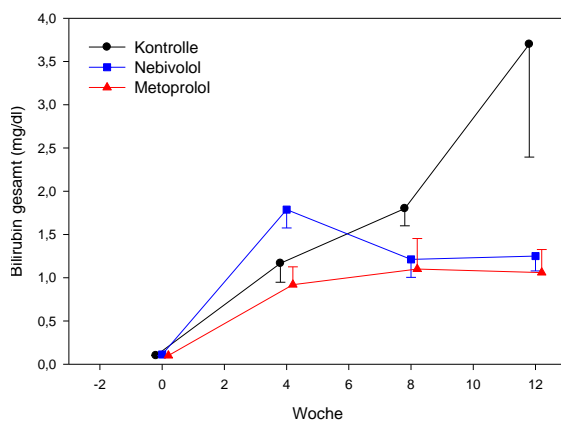
Die Aktivität der **Lipase** lag in Woche -2 durchschnittlich bei  $82,9 \pm 4,4$  U/l. Bis zum Versuchsende stieg sie in der Kontroll-Gruppe auf  $1312 \pm 190$  U/l, in der Nebivolol-Gruppe auf  $696 \pm 137$  U/l und in der Metoprolol-Gruppe auf  $856 \pm 151$  U/l (**Abb. 16**). Damit war die AUC der Lipase-Aktivität in der Nebivolol-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontroll-Gruppe ( $p=0,0182$ ).



**Abb. 16: Aktivität der Lipase im Plasma über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Aktivität der Lipase.

Die Aktivität der Lipase stieg in allen Gruppen in 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).



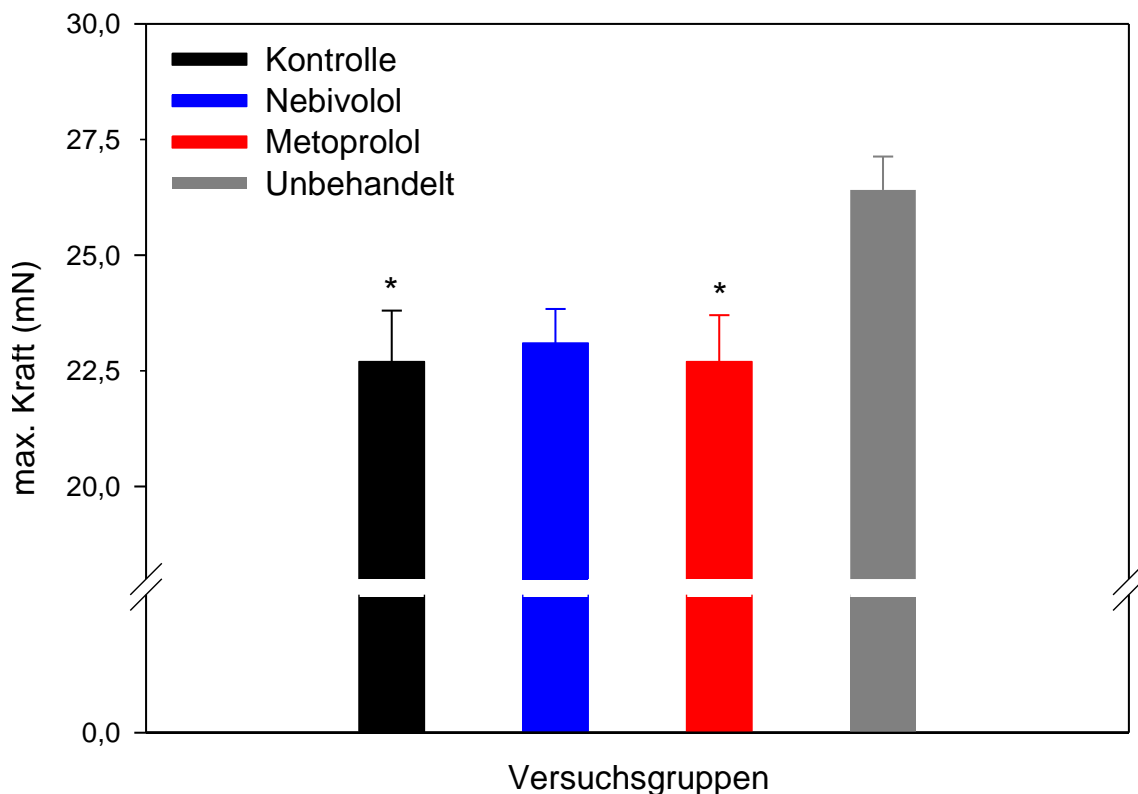
**Abb. 17: Gesamt-Bilirubin-Konzentration und Enzym-Aktivitäten der GOT, GPT und  $\gamma$ -GT im Plasma über die Untersuchungsdauer von 15 Wochen.**

Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in der AUC der Gesamt-Bilirubin-Konzentration, der GOT-, GPT- und  $\gamma$ -GT-Aktivität waren nicht nachweisbar.

### 3.6 Kontraktions- und Relaxationsmessungen

#### 3.6.1 Endothelabhängige Relaxation auf Acetylcholin

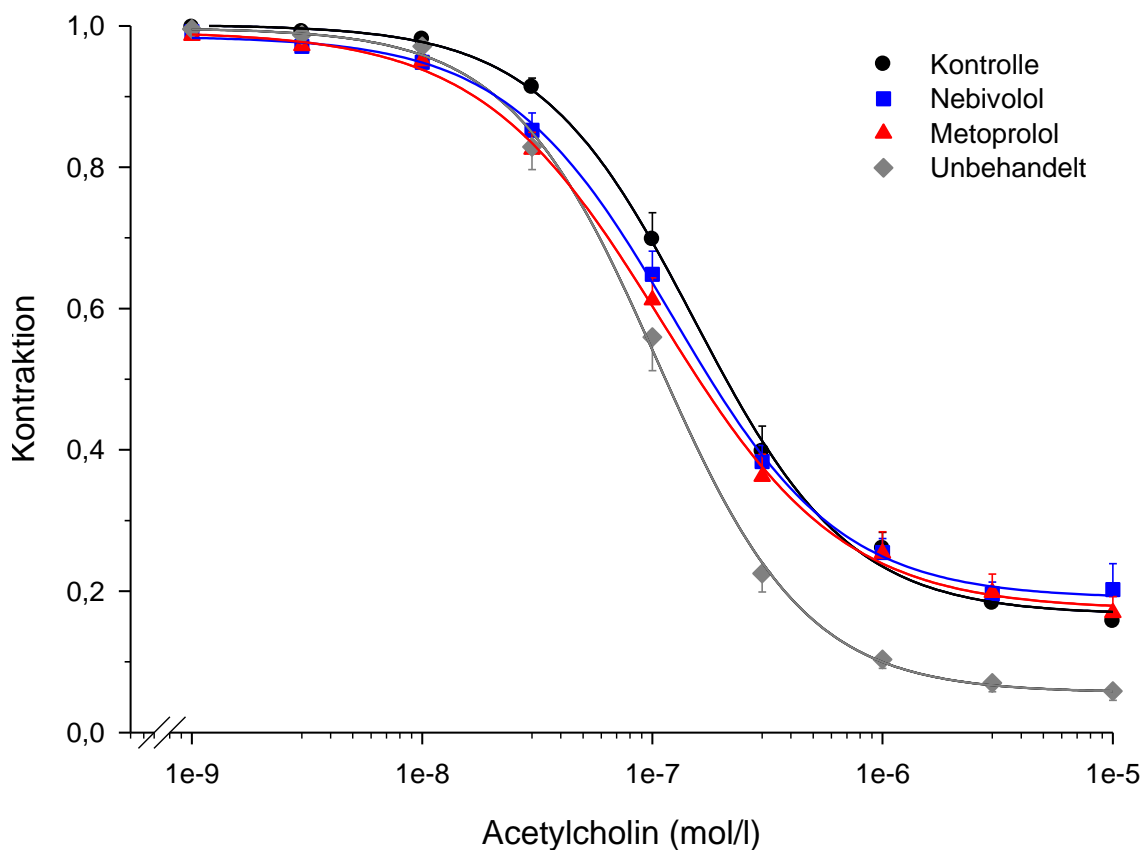
Vor der endothelabhängigen Relaxation (EDR) auf Acetylcholin erfolgte zunächst die Zugabe einer Einzeldosis Noradrenalin ( $3 \mu\text{mol/l}$ ). Die maximal entwickelte Kraft in der Kontroll- ( $22,7 \pm 1,1 \text{ mN}$ ), Nebivolol- ( $23,1 \pm 0,7 \text{ mN}$ ) und Metoprolol-Gruppe ( $22,7 \pm 1,0 \text{ mN}$ ) war dabei niedriger als die Kraft in der unbehandelten Gruppe ( $26,4 \pm 0,7 \text{ mN}$ ) (**Abb. 18**). Eine signifikant stärkere Kontraktion in der Gruppe unbehandelter Tiere konnte im Vergleich zur Metoprolol- und Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden ( $n=95$ ;  $p=0,0205$ ). Weitere signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden (**Tab. 9** im Anhang).



**Abb. 18: Maximale Kontraktion vor Relaxation auf Acetylcholin.**

Je Tier wurden vier Gefäßringe der Karotiden für die Organbadversuche verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in den einzelnen Gruppen auf eine Einzeldosis von  $3 \mu\text{mol/l}$  Noradrenalin. Die unbehandelten, nicht mit Cholesterin gefütterten Tiere zeigten eine signifikant stärkere Kontraktion als die Gruppen Metoprolol und Kontrolle ( $n=95$ ;  $p=0,0205$ ).

In der kumulativen Dosis-Wirkungskurve konnten für die halbmaximale Relaxation  $EC_{50}$  der EDR keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die unbehandelten Tiere zeigten nach der EDR eine maximale Relaxation von  $94,1 \pm 1,3 \%$ . Eine signifikant geringere Relaxation konnte in den Gruppen Kontrolle ( $84,3 \pm 1,3 \%$ ), Nebivolol ( $83,0 \pm 1,6 \%$ ) und Metoprolol ( $85,7 \pm 1,5 \%$ ) nachgewiesen werden ( $n=95$ ;  $p<0,0001$ ) (**Abb. 19**; **Tab. 9** im Anhang). Weitere signifikante Unterschiede waren nicht nachweisbar.



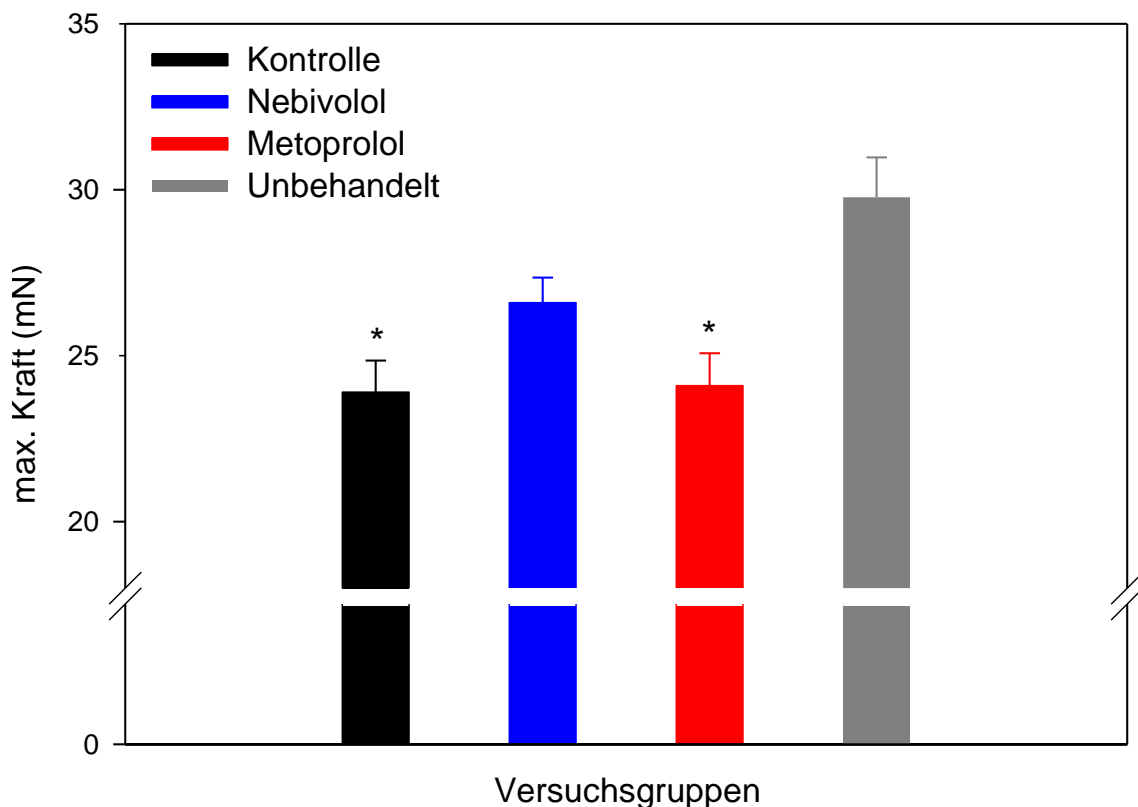
**Abb. 19: Kumulative Dosis-Wirkungskurve auf Acetylcholin.**

Je Tier wurden vier Gefäßringe der Karotiden für die Organbadversuche verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in den einzelnen Gruppen auf kumulative Dosen von Acetylcholin in Relation zur maximalen Kontraktion auf Noradrenalin.

Die unbehandelten, nicht mit Cholesterin gefütterten Tiere zeigten eine signifikant bessere maximale endothelabhängige Relaxation als die Gruppen Kontrolle, Nebivolol und Metoprolol ( $p<0,0001$ ). Für die Konzentration der halbmaximalen Relaxation ( $EC_{50}$ ) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden.

### 3.6.2 Endothelunabhängige Relaxation auf Nitroprussidnatrium

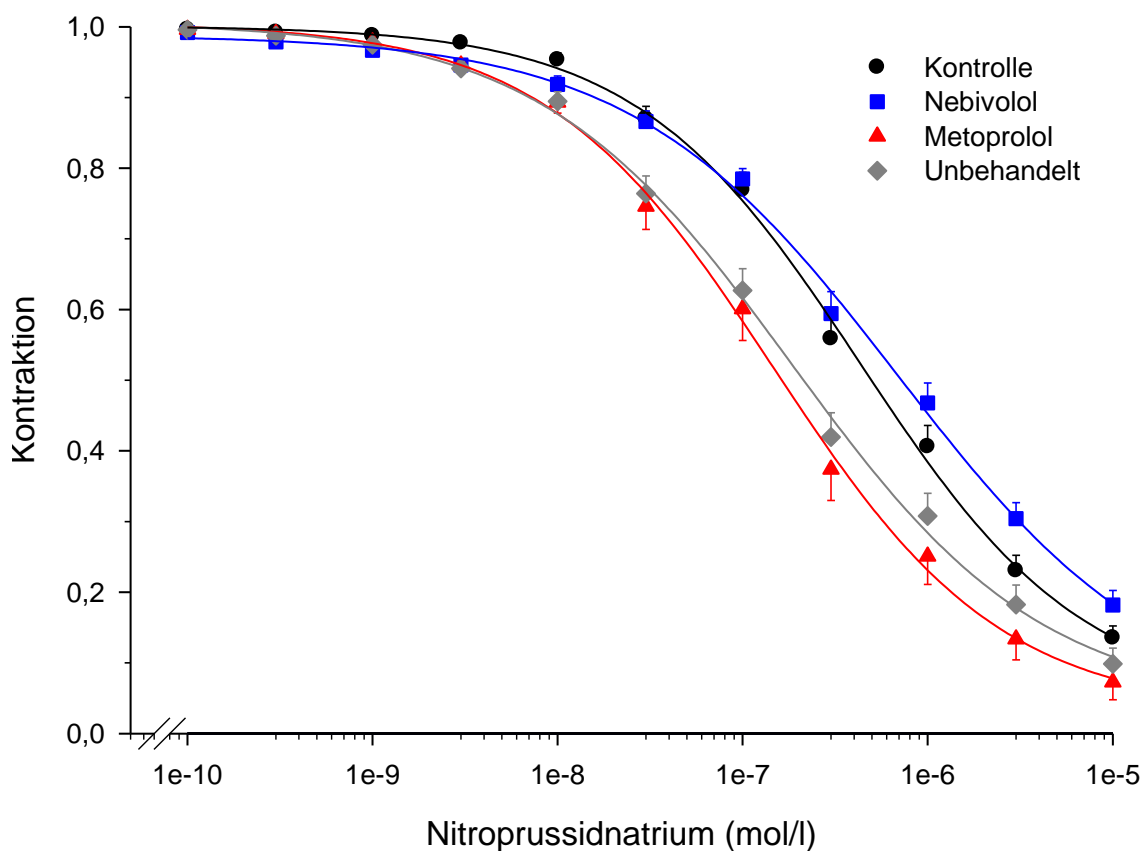
Vor der endothelunabhängigen Relaxation (NEDR) auf Nitroprussidnatrium lag die Kontraktion nach einer Einzeldosis Noradrenalin ( $3 \mu\text{mol/l}$ ) in der Kontroll-Gruppe bei  $23,9 \pm 1,0 \text{ mN}$  und in der Metoprolol-Gruppe bei  $24,1 \pm 1,0 \text{ mN}$ . Die Gefäß-Ringe der Nebivolol-Gruppe kontrahierten stärker und erreichten im Mittel einen Wert von  $26,6 \pm 0,8 \text{ mN}$ . Die Karotiden der unbehandelten Tiere zeigten die stärkste Kraftentwicklung von  $29,8 \pm 0,9 \text{ mN}$  und unterschieden sich signifikant von den Gruppen Metoprolol und Kontrolle ( $n=94$ ;  $p<0,0001$ ) (**Abb. 20**, **Tab. 10** im Anhang). Ein signifikanter Unterschied zur Nebivolol-Gruppe wurde nicht gefunden.



**Abb. 20: Maximale Kontraktion vor Relaxation auf Nitroprussidnatrium.**

Je Tier wurden vier Gefäßringe der Karotiden für die Organbadversuche verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in den einzelnen Gruppen auf eine Einzeldosis von  $3 \mu\text{mol/l}$  Noradrenalin. Die unbehandelten Tiere zeigten eine signifikant stärkere Kontraktion als die Gruppen Metoprolol und Kontrolle ( $n=94$ ;  $p<0,0001$ ).

In der kumulativen Dosis-Wirkungskurve zeigte sich konzentrationsabhängig für die Gruppen Nebivolol und Kontrolle eine Rechtsverschiebung mit Zunahme der  $EC_{50}$ . Für beide Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied zur Metoprolol- und Unbehandelt-Gruppe nachgewiesen werden ( $n=96$ ;  $p<0,0001$ ). Die Metoprolol-Gruppe erreichte nach der NEDR die stärkste maximale Relaxation von  $92,7 \pm 2,5$  % und unterschied sich signifikant von der Nebivolol-Gruppe, die die schwächste Relaxation von  $81,8 \pm 2,0$  % zeigte ( $n=96$ ;  $p=0,0040$ ). Für die Gruppen Kontrolle ( $86,5 \pm 1,7$  %) und Unbehandelt ( $90,1 \pm 2,2$  %) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (**Abb. 21, Tab. 10** im Anhang).



**Abb. 21: Kumulative Dosis-Wirkungskurve auf Nitroprussidnatrium.**

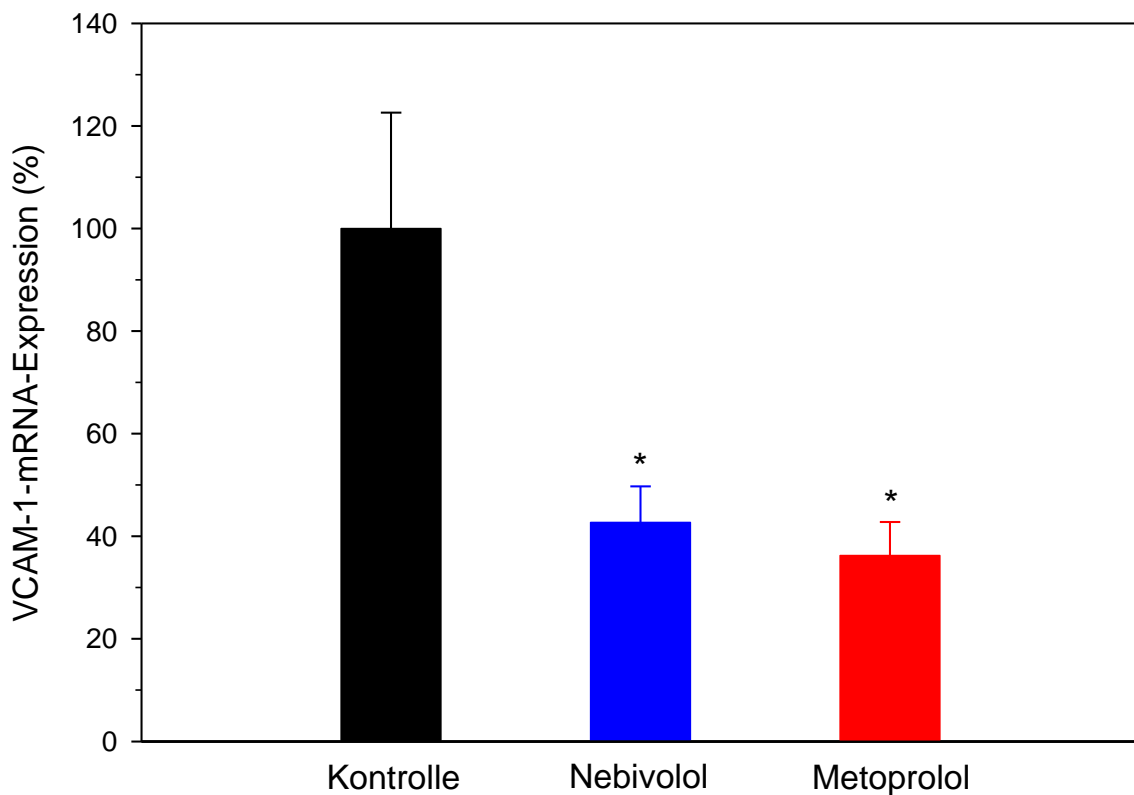
Je Tier wurden vier Gefäßringe der Karotiden für die Organbadversuche verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in Relation zur maximalen Kontraktion auf Noradrenalin.

Eine signifikant höhere maximale endothelunabhängige Relaxation konnte zwischen der Metoprolol- und Nebivolol-Gruppe nachgewiesen werden ( $p=0,0040$ ). Für die beiden Gruppen Metoprolol und Unbehandelt zeigte sich eine signifikant geringere Konzentration der halbmaximalen Relaxation ( $EC_{50}$ ) gegenüber der Nebivolol- und Kontroll-Gruppe ( $p<0,0001$ ).

### 3.7 mRNA-Expression von VCAM-1, MCP-1 und CRP in den Karotiden

#### 3.7.1 Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)

Die relativ quantitative Auswertung der RT-PCR ergab eine verminderte Expression von VCAM-1-mRNA in den Karotiden der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe. 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. 22, Tab. 14** im Anhang).



**Abb. 22: 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.

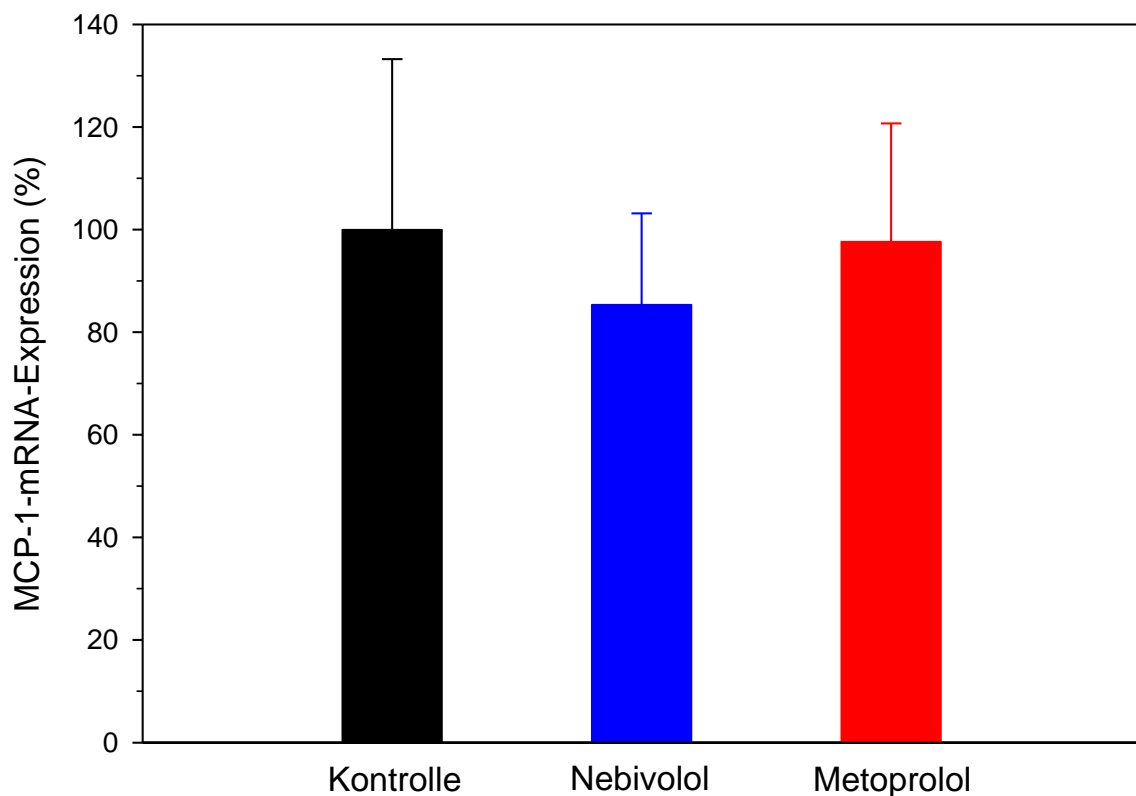
Die Expression der VCAM-1-mRNA war in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $p=0,0017$ ;  $n=30$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden.



Bei den mit  $\beta$ -Blockern behandelten Tieren war damit die Expression von VCAM-1-mRNA gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $n=30$ ;  $p=0,0017$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe wurde nicht festgestellt.

### 3.7.2 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

Die Expression von MCP-1-mRNA war in 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. 23**, **Tab. 14** im Anhang). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden ( $p=0,8790$ ).



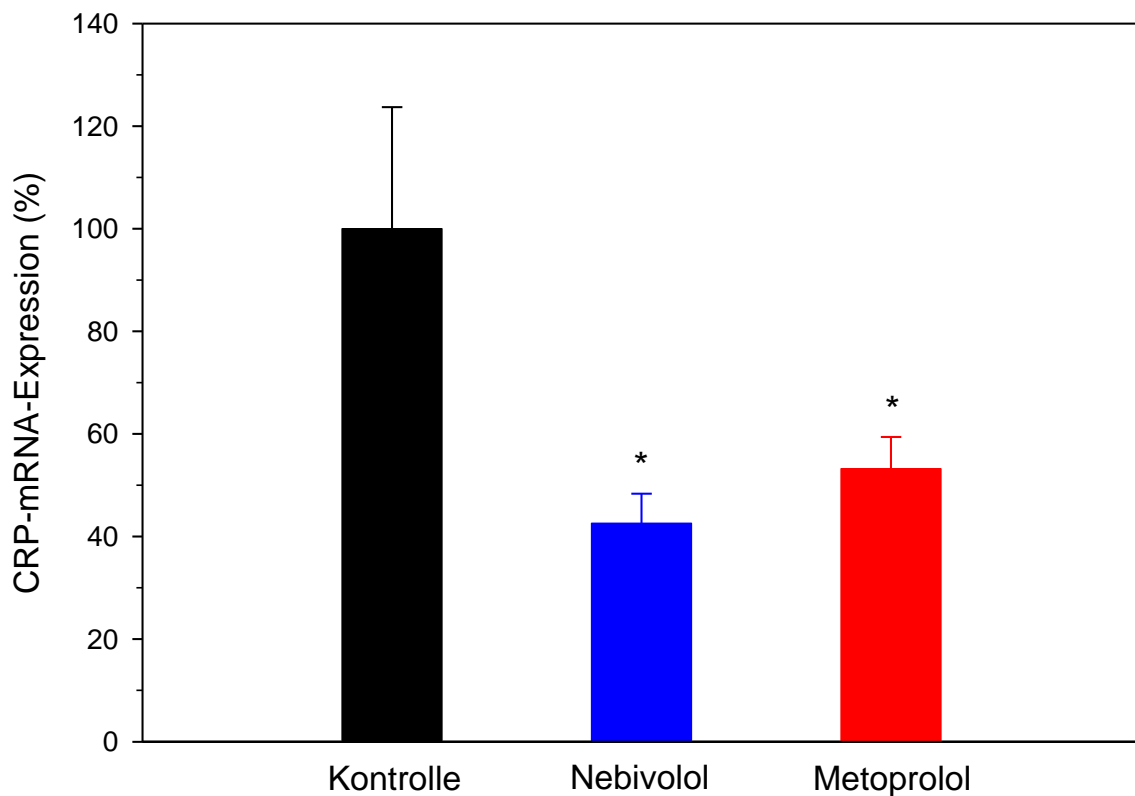
**Abb. 23: Expression von MCP-1-mRNA in schockgefrorenen Karotiden.**

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.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden ( $n=31$ ;  $p=0,8790$ ).

### 3.7.3 C-reaktives Protein (CRP)

Die Expression der CRP-mRNA lag in der Kontroll-Gruppe bei  $100,0 \pm 23,7 \%$  und war bei den Tieren der Nebivolol- ( $42,6 \pm 5,8 \%$ ) und Metoprolol-Gruppe ( $53,2 \pm 6,2 \%$ ) signifikant reduziert ( $n=31$ ;  $p<0,0027$ ) (**Abb. 24**, **Tab. 14** im Anhang). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden.



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

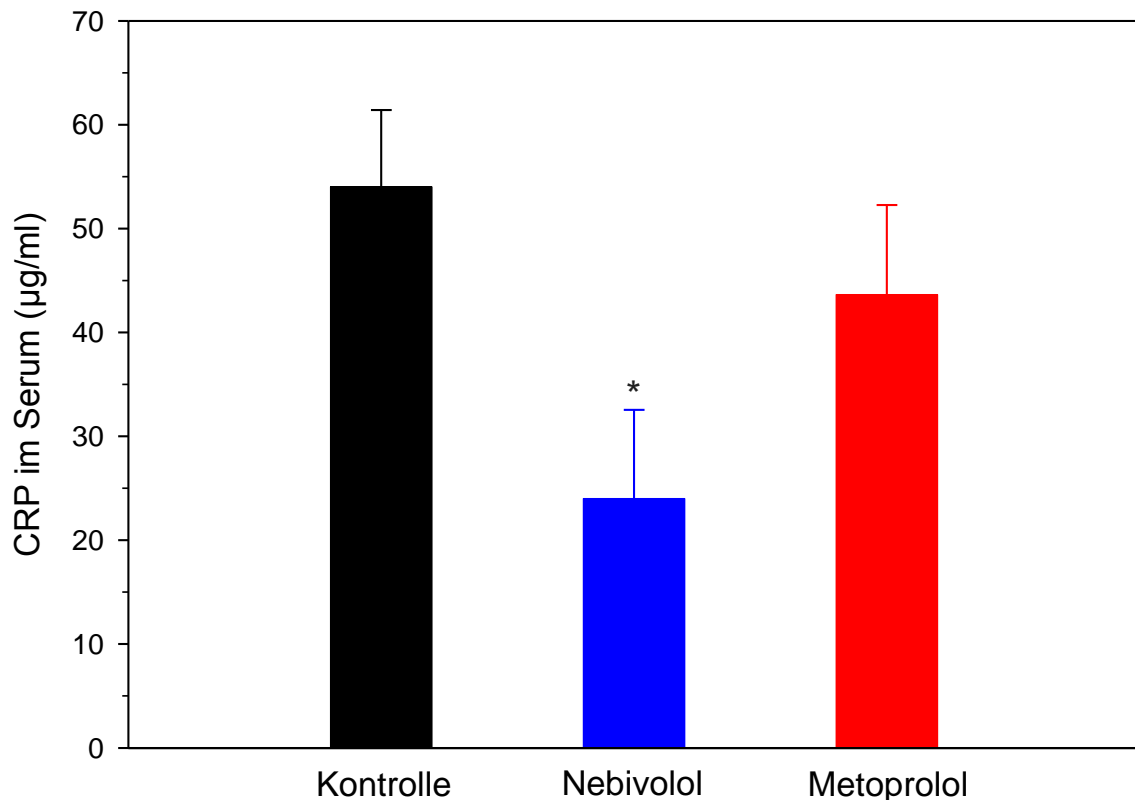
Die Untersuchung der CRP-mRNA-Expression an den rechten und linken Karotiden erfolgte mittels Real-time-RT-PCR nach Isolation der Gesamt-RNA und unspezifischer RT-Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen mRNA-Expression.

Die Expression der CRP-mRNA war in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $p<0,0027$ ;  $n=31$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte nicht festgestellt werden.

### 3.8 CRP- und IL-8-Konzentrationen im Serum

#### 3.8.1 C-reaktives Protein (CRP)

Alle vorzeitig aus dem Versuch genommenen Kaninchen wurden in dieser Auswertung berücksichtigt (Intention-to-treat-Analyse). Die CRP-Konzentration im Serum lag in der Kontroll-Gruppe bei Versuchsende im Mittel bei  $54,0 \pm 7,4 \mu\text{g/ml}$ . Um 55 % geringer war die Konzentration in der Nebivolol-Gruppe ( $24,0 \pm 8,6 \mu\text{g/ml}$ ) und um 19 % geringer in der Metoprolol-Gruppe ( $43,6 \pm 8,6 \mu\text{g/ml}$ ) (**Abb. 25, Tab. 15** im Anhang).



**Abb. 25: Konzentration von C-reaktivem Protein (CRP) im Serum bei Versuchsende (Intention-to-treat-Analyse).**

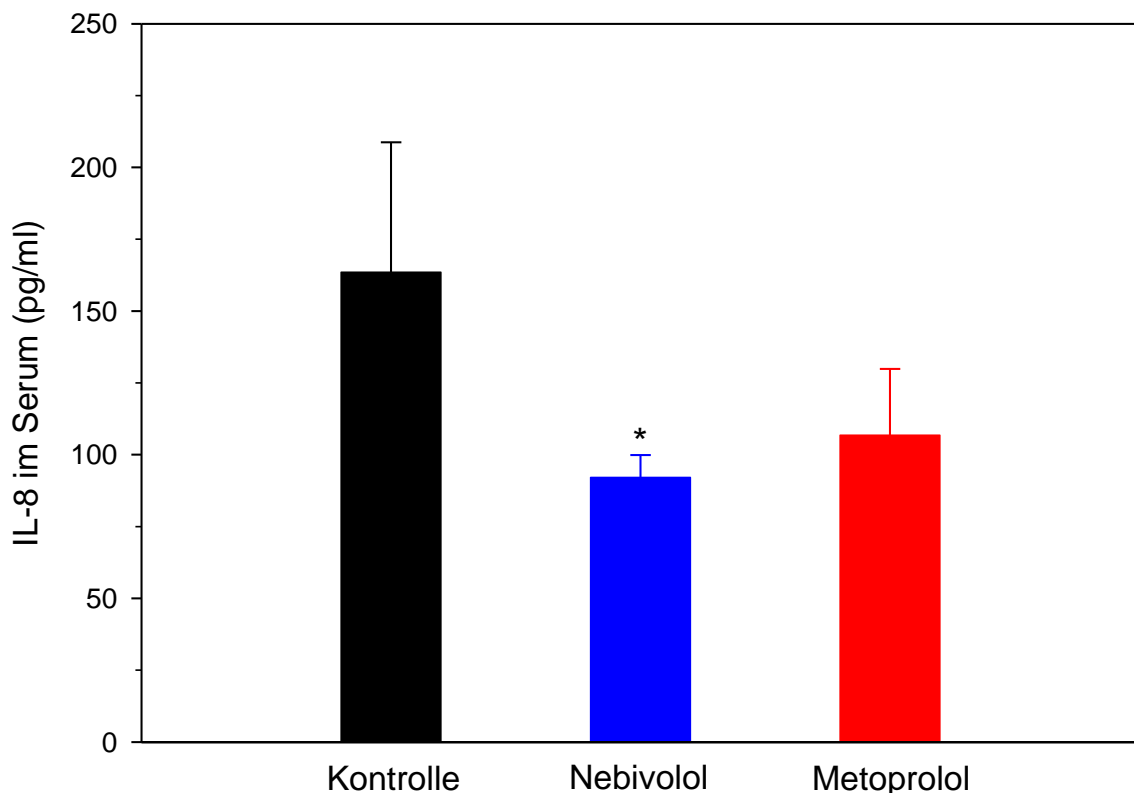
Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in den einzelnen Gruppen. Die Serum-Konzentrationen aller 24 Versuchstiere wurden aus mindestens zwei am ELISA-Reader gemessenen Absorptionswerten berechnet.

Die Konzentration von CRP im Serum war in der Nebivolol-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ). Zwischen der Metoprolol- und Kontroll-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Im Dunnett's-Test konnte bei den Tieren der Nebivolol-Gruppe eine signifikant verminderte Konzentration von CRP im Serum gegenüber der Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden ( $n=24$ ;  $p<0,05$ ). Zwischen der Metoprolol- und Kontroll-Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet.

### 3.8.2 Interleukin-8 (IL-8)

Bei Versuchsende lag die Konzentration von Interleukin-8 (IL-8) im Serum der Kontrollgruppe bei  $163,5 \pm 45,2$  pg/ml. Verminderte IL-8-Konzentrationen fanden sich bei den Tieren der Metoprolol- ( $106,8 \pm 23,1$  pg/ml) und Nebivolol-Gruppe ( $92,1 \pm 2,7$  pg/ml) (**Abb. 26, Tab. 15** im Anhang). Die Nebivolol-Gruppe zeigte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine signifikante Reduktion der Serum-Konzentration von IL-8 ( $n=16$ ;  $p<0,05$  Dunnett's-Test). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Metoprolol- und Kontroll-Gruppe war nicht erkennbar.

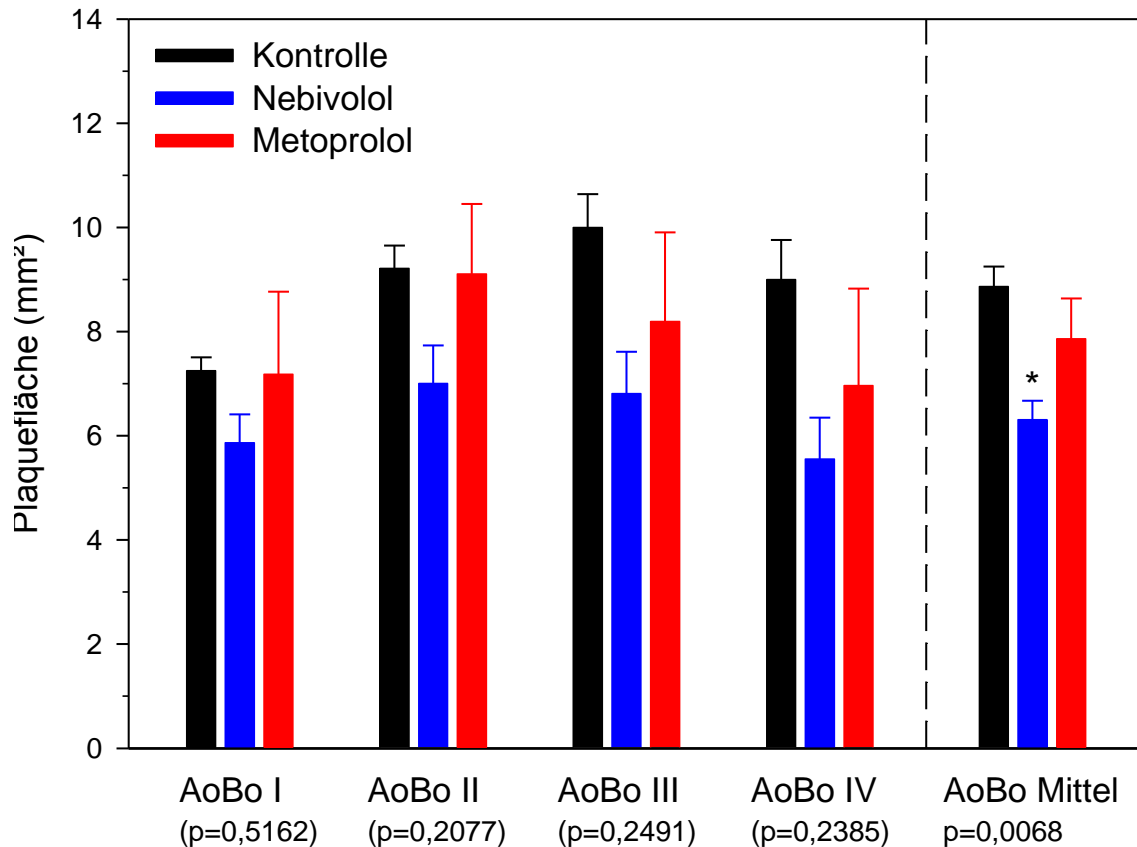


**Abb. 26: Konzentration von Interleukin-8 (IL-8) im Serum bei Versuchsende.** Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in den einzelnen Gruppen. Die Serum-Konzentrationen wurden aus mindestens zwei am ELISA-Reader gemessenen Absorptionswerten berechnet. Die Konzentration von IL-8 im Serum war in der Nebivolol- gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert ( $p<0,05$ ).

### 3.9 Morphometrie und Histologie des Aortenbogens

#### 3.9.1 Plaquetfläche und Intima-Media-Verhältnis

In allen Gruppen entwickelten sich atherosklerotische Läsionen im Aortenbogen (**Abb. 27**).



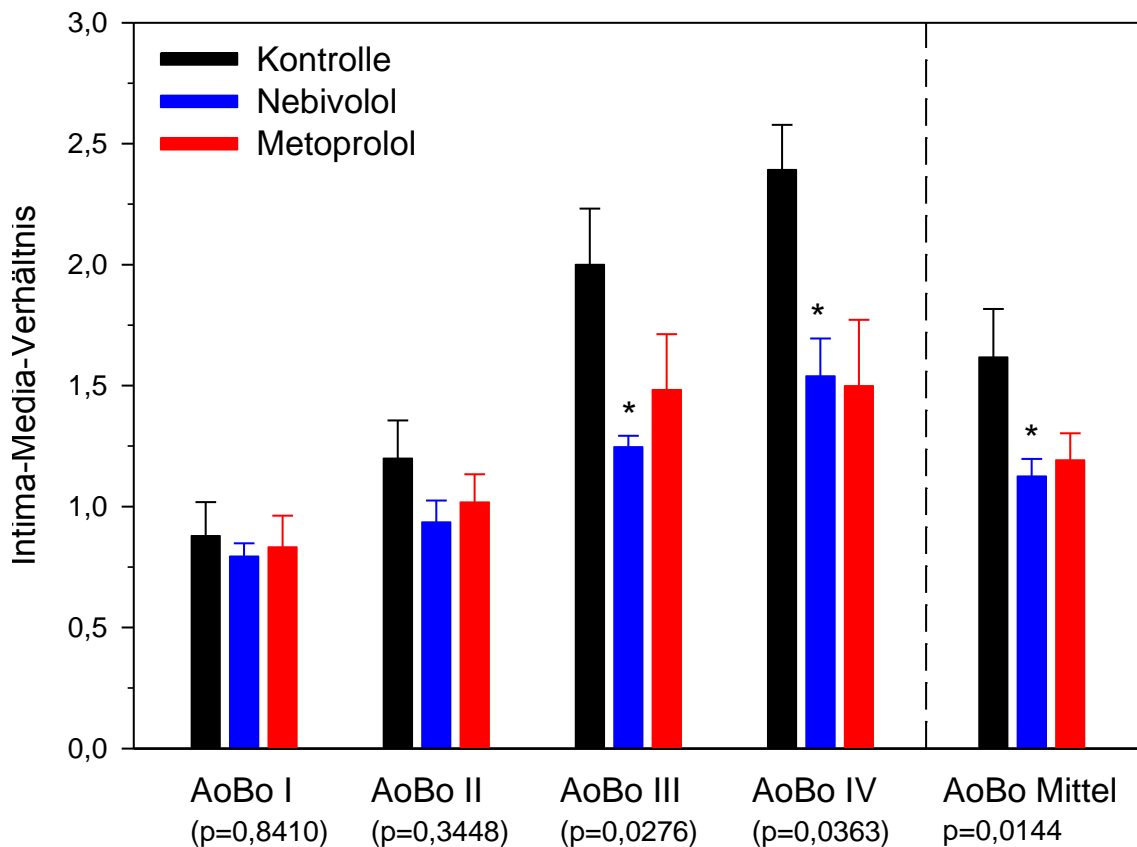
**Abb. 27: Plaquetfläche in den Segmenten des Aortenbogens (AoBo I-IV) und im Mittel aller Segmente (AoBo Mittel)**

Die Plaquetfläche wurde an 64 EvG-gefärbten Präparaten morphometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Im Mittel aller Segmente konnte in der Nebivolol-Gruppe eine signifikant kleinere Plaquetfläche im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden ( $n=64$ ;  $p=0,0068$ ). Weitere signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt.

Die Tiere der Kontroll-Gruppe wiesen im Mittel aller Segmente eine Plaquetfläche im Aortenbogen von  $8,9 \pm 0,4$  mm<sup>2</sup> auf. Die Fläche bei den Tieren der Nebivolol-Gruppe war mit  $6,3 \pm 0,4$  mm<sup>2</sup> um 29 % geringer. In der Metoprolol-Gruppe war die Plaquetfläche mit  $7,9 \pm 0,8$  mm<sup>2</sup> um 11 % geringer als in der Kontroll-Gruppe (**Abb. 27**). In der Nebivolol-Gruppe war die

Plaquerfläche im Mittel aller Segmente signifikant geringer als in der Kontroll-Gruppe ( $n=64$ ;  $p=0,0068$ ). Zwischen der Kontroll- und Metoprolol-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden, ebenfalls nicht zwischen der Nebivolol- und der Metoprolol-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied in der Plaquerfläche einzelner Segmente konnte nicht nachgewiesen werden (**Tab. 11** im Anhang).

Das Intima-Media-Verhältnis erreichte im Mittel aller AoBo-Segmente den maximalen Wert in der Kontroll-Gruppe ( $1,6 \pm 0,2$ ), vermindert war es bei den Tieren der Metoprolol- ( $1,2 \pm 0,1$ ) und Nebivolol-Gruppe ( $1,1 \pm 0,1$ ) (**Abb. 28**).



**Abb. 28: Intima-Media-Verhältnis in den Segmenten des Aortenbogens (AoBo I-IV) und im Mittel aller Segmente (AoBo Mittel)**

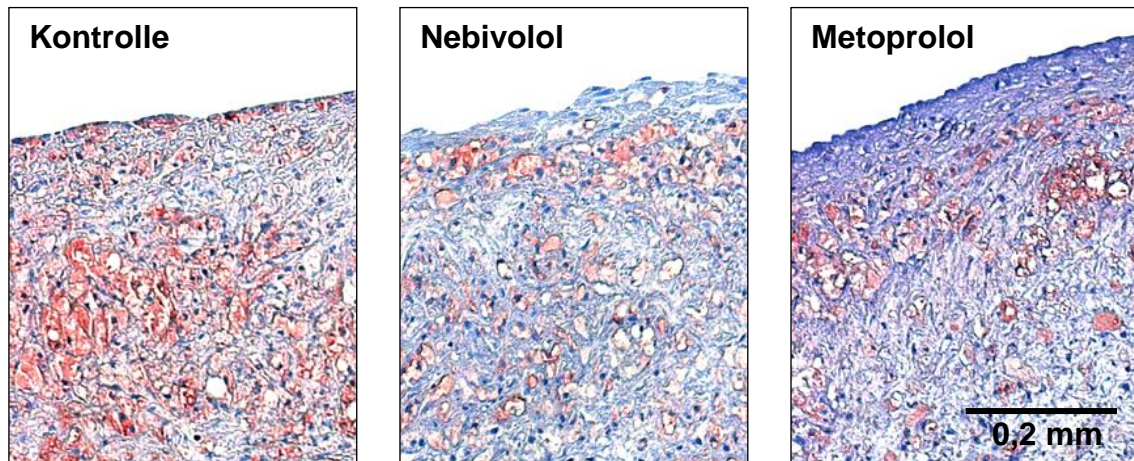
Das Intima-Media-Verhältnis wurde an 62 EvG-gefärbten Präparaten morphometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. In der Nebivolol-Gruppe konnte ein signifikant vermindertes Intima-Media-Verhältnis im Vergleich zur Kontroll-Gruppe im Mittel aller Tiere ( $n=62$ ;  $p=0,0144$ ) und in den Segmenten AoBo III ( $n=15$ ;  $p=0,0276$ ) und AoBo IV ( $n=15$ ;  $p=0,0363$ ) nachgewiesen werden. Weitere signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt.

Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen der Nebivolol- und Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden ( $n=62$ ;  $p=0,0144$ ). In den einzelnen Segmenten lag das Intima-Media-Verhältnis in der Kontroll-Gruppe bei  $2,0 \pm 0,2$  im AoBo III und  $2,4 \pm 0,2$  im AoBo IV. Gegenüber der Nebivolol-Gruppe war es im AoBo III mit  $1,2 \pm 0,04$  ( $n=15$ ;  $p=0,0276$ ) und im AoBo IV mit  $1,5 \pm 0,2$  ( $n=15$ ;  $p=0,0363$ ) signifikant erhöht. Ein signifikanter Unterschied zur Metoprolol-Gruppe war nicht nachweisbar, das Intima-Media-Verhältnis lag bei den mit Metoprolol behandelten Tieren bei  $1,5 \pm 0,2$  im AoBo III und  $1,5 \pm 0,3$  im AoBo IV. In den beiden Segmenten AoBo I und AoBo II konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (**Abb. 28, Tab. 11** im Anhang).

### 3.9.2 Plaquebestandteile

#### 3.9.2.1 Makrophagen

Die Fläche der Makrophagen lag im Mittel aller Aortenbogen-Segmente in der Kontroll-Gruppe bei  $1,9 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ , in der Metoprolol-Gruppe bei  $1,6 \pm 0,2 \text{ mm}^2$  und war gegenüber der Nebivolol-Gruppe ( $1,2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ ) signifikant erhöht ( $n=61$ ;  $p=0,0034$ ) (**Abb. 29, Abb. 30, Tab. 12** im Anhang).

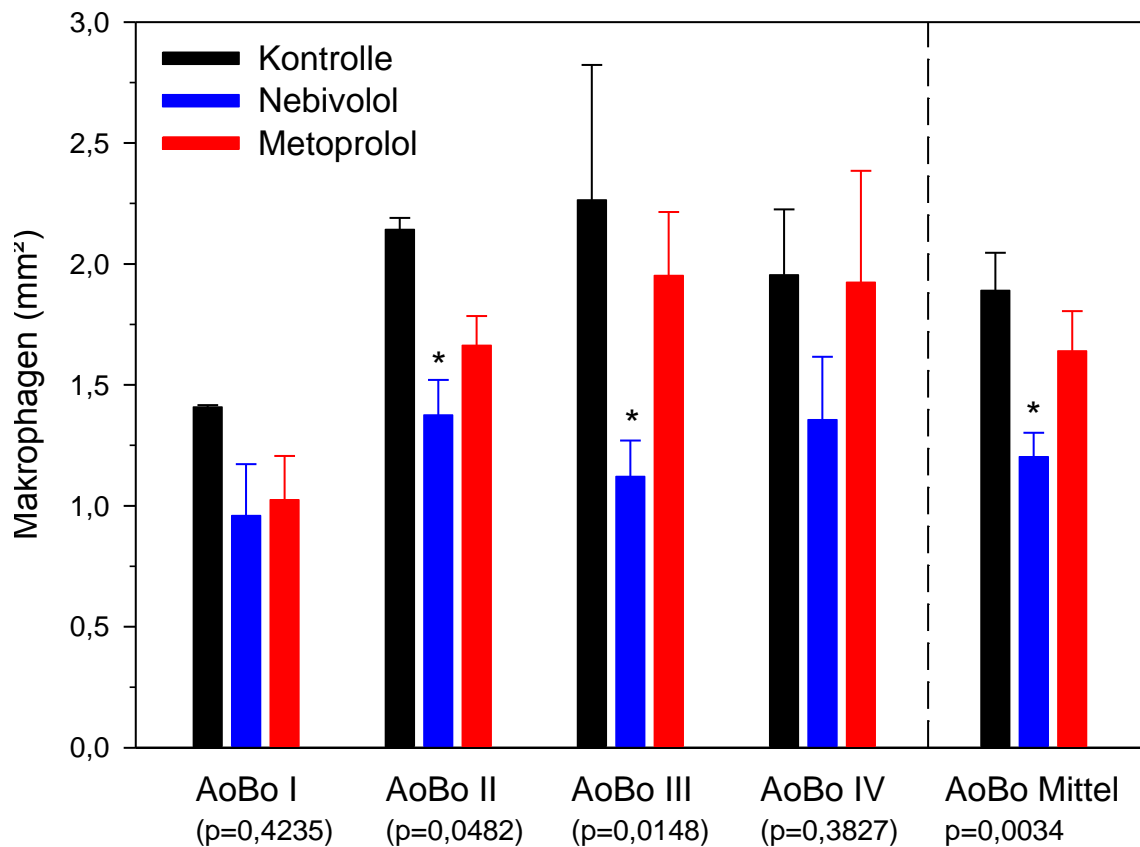


**Abb. 29: RAM-11 Färbung der Makrophagen in den Segmenten des Aortenbogens.**

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt aus der Plaque.

Im Segment II des Aortenbogens betrug die Fläche der Makrophagen in der Kontroll-Gruppe  $2,1 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ , in der Nebivolol-Gruppe  $1,4 \pm 0,1 \text{ mm}^2$  und in der Metoprolol-Gruppe  $1,7 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ . Signifikant vermindert war die Fläche in der Nebivolol- gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $n=14$ ;  $p=0,0482$ ). Auch in Segment III des Aortenbogens ließ sich bei den Tieren der Nebivolol-Gruppe eine signifikant verminderte Fläche der Makrophagen ( $1,1 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ ) im Vergleich zur Kontroll- ( $2,3 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ ) und Metoprolol-Gruppe ( $2,0 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ ) nachweisen ( $n=15$ ;  $p=0,0148$ ) (**Abb. 30**). In den Segmenten AoBo I und AoBo IV konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (**Tab. 12** im Anhang).





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

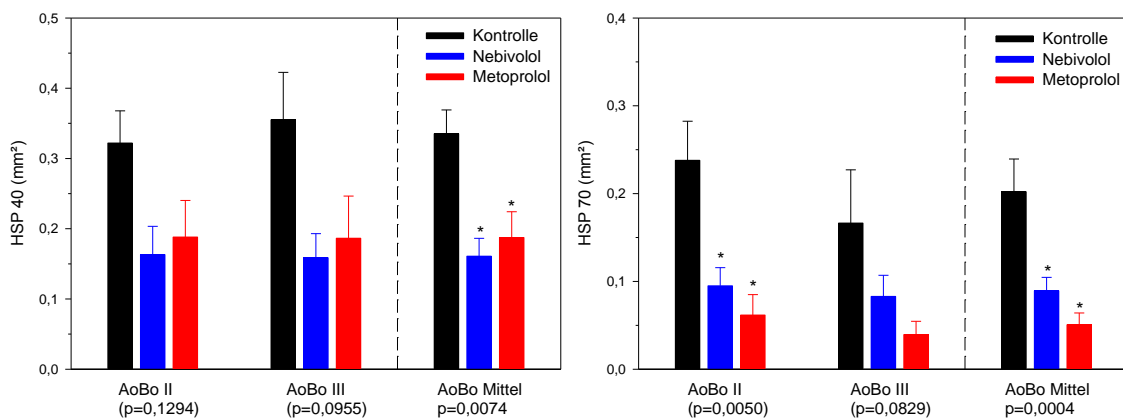
Die Fläche der Makrophagen wurde an 61 RAM 11-gefärbten Präparaten mittels digitaler Auswertung bestimmt. Der prozentuale Anteil der Makrophagen wurde dabei in Bezug zur Plaquefläche gesetzt und daraus die Fläche der Makrophagen berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In der Nebivolol-Gruppe konnte eine signifikant kleinere Fläche der Makrophagen im Vergleich zur Metoprolol- und Kontroll-Gruppe im Mittel aller Segmente ( $n=61$ ;  $p=0,0034$ ) und im Segment AoBo III ( $n=15$ ;  $p=0,0148$ ) nachgewiesen werden. In Segment AoBo II wurde eine signifikant kleinere Fläche der Nebivolol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ( $n=14$ ;  $p=0,0482$ ) festgestellt. Weitere signifikante Unterschiede waren nicht nachweisbar.

### 3.9.2.2 Hitze-Schock-Proteine (HSP)

Die in der **HSP 40**-Färbung positive Fläche betrug im Mittel beider Segmente AoBo II und AoBo III in der Kontroll-Gruppe  $0,34 \pm 0,03 \text{ mm}^2$  und lag signifikant über der Fläche von HSP 40 in der Nebivolol- ( $0,16 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ ) und Metoprolol-Gruppe ( $0,19 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ ) ( $n=28$ ;  $p=0,0074$ ) (**Abb. 32, Abb. 31, Tab. 13** im Anhang).

In der Kontroll-Gruppe betrug die in der **HSP 70**-Färbung positive Fläche im Mittel beider Segmente  $0,20 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ , in der Nebivolol-Gruppe  $0,09 \pm 0,02 \text{ mm}^2$  und in der Metoprolol-Gruppe  $0,05 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ . Die Tiere der medikamentös behandelten Gruppen zeigten eine signifikant kleinere Fläche im Mittel beider Segmente ( $n=29$ ;  $p=0,0004$ ). Dieser signifikante Unterschied war auch in Segment AoBo II ( $n=15$ ;  $p=0,0050$ ) nachweisbar (**Abb. 32, Abb. 31, Tab. 13** im Anhang).

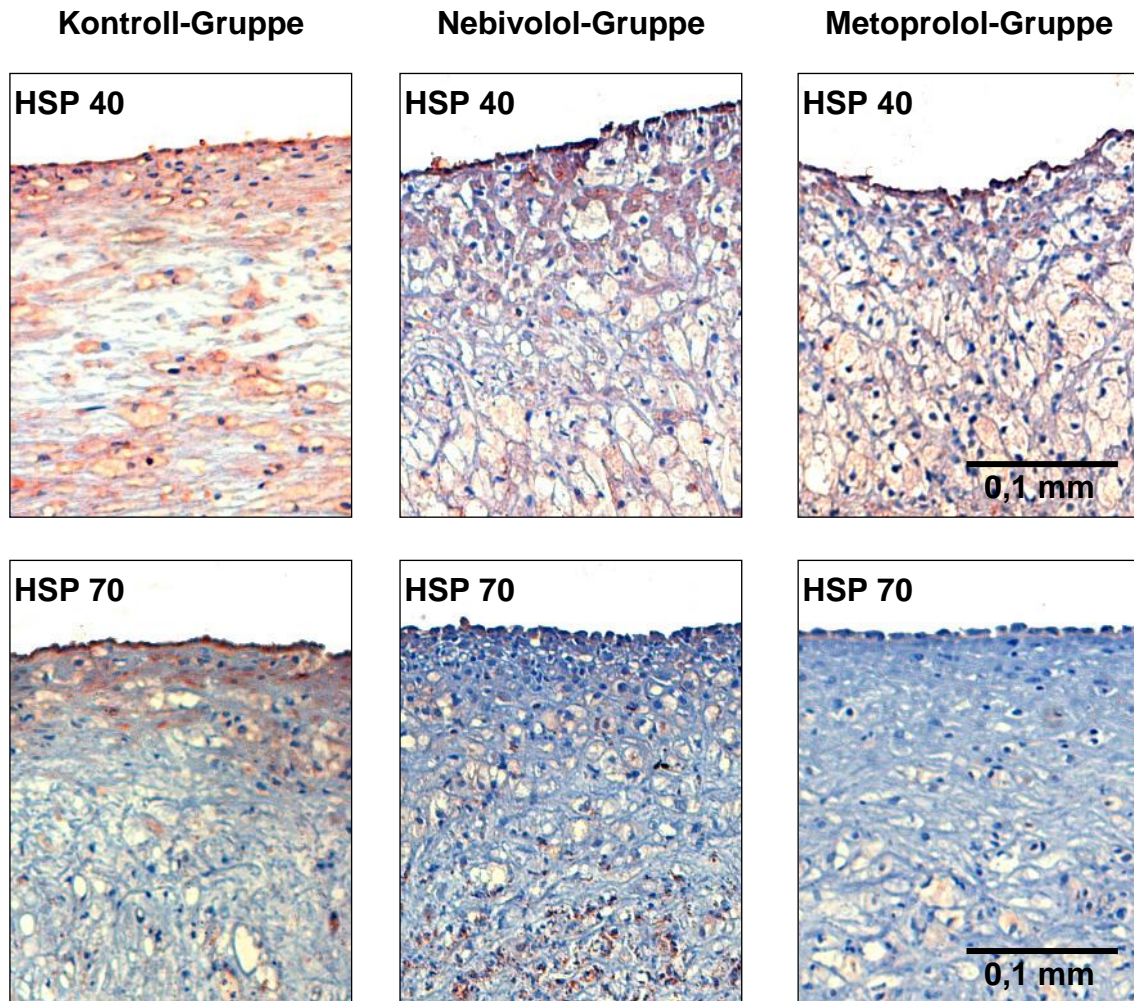


**Abb. 31: Fläche der Hitze-Schock-Proteine 40 und 70 in den Segmenten des Aortenbogens (AoBo II-III) und im Mittel der Präparate (AoBo Mittel).**

An immunhistochemischen Färbungen wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Plaquebestandteile mittels digitaler Auswertung bestimmt. Dieser wurde in Bezug zur Plaquefläche gesetzt. Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe konnte im Mittel aller Segmente eine signifikant kleinere Fläche an HSP 40 ( $n=28$ ;  $p=0,0074$ ) und HSP 70 ( $n=29$ ;  $p=0,0004$ ) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. In der HSP-70-Färbung zeigte sich dieser signifikante Unterschied bereits im Segment AoBo II ( $n=15$ ;  $p=0,0050$ ).

Die in der **HSP 60**-Färbung positive Fläche war in der Nebivolol- ( $0,38 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ ) und Metoprolol-Gruppe ( $0,31 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ ) gegenüber der Kontroll-Gruppe verringert ( $0,56 \pm 0,13 \text{ mm}^2$ ) (**Tab. 13** im Anhang). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten jedoch nicht nachgewiesen werden ( $p=0,0916$ ).



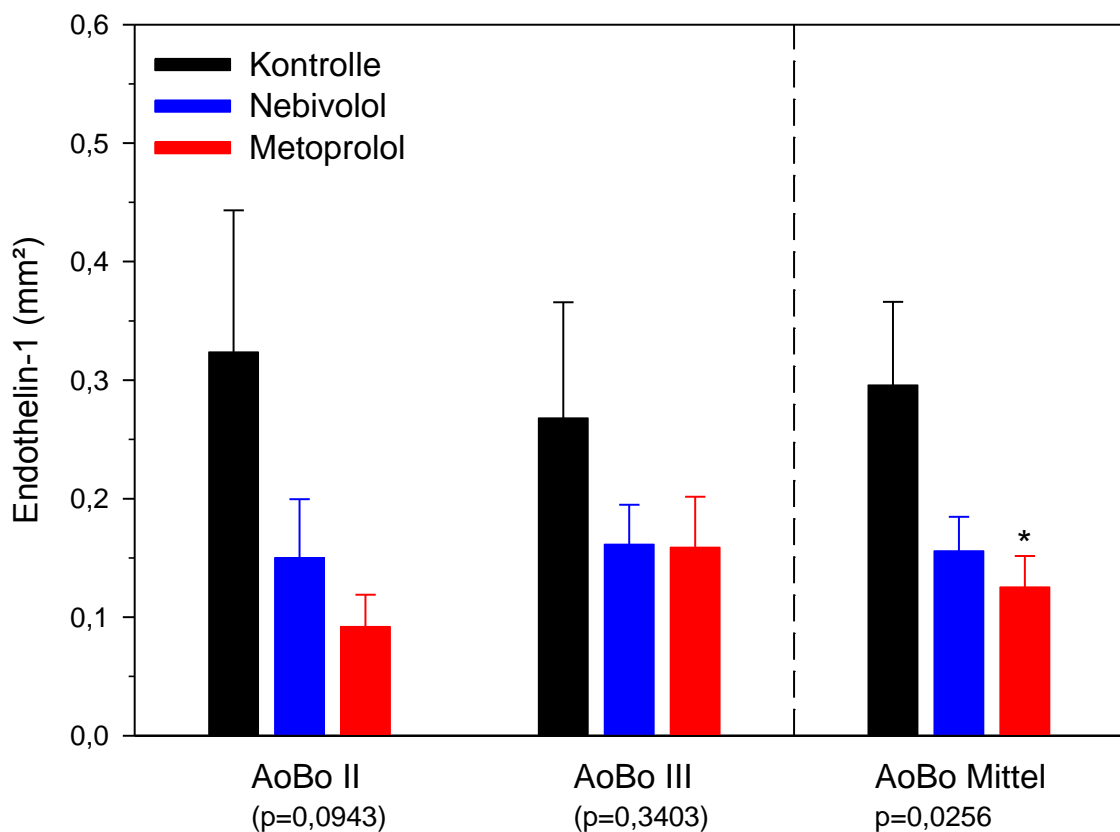
**Abb. 32: HSP 40- und HSP 70-Färbung in den Segmenten des Aortenbogens.**

Gezeigt sind jeweils repräsentative Ausschnitte aus den Plaques.

### 3.9.2.3 Glatte Muskelzellen, Endothelin-1, NFκB, Lipide

Die Fläche der **glatten Muskelzellen** lag in der Kontroll-Gruppe bei  $0,54 \pm 0,18 \text{ mm}^2$  (**Abb. 34, Tab. 13** im Anhang). Eine geringere Akkumulation zeigte sich in der Nebivolol- ( $0,39 \pm 0,08 \text{ mm}^2$ ) und Metoprolol-Gruppe ( $0,45 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden jedoch nicht beobachtet ( $p=0,5824$ ).

Die Metoprolol-Gruppe zeigte im Mittel der beiden Segmente AoBo II und AoBo III eine signifikant kleinere **Endothelin-1-positive Fläche** ( $0,13 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ ) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ( $0,30 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ ) ( $n=32$ ;  $p=0,0256$ ). Ein signifikanter Unterschied zur Nebivolol-Gruppe ( $0,16 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ ) war nicht erkennbar (**Abb. 33, Abb. 34, Tab. 13** im Anhang).



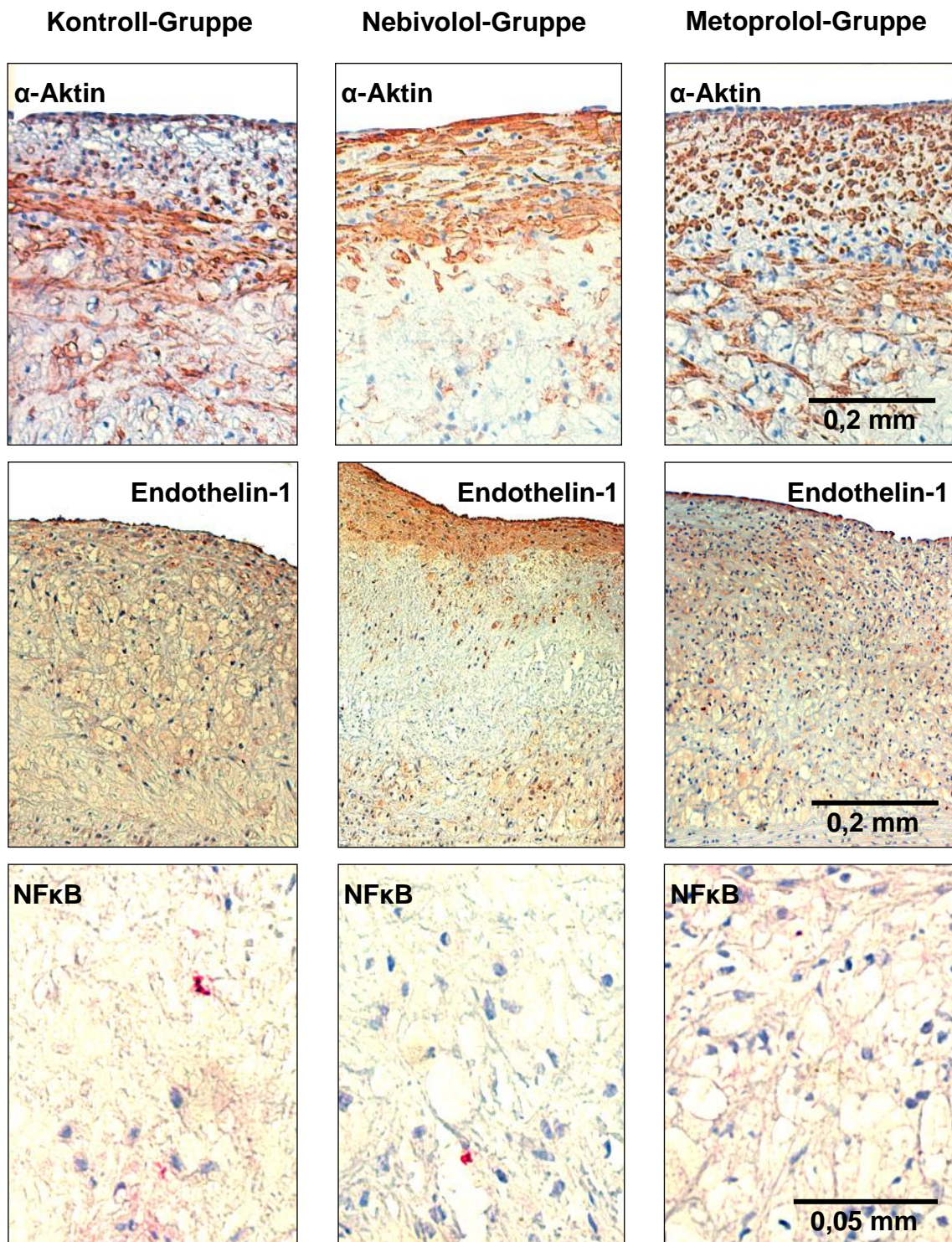
**Abb. 33: Endothelin-1-positive Fläche in Segmenten des Aortenbogens.**

Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Metoprolol-Gruppe zeigte im Mittel aller Segmente eine signifikant kleinere Endothelin-1-positive Fläche im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ( $n=32$ ;  $p=0,0256$ ).

Die Tiere der Kontroll-Gruppe zeigten im Segment AoBo I des Aortenbogens eine in der **Lipid**-Färbung positive Fläche von  $0,7 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ , geringer war diese bei den Tieren der Nebivolol- ( $0,4 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ ) und Metoprolol-Gruppe ( $0,5 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ) (**Tab. 13** im Anhang). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch nicht nachweisbar ( $p=0,5105$ ).

Der Anteil an **NFκB-positiven Zellen** lag im Mittel in der Kontroll-Gruppe bei  $4,2 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-4} \%$ , in der Nebivolol-Gruppe bei  $5,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-4} \%$  und in der Metoprolol-Gruppe bei  $3,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-4} \%$  (**Abb. 34, Tab. 13** im Anhang). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen wurde nicht festgestellt ( $p=0,2420$ ).





**Abb. 34:  $\alpha$ -Aktin-, Endothelin-1- und NF $\kappa$ B-Färbung in den Segmenten des Aortenbogens.**  
Gezeigt sind jeweils repräsentative Ausschnitte aus den Plaques.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Metoprolol auf inflammatorische Prozesse im Kaninchenmodell der Atherosklerose untersucht.

### 4.1 Versuchsverlauf

Bei der Futteraufnahme, der Körpergewichtsentwicklung und dem Verhalten der Tiere waren keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen erkennbar. Die Futteraufnahme nahm im Versuchsverlauf in allen Gruppen ab. Aufgrund der schlechten Verträglichkeit des 1%igen Cholesterinfutters erfolgte daher in Woche 8 die Futterumstellung. Die Cholesterindosis im Futter wurde von 1 % auf 0,5 % reduziert und die Medikamentendosis verdoppelt, um eine ausreichende enterale Resorption der  $\beta$ -Blocker zu gewährleisten.

Die aufgenommene Medikamentendosis lag in der Nebivolol-Gruppe im Bereich von ca. 10-35 mg/d und kg KG. Dies ist zwar vergleichbar mit einer anderen tierexperimentellen Studie an Kaninchen<sup>88</sup>, liegt aber über der beim Menschen üblichen therapeutischen Dosierung von 5 mg/d. Die aufgenommene Medikamentendosis in der Metoprolol-Gruppe lag zwischen 20-60 mg/d und kg KG. Die therapeutische Dosierung beim Menschen liegt zwischen 50-100 mg/d. Nebivolol und Metoprolol reduzierten die Herzfrequenz der NZW-Kaninchen in gleichem Ausmaß. Die signifikant erniedrigte Herzfrequenz bei den mit  $\beta$ -Blockern behandelten Tieren lässt daher eine ausreichende enterale Resorption und eine im therapeutischen Bereich liegende Plasmakonzentration von Nebivolol bzw. Metoprolol vermuten.

Auch die Cholesterinaufnahme nahm im Versuchsverlauf in allen drei Gruppen ab. Einen wesentlichen Einfluss auf die Gefäßfunktion und die Entstehung atherosklerotischer Läsionen hatte in einer Studie von Sun et al.<sup>89</sup> weniger die 0,5- oder 1%ige Dosierung des Cholesterins im Futter, sondern eher die unterschiedliche Dauer der Cholesterinexposition. In dieser Studie konnte während 10- bzw. 14-wöchiger Fütterung von 0,5- und 1%igem Cholesterinfutter bei 17 NZW-Kaninchen ebenfalls eine verminderte Futteraufnahme aufgrund einer Verschlechterung des Allgemeinzustands beobachtet werden.

#### 4.1.1 Hypercholesterinämie und Hyperlipoproteinämie

Die Fütterung einer cholesterinreichen Diät führt bei NZW-Kaninchen schon nach wenigen Tagen zur Entwicklung einer Hypercholesterinämie und Hyperlipoproteinämie.<sup>82,89,90</sup>

Auch in der vorliegenden Studie stieg die Cholesterin-Konzentration im Plasma von initial  $63,9 \pm 3,7$  mg/dl innerhalb der ersten 2 Wochen der Cholesterinfütterung auf maximale Werte von durchschnittlich  $2710,2 \pm 183,1$  mg/dl an. Ein ähnlich starker Anstieg der Cholesterin-Konzentrationen im Plasma konnte in mehreren Studien an NZW-Kaninchen nach Fütterung einer cholesterinreichen Diät beobachtet werden.<sup>89,90</sup> Die Behandlung mit den  $\beta$ -Blockern Nebivolol und Metoprolol hatte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe keinen Einfluss auf die AUC der Gesamt-Cholesterin-Konzentration. Vergleichbar der Studie von Sun et al.<sup>89</sup> hatte auch die Futterumstellung keinen wesentlichen Einfluss auf die Gesamt-Cholesterin-Konzentration im Plasma.

Bei der Entwicklung der Triglyzerid- und Lipoprotein-Konzentrationen war ein Trend zu einem protektiven Einfluss der  $\beta$ -Blocker erkennbar. Die Triglyzerid-Konzentration im Plasma lag vor Fütterung der Cholesterindiät bei durchschnittlich ca. 90 mg/dl und stieg in der Kontroll-Gruppe bis Versuchsende auf das 4fache an, in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe lediglich auf das 2fache. Bei der Entwicklung der Lipoprotein-Konzentrationen waren in Woche 12 tendenziell niedrigere LDL-Konzentrationen und höhere HDL-Konzentrationen in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe erkennbar.

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der Studie von Östlund-Lindquist et al.<sup>91</sup> Die Autoren untersuchten den Einfluss von Metoprolol (0,35 mg/kg/h) auf die Atherogenese an 44 Kaninchen, die ein 0,25%iges Cholesterinfutter mit einem Zusatz von 3 % Kokosnussöl über eine Versuchsdauer von 21 Wochen erhielten. Metoprolol hatte in dieser Studie keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamt-Cholesterin-, Triglyzerid- und Lipoprotein-Konzentrationen im Plasma. In einer weiteren Studie von Mollnau et al.<sup>88</sup> wurden zehn hyperlipidämische



WHHL-Kaninchen mit Nebivolol in der Dosierung von 10 mg/kg/d über eine Versuchsdauer von 8 Wochen behandelt. In dieser Untersuchung zeigte auch Nebivolol keinen Einfluss auf die Gesamt-Cholesterin-, Triglyzerid-, HDL- und LDL-Konzentrationen. Klinische Studien zur Auswirkung einer Nebivolol-Therapie bei hypertensiven Patienten deuten auf eine lipidneutrale Wirkung hin, mit tendenziell positiven Effekten auf die HDL-Konzentration.<sup>92</sup>

#### 4.1.2 Anämie und Leukozytose

Im Versuchsverlauf entwickelten Tiere aller Versuchsgruppen eine Anämie. Die Hämoglobin-Konzentration fiel im Mittel von initial  $12,0 \pm 0,3$  g/dl auf  $9,4 \pm 0,4$  g/dl in Woche 12 ab, deutlich unter den vom Züchter angegebenen Referenzwert von  $14,7 \pm 1,3$  g/dl (Charles River, Kißlegg). Das MCV lag bei den Versuchstieren relativ konstant bei durchschnittlich ca. 64 fl (Referenzwert:  $62,7 \pm 0,3$  fl). Das MCH stieg in allen Versuchsgruppen leicht an, von im Mittel ca. 21,2 pg auf ca. 26,1 pg in der Kontroll-Gruppe und ca. 23,5 pg in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe und lag somit bei Versuchsende leicht über dem Referenzwert von  $21,3 \pm 0,1$  pg. Die Ursache für die Entwicklung dieser normozytären, hyperchromen Anämie ist am ehesten im Zusammenhang mit der cholesterinreichen Diät zu sehen. So konnten auch Feldman et al.<sup>93</sup> nach Fütterung einer 0,25%igen Cholesterindiät über 6-8 Wochen an 30 NZW-Kaninchen eine cholesterininduzierte Anämie beobachten.

Die Zahl der Leukozyten stieg in der vorliegenden Studie in allen Gruppen unmittelbar nach Fütterung der 1,0%igen Cholesterindiät bis Woche 8 vergleichbar an. Nach der Futterumstellung zeigte nur die Kontroll-Gruppe einen starken Anstieg von  $7280 \pm 670 \mu\text{l}^{-1}$  auf  $26607 \pm 8972 \mu\text{l}^{-1}$  (Referenzwert:  $6340 \pm 240 \mu\text{l}^{-1}$ ). Die Behandlung mit Nebivolol senkte die AUC der Leukozytenzahl gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant. Auch in der Metoprolol-Gruppe war eine Tendenz zu niedrigeren Leukozytenzahlen erkennbar. Feldman et al.<sup>93</sup> untersuchten in ihrer Studie auch den Einfluss einer cholesterinreichen Diät auf die Zahl der Leukozyten. Sie fütterten 20 NZW-Kaninchen mit einer 0,25%igen- und 15 NZW-Kaninchen mit einer 0,1%igen Cholesterindiät über jeweils 4-10 Monate. Schon kurz nach

Versuchsbeginn kam es in beiden Gruppen zu einer cholesterininduzierten Leukozytose und nach ca. 22 Wochen bei Kaninchen mit ikterischen Veränderung zu einem noch deutlicheren Anstieg der Leukozytenzahl. Damit kann die in der vorliegenden Studie aufgetretene Leukozytose in der Kontroll-Gruppe zu Versuchsende mit dem gleichzeitig starken Anstieg der Gesamt-Bilirubin-Konzentration erklärt werden.

### **4.1.3 Leberschädigung**

Alle vorzeitig aus dem Versuch genommenen Tiere zeigten in den Skleren kurz vor ihrem Tod deutliche ikterische Veränderungen. Auch bei den nicht ausgeschiedenen Versuchstieren kam es vereinzelt zum Ikterus. Die Ursache ist ein Anstieg der Gesamt-Bilirubin-Konzentration von initial  $<0,1$  mg/dl auf ca. 3,7 mg/dl in der Kontroll-Gruppe und durchschnittlich ca. 1,1 mg/dl in den mit  $\beta$ -Blockern behandelten Gruppen (Referenzwert:  $0,02 \pm 0,0$  mg/dl). Die Behandlung mit Nebivolol und Metoprolol zeigte vor allem bei Versuchsende eine Tendenz zu niedrigeren Gesamt-Bilirubin-Konzentrationen, jedoch war dieser Unterschied in der AUC der Gesamt-Bilirubin-Konzentration nicht signifikant ( $p=0,0800$ ). Dass es sich bei ikterischen Veränderungen um eine bei Cholesterinfütterung häufige Nebenwirkungen handelt, zeigt auch die Untersuchung von Sun et al.<sup>89</sup> Zwei von 17 Kaninchen entwickelten am Ende einer 10-wöchigen Verabreichung von 1%igem Cholesterinfutter einen Ikterus.

Ursächlich für diese erhöhten Gesamt-Bilirubin-Konzentrationen ist vermutlich eine durch das Cholesterinfutter induzierte Leberschädigung. So wurde bei allen Tieren in Woche 8 ein Anstieg der Transaminasen auf das 2-3fache des Referenzwerts beobachtet (Referenzwerte: GOT  $15,9 \pm 0,8$  U/l und GPT  $25,0 \pm 1,6$  U/l). Nach Reduktion der Cholesterindosis im Futter war diese Entwicklung zwar wieder rückläufig, allerdings muss vor allem in der Kontroll-Gruppe aufgrund der bis Versuchsende anhaltend ansteigenden Gesamt-Bilirubin-Konzentration von einer persistierenden Schädigung der Leber ausgegangen werden. Auch Kolodgie et al.<sup>94</sup> beobachteten bei 50 NZW-Kaninchen, die über 32 Wochen ein 0,15-2%iges Cholesterinfutter gelöst in 6 % Erdnussöl erhielten, ab der zwölften Untersuchungswoche einen

Anstieg der Leberenzyme auf das Doppelte. Aufgrund der Leberschädigung und der eingeschränkten Futtermenge starben bei dieser Untersuchung in den letzten acht Wochen drei Tiere aus der Gruppe mit 0,25%igem Cholesterinzusatz frühzeitig. Außerdem beobachteten die Autoren ähnlich der vorliegenden Studie eine Gewichts- und Größenzunahme der Leber.

So war bei allen Tieren der vorliegenden Untersuchung das Gewicht der Leber gegenüber dem Normalwert von  $104 \pm 14$  g (mw  $\pm$  sd, Charles River, Kißlegg) um ca. 52 - 67 g erhöht. Die Ursache dieser Gewichtserhöhung ist vermutlich eine cholesterininduzierte Verfettung der Leber. Bei einer vergleichbaren Cholesterin-Belastung beobachteten Bocan et al.<sup>82</sup> bei 8 NZW-Kaninchen einen Anstieg des relativen Cholesteringehalts der Leber auf mehr als das 3fache.

#### **4.1.4 Überlebenszeit**

In der vorliegenden Studie schieden fünf Tiere aus der Kontroll-Gruppe und drei Tiere aus der Metoprolol-Gruppe frühzeitig aus dem Versuch aus. Alle Tiere der Nebivolol-Gruppe erreichten das geplante Versuchsende. Die Behandlung mit Nebivolol verlängerte das Überleben gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant.

Für  $\beta$ -Blocker konnte in großen klinischen Studien eine signifikante Reduktion der kardiovaskulären und der Gesamt-Mortalität nachgewiesen werden.<sup>47,48,49</sup> Ursächlich für das verlängerte Überleben in der Nebivolol-Gruppe könnte eine verminderte Schädigung der Leber sein. Tendenziell war das Lebergewicht in der Nebivolol-Gruppe am geringsten. Allerdings zeigten die Tiere der Metoprolol-Gruppe einen vergleichbaren Verlauf der Konzentrationen des Gesamt-Bilirubins und der Transaminasen. Obwohl dies in der Metoprolol-Gruppe auf ein ähnliches Ausmaß der Leberschädigung schließen lässt, schieden drei Tiere frühzeitig aus dem Versuch aus. Auch wenn der Unterschied in der Überlebenszeit der Metoprolol-Gruppe zur Kontroll-Gruppe nicht signifikant war ( $p=0,4668$ ), wurde die Signifikanzgrenze zur Nebivolol-Gruppe nur knapp verfehlt ( $p=0,0637$ ). Dies legt den Schluss nahe, dass Nebivolol im Vergleich zu Metoprolol einen zusätzlichen günstigen Einfluss auf das Überleben der Kaninchen gehabt haben könnte.

## 4.2 Einfluss von Nebivolol und Metoprolol auf die Atherogenese

Die Beeinflussung von oxidativem Stress, entzündlichen Prozessen oder der verminderten NO-Bioverfügbarkeit sind mögliche Therapieoptionen in der Prävention der Atherosklerose. ACE-(Angiotensin-Converting-Enzyme)-Inhibitoren, Statine, Kalzium-Kanal-Blocker oder auch  $\beta$ -Blocker stehen dabei im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.<sup>16</sup>

Eine Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren führt unter anderem zur endothelialen Dysfunktion und begünstigt die Entstehung der Atherosklerose.<sup>50,51,52</sup>  $\beta$ -Blocker antagonisieren die Wirkungen des sympathischen Nervensystems an den  $\beta$ -Adrenorezeptoren. Nebivolol hat im Gegensatz zu dem klassischen  $\beta_1$ -Blocker Metoprolol zudem NO-vermittelte vasodilatierenden Eigenschaften und wirkt antioxidativ.<sup>61,62</sup>

### 4.2.1 Endotheliale Dysfunktion

Die Endotheliale Dysfunktion ist der erste Schritt in der Atherogenese. Eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit führt zu einer verringerten Vasodilatation auf spezifische Stimuli sowie zu proinflammatorischen und prothrombotischen Reaktionen am Endothel.<sup>8,9,10,15</sup>

Bei der experimentell durchgeführten endothelabhängigen Vasodilatation auf Acetylcholin konnte in der vorliegenden Studie in allen mit Cholesterin behandelten Gruppen im Vergleich zu den unbehandelten, nicht mit Cholesterin gefütterten Tieren eine verringerte maximale Vasodilatation nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine verringerte Produktion oder Aktivität von NO am Endothel schließen. Allerdings konnte in der kumulativen Dosis-Wirkungskurve für die halbmaximale Relaxation  $EC_{50}$  kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dass eine Hypercholesterinämie zu einer verminderten Gefäßrelaxation wie in der vorliegenden Studie führt, konnte bereits in mehreren tierexperimentellen und klinischen Studien bestätigt werden.<sup>95,96,89</sup> Laight et al.<sup>96</sup> konnten nach 8-10-wöchiger Fütterung von 1%igem Cholesterinfutter an Karotiden von NZW-Kaninchen ebenfalls eine

signifikant verminderte endothelabhängige Vasorelaxation auf Acetylcholin und eine veränderte Vasokonstriktion im Vergleich zu unbehandelten Kaninchen beobachten. Sun et al.<sup>89</sup> stellten an Aortenringen nach Cholesterinexposition ebenfalls eine verminderte Gefäßrelaxation auf  $10^{-7}$  M Acetylcholin fest. Allerdings beobachteten sie in ihrer Studie keinen signifikanten Unterschied in der maximalen Gefäßkontraktion und -dilatation. In klinischen Studien konnten Creager et al.<sup>95</sup> bereits 1990 an Patienten mit Hypercholesterinämie eine verminderte Vasodilatation der Blutgefäße des Unterarms nachweisen.

Die Behandlung mit Nebivolol oder Metoprolol führte in der vorliegenden Studie im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu keiner signifikant verbesserten endothelabhängigen Gefäßrelaxation auf Acetylcholin. Dies würde ein vergleichbares Ausmaß der endothelialen Schädigung und der NO-Bioverfügbarkeit in allen mit Cholesterin behandelten Gruppen bedeuten. Allerdings steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu Studien, die für Nebivolol eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit und eine verbesserte Gefäßrelaxation nachweisen konnten.<sup>63,64</sup> In einer ähnlich angelegten Studie konnten Mollnau et al.<sup>88</sup> an zehn mit Nebivolol behandelten hyperlipidämischen WHHL-Kaninchen eine signifikant verbesserte endothelabhängige Relaxation auf Acetylcholin an Aortenringen in der  $EC_{50}$  und der maximalen Relaxation nachweisen. Zahlreiche andere experimentelle Untersuchungen bestätigten eine verbesserte Vasodilatation und damit eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit durch Nebivolol.<sup>63,97</sup> Diese präklinischen Daten stehen im Einklang mit mehreren klinischen Studien, die ebenfalls eine durch Nebivolol induzierte erhöhte NO-Bioverfügbarkeit zeigen konnten, entweder durch erhöhte Synthese oder verminderte Inaktivierung von NO.<sup>64</sup> Die Therapie mit Nebivolol machte bei Patienten mit Hypertonie die Endotheliale Dysfunktion rückgängig.<sup>72</sup> Die Ursache für die in der vorliegenden Studie beobachtete, nicht verbesserte Gefäßrelaxation auf Acetylcholin nach Behandlung mit Nebivolol bleibt unklar.

Die Cholesterinexposition führte in der vorliegenden Studie außerdem zu einer signifikant verminderten Kontraktion auf Einzeldosen von 3  $\mu$ M Noradrenalin in der Kontroll- und Metoprolol-Gruppe im Vergleich zu den unbehandelten Tieren.

In der Nebivolol-Gruppe war eine Tendenz zu einer stärkeren Vasokonstriktion erkennbar. Aufgrund der zusätzlich reduzierten maximalen Gefäßrelaxation auf Nitroprussidnatrium in der Nebivolol-Gruppe lässt sich auch die signifikante Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve erklären. Die Ursachen hierfür bleiben spekulativ, zumal in der Dosis-Wirkungskurve auf Acetylcholin in der  $EC_{50}$  und der maximalen Relaxation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten. Da die Gefäße der mit Nebivolol behandelten Tiere aber tendenziell in allen Kontraktionsversuchen wie die Gefäße der unbehandelten, nicht mit Cholesterin gefütterten Tiere kontrahierten, könnte dies für einen protektiven Einfluss von Nebivolol auf die Gefäßfunktion sprechen. Interessanterweise berichten Oelze et al.<sup>97</sup> in einer Studie an mit Nebivolol behandelten, hypertensiven Ratten über eine drastisch reduzierte Sauerstoffradikal-Produktion nicht nur am Endothel, sondern in der gesamten Gefäßwand. Die Autoren führten dies auf eine Aktivitätsminderung der vaskulären NADPH-Oxidase zurück, die die Reaktion von Sauerstoff und NADPH zu freien Sauerstoffradikalen katalysiert. Zudem beobachteten sie im Herzgewebe der Ratten eine Normalisierung der NADPH-Oxidase-Aktivität sowie eine reduzierte Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten (p22phox, gp91phox, Nox1, p47phox und p67phox). Diese Effekte konnten nach Behandlung mit Metoprolol nicht nachgewiesen werden. Die Inhibierung der vaskulären NADPH-Oxidase durch Nebivolol könnte auch die in der vorliegenden Studie aufgetretene tendenziell stärkere Gefäßkontraktion in der Nebivolol-Gruppe erklären.

#### 4.2.2 Inflammatorische Prozesse

Eine Schädigung des Endothels führt zur Expression von Adhäsionsmolekülen an den Endothelzellen. Der Rezeptor VCAM-1 bindet hauptsächlich Monozyten und T-Lymphozyten.<sup>4</sup> Die Adhäsion und Infiltration dieser inflammatorischen Zellen ist ein erster wichtiger Schritt in der Entstehung der Atherosklerose. Die Expression von VCAM-1 konnte in cholesterininduzierten Läsionen von NZW- und WHHL-Kaninchen noch vor einer Infiltration von Leukozyten in die Gefäßwand nachgewiesen werden.<sup>98,77</sup> Eine experimentelle Inaktivierung des VCAM-1 Rezeptors in hypercholesterinämischen Mäusen reduziert die Progression der Atherosklerose.<sup>99</sup> In der vorliegenden Studie führte die Behandlung mit Nebivolol und Metoprolol zu einer signifikanten Reduktion der VCAM-1-mRNA-Expression in Karotiden der NZW-Kaninchen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

Die Migration der von VCAM-1 gebundenen Monozyten in die Intima wird unter anderem durch das Chemokin MCP-1 vermittelt.<sup>4</sup> MCP-1 wird bereits in frühen atherosklerotischen Läsionen von NZW-Kaninchen und Menschen exprimiert.<sup>100</sup> Die experimentelle Blockade von MCP-1 an Mäusen mit Hypercholesterinämie führt zu einer Reduktion der Atherogenese und zu einer höheren Stabilität der Plaques.<sup>101</sup> In der vorliegenden Studie war die Expression von MCP-1-mRNA in den Karotiden durch die Behandlung mit Nebivolol zwar tendenziell vermindert, ein signifikanter Unterschied zur Kontroll- und Metoprolol-Gruppe wurde jedoch nicht festgestellt.

Auch das Chemokin IL-8 fördert die Adhäsion von Monozyten an das Endothel. Es lässt sich in der Atherosklerose sowohl systemisch als auch lokal in der Plaque nachweisen.<sup>102,103</sup> Eine genetische Inaktivierung des homologen IL-8-Rezeptors am Endothel von Mäusen verringert die Akkumulation von Makrophagen und eine Progression der Atherosklerose.<sup>42</sup> Die Behandlung mit Nebivolol führte in der vorliegenden Studie im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu einer signifikanten Reduktion der Serum-Konzentration von IL-8 ( $p < 0,05$ ). Auch die Behandlung mit Metoprolol zeigte eine Tendenz zu niedrigeren IL-8-Serum-Konzentrationen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

In der Gefäßintima verursachen die eingewanderten Monozyten lokale inflammatorische Reaktionen. Zytokine und Wachstumsfaktoren führen zu einer Differenzierung der Monozyten in Makrophagen.<sup>2,4</sup> Makrophagen produzieren wiederum inflammatorische Zytokine, Chemokine, Proteasen und Radikale, die die Stabilität der Plaque vermindern.<sup>19</sup> Sie tragen dadurch wesentlich zur Progression der Atherosklerose bei.<sup>3</sup>

Die verminderten Genexpressionen von VCAM-1 und MCP-1 in den Karotiden sowie die verminderten IL-8 Serum-Konzentrationen in den medikamentös behandelten Gruppen lassen eine geringere Akkumulation von Makrophagen in der Intima des Aortenbogens vermuten. Dies ließ sich in der vorliegenden Studie in der RAM-11-Färbung bestätigen. Die Behandlung mit Nebivolol zeigte eine signifikante Reduktion der Makrophagen im Aortenbogen ( $p=0,0034$ ). Nebivolol reduzierte die Makrophagen in der Plaque um 37 % im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und gegenüber den mit Metoprolol behandelten Tieren um 25 %. In der Metoprolol-Gruppe war nur eine tendenziell geringere Akkumulation von Makrophagen in der Plaque erkennbar.

Hitze-Schock-Proteine werden in atherosklerotischen Läsionen von Kaninchen und Menschen stark exprimiert.<sup>21</sup> Die Familien HSP 40, HSP 60 und HSP 70 sind an der Atherosklerose und an lokalen inflammatorischen Reaktionen in der Plaque beteiligt.<sup>20,21</sup> Das Ausmaß der HSP-Expression korreliert positiv mit der Schwere der Atherosklerose.<sup>104</sup> Die Expression von HSP 40 und HSP 70 war in den mit  $\beta$ -Blockern behandelten Gruppen gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert. Berberian et al.<sup>105</sup> konnten HSP 70 in atherosklerotischen Plaques im Bereich von Makrophagen nachweisen. Die geringere Akkumulation von Makrophagen könnte daher auch zu einer Reduktion von HSP 70 in den Plaques beigetragen haben. HSP 40 wird im Atherom vor allem in kollagenreichen Regionen stark exprimiert und ist daher ein möglicher Indikator für die Stabilität der Plaque.<sup>25</sup> Dies deutet auf einen günstigen Einfluss von Nebivolol und Metoprolol auf die Stabilität der Plaque hin. Der Grad der Expression von HSP 60 korreliert positiv mit der Schwere der Atherosklerose.<sup>23</sup> HSP 60 wird in atherosklerotischen Läsionen überwiegend am Endothel, an



mononukleären Zellen und an glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert.<sup>21</sup> Allerdings konnte in der vorliegenden Studie lediglich eine Tendenz zu einer verminderten HSP 60-Expression in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe beobachtet werden.

Aktivierte Immunzellen in den Plaques produzieren inflammatorische Zytokine. Dazu zählen unter anderem Interferon- $\gamma$ , Interleukin-1 und der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), die wiederum eine Produktion von Interleukin-6 (IL-6) induzieren. IL-6 stimuliert vor allem in der Leber die Produktion des Akut-Phase-Proteins CRP. Die lokale Aktivierung von Immunzellen führt so auch zu systemisch nachweisbaren entzündlichen Prozessen.<sup>2</sup> Epidemiologische Studien konnten ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufgrund erhöhter CRP-Plasmaspiegel nachweisen.<sup>106</sup>

Die Behandlung mit Nebivolol führte in der Intention-to-treat-Analyse zu einer signifikanten 55%igen Reduktion der CRP-Konzentration im Serum zu Versuchsende gegenüber der Kontroll-Gruppe. Die CRP-Konzentration im Serum lag in der Kontroll-Gruppe im Mittel bei  $54,0 \pm 7,4 \mu\text{g/ml}$ . Dies zeigt einen Vorteil gegenüber der Behandlung mit Metoprolol, die lediglich zu einer um 19 % geringeren CRP-Konzentration im Serum führte. Auch Sun et al.<sup>107</sup> konnten erstmalig in einer tierexperimentellen Studie an 45 Kaninchen die über 16 Wochen mit einer 0,3%igen Cholesterindiät gefüttert wurden und 31 hyperlipidämischen WHHL-Kaninchen erhöhte CRP-Plasmaspiegel im Vergleich zu 62 unbehandelten Kontroll-Tieren nachweisen. Die CRP-Plasmaspiegel korrelierten positiv mit der Schwere der Atherosklerose. Außerdem konnte CRP auch lokal in der Plaque in allen Stadien der Atherogenese nachgewiesen werden. Allerdings kamen die Autoren aufgrund des fehlenden Nachweises von CRP-mRNA in den Plaques zu der Schlussfolgerung, dass CRP überwiegend in der Leber synthetisiert wird. Dies steht im Widerspruch zu mehreren Studien, die eine lokale Produktion von CRP in glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen im Atherom postulieren.<sup>108,109</sup> Im Unterschied zur Studie von Sun et al.<sup>107</sup> konnte auch in der vorliegenden Studie in den Karotiden aller Gruppen CRP-mRNA in der real-time RT-PCR

nachgewiesen werden. Sowohl die Behandlung mit Nebivolol als auch mit Metoprolol führte dabei zu signifikant verminderten CRP-mRNA-Expressionen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

Die pathophysiologische Bedeutung von CRP in der Atherosklerose ist derzeit noch unklar. CRP scheint sowohl ein Marker inflammatorischer Prozesse in der Atherosklerose zu sein, als auch ein proatherogener Faktor in der Plaque.<sup>31,32</sup> Verschiedene in-vitro-Untersuchungen konnten, wie in **Kap. 1.1.4** beschrieben, einen direkten proinflammatorischen Einfluss von exogen zugegebenem CRP auf Endothelzellen, Monozyten-Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen beobachten. Daher könnte eine Therapie durch CRP-Antagonisten sinnvoll sein, um die Progression der Atherosklerose zu vermindern. Bisher stehen jedoch keine CRP-Antagonisten im eigentlichen Sinn zur Verfügung.<sup>76</sup> Hauptsächlich in Studien mit Statinen konnte bisher ein Zusammenhang zwischen der Reduktion von CRP-Plasmaspiegeln und einem verminderten kardiovaskulären Risiko nachgewiesen werden.<sup>110</sup>

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass auch durch die Behandlung mit dem  $\beta$ -Blocker Nebivolol und in geringerem Ausmaß auch durch Metoprolol die CRP-Serum-Konzentrationen und die lokale CRP-Genexpression in den Karotiden vermindert werden konnte. Einerseits könnte dies auf eine allgemeine Reduktion inflammatorischer Prozesse zurückzuführen sein, andererseits aber auch eine direkte antiatherogene Wirkung auf die CRP-bedingte Steigerung der proatherosklerotischen Faktoren VCAM-1, MCP-1, und IL-8 bedeuten. Sauter et al.<sup>76</sup> untersuchten an kultivierten Endothelzellen die Effekte von  $\beta$ -Blockern auf die durch CRP vermittelte Expression von Entzündungsmarkern. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Nebivolol reduzierte die CRP-vermittelte Hochregulation der VCAM-1-, IL-6- und IL-8-mRNA-Expression. Metoprolol hatte auf den CRP-bedingten Expressionsanstieg von VCAM-1 und IL-6 keinen signifikanten Hemmeffekt, lediglich die IL-8-mRNA-Expression war signifikant vermindert.<sup>76</sup> Wolf et al.<sup>77</sup> konnten auch ohne exogene Zugabe von CRP in-vitro an Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen eine signifikant reduzierte Expression von VCAM-1- und MCP-1-mRNA durch

Nebivolol nachweisen. Die Inkubation der Zellen mit Metoprolol hatte im Unterschied zur vorliegenden Studie jedoch keinen Einfluss auf die Expression der VCAM-1- und MCP-1-mRNA. Außerdem beobachteten sie in in-vivo-Untersuchungen an Ratten nach Ballondilatation und Behandlung mit Nebivolol ebenfalls eine verminderte Akkumulation von Makrophagen in der Neointima der Karotiden. Als mögliche Ursache diskutierten die Autoren eine verminderte Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der durch oxidativen Stress aktiviert wird. Nebivolol hat antioxidative Eigenschaften und könnte dadurch zu einer verminderten Aktivierung von NF- $\kappa$ B beigetragen haben. In einer weiteren Studie konnten Wolf et al.<sup>111</sup> an humanen koronararteriellen glatten Muskelzellen nach Inkubation mit Nebivolol für 48 und 52 h eine verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung nachweisen. In der vorliegenden Studie konnten diese Beobachtungen nicht jedoch nicht bestätigt werden. Der Anteil NF- $\kappa$ B positiver Zellen in den atherosklerotischen Plaques war durch Nebivolol nicht vermindert.

Zusammenfassend führte eine Reduktion lokaler und systemischer inflammatorischer Prozesse durch die beiden  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Metoprolol zu einer geringeren Akkumulation von Makrophagen in der Plaque. Nebivolol zeigte tendenzielle, aber auch signifikante Vorteile gegenüber der Behandlung mit Metoprolol. Eine verminderte Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B als mögliche Ursache konnte nicht nachgewiesen werden.

### 4.2.3 Plaqueeentwicklung

In allen Gruppen der vorliegenden Studie kam es durch die Fütterung der cholesterinreichen Diät zur Entwicklung von atherosklerotischen Plaques im Aortenbogen. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Plaqueeentwicklung im Aortenbogen am stärksten ist.<sup>91</sup>

Die Behandlung mit Nebivolol führte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu einer signifikant verminderten Atherogenese im Aortenbogen. Die Plaquefläche und das Intima-Media-Verhältnis waren um ca. 30 % geringer als in der Kontroll-Gruppe. Auch in der Metoprolol-Gruppe war diese Tendenz erkennbar. Die Plaquefläche in der Metoprolol-Gruppe war im Vergleich zur Kontroll-Gruppe um 11 % reduziert, das Intima-Media-Verhältnis um 25 %.

Außerdem wurde durch die  $\beta$ -Blocker die Akkumulation von Lipiden und glatten Gefäßmuskelzellen im Atherom tendenziell vermindert. Nebivolol führte gegenüber Metoprolol vor allem zu einer leicht stärkeren Reduktion der glatten Gefäßmuskelzellen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden jedoch nicht festgestellt.

Eine Reduktion atherosklerotischer Läsionen in der Kaninchen-Aorta durch Metoprolol wurde bereits in mehreren tierexperimentellen Studien beobachtet.<sup>91,112,113</sup> Wolf et al.<sup>77</sup> konnten in-vivo an mit Nebivolol behandelten Ratten nach Ballondilatation der Karotiden ebenfalls eine verminderte Plaqueeinstellung und Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen im Vergleich zu unbehandelten Tieren nachweisen.

Gründe für die Plaquereduktion nach Behandlung mit  $\beta$ -Blockern liegen einerseits an der direkten Blockade der  $\beta$ -Adrenorezeptoren. So führt eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems bei Kaninchen und Affen zu einer beschleunigten Atherogenese, die durch  $\beta$ -Blocker vermindert werden kann.<sup>50,51,52</sup> Als weitere mögliche Ursachen diskutierten Ablad et al.<sup>112</sup> bereits 1988 eine durch  $\beta$ -Blocker induzierte erhöhte Biosynthese von Prostazyklin, eine Modifikation von LDL sowie eine Verbesserung der hämodynamischen Strömungseigenschaften.<sup>112</sup> Andererseits spielen Thrombozyten eine wichtige

Rolle in der Entstehung der Atherosklerose.<sup>114</sup> Allerdings wird der Effekt einer  $\beta$ -Blockade auf Thrombozyten kontrovers diskutiert.<sup>115</sup> Metoprolol reduzierte in therapeutischer Dosierung die Thrombozyten-Akkumulation in der Kaninchen-Aorta, während in einer klinischen Studie kein Effekt auf die Thrombozyten-Aggregation nachgewiesen werden konnte.<sup>116,117</sup> Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit Nebivolol in zwei klinischen Studien an hypertensiven Patienten zu einer Reduktion der Thrombozytenaktivierung.<sup>73,118</sup> Celik et al.<sup>118</sup> untersuchten den Effekt einer Therapie mit Nebivolol im Vergleich zu Metoprolol auf die Aktivierung von Thrombozyten in einer prospektiven klinischen Studie an 80 Patienten. Nach einer 6-monatigen Versuchsphase konnte nach Nebivolol-Therapie ein stärkerer positiver Effekt auf die Thrombozyten-Aktivierung als nach Behandlung mit Metoprolol nachgewiesen werden.<sup>118</sup> Dies könnte ein Grund für die in der vorliegenden Studie beobachtete tendenziell stärkere Plaquereduktion durch Nebivolol sein. Eine weitere Ursache für die verminderte Atherogenese in der Nebivolol-Gruppe ist auch im Zusammenhang mit der in der vorliegenden Studie beobachteten Reduktion lokaler und systemischer inflammatorischer Prozesse zu sehen.

### **4.3 Grenzen der Studie**

Obwohl das cholesteringefütterte Kaninchen ein etabliertes Modell in der tierexperimentellen Atheroskleroseforschung ist, kann diese 15wöchige Kurzzeit-Untersuchung nur teilweise die komplizierten pathophysiologischen Vorgänge in der menschlichen Atherogenese wiedergeben. Damit es zur Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen beim Menschen kommt, bedarf es eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Faktoren über einen Zeitraum von Jahrzehnten.

Außerdem schränkt die geringe Anzahl von 24 NZW-Kaninchen und die damit verbundene kleine Gruppengröße die Validität unserer Ergebnisse weiter ein. Zumal in der Kontroll-Gruppe fünf Tiere und in der Metoprolol-Gruppe drei Tiere frühzeitig aus dem Versuch ausschieden und daher auch aus der Auswertung ausgeschlossen werden mussten.

Die Plasmakonzentrationen der  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Metoprolol wurden nicht bestimmt. Die regelmäßige EKG-Kontrolle der Herzfrequenz ließ jedoch auf eine ausreichende enterale Resorption und eine im therapeutischen Bereich liegende Plasmakonzentration schließen.

Die Untersuchung der lokalen Genexpressionen von VCAM-1, MCP-1 und CRP erfolgte aufgrund der Perfusionsfixierung mit Formalin nicht an den für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten Abschnitten des Aortenbogens, sondern an den zuvor entnommenen schockgefrorenen Karotiden. Ein histologischer Nachweis atherosklerotischer Läsionen erfolgte jedoch nur im Aortenbogen. Aufgrund der raschen Progression der Atherosklerose in cholesteringefütterten NZW-Kaninchen ist jedoch davon auszugehen, dass es auch in den Karotiden zu atherosklerotischen Veränderungen kam.

Zudem gibt es zwischen dem CRP des Kaninchens und dem menschlichem CRP Unterschiede im Aufbau und den physiologischen Eigenschaften.<sup>107</sup> Beispielsweise führt humanes CRP zu einer Aktivierung des Komplementsystems, wobei für das CRP der Kaninchen diese Eigenschaft noch nicht beobachtet werden konnte.<sup>107</sup> Ob dies allerdings die physiologische Funktion des Kaninchen-CRP etwa in der Atherosklerose überhaupt beeinflusst, ist unklar. Das Kaninchen-Modell bietet gegenüber anderen tierexperimentellen Modellen dennoch Vorteile. So ist CRP in Mäusen beispielsweise kein Akut-Phase-Protein und daher für die experimentelle Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung von CRP in der Atherosklerose ungeeignet.<sup>119</sup>

Grundlegende pathophysiologische Zusammenhänge und der Einfluss einer  $\beta$ -Blockade auf frühe atherosklerotische Plaques konnten in unserem Tiermodell an NZW-Kaninchen in-vivo gut untersucht werden.

#### 4.4 Gesamtbeurteilung und Schlussfolgerung

Die Behandlung der hypercholesterinämischen NZW-Kaninchen mit Nebivolol führte in der vorliegenden Studie zu einem signifikant verlängerten Überleben der Tiere. Die atherosklerotischen Plaques und die Akkumulation von Makrophagen im Aortenbogen waren in der Nebivolol-Gruppe am geringsten ausgeprägt. Die Reduktion lokaler und systemischer inflammatorischer Prozesse durch Nebivolol ist eine mögliche Erklärung hierfür. Metoprolol zeigte tendenziell ähnliche Eigenschaften, diese waren allerdings schwächer ausgeprägt. Nebivolol scheint daher gegenüber der Behandlung mit Metoprolol Vorteile in der Prävention der Atherosklerose zu bieten.

Im Gegensatz zum  $\beta_1$ -selektiven-Blocker Metoprolol hat Nebivolol zusätzlich NO-vermittelte vasodilatierende Eigenschaften.<sup>61,62,63,64</sup> Dabei scheint Nebivolol über zwei verschiedene Mechanismen zu einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit zu führen, die die in der vorliegenden Studie beobachteten Vorteile gegenüber der Behandlung mit Metoprolol erklären könnten. Zum einen steigert es die NOS-Aktivität in Endothelzellen und Thrombozyten, zum anderen wirkt es direkt antioxidativ.<sup>63,65</sup>

Diese Eigenschaften lassen eine Anwendung von Nebivolol in der Prävention und Therapie der Atherosklerose sinnvoll erscheinen. Weitere Untersuchungen werden jedoch notwendig sein, um Vorteile in der antiatherogenen Wirkung von Nebivolol gegenüber Metoprolol auch klinisch bestätigen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die führende Todesursache in den westlichen Industrienationen. Die Hauptursache von Myokardinfarkt, peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder zerebrovaskulärer Erkrankungen ist die Atherosklerose. In der Therapie von Herzkreislauferkrankungen sind Beta-rezeptorenblocker ( $\beta$ -Blocker) unverzichtbar. Sie führen neben einer Reduktion von Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Hypertonie, Herzfehler oder Myokardinfarkt auch zu antiatherosklerotischen Effekten. Nebivolol ist im Unterschied zu Metoprolol ein hochselektiver  $\beta_1$ -Rezeptorenblocker mit NO-vermittelten vasodilatierenden Eigenschaften. NO wirkt antiatherogen. Nebivolol könnte daher in der Prävention der Atherosklerose von besonderem Vorteil sein.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der  $\beta$ -Blocker Nebivolol und Metoprolol auf inflammatorische Prozesse im Kaninchenmodell der Atherosklerose zu untersuchen. 24 NZW-Kaninchen wurden in drei Gruppen zu je acht Tieren randomisiert. Die Versuchsdauer betrug 15 Wochen. In der Kontroll-Gruppe erhielten die Tiere zunächst für zwei Wochen Standardfutter, anschließend für acht Wochen 1%iges und bis Versuchsende 0,5%iges Cholesterinfutter. Die Tiere der Nebivolol-Gruppe erhielten zusätzlich von Versuchsbeginn an Nebivolol in einer Dosierung von 10-35 mg/d und kg Körpergewicht, die Tiere der Metoprolol-Gruppe Metoprolol in einer Dosierung zwischen 20-60 mg/d und kg Körpergewicht. Die regelmäßig mittels EKG kontrollierte Herzfrequenz zeigte eine signifikante Reduktion bei den mit  $\beta$ -Blockern behandelten Tieren, was auf eine ausreichende enterale Resorption und eine therapeutische Plasmakonzentration der  $\beta$ -Blocker hindeutete. Plasmalipide, Blutbild und Leberwerte wurden regelmäßig kontrolliert. Bei Versuchsende wurden die Karotiden zur Untersuchung der Gefäßfunktion entnommen. Nach einer Perfusionsfixierung wurden an den Aortenbögen der Versuchstiere die Fläche der atheromatösen Plaques sowie deren zelluläre Zusammensetzung analysiert. Darüber hinaus wurden anhand der real-time-RT-PCR die mRNA-Expressionen von VCAM-1, MCP-1 und CRP in den Karotiden untersucht. Im Serum der Kaninchen wurden mittels ELISA die CRP- und IL-8-Konzentrationen bestimmt.



Die Fütterung der cholesterinreichen Diät führte bei den NZW-Kaninchen innerhalb weniger Wochen zur Entwicklung einer Hypercholesterinämie und Hyperlipoproteinämie. Die Behandlung mit Nebivolol und Metoprolol hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamt-Cholesterin-, Triglyzerid- und Lipoprotein-Konzentrationen im Plasma. Im Versuchsverlauf entwickelte sich in allen Gruppen eine cholesterininduzierte normozytäre, hyperchrome Anämie sowie eine Leukozytose. Nebivolol senkte die AUC der Leukozytenzahl gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant. Die Behandlung der hypercholesterinämischen NZW-Kaninchen mit Nebivolol führte zu einem signifikant verlängerten Überleben der Tiere gegenüber der Kontroll-Gruppe und zeigte tendenziell einen Vorteil gegenüber der Behandlung mit Metoprolol. In der Kontroll-Gruppe schieden fünf Tiere und in der Metoprolol-Gruppe drei Tiere vorzeitig aus dem Versuch aus. Ursächlich für die kurz vor ihrem Tod aufgetretenen deutlichen ikterischen Veränderungen in den Skleren war vermutlich eine cholesterininduzierte Leberschädigung. Die Behandlung mit Nebivolol oder Metoprolol führte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu keiner signifikant verbesserten endothelabhängigen Gefäßrelaxation auf Acetylcholin. Eine Inhibierung der vaskulären NADPH-Oxidase durch Nebivolol könnte die in der vorliegenden Studie aufgetretene tendenziell stärkere Gefäßkontraktion in der Nebivolol-Gruppe erklären.

Die Behandlung mit Nebivolol reduzierte lokal in den Plaques die Expression der VCAM-1- und CRP-mRNA, HSP 40 und HSP 70 sowie systemisch die Serumkonzentrationen von IL-8 und CRP im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant. Die Expression von HSP 60 und der MCP-1-mRNA war tendenziell vermindert. Eine verminderte Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B als mögliche Ursache konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Reduktion lokaler und systemischer inflammatorischer Prozesse in der Nebivolol-Gruppe ist eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zur Kontroll-Gruppe verringerte Akkumulation von Makrophagen in der Plaque. Die Plaquefläche und das Intima-Media-Verhältnis waren signifikant geringer als in der Kontroll-Gruppe. Metoprolol reduzierte lediglich die Expression von HSP 40, HSP 70 und der VCAM-1- und CRP-mRNA gegenüber der Kontroll-Gruppe

signifikant, alle übrigen Parameter waren nur tendenziell vermindert. Ein signifikanter Unterschied zur Nebivolol-Gruppe konnte in einer vermehrten Akkumulation von Makrophagen in den Plaques beobachtet werden.

Die Behandlung mit Nebivolol zeigte gegenüber Metoprolol Vorteile in einer tendenziell stärkeren Reduktion inflammatorischer Prozesse und einer verminderten Atherogenese im Aortenbogen der NZW-Kaninchen. Diese Eigenschaften lassen eine Anwendung von Nebivolol in der Prävention und Therapie der Atherosklerose sinnvoll erscheinen. Weitere Untersuchungen werden jedoch notwendig sein, um Vorteile in der antiatherogenen Wirkung von Nebivolol gegenüber Metoprolol auch klinisch bestätigen zu können.

## 6 Anhang

**Tab. 7: Parameter des kleinen Blutbilds.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM zu Versuchsbeginn (Woche -2) und zu Versuchsende (Woche 12) mit Angabe der area under the curve (AUC) und des jeweiligen p-Werts der AUC.

	Kontrolle	Nebivolol	Metoprolol	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 $\pm$ 2,4	73,2 $\pm$ 1,1	78,3 $\pm$ 1,7	0,0066
<i>Die AUC in der Metoprolol-Gruppe war gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant erhöht.</i>				
<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
<i>Die AUC in der Metoprolol-Gruppe war gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant erhöht.</i>				
<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
<i>Die AUC in der Metoprolol-Gruppe war gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt.</i>				

**Tab. 6: Fortsetzung: Parameter des kleinen Blutbilds.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM zu Versuchsbeginn (Woche -2) und zu Versuchsende (Woche 12) mit Angabe der area under the curve (AUC) und des jeweiligen p-Werts der AUC.

	Kontrolle	Nebivolol	Metoprolol	p-Wert AUC
<b>MCHC (g/dl)</b>				
Woche -2	30,5 $\pm$ 0,2	31,9 $\pm$ 0,9	31,6 $\pm$ 1,1	
Woche 12	40,0 $\pm$ 4,6	36,5 $\pm$ 0,6	34,6 $\pm$ 0,4	
AUC	519,1 $\pm$ 6,7	534,4 $\pm$ 3,7 *	519,6 $\pm$ 3,8	0,1174
<b>Leukozyten (1/<math>\mu</math>l)</b>				
Woche -2	7280 $\pm$ 670	6311 $\pm$ 606	6745 $\pm$ 654	
Woche 12	26607 $\pm$ 8972	12518 $\pm$ 790	12964 $\pm$ 1880	
AUC ( $10^3$ )	238,7 $\pm$ 36,6	169,8 $\pm$ 6,7	188,4 $\pm$ 13,1	0,0322
<i>Die AUC in der Nebivolol-Gruppe waren gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert.</i>				
<b>Thrombozyten (1/nl)</b>				
Woche -2	312 $\pm$ 97	391 $\pm$ 40	310 $\pm$ 40	
Woche 12	612 $\pm$ 73	482 $\pm$ 33	461 $\pm$ 55	
AUC ( $10^3$ )	7,3 $\pm$ 0,4	7,0 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,6	0,1833

**Tab. 8: Leber- und Pankreas-Werte.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM zu Versuchsbeginn (Woche -2) und zu Versuchsende (Woche 12) mit Angabe der area under the curve (AUC) und des jeweiligen p-Werts der AUC.

	Kontrolle	Nebivolol	Metoprolol	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 $\pm$ 2,8	15,7 $\pm$ 1,8	10,9 $\pm$ 2,4	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	46,0 $\pm$ 15,6	40,0 $\pm$ 4,0	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 $\pm$ 0,8	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	2,6 $\pm$ 1,2	2,2 $\pm$ 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	87,4 $\pm$ 4,4	80,4 $\pm$ 7,2	
Woche 12	1312 $\pm$ 190	696 $\pm$ 137	856 $\pm$ 151	
AUC ( $10^3$ )	4,8 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,4	0,0182
<i>Die AUC war in der Nebivolol-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontroll-Gruppe.</i>				

**Tab. 9: Zusammenfassung der endothelabhängigen Relaxation auf Acetylcholin.**

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der maximalen Kontraktion und Relaxation, sowie der halbmaximalen Relaxation  $EC_{50}$ .

Die Gruppe Unbehandelt zeigte eine signifikant stärkere Kontraktion als die Gruppen Kontrolle und Metoprolol. Ein signifikanter Unterschied in der maximalen Relaxation war zwischen der Gruppe Unbehandelt und den Gruppen Kontrolle, Nebivolol und Metoprolol feststellbar.

	Kontrolle	Nebivolol	Metoprolol	Unbehandelt	Anzahl (n) p-Wert
Kontraktion (mN)	22,7 $\pm$ 1,1	23,1 $\pm$ 0,7	22,7 $\pm$ 1,0	26,4 $\pm$ 0,7	n=95 p=0,0205
$EC_{50}$ (log[mol/l])	-6,74 $\pm$ 0,07	-6,87 $\pm$ 0,06	-6,96 $\pm$ 0,06	-6,94 $\pm$ 0,06	n=97 p=0,0686
Relaxation max. (%)	84,3 $\pm$ 1,3	83,0 $\pm$ 1,6	85,7 $\pm$ 1,5	94,1 $\pm$ 1,3	n=95 p<0,0001

**Tab. 10: Zusammenfassung der endothelunabhängigen Relaxation auf Nitroprussidnatrium.**

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der maximalen Kontraktion und Relaxation, sowie der halbmaximalen Relaxation  $EC_{50}$ .

Ein signifikanter Unterschied in der maximalen Kontraktion war zwischen der Gruppe Unbehandelt und den Gruppen Kontrolle und Metoprolol feststellbar. In der  $EC_{50}$  unterschieden sich die Gruppen Kontrolle und Nebivolol signifikant von den Gruppen Metoprolol und Unbehandelt. Ein signifikanter Unterschied in der maximalen Relaxation war zwischen der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe feststellbar.

	Kontrolle	Nebivolol	Metoprolol	Unbehandelt	Anzahl (n) p-Wert
Kontraktion (mN)	23,9 $\pm$ 1,0	26,6 $\pm$ 0,8	24,1 $\pm$ 1,0	29,8 $\pm$ 0,9	n=94 p<0,0001
$EC_{50}$ (log[mol/l])	-6,49 $\pm$ 0,07	-6,49 $\pm$ 0,08	-6,86 $\pm$ 0,07	-6,88 $\pm$ 0,08	n=96 p<0,0001
Relaxation max. (%)	86,5 $\pm$ 1,7	81,8 $\pm$ 2,0	92,7 $\pm$ 2,5	90,1 $\pm$ 2,2	n=96 p=0,0040

**Tab. 11: Plaquefläche und Intima-Media-Verhältnis in den Segmenten des Aortenbogens.**

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in den einzelnen Segmenten (AoBo I-IV) und im Mittel aller Segmente (AoBo Mittel) mit Angabe des jeweiligen p-Werts.

Signifikante Unterschiede konnten zwischen der Nebivolol- und Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden.

	Kontrolle (mm <sup>2</sup> )	Nebivolol (mm <sup>2</sup> )	Metoprolol (mm <sup>2</sup> )	p-Wert
<b>Plaquefläche</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>Intima-Media-Verhältnis</b>				
AoBo I	0,9 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,8410
AoBo II	1,2 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,3448
AoBo III	2,0 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	0,0276
AoBo IV	2,4 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3	0,0363
AoBo Mittel	1,6 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	0,0144

**Tab. 12: 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. Signifikante Unterschiede konnten im Segment AoBo II zwischen der Nebivolol- und Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden, sowie im Segment AoBo III und im Mittel aller Segmente zwischen der Nebivolol-Gruppe und den Gruppen Metoprolol und Kontrolle.

	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 $\pm$ 0,05	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

**Tab. 13: Fläche der Plaquebestandteile im Mittel der Segmente AoBo II-III.**

Gezeigt ist die Gesamtzahl der Präparate je Gruppe, sowie der jeweilige Mittelwert  $\pm$  SEM mit Angabe des p-Werts. Bei den mit  $\beta$ -Blockern behandelten Tieren war die HSP-40- und HSP-70-positive Fläche signifikant geringer als in der Kontroll-Gruppe. Die Endothelin-1-positive Fläche war in der Metoprolol-Gruppe signifikant kleiner als in der Kontroll-Gruppe.

	Anzahl K/N/M	Kontrolle (mm <sup>2</sup> )	Nebivolol (mm <sup>2</sup> )	Metoprolol (mm <sup>2</sup> )	p-Wert
<b>HSP 40</b>	5/14/9	0,34 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,04	0,0074
<b>HSP 60</b>	6/16/8	0,56 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,03	0,0916
<b>HSP 70</b>	6/15/8	0,20 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,0004
<b>glatte Muskelzellen</b>	6/16/10	0,54 $\pm$ 0,18	0,39 $\pm$ 0,08	0,45 $\pm$ 0,05	0,5824
<b>Endothelin-1</b>	6/16/10	0,30 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,03	0,0256
<b>NFkB (10<sup>-4</sup> %)</b>	6/16/9	4,2 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1	0,2420
<b>Lipide</b>	3/7/5	0,67 $\pm$ 0,23	0,39 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,21	0,5105



**Tab. 14: VCAM-1-, MCP-1- und CRP-mRNA-Expressionen in den schock-gefrorenen Karotiden.**

Die Untersuchung der mRNA-Expressionen 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.

Die Expression der VCAM-1- und CRP-mRNA war in der Nebivolol- und Metoprolol-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert.

	Anzahl K/N/M	Kontrolle (%)	Nebivolol (%)	Metoprolol (%)	p-Wert
<b>VCAM-1</b>	6/15/9	100,0 $\pm$ 22,6	42,7 $\pm$ 7,03	36,3 $\pm$ 6,51	0,0017
<b>MCP-1</b>	6/15/10	100,0 $\pm$ 33,2	85,4 $\pm$ 17,8	97,7 $\pm$ 23,0	0,8790
<b>CRP</b>	5/15/10	100,0 $\pm$ 23,7	42,6 $\pm$ 5,76	53,2 $\pm$ 6,31	0,0027

**Tab. 15: CRP- und IL-8 Serum-Konzentrationen.**

Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in den einzelnen Gruppen. Die Serum-Konzentrationen aller 24 Versuchstiere wurden aus mindestens zwei am ELISA-Reader gemessenen Absorptionswerten berechnet.

Die Konzentration von CRP und IL-8 im Serum war in der Nebivolol-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant vermindert (Dunnett's Test).

	Anzahl K/N/M	Kontrolle	Nebivolol	Metoprolol	p-Wert
<b>CRP (<math>\mu</math>g/ml)</b>	8/8/8	54,0 $\pm$ 7,4	24,0 $\pm$ 8,6	43,6 $\pm$ 8,6	<0,05
<b>IL-8 (pg/ml)</b>	3/8/5	163,5 $\pm$ 45,2	92,1 $\pm$ 2,7	106,8 $\pm$ 23,1	<0,05

## 7 Literatur

1. Statistisches Bundesamt: Pressemitteilung zur Todesursachenstatistik 2006. *Pressemitteilung* 2007;
2. Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**352**:1685-1695
3. Ross R: Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;**340**:115-126
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;**105**:1135-1143
5. 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. *Circulation* 1995;**92**:1355-1374
6. 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
7. 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
8. Davignon J, Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;**109**:III27-III32
9. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA: Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006;**5**:4.:4-22
10. Luscher TF, Barton M: Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997;**20**:II-10
11. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;**84**:9265-9269

12. Hansson GK, Jornvall H, Lindahl SG: The Nobel Prize 1998 in physiology or medicine. Nitrogen oxide as a signal molecule in the cardiovascular system. *Ugeskr Laeger* 1998;**160**:7571-7578
13. Cooke JP, Tsao PS: Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb* 1994;**14**:653-655
14. 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
15. Endemann DH, Schiffrin EL: Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;**15**:1983-1992
16. Mason RP: Nitric oxide mechanisms in the pathogenesis of global risk. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006;**8**:31-38
17. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S: Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002;**14**:123-128
18. Takeda K, Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;**17**:1-14
19. Boyle JJ: Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;**3**:63-68
20. Roma P, Catapano AL: Stress proteins and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1996;**127**:147-154
21. Xu Q: Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:1547-1559
22. Johnson AD, Berberian PA, Tytell M, Bond MG: Differential distribution of 70-kD heat shock protein in atherosclerosis. Its potential role in arterial SMC survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**:27-36
23. Hammerer-Lercher A, Mair J, Bonatti J, Watzka SB, Puschendorf B, Dirnhofer S: Hypoxia induces heat shock protein expression in human coronary artery bypass grafts. *Cardiovasc Res* 2001;**50**:115-124
24. Williams RS: Heat shock protein 47 : a chaperone for the fibrous cap? *Circulation* 2000;**101**:1227-1228
25. Rocnik E, Chow LH, Pickering JG: Heat shock protein 47 is expressed in fibrous regions of human atheroma and is regulated by growth factors and oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 2000;**101**:1229-1233
26. Tillett W, Francis T: Serological reactions in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 1930;**52**:561-585

27. Black S, Kushner I, Samols D: C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2004;**279**:48487-48490
28. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB: C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999;**99**:237-242
29. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH: Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;**336**:973-979
30. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;**342**:836-843
31. Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK: C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension* 2004;**44**:6-11
32. Verma S, Szmitko PE, Ridker PM: C-reactive protein comes of age. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;**2**:29-36
33. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:2094-2099
34. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET: Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000;**102**:2165-2168
35. Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET: Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001;**103**:2531-2534
36. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I: Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2002;**106**:1439-1441
37. Cleland SJ, Sattar N, Petrie JR, Forouhi NG, Elliott HL, Connell JM: Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease. *Clin Sci* 2000;**98**:531-535

38. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM: Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000;**102**:1000-1006
39. Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B, Mickle DA: Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 2002;**105**:1890-1896
40. Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I: Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2004;**36**:405-410
41. Verma S, Badiwala MV, Weisel RD, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Mickle DA: C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;**126**:1886-1891
42. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA: A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998;**101**:353-363
43. Cermak J, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM: C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* 1993;**82**:513-520
44. Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL: C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:13043-13048
45. Ballou SP, Lozanski G: Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine* 1992;**4**:361-368
46. Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmítko P, Li RK, Mickle DA, Verma S: C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 2003;**107**:1783-1790
47. 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
48. Egan BM, Basile J, Chilton RJ, Cohen JD: Cardioprotection: the role of beta-blocker therapy. *J Clin Hypertens* 2005;**7**:409-416

49. Wikstrand J: Primary prevention with beta-blockade in patients with hypertension: review of results and clinical implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;**16 Suppl**:64-75
50. 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
51. Kaplan JR, Manuck SB, Adams MR, Weingand KW, Clarkson TB: Inhibition of coronary atherosclerosis by propranolol in behaviorally predisposed monkeys fed an atherogenic diet. *Circulation* 1987;**76**:1364-1372
52. 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
53. Lohmann FW, Loesment WA, Kaehler H: Beta-receptor blockade, physical activity, and metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;**16 Suppl**:45-52
54. Lohmann FW: Stellenwert der Betablocker in der Inneren Medizin. *Internist Prax* 2003;**43**:473-488
55. 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
56. 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**:A51-A52
57. Sule SS, Frishman W: Nebivolol: new therapy update. *Cardiol Rev* 2006;**14**:259-264
58. Pauwels PJ, Gommeren W, Van Lommen G, Janssen PA, Leysen JE: The receptor binding profile of the new antihypertensive agent nebivolol and its stereoisomers compared with various beta-adrenergic blockers. *Mol Pharmacol* 1988;**34**:843-851
59. Van Nueten L, Taylor FR, Robertson JI: Nebivolol vs atenolol and placebo in essential hypertension: a double-blind randomised trial. *J Hum Hypertens* 1998;**12**:135-140
60. Ignarro LJ, Byrns RE, Trinh K, Sisodia M, Buga GM: Nebivolol: a selective beta(1)-adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide- and cyclic GMP-dependent mechanisms. *Nitric Oxide* 2002;**7**:75-82

61. 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
62. Cockcroft JR: Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. *Am J Hypertens* 2005;**18**:177S-183S
63. Ignarro LJ: Experimental evidences of nitric oxide-dependent vasodilatory activity of nebivolol, a third-generation beta-blocker. *Blood Press Suppl* 2004;**1**:2-16
64. 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
65. Fratta PA, Garbin U, Nava MC, Stranieri C, Davoli A, Sawamura T, Lo C, V, Cominacini L: Nebivolol decreases oxidative stress in essential hypertensive patients and increases nitric oxide by reducing its oxidative inactivation. *J Hypertens* 2005;**23**:589-596
66. 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
67. 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
68. 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
69. 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
70. Mason RP, Kalinowski L, Jacob RF, Jacoby AM, Malinski T: Nebivolol reduces nitrooxidative stress and restores nitric oxide bioavailability in endothelium of black Americans. *Circulation* 2005;**112**:3795-3801
71. 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

72. Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM: Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation* 2001;**104**:511-514
73. 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
74. Brehm BR, Wolf SC, Bertsch D, Klaussner 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
75. 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
76. 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
77. Wolf S, Sauter G, Preyer M, Poerner T, Kempf V, Risler T, Brehm B: 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
78. McMahon AC, Kritharides L, Lowe HC: Animal models of atherosclerosis progression: current concepts. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005;**5**:433-440
79. Yanni AE: The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim* 2004;**38**:246-256
80. Anitschkow N: Über die Veränderung der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Beitr Pathol Anat* 1913;**56**:379-404
81. 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
82. 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
83. Constantinides P: The role of arterial wall injury in atherogenesis and arterial thrombogenesis. *Zentralbl Allg Pathol* 1989;**135**:517-530



84. Hadoke PW, Wadsworth RM, Wainwright CL: Characterization of the responses of isolated rings of rabbit left carotid artery. A potential protocol for the assessment of pathologically induced functional changes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993;**29**:195-202
85. 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
86. Johnstone MT, Perez AS, Nasser I, Stewart R, Vaidya A, Al Ammary F, Schmidt B, Horowitz G, Dolgoff J, Hamilton J, Quist WC: Angiotensin Receptor Blockade With Candesartan Attenuates Atherosclerosis, Plaque Disruption, and Macrophage Accumulation Within the Plaque in a Rabbit Model. *Circulation* 2004;**110**:2060-2065
87. Bewick V, Cheek L, Ball J: Statistics review 13: receiver operating characteristic curves. *Crit Care* 2004;**8**:508-512
88. 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
89. 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
90. Boger RH, Bode-Boger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Bohme M, Nafe R, Mugge A, Frolich JC: Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 1997;**96**:1282-1290
91. Ostlund-Lindqvist AM, Lindqvist P, Brautigam J, Olsson G, Bondjers G, Nordborg C: Effect of metoprolol on diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis* 1988;**8**:40-45
92. 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
93. Feldman DL, Mogelesky TC, Liptak BF, Gerrity RG: Leukocytosis in rabbits with diet-induced atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1991;**11**:985-994

94. 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
95. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ: Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990;**86**:228-234
96. Laight DW, Matz J, Caesar B, Carrier MJ, Anggard EE: Investigation of endogenous nitric oxide vascular function in the carotid artery of cholesterol-fed rabbits. *Br J Pharmacol* 1996;**117**:1471-1474
97. Oelze M, Daiber A, Brandes RP, Hortmann M, Wenzel P, Hink U, Schulz E, Mollnau H, von Sandersleben A, Kleschyov AL, Mulsch A, Li H, Forstermann U, Munzel T: Nibivolol inhibits superoxide formation by NADPH oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats. *Hypertension* 2006;**48**:677-684
98. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr.: Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;**251**:788-791
99. 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
100. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja 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
101. 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
102. Nie Y, Chen H, Cheng M, Liu X, Deng Y: [Interleukin-8 protein and gene expression in atherosclerotic lesions of hyperlipemia rabbits]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2005;**22**:258-264
103. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A: MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999;**398**:718-723

104. Pockley AG: Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002;**105**:1012-1017
105. Berberian PA, Myers W, Tytell M, Challa V, Bond MG: Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am J Pathol* 1990;**136**:71-80
106. Scirica BM, Morrow DA: Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The verdict is still out. *Circulation* 2006;**113**:2128-2134
107. Sun H, Koike T, Ichikawa T, Hatakeyama K, Shiomi M, Zhang B, Kitajima S, Morimoto M, Watanabe T, Asada Y, Chen YE, Fan J: C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. *Am J Pathol* 2005;**167**:1139-1148
108. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V: C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;**18**:1386-1392
109. Zhang YX, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G: Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;**145**:375-379
110. Verma S, Devaraj S, Jialal I: Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation* 2006;**113**:2135-2150
111. 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; **125**:4-10
112. 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
113. Lindqvist P, Olsson G, Nordborg C, Bondjers G, Brautigam 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
114. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller 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

115. Hjerdahl P, Larsson PT, Wallen NH: Effects of stress and beta-blockade on platelet function. *Circulation* 1991;**84**:VI44-VI61
116. 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
117. Larsson PT, Olsson G, Angelin B, Granstrom E, Hansson G, Hjerdahl P: Metoprolol does not reduce platelet aggregability during sympatho-adrenal stimulation. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;**42**:413-421
118. 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
119. Torzewski J: C-reactive protein and atherogenesis: new insights from established animal models. *Am J Pathol* 2005;**167**:923-925

## Danksagung

An allererster Stelle gilt mein besonderer Dank meiner Mitstreiterin Carolin Lorenz, ohne deren Hilfe und stete Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht in diesem Umfang entstanden wäre.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Frau Dr. U. Brehme bedanken, die mich während meiner Arbeit mit nicht selbstverständlichem Engagement zunächst von Tübingen, später dann von Bonn aus unterstützte.

Außerdem bin ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. B. Brehm zu großem Dank verpflichtet, der den Entstehungsprozess meiner Arbeit stets mit Interesse und viel Geduld von Tübingen und Jena aus begleitet hat. Mein Dank gilt insbesondere auch Frau Dr. G. Sauter, die mir bei vielen experimentellen Versuchen eine große Hilfe war.

Dank sagen möchte ich Frau Dr. V. Röder, Herrn Professor Dr. F. W. Schmahl, sowie den Mitarbeiterinnen des Klinischen Labors aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin. Bei Frau Dr. E. Decker aus der Zahnklinik möchte ich mich für die Bereitstellung des Lichtmikroskops ganz herzlich bedanken.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen möchte ich meinen Dank Herrn Prof. Dr. H. Oßwald, Herrn Dr. T. Rieger und Frau Prof. Dr. S. Wolf zukommen lassen. Bei der statistischen Auswertung der pharmakologischen Daten unterstütze mich Herr Prof. Dr. K. Dietz, auch hierfür vielen Dank!