

***In vitro* Modell zur Untersuchung der Wirkung von Östrogenen auf die Neointimabildung nach Endothelverletzung an der Kaninchenaorta**

Gerald Finking, Christina Lenz, Markus Wohlfrom, Hartmut Hanke
Universität Ulm, Abt. Innere Medizin II, Kardiologie, D-Ulm

Zusammenfassung

Tierexperimente bilden eine wichtige Grundlage für die Beantwortung bestimmter Fragestellungen im Rahmen der Arterioskleroseforschung. Experimente mit Östrogenen haben gezeigt, dass diese nicht nur einen Effekt auf die Cholesterinspiegel und den Gefäßtonus besitzen, sondern auch antiproliferativ auf solche Zellen in der Gefäßwand wirken, die eine Rolle bei Stenosierungsprozessen, zum Beispiel nach Verletzungen oder im Rahmen der Atherosklerose, spielen. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Organkulturmodell (Kaninchenaorta) zu etablieren, mit dem reproduzierbar definierte Wirkungen von Östrogenen im kardiovaskulären System untersucht werden können. Es wurde als Untersuchungsgegenstand die Bauchschlagader (aorta abdominalis) des Kaninchens gewählt, die auch in entsprechenden Tiermodellen häufig Zielorgan ist. Diese galt es im Bereich des Endothels (innere einzellige Schicht) so zu manipulieren (Verletzungsmodell), dass eine reproduzierbare und messbare Verletzungsreaktion entsteht (Neointimabildung). Im Rahmen dieser Verletzungsreaktion sollte nun die Wirkung verschiedener Östrogene (17 β -Östradiol, der Phytoöstrogene Genistein und Daidzein) im geschlechtsspezifischen Unterschied untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei äquivalenten Dosierungen (50 μ g/ml) alle drei Östrogene geschlechtsunspezifisch die Neointimabildung hemmen. Durch den Einsatz dieses Organkulturmodells war es im Rahmen der Fragestellung möglich, Effekte verschiedener Östrogene auf die Verletzungsreaktion des arteriellen Gefäßes zu zeigen und dadurch auf aufwendige Tierversuche zu verzichten. Da aus einer Kaninchenaorta 10 Gefäßsegmente geschnitten werden konnten, wurde die Zahl der Tiere, die aus statisti-

schen Gründen für einen *in vivo* Versuch notwendig gewesen wäre, um den Faktor 10 reduziert.

Summary: *In vitro* model to investigate the effect of estrogens on neointima development after endothelial injury in the rabbit aorta.

Animal experiments are widely accepted in arterosclerosis research. Estrogens have lipid lowering properties and beneficial effects on the vasomotion. They act antiproliferative on those cells of the vascular wall which play a major role in lumen narrowing after vascular injury and in atherogenesis. The aim of the present study was to establish an organ culture model (rabbit aorta) to investigate post injury estrogen effects in the vessel wall. We chose the rabbit abdominal aorta which is the target organ in various animal experiments on this matter. The endothelial mono-layer was manipulated in a way that caused a measurable and reproducible post injury reaction (neointima formation). Then the effect of different estrogens (17 β -Estradiol, the phytoestrogens Genistein and Daidzein) on neointima development was investigated in male and female rabbit aortae. In equivalent dosages of 50 μ g/ml all three estrogens inhibited the neointima formation significantly in male and female vessels. By the use of this organ culture model it was possible to show post injury effects of different estrogens in the vasculature while the consumption of animals was significantly reduced. Because 10 aortic segments could be taken from one aortic vessel, the number of animals that would have been necessary for an *in vivo* experiment could be reduced by the factor 10.

Keywords: 3R, reduce, vascular injury, organ culture, estrogen, phytoestrogens

1 Einleitung

Tierexperimente bilden eine wichtige Grundlage für die Beantwortung bestimmter Fragestellungen im Rahmen der Arterioskleroseforschung. Das Ziel dieser Arbeit war es, zur Verminderung der Zahl dieser Tierexperimente ein Organkulturmodell zu etablieren, mit dem reproduzierbar definierte Wirkungen von Östrogenen auf die Verletzungsre-

aktion der Gefäßwand untersucht werden können.

Experimente mit Östrogenen (z.B. 17 β -Östradiol) haben gezeigt, dass diese die Proliferation insbesondere glatter Gefäßmuskulzellen *in vitro* hemmen können (Vargas et al., 1993; Voisard et al., 1995). Auch eine Hemmung der Verletzungsreaktion nach Schädigung der Gefäßwand wurde im Tierexperiment dokumentiert (Chen et al., 1996; Krasinski et al., 1997). Diese Wirkung war,

im Gegensatz zur günstigen Östrogenwirkung auf die Atherogenese (Hanke et al., 1996), geschlechtsunspezifisch. Auch pflanzliche Östrogene besitzen, ähnlich wie 17 β -Östradiol (Wagner et al., 1997; Collins et al., 1995), eine Wirkung auf den Lipidmetabolismus (Anthony et al., 1996) und auf die Vasomotion (Honore et al., 1997). Darüber hinaus werden antiproliferative Eigenschaften, z.B. im Hinblick auf bösartige Tumoren (Prostata- und Colon-Karzi-

nom) diskutiert (Adlercreutz et al., 1993; Barnes et al., 1998).

Gegenstand der Untersuchung in diesem Organkulturmodell (Kaninchenaorta) war die Beeinflussung der Verletzungsreaktion (Neointimabildung) der arteriellen Gefäßwand durch 17 β -Östradiol und die Phytoöstrogene Genistein und Daidzein. Um geschlechtsspezifische Wirkmechanismen zu untersuchen, wurden Aortensegmente von weiblichen und männlichen Kaninchen behandelt.

2 Material und Methoden

2.1 Gefässentnahme, Kultivierung, Versuchsaufbau

Insgesamt wurden 6 weibliche und 6 männliche weisse Neuseelandkaninchen mit 3 kg Körpergewicht (aus dem Tierforschungs-

ge von 5 mm Breite geschnitten. Diese wurden in jeweils 6 weibliche und 6 männliche Gruppen à 10 Ringe randomisiert (Abb. 1) und in handelsüblichen 6-Loch-Schalen (Costar, D-Bodenheim) kultiviert (Abb. 2). Dabei schwebten die Organstücke frei in 5 ml Nährmedium. Die Temperatur im Brutschrank entsprach mit konstant 37°C der Körpertemperatur.

Das Nährmedium bestand aus Phenolrot-freiem DMEM mit Hams F12 im Verhältnis 1+4 gemischt (Gibco, D-Eggenstein). Auf den Zusatz von Phenolrot wurde bewusst verzichtet, da es bekanntermaßen mit Östrogenrezeptoren kommuniziert, was zu Wechselwirkungen mit den Östrogenen führen würde. Das Medium enthielt ausserdem einen 15 %igen Anteil an fetalem Kälberserum „fcs“ (Bioproducts, D-Heidelberg), das über die enthaltenen Wachstumsfakto-

slich den ballondenudierten unbehandelten Kontrollgruppen exakt 1 % Äthanol. Genistein und Daidzein wurden in Konzentrationen von 5 und 50 µg/ml dem Medium zugesetzt. Die bereits in früheren Experimenten (Voisard et al., 1996) als antiproliferativ evaluierte 17 β -Östradioldosis von 50 µg/ml diente ebenfalls der Kontrolle.

Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Hierbei wurde zunächst der Zustand des verbrauchten Mediums mikroskopisch auf Bakterien- und Pilzbefall hin überprüft. Dann wurde es vorsichtig steril abgesaugt und durch neues, zuvor auf 37°C erhitztes ersetzt. In dieses Medium waren zuvor die entsprechenden Mengen an 17 β -Östradiol, Genistein oder Daidzein titriert worden. Das Experiment dauerte 28 Tage.

2.2 Histologie, Immunhistochemie, Auswertung

18 Stunden vor Versuchsende wurde dem Nährmedium 5-Brom-2'-Desoxy-Uridin (30,71 mg BrDU + 26,37 mg 2'-Desoxycytidin; Sigma, D-Deisenhofen) in einer Konzentration von 20 µM zugesetzt. BrDU wird in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut und dient als Proliferationsmarker. Nach Versuchsende wurden die Aortensegmente über 24 Stunden in 4%iger Formalinlösung fixiert und anschliessend in Paraffin eingebettet. Danach wurden die Aortenstücke zur histochemischen Weiterbehandlung mittels Mikrotom in 4 µm breite Ringe geschnitten. Färbungen nach Elastica-van-Gieson und Hämalaun-Eosin dienten der morphologischen und morphometrischen (Morphometrie-Einrichtung: Mikroskop der Fa. Leica, Software von Bilany Consulting in D-Düsseldorf) Auswertung. Die Neointima war definitionsgemäss die Fläche zwischen *Lamina elastica interna* und Lumen. Verglichen wurden zwischen den einzelnen Versuchsgruppen dann die Schnitte mit der jeweils grössten Neointimafläche.

Die immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen α -Aktin (Fa. Renner, D-Darmstadt) wurde nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode durchgeführt und identifizierte glatte Gefässmuskelzellen. Ein positiver Befund ist zugleich ein Hinweis auf die Integrität des Gefässschnittes. BrDU wurde mit einem monoklonalen Antikörper (Bio Consulting, D-Reinach) und der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode sichtbar gemacht. Dadurch können einmal die proliferative

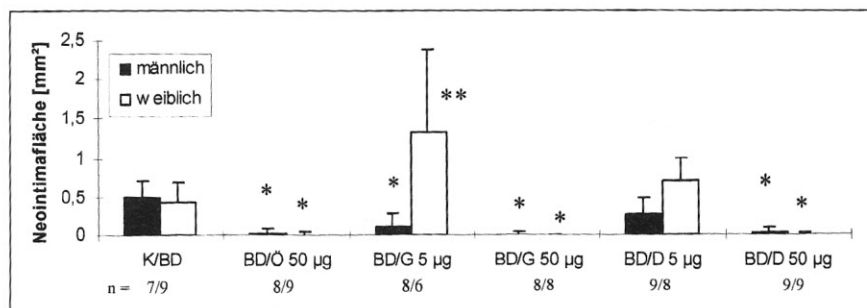


Abbildung 1: Dosisabhängige Wirkung von 17 β -Östradiol, Genistein und Daidzein auf die Neointimabildung nach Endotheldenudation mittels Ballonkatheter. Werte sind ausgedrückt in Mittelwert und Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$) vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe. ** = signifikant ($p < 0,05$) vermehrt im Vergleich zur Kontrollgruppe. K = Kontrollgruppe; BD = Ballondenudation; Ö = 17 β -Östradiol; G = Genistein; D = Daidzein.

zentrum der Universität Ulm) mittels Bolzenschuss getötet und anschliessend über die *arteria carotis* entblutet. Danach wurde *in situ* eine Gefässverletzung der Bauchschlagader (*aorta abdominalis*) durchgeführt. Dazu musste das Abdomen mit einem Skalpell eröffnet und das Fettgewebe vorsichtig mit Tupfern und kleinen Pinzetten entfernt werden. Nach Freilegung des Gefässes wurde über einen Schnitt im Bereich des Abgangs der Iliacalarterien ein 3F Fogarty Ballonkatheter (Baxter, D-Unterschleißheim) in die Bauchaorta eingeführt. Nach der Entfaltung mittels 0,9 %iger Kochsalzlösung wurde der Ballon einmal durch das Gefäss gezogen, was zu einer Dehnung und transmuralen Verletzung der Gefässwand und zur Schädigung des Endothels führte. Danach wurden die Gefässe unter Schonung der äusseren Wandschicht (*adventitia*) exzidiert und in jeweils 10 Rin-

gen proliferativ wirkt, sowie 5 ml/l Penicillin/Streptomycin (Gibco, D-Eggenstein) zum Schutz vor bakterieller Kontamination. Da die Östrogene in Äthanol gelöst werden mussten, enthielt das Medium ausserdem in allen Versuchsgruppen einschlies-

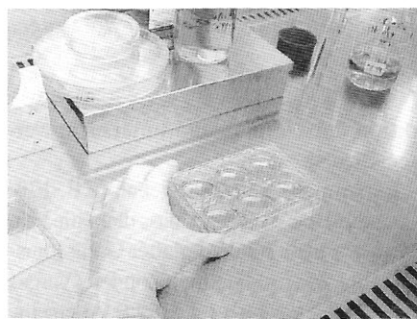


Abbildung 2: Die Kultivierung der Gefässringe (*aorta abdominalis*) geschah in sogenannten 6-Loch-Schalen, in denen die Ringe frei in 5 ml Nährmedium schweben.

Aktivität und darüber die Vitalität des Gefäßschnittes beurteilt werden.

Die Prüfung auf Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon Test ($p < 0,05$) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Abbildung 1: In keiner der Versuchsgruppen kamen alle 10 Gefäßsegmente in die Auswertung. Einige wenige mussten wegen makroskopisch erkennbarer Schädigungen aus der Kultur genommen werden. Einige Gefäßsegmente wurden durch die histologische Aufarbeitung (z.B. Fältelungen) so geschädigt, dass eine Auswertung nicht mehr möglich war. Die zur weiteren Auswertung verwendeten Gefäßsegmente waren makroskopisch unauffällig und in vitalem Zustand. Nekrosen waren auch mikroskopisch nicht erkennbar.

Die Gefäßverletzung mittels Ballonkatheter führte in den Gefäßen der Kontrollgruppe zu einer deutlichen Neointimbildung (Abb. 3A). Bereits 5 µg/ml Genistein, jedoch nicht Daidzein, verminderten die Neointimbildung bei männlichen Aortensegmenten signifikant ($p < 0,05$). In weiblichen Segmenten führte diese Konzentration zu einer signifikanten Zunahme der Neointimbildung ($p < 0,05$). In Konzentrationen von 50 µg/ml verhierten sowohl 17β-Östradiol als auch die Phytoöstrogene Genistein und Daidzein signifikant ($p < 0,05$) und geschlechtsunspezifisch die Neointimbildung in weiblichen und männlichen Aortensegmenten (Abb. 3B).

Die Färbung für α-Aktin als Indikator für glatte Muskelzellen markierte in allen Gefäßschnitten sowohl Zellen der Media als auch, wenn vorhanden, der Neointima. In der Neointima waren die locker gruppierten α-Aktin positiven Zellen von Bindegewebe umgeben. BrDU-positive proliferierende Zellen kamen in den Gefäßschnitten in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlung mit unterschiedlicher Häufigkeit vor. Ihre Zahl war bei Schnitten männlicher und weiblicher Tiere unter Behandlung mit 50 µg/ml 17β-Östradiol und 5 µg/ml Daidzein signifikant erhöht. Bei Behandlung mit 50 µg/ml Genistein waren keine proliferierenden Zellen in der Gefäßwand mehr nachweisbar.

4 Diskussion

17β-Östradiol, Genistein und Daidzein verminderten in diesem Organkultur-

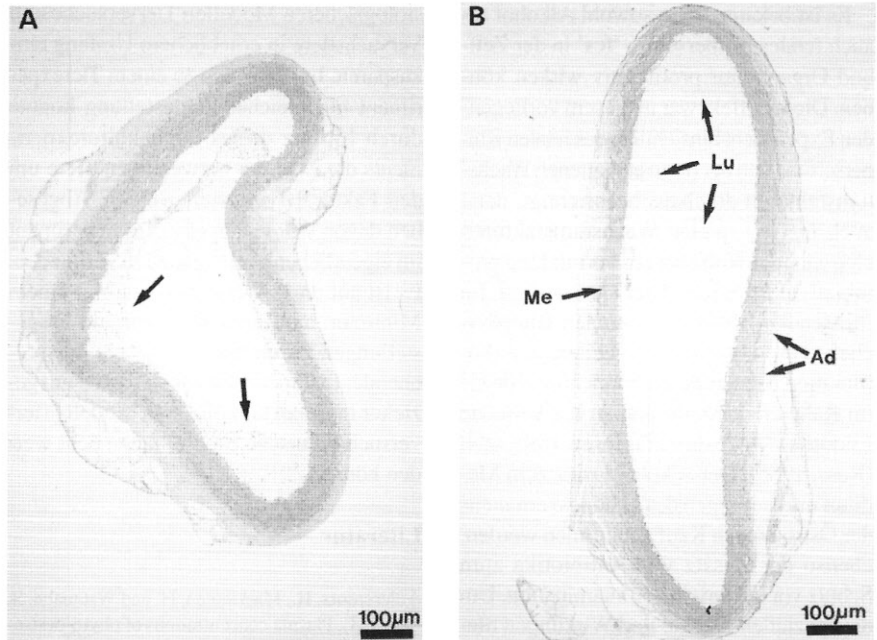


Abbildung 3: A) Querschnitt durch die *aorta abdominalis* eines weiblichen Kaninchens nach Ballondenudation und Kultivierung über 28 Tage. In der HE-Färbung erkennt man die ausgeprägte Neointimbildung (Pfeile). B) Nach 28tägiger Behandlung mit 50 µg/ml Daidzein (*aorta abdominalis* eines männlichen Kaninchens) ist keine signifikante Neointimbildung nach Ballondenudation erkennbar. Lu = Lumen; Me = Media; Ad = adventitia.

ment die Neointimbildung nach Endothelschädigung geschlechtsunabhängig bei einer Konzentration von 50 µg/ml signifikant. In der Konzentration von 5 µg/ml hatte Genistein geschlechtsabhängig „proliferative“ und „antiproliferative“ Effekte.

Geschlechtsspezifische antiproliferative Wirkungen von Östrogen, die unsere Arbeitsgruppe kürzlich im Tierexperiment demonstrieren konnte (Hanke et al., 1996), scheinen u.a. über eine erhöhte NO-Freisetzung aus dem Endothel vermittelt zu werden (Hayashi et al., 1992), das in dem vorliegenden Experiment aber durch die Ballondenudation erheblich geschädigt worden war. Die hier gezeigte „endothelunabhängige“ Hemmwirkung auf die Neointimbildung, die im höheren Dosisbereich geschlechtsunabhängig war, könnte deshalb beispielsweise auf Kalzium-antagonistischen Mechanismen beruhen. Solche wurden bereits von Jiang et al. (1991) für das 17β-Östradiol und von Wijetunge et al. (1992) für Phytoöstrogene beschrieben. Inwieweit die Eigenschaft des Genisteins als Thyrosinkinase-Hemmer (Bischof et al., 1995) eine Rolle spielt, bleibt spekulativ. Andererseits besitzt Daidzein keine derartige Wirkung auf Thyrosinasen, so dass sie in diesem Experiment als untergeordnet angesehen werden kann.

Die Neointima in diesem Organkulturmodell besteht unter anderem aus α-Aktin positiven Zellen mit umgebendem Bindegewebe, was auf ihre Herkunft von glatten Muskelzellen der Media bzw. Fibroblasten der *adventitia* hinweist (Ross et al., 1985; Shi et al., 1996). Glatte Muskelzellen und transformierte Myofibroblasten sind in der Lage, dieses Bindegewebe selbst zu produzieren (Layman et al., 1975; Shi et al., 1996).

Die gezeigten Hemmeffekte auf die Neointimbildung sind am ehesten statische und nicht toxische Effekte. Dafür spricht einmal der makroskopische und mikroskopische morphologische Zustand der Gefäßstücke bei Versuchsende. Darüber hinaus war die α-Aktinfärbung auch nach Behandlung mit der wirksamen Östrogen- und Phytoöstrogendosis von 50 µg/ml über 28 Tage noch deutlich positiv im Bereich der mittleren Gefäßschicht (Media), die aus glatten Muskelzellen besteht. Abgesehen von den mit 50 µg/ml Genistein behandelten Gruppen liessen sich in allen anderen Versuchsgruppen nach 28 Tagen auch proliferierende Zellen mittels der BrDU-Färbung nachweisen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die grundsätzliche Vitalität der Gefäßsegmente nach diesem Behandlungszeitraum.

Es ist bekannt, dass sowohl Alkohol als auch fetales Kälberserum 'fcs' in der Zell- und Organkultur proliferativ wirken können. Dieser Effekt war in diesem vorliegenden Experiment hinsichtlich des fetalen Kälberserums und der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren durchaus beabsichtigt, denn auch *in vivo* spielen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Vermittlung proliferativer Prozesse in der Gefäßwand. Im fließenden Blutstrom kommen Blutplättchen (Thrombozyten) als weitere, die Proliferation triggernde Faktoren hinzu, da sie im Rahmen der Adhäsion an das verletzte Endothel Wachstumsfaktoren freisetzen (Ross, 1985). Der Alkoholzusatz zum Medium musste wegen des Lösungsverhaltens der Östrogene in Kauf genommen werden, ebenso der Zusatz von Antibiotika zum Schutz vor bakterieller Kontamination. Um die speziellen Effekte und Wirkungen dieser Substanzen zu nivellieren, wurden dem Medium der Kontrollgruppen dieselben Mengen an Äthanol, Antibiotika und fetalem Kälberserum zugegeben, wie denjenigen der mit 17 β -Östradiol oder mit den Phytoöstrogen behandelten Gruppen. Eine Interaktion zwischen 17 β -Östradiol, Genistein oder Daidzein und besagten Substanzen kann aber letztendlich nicht ausgeschlossen werden. D.h., dieses artifizielle Organkultursystem beinhaltet neben der reinen mechanischen Verletzung der Gefäßwand weitere Variablen, die nur für dieses *in vitro* System typisch eine Wirkung an der Gefäßwand und womöglich auf die Wirkung der Prüfsubstanzen ausüben. Der Aussagewert des Experiments, beispielsweise für die Situation beim Menschen, bedarf daher der gezielten weiteren Untersuchung an „physiologischen“ Modellen.

Andererseits bietet gerade ein Organkultursystem wie dieses die Möglichkeit, durch Ausschaltung bestimmter Variablen oder Prozesse (z.B. Thrombozyten- und Monozytenaktivierung, Cholesterinwirkungen, Blutdruck usw.) gezielt Einzelmechanismen zu untersuchen. Dies kann, neben dem Aspekt der reinen Grundlagenforschung, auch für Fragen der Dosisfindung und der Auswahl bestimmter wirkungsverwandter Substanzen *in vivo* eine Rolle spielen.

Dieses Organkulturmolell ist grundsätzlich geeignet, die Wirkungen pharmakologisch wirksamer Substanzen an der Gefäßwand nach Endothelverletzung zu untersuchen. Es ist dadurch möglich, vor der Untersuchung derartiger Substanzen an phy-

siologischen Modellen Tierversuche und Versuchstiere in erheblichem Umfang einzusparen. Im Vergleich zu einem Tierexperiment mit gleicher Fragestellung konnte durch Einsatz dieses Organkulturexperiments die Zahl der notwendigen Tiere um den Faktor 10 reduziert werden. Abgesehen davon wurde hier ein „Tierexperiment im eigentlichen Sinn“ gänzlich vermieden. Es ist auf diese Weise möglich, mit einem Minimum an Tieren Kriterien und Fragestellungen zu erarbeiten, die bei entsprechender therapeutischer Relevanz dann gezielter in einem komplexeren Modell (Tierversuch/Klinische Studie) untersucht werden können.

Literatur

- Adlercreutz, H., Markkanen, H. and Watanabe, S. (1993). Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet* 342, 1209-1210.
- Anthony, M. S., Clarkson, T. B., Hughes, C. L. jr., Morgan, T. M., Burke, G. L. (1996). Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.* 126, 43-50.
- Barnes, S. (1998). Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217, 386-392.
- Bischof, G., Illek, B., Reenstra, W. W. and Machen, T.E. (1995). Role for tyrosine kinases in carbachol-regulated Ca²⁺ entry into colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 268, 154C-161C.
- Chen, S.-J., Li, H., Durand, J., Oparil, S. and Chen, Y.-F. (1996). Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery. *Circulation* 93, 577-584.
- Collins, P., Rosano, G. M. C., Sarrel, P. M., Ulrich, L., Adamopoulos, S., Beale, C. M., McNeill, J. G. and Poole-Wilson, P.A. (1995). 17 β -estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation* 92, 24-30.
- Hanke, H., Hanke, S., Finking, G., Muhic Lohrer, A., Muck, A. O., et al. (1996). Different effects of estrogen and progesterone on experimental atherosclerosis in female versus male rabbits. Quantification of cellular proliferation by bromodeoxyuridine. *Circulation* 94, 175-181.
- Hayashi, T., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J. and Chaudhuri, G. (1992). Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: Implications for atherosclerosis. *Nat. Acad. Sci. USA* 89, 11259-11263.
- Honore, E. K., Williams, J. K., Anthony, M. S. and Clarkson, T. B. (1997). Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil. Steril.* 67, 148-154.
- Jiang, C., Sarrel, P. M., Lindsay, D. C., Poole-Wilson, P. A. and Collins, P. (1991). Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β -oestradiol *in vitro*. *Br.J. Pharmacol.* 104, 1033-1037.
- Jiang, C., Poole-Wilson, P. A., Sarrel, P. M., Mochizuki, S. and Collins, P. et al. (1992). Effect of 17-beta-oestradiol on contraction. Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Brit. J. Pharmacol.* 106, 739-745.
- Krasinski, K., Spyridopoulos, I., Asahara, T., Zee, Rvd., Isner, J. M., et al. (1997). Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 95, 1768-1772.
- Layman, D. L. and Titus, J. L. (1975). Synthesis of type I collagen by human smooth muscle cells *in vitro*. *Lab. Invest.* 33, 103-107.
- Ross, R. (1985). The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N. Engl. J. Med.* 314, 488-500.
- Shi, Y., Pieniek, M., Fard, A., O'Brien, J., Mannion, J. D. et al. Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation* 93, 340-348.
- Shi, Y., O'Brien, J. E. jr., Fard, A., Mannion, J. D., Wang, D. et al. (1996). Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 94, 1655-1664.
- Vargas, R., Wroblewska, B., Rego, A., Hatch, J. and Ramwell, P. W. (1993). Oestradiol inhibits smooth muscle cell proliferation of pig coronary artery. *Br. J. Pharmacol.* 109, 612-617.
- Voisard, R., Baur, R., Hanke, H., Vogel, U., Mattfeldt, T. et al. (1995). The effect of β -estradiol and progesterone on the proliferation of human endothelial and coronary smooth muscle cells *in vitro*. *Eur. Heart. J.* 16, 278 (Abstract).
- Wagner, J. D., Cefalu, W. T., Anthony, M. S., Litwak, K. N., Zhang, L. and Clarkson, T. B. (1997). Dietary soy protein and estrogen replacement therapy improve cardiovascular risk factors and decrease aortic cholesteryl ester content in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Metabolism* 46, 698-705.
- Wijetunge, S., Aalkjaer, C., Schachter, M. and Hughes, A. D. (1992). Tyrosine kinase inhibitors block calcium channel currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1620-1623.

Danksagung

Dieses Experiment wurde durch die ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch), Berlin, gefördert.

Korrespondenzadresse

Dr. med. Gerald Finking
Abteilung Innere Medizin II – Kardiologie
Robert-Koch-Str. 8
D-89081 Ulm
Tel: 0731/5024441
Fax: 0731/5024442
Email: gerald.finking@medizin.uni-ulm.de