Zentralbl Gynakol 123 (2001) 648–654

Zentralblatt
für Gynäkologie
© 2001 Johann Ambrosius Barth

Effekte von Tibolon auf vaskuläre Marker menschlicher weiblicher Koronararterien – Vergleich mit Estradiol/Norethisteron

A.O. Mueck, H. Seeger, D. Wallwiener

Bereich Endokrinologie und Menopause, Universitäts-Frauenklinik, Tübingen

Zusammenfassung: *Fragestellung:* Das synthetische Norethynodrel-Derivat Tibolon wird erfolgreich bei der Behandlung klimakterischer Beschwerden sowie zur Prophylaxe der Osteoporose eingesetzt. Im Gegensatz zur Hormonsubstitution gibt es hinsichtlich der Wirkung im kardiovaskulären System bisher kaum Untersuchungen zu möglichen direkten Gefäßeffekten. Da Tibolon pharmakologisch am besten mit einer Estradiol/Norethisteron-Kombination (E2/NET) verglichen werden kann, war das Ziel, diese beiden Behandlungsregime diesbezüglich erstmals direkt in ihrer Wirkung auf menschliche Gefäßzellen zu vergleichen. – *Material und Methode:* Mit menschlichen, weiblichen Koronarien wurde das für die Fragestellung wichtigste Gefäßbett verwendet. Dabei wurden sowohl Endothel- als auch Muskelzellen untersucht. Tibolon und E2/NET wurden in den Konzentrationen 0,1, 1 und 10 µM getestet. Die Inkubationszeit für die Endothelzellkulturen lag bei 24 Stunden, diejenige für die Muskelzellkulturen bei 7 Tagen. Die Effekte auf Marker für pathophysiologisch verschiedene Fragestellungen wurden vergleichend getestet: Marker der Endothelfunktion wie Prostacyclin, Endothelin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1); Marker der Plaqueinitiierung wie die Adhäsionsmoleküle E-Selectin und ICAM-1 und das Monozytenattraktionsmolekül-1 (MCP-1) sowie Marker der Plaquestabilität wie die Vorstufe der Matrix-Metalloproteinase-1 (pro-MMP-1). – *Ergebnisse:* Tibolon war in der Lage, die Endothelinsynthese zu reduzieren sowie die Konzentrationen von E-Selectin, PAI-1 und pro-MMP-1 zu senken. Prozentual lag die Hemmung dieser Marker sehr unterschiedlich, im Bereich von 11–42 %. Durch E2/NET konnten vergleichbare Hemmungen festgestellt werden; ein signifikant stärkerer Effekt war auf pro-MMP-1 zu verzeichnen. Darüber hinaus wurden jedoch durch E2/NET auch die Konzentrationen für ICAM-1 und MCP-1 reduziert. Hinsichtlich der Wirkung auf Gefäßmuskelzellen konnte eine Hemmung der Proliferation nur durch E2/NET erreicht werden. – *Schlussfolgerungen:* In Zellkulturen mit menschlichen, weiblichen Koronarien vermag Tibolon sowohl Marker, die den Vasotonus modulieren, als auch Marker, die in den verschiedenen Stadien der Atherosklerose eine Rolle spielen, positiv zu beeinflussen. Estradiol kombiniert mit Norethisteron ist diesbezüglich genau so effektiv, kann jedoch stärker bzw. zusätzlich Markersysteme positiv verändern, welche für das Frühstadium der Atherogenese und für die Stabilität arteriosklerotischer Plaques von Bedeutung sind. Experimentelle Untersuchungen dieser Art sind wertvoll, um Wirkmechanismen aufzuklären, können jedoch klinische Studien nicht ersetzen.

Schlüsselwörter: Tibolon – Estradiol/Norethisteron – Koronararterien – vaskuläre Marker

Effect of tibolone on vascular markers of human female coronary arteries – comparison with estradiol/norethisterone

Summary: *Objectives:* Tibolone, a synthetic norethynodrel derivative, is effective at alleviating climacteric complaints and for osteoporosis prophylaxis. Concerning the cardiovascular system little data are available on possible direct effects on the vasculature compared with hormone replacement therapy. Since tibolone is pharmacologically best comparable to an estradiol/norethisterone combination (E2/NET), the aim of the present study was to compare these treatment regimens with respect to their effects on human vascular cells, this being the first study to investigate this question. – *Material and methods:* Human female coronary arteries were used, the most appropriate vessels for our issue in question. The experiments were conducted with endothelial cells as well as smooth muscle cells. Tibolone and E2/NET were tested at the concentrations 0.1, 1 und 10 µM. Incubation time was 24 h for endothelial cell cultures and 7 days for smooth muscle cell cultures. The effects on markers of pathophysiologically different problems were studied in a comparable manner: Markers of endothelial function such as prostacyclin, endothelin and plasminogen-activator-inhibitor-1 (PAI-1), markers of plaque initiation such as the adhesion molecules E-Selectin, ICAM-1 and the monocyte attraction protein-1 (MCP-1) and markers of plaque stability such as the precursor of the matrix-metalloproteinase-1 (pro-MMP-1). – *Results:* Tibolone reduced the synthesis of endothelin as well as the concentrations of E-Selectin, PAI-1 and pro-MMP-1. The magnitude of the effects on these markers varied and was in the range of 11–42 %. similar inhibitions were seen for E2/NET; yet a significantly stronger inhibitory effect was found for pro-MMP-1. Moreover, E2/NET also reduced concentrations of ICAM-1 and MCP-1. Concerning smooth muscle cells only E2/NET was able to elicit an anti-proliferative effect. –

Heruntergeladen von: University of Pennsylvania Libraries. Urheberrechtlich geschützt.

Conclusions: Tibolone can positively influence the synthesis of markers in cell cultures of human female coronary artery which modulate vascular tone and which play a decisive role in the various stages of atherosclerosis. In this respect estradiol combined with norethisterone is as potent as tibolone, in addition this combination is partially more effective and able to influence a wider range of markers which are important in the early stages of atherogenesis or for the stability of atherosclerotic plaques. Experimental studies such as the present one are useful to explore mechanisms, but clearly cannot replace clinical studies.

Key words: Tibolone – estradiol/norethisterone – human female coronary arteries – vascular markers

Einleitung

Tibolon ist ein synthetisches Steroid, das sich strukturell vom C-19-Gestagen Norethyndrol ableitet. Als besonderes pharmakologisches Merkmal von Tibolon wird eine als „gewebsspezifische“ bzw. „intrakrine“ bezeichnete Umwandlung in den Zielzellen in drei Hauptmetabolite mit partiell östrogenen, gestagenen und auch androgenen Eigenschaften herausgestellt [10]. Die bevorzugte Entstehung der Metabolite soll sich nach der jeweiligen Enzymausstattung der Zielzelle richten. So soll in den endometrialen Zellen primär ein Metabolit mit gestagenen Eigenschaften entstehen; dies soll begründen, dass bei postmenopausalen Frauen schnell eine Atrophie des Endometriums herbeigeführt wird, wodurch im Vergleich zu einer Hormonsubstitution weniger häufig gestagene Entzugsblutungen auftreten [10]. Auf der anderen Seite soll aber im Brustgewebe nach Tibolongabe kein östrogener Metabolit entstehen, womit das Risiko einer Brustkrebsentstehung vermieden werden soll [10]. Für den Knochen wiederum wird beschrieben, dass nur Metabolite mit östrogenen Eigenschaften wirken, womit eine Protektion der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen erklärt wird [11]. Obwohl eine diesbezügliche Wirkung nach verschiedenen Studien wahrscheinlich ist, wurde Tibolon allerdings bisher nur für die Indikation „zur Behandlung klimakterischer Beschwerden“ zugelassen. Bislang fehlt auch noch die Indikation zur Behandlung vaginaler Beschwerden, aber auch hier ist eine Wirksamkeit nach klinischen Studien sehr wahrscheinlich, wiederum im Sinne eines Östrogens. Arbeiten fehlen bisher für urologische postmenopausale Beschwerden.

Bezüglich der Wirkungen von Tibolon im kardiovaskulären System liegen für Tibolon bisher eine Reihe von Untersuchungen im metabolischen Stoffwechsel vor; sehr spärlich sind jedoch Studien hinsichtlich Wirkmechanismen direkt an den Gefäßen, vergleicht man mit den ca. 1 000 experimentellen Arbeiten für die Hormonsubstitution. Obwohl eine diesbezügliche Bewertung der Hormonsubstitution immer noch nicht abgeschlossen ist, machen zumindest Beobachtungsstudien wie v. a. die Nurses Health Studie eine kardiovaskuläre Primärprävention sehr wahrscheinlich [7]. Sowohl für die Frage einer möglichen kardiovaskulären Protektion als auch für ein v. a. bei vorbestehenden Erkrankungen erhöhtes kardiovaskuläres Risiko sind direkte Gefäßwirkungen von großer Bedeutung. Diesbezüglich sind für Östrogene verschiedenartige, zumeist als positiv zu bewertende Wirkmechanismen nachgewiesen [11]. Dabei können allerdings bei Kombination mit Gestagenen abhängig vom eingesetzten Gestagentyp auch antagonistische bzw. negative Effekte auftreten [16].

Obwohl bisher keine Untersuchungen über mögliche Metabolisierungen des Tibolon im vaskulären Gewebe vorliegen, erscheint für die hier zu beschreibenden Untersuchungen die Tatsache relevant, dass Tibolon offensichtlich vor allem zu zwei Metaboliten mit vorwiegend östrogener Wirkung und einem Derivat des Norethisteron (7α-Methyl-Norethisteron) metabolisiert wird. Damit lässt sich Tibolon pharmakologisch am besten mit einer Estradiol/Norethisteron-Kombination vergleichen. Dies war die Basis dafür, in den vorliegenden experimentellen Untersuchungen einen diesbezüglichen Direktvergleich, d. h. unter gleichen experimentellen Bedingungen, durchzuführen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in menschlichen Zellkulturen die Wirkung von Tibolon auf verschiedene biochemische Marker für direkte Gefäßwirkungen zu untersuchen und mit der Wirkung einer Östradiol/Norethisteron-Kombination zu vergleichen. Untersuchungen dieser Art können auf Wirkmechanismen hinweisen, sie können natürlich – um diese Diskussion vorwegzunehmen – klinische Studien nicht ersetzen. Als experimentelles Modell wurden Zellkulturen aus menschlichen weiblichen Koronarien gewählt – vergleichbare Untersuchungen sind unseres Wissens bisher noch nicht durchgeführt worden. Es wurden dabei sowohl Marker der Endothelfunktion als auch Marker der arteriosklerotischen Plaqueinitiation sowie auch Marker für die Plaquestabilität getestet. Die Frage war, inwieweit die beiden in der Praxis weit verbreiteten Behandlungsregime in diesem Modell positive oder negative Wirkungen zeigen und ob wesentliche Unterschiede zwischen der Wirkung von Tibolon im Vergleich zur konventionellen Hormonbehandlung bestehen.

Methoden

Als Marker wurden das vasodilatative Prostacyclin, das vasokonstriktorische Endothelin, die Zelladhäsionsmoleküle E-Selectin und ICAM-1, das Chemokin MCP-1, die prokoagulatorische Substanz Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) sowie die Vorstufe der Matrix-Metalloproteinase-1, pro-MMP-1, herangezogen. Desweiteren wurde die Wirkung von Tibolon und Estradiol/Norethisteron auf das Wachstum vaskulärer Muskelzellen aus der Koronararterie untersucht.

Die Testsubstanzen wurden in Alkohol gelöst und auf die jeweiligen Testkonzentrationen verdünnt. Als Zellmo-

Heruntergeladen von: University of Pennsylvania Libraries. Urheberrechtlich geschützt.

delle wurden Endothelzellen und Muskelzellen aus weiblichen menschlichen Koronararterien verwendet. Die Zellen wurden von der Firma PromoCell, Heidelberg, bezogen und in Passage 3–4 (Endothelzellen) bzw. 4–6 (Muskelzellen) verwendet.

Versuchsbedingungen mit Endothelzellen

Die Zellen wurden in Kulturschalen transferiert und bis zur Konfluenz in serumhaltigem Medium kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurde auf serumfreies Medium gewechselt und die Testsubstanzen in den Testkonzentrationen den Kulturschalen zugesetzt und für 24 h inkubiert. Als Kontrolle diente die analoge Menge an Alkohol (< 1 % Endkonzentration).

Die Prostacyclin-Synthese wurde durch Bestimmung des stabilen Metaboliten 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ untersucht. Die Messung des Prostacyclin-Metaboliten erfolgte direkt im Zellkulturüberstand mittels Enzymimmunoassay. Endothelin und PAI-1 wurden ebenfalls direkt im Zellüberstand mittels Enzymimmunoassay bestimmt. Auch die Messungen von E-Selectin, ICAM und MCP-1 erfolgten durch Enzymimmunoassay im Überstand. Dazu wurden die Zellen mit den Testsubstanzen für 24 h vorinkubiert und anschließend diese Marker durch Zugabe von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF-α, 1 µg/ml) für 24 h induziert. Die Konzentrationen von pro-MMP-1 wurden mittels Enzymimmunoassay direkt im Zellüberstand gemessen.

Versuchsbedingungen mit Muskelzellen

Etwa 50 000 Zellen wurden in 6er-Kulturschalen transferiert und für einen Tag mit Wachstumsfaktor-freiem Medium kultiviert, anschließend wurden die Testsubstanzen zugesetzt und für 7 Tage inkubiert. Alle 48 Stunden wurden Medium und Testsubstanzen gewechselt. Als Kontrolle diente eine Alkohollösung ohne Testsubstanzzusatz (< 1 % Endkonzentration). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Zellzahl mittels eines Zellcounters bestimmt.

In den durchgeführten Experimenten wurden toxische Effekte auf die Zellkulturen dadurch ausgeschlossen, dass entsprechende Zellviabilitäts-Untersuchungen durchgeführt wurden.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte aus Dreifachbestimmungen pro Dosis von 2 verschiedenen Experimenten mittels ANOVA und Student-t-Test.

Ergebnisse

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 1 dargestellt. Zusätzlich wurden diejenigen Marker grafisch dargestellt, bei denen signifikante Unterschiede zwischen Tibolon und der Estradiol/Norethisteron-Kombination gefunden wurden.

Tabelle 1 Wirkungen von Tibolon und Estradiol/Norethisteron (E2/NET) auf verschiedene Parameter des Gefäßsystems

Parameter	Tibolon	E2/NET	Wirkungsunterschied
Prostacyclin	kein Effekt	Stimulierung	signifikant
Endothelin	Reduktion	Reduktion	nicht signifikant
PAI-1	Reduktion	Reduktion	nicht signifikant
E-Selectin	Reduktion	Reduktion	nicht signifikant
ICAM-1	kein Effekt	Reduktion	signifikant
MCP-1	kein Effekt	Reduktion	signifikant
Pro-MMP-1	Reduktion	Reduktion	signifikant
Proliferation von Gefäßmuskelzellen	kein Effekt	Reduktion	signifikant

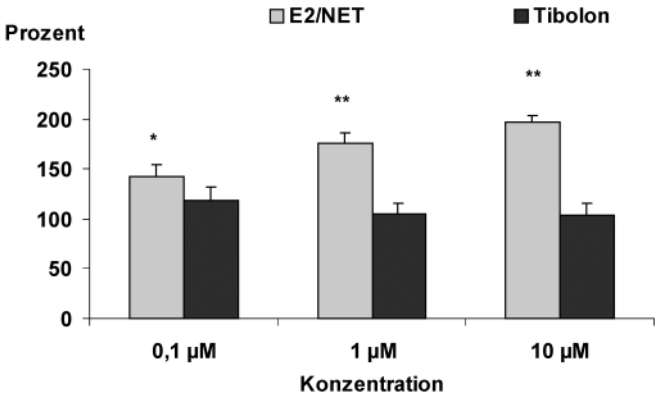

Abb. 1 Prozentuale Veränderung der Prostacyclin-Synthese von menschlichen Koronarendothelzellen nach Zugabe von Estradiol/Norethisteron (E2/NET) und Tibolon im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %)
Mittelwerte ± SD, n = 6, *p < 0,05, **p < 0,01

Tibolon zeigte in keiner der getesteten Konzentrationen eine signifikante Veränderung auf die Prostacyclin-Produktion (Abb. 1). Für die E2/NET-Kombination zeigte sich für die Konzentrationen 1 und 10 µM signifikante Steigerungen der Prostacyclin-Produktion; die Anstiege betrugen 44 % (38; 50) bzw. 78 % (70; 86). Die Endothelin-Synthese wurde durch Tibolon in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM signifikant um 11 % (95 % Konfidenzintervall: 8; 16) bzw. 31 % (26; 35) reduziert. Durch die Estrogen/Gestagen-Kombination wurde die Endothelin-Synthese in den Konzentrationen 1 und 10 µM um 16 % (11; 21) bzw. um 42 % (34; 49) signifikant gehemmt. Hinsichlich des Effektes auf die Endothelin-Produktion war kein signifikanter Unterschied zwischen Tibolon und der E2/NET-Kombination feststellbar.

Tibolon war in der Lage, die PAI-1 Synthese zu reduzieren; in der Konzentration 1 µM um 15 % (9; 20) und in der Konzentration 10 µM um 42 % (34; 49). Für die E2/NET-Kombination konnte ein ähnliches Verhalten festgestellt werden; die Hemmungen der PAI-1 Synthese betrugen hier 18 % (15; 21) bzw. 43 % (38; 48). In der Between-group-Analyse konnte kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden.

Heruntergeladen von: University of Pennsylvania Libraries. Urheberrechtlich geschützt.

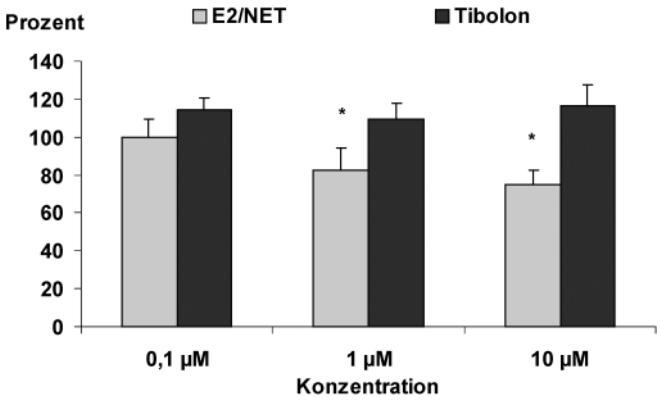

Abb. 2 Prozentuale Veränderung der Konzentration des interzellulären Adhäsionsmolekül (ICAM-1) von menschlichen Koronarendothelzellen nach Zugabe von Estradiol/Norethisteron (E2/NET) und Tibolon im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %)
Mittelwerte ± SD, n = 6, *p < 0,05, **p < 0,01

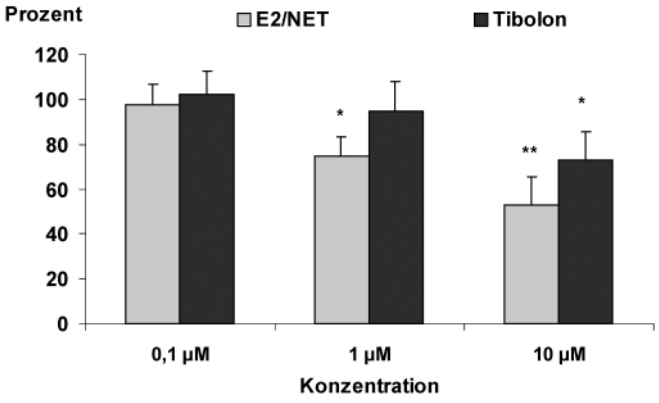

Abb. 4 Prozentuale Veränderung der Synthese des Zymogens der Matrixmetalloproteinase 1 (pro-MMP-1) von menschlichen Koronarendothelzellen nach Zugabe von Estradiol/Norethisteron (E2/NET) und Tibolon im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %)
Mittelwerte ± SD, n = 6, *p < 0,05, **p < 0,01

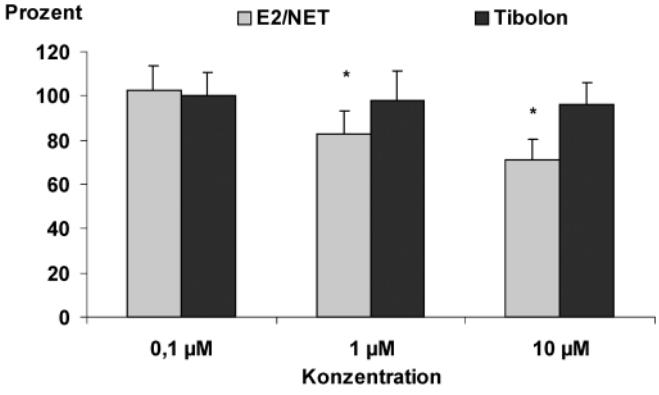

Abb. 3 Prozentuale Veränderung der Synthese des Monozytenattraktionsmolekül-1 (MCP-1) von menschlichen Koronarendothelzellen nach Zugabe von Estradiol/Norethisteron (E2/NET) und Tibolon im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %)
Mittelwerte ± SD, n = 6, *p < 0,05, **p < 0,01

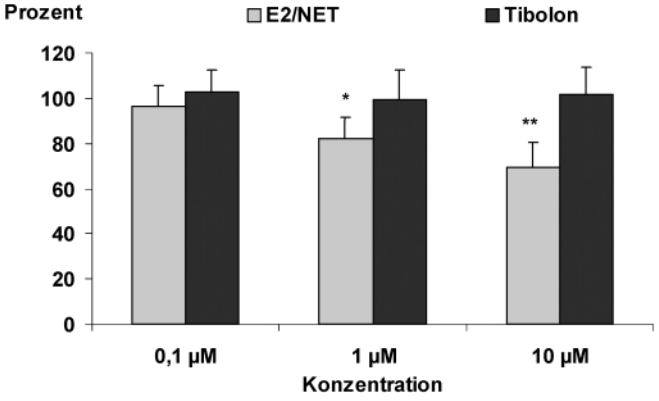

Abb. 5 Prozentuale Veränderung der Zellzahl von menschlichen Koronarmuskelzellen nach Zugabe von Estradiol/Norethisteron (E2/NET) und Tibolon im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %)
Mittelwerte ± SD, n = 6, *p < 0,05, **p < 0,01

Die Konzentrationen der löslichen Form von E-Selectin wurde durch Tibolon signifikant gehemmt; die Reduktionen betrugen 39 % bei 10 µM (36; 41), 30 % bei 1 µM (25; 36) und 19 % (14; 23) bei 0,1 µM. Auch für die E2/NET-Kombination wurden signifikante Hemmungen beobachtet, die entsprechenden Werte waren 43 % bei 10 µM (40; 46), 31 % bei 1 µM (26; 38) und 12 % bei 0,1 µM (9; 16). Zwischen den beiden Therapiearten gab es keine signifikanten Unterschiede.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, konnten hinsichtlich der Konzentrationen von ICAM-1 für Tibolon keine signifikanten Veränderungen gefunden werden, wohingegen für die E2/NET-Kombination signifikante Hemmungen um 25 % bei 10 µM (23; 26) und um 18 % bei 1 µM (15; 20) gefunden wurden.

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse für die Veränderungen von MCP-1 nach Zugabe der Testsubstanzen abgebildet. Für Tibolon wurden keine signifikanten Veränderungen registriert. Die E2/NET-Kombination bewirkte ein signifikante Reduktion der MCP-1 Konzentrationen um 29 % bei 10 µM (26; 31) und um 17 % bei 1 µM (14; 20); diese Veränderungen waren signifikant unterschiedlich zu derjenigen von Tibolon.

Hinsichtlich der Ergebisse auf die Produktion von pro-MMP-1, die in Abbildung 4 dargestellt sind, war für Tibolon nur bei 10 µM eine signifikante Reduktion zu beobachten, der Wert betrug 27 % (22; 31). Für die E2/NET Kombination war eine signifikante Reduktion sowohl bei 1 µM als auch bei 10 µM zu verzeichnen; die Abnahmen betrugen 25 % (17; 33) bzw. 47 % (43; 51).

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse hinsichtlich der Proliferation von glatten Muskelzellen dargestellt. Im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 µM wurde für Tibolon keine Wirkung auf das Zellwachstum festgestellt. Demgegenüber konnte die Zellproliferation durch die E2/NET Kombination bei 1 und 10 µM signifikant gegenüber dem Kontrollwert reduziert werden. Die Hemmungen des Zellwachstums betrugen 21 % (16; 25) bzw. 44 % (38; 50).

Heruntergeladen von: University of Pennsylvania Libraries. Urheberrechtlich geschützt.

Diskussion

Zur Wirkung von Tibolon auf das kardiovaskuläre System liegen einige wenige Daten aus Tierexperimenten und klinischen Studien vor. Es wurde unter der Behandlung postmenopausaler Frauen gezeigt, dass Tibolon den Lipidstoffwechsel positiv beeinflussen kann. So führt Tibolon zu einer Senkung des Gesamt-Cholesterins; es reduziert VLDL, Triglyzeride und Lipoprotein (a), aber auch HDL [12]. Das Fibrinolyse/Koagulations-Gleichgewicht wird unter Tibolongabe in Richtung erhöhter Fibrinolyse verschoben [20]. Tibolon hatte eine ähnlich reduzierende Wirkung auf den Endothelinspiegel in postmenopausalen Frauen wie orales und transdermales Estradiol [8]. In kürzlich publizierten Tierexperimenten war nach Tibolongabe eine Verminderung der atherosklerotischen Plaqueentstehung zu verzeichnen: bei Kaninchen reduzierte Tibolon die Akkumulierung von Cholesterin in der Gefäßwand [21], analog den Untersuchungen, wie sie mit Hormonsubstitution bekannt sind [9].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Tibolon verschiedene direkte Gefäßwirkungen aufweist. Es zeigte zwar keine signifikante Wirkung auf die Prostacyclinsynthese im Gegensatz zu der Estradiol/Norethisteron-Kombination, reduzierte aber die vaskuläre Endothelinsynthese, der Unterschied zur Estrogen/Gestagen-Kombination war hier nicht signifikant. Dieses Resultat steht im Einklang mit der bisher einzigen klinischen Studie [8], in der Tibolon die Plasma-Endothelinkonzentration bei postmenopausalen Frauen reduzierte, wobei allerdings der Effekt nicht stärker war als derjenige von oralem bzw. transdermalem Estradiol/NETA. Da Endothelin ein stark vasokonstriktorisches Agens ist, ist dieser Wirkmechanismus sicher positiv zu bewerten, insbesondere bei vaskulären Veränderungen, wie z. B. festgestellt bei Raucherinnen, bei denen Endothelin verstärkt produziert wird.

Die prokoagulatorische Substanz PAI-1 scheint ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zu sein. Dieser Faktor konnte sowohl durch Tibolon als auch durch die E2/NET-Kombination in ähnlicher Größenordnung reduziert werden. In klinischen Studien wurden für beide Hormontherapien unterschiedliche Wirkungen auf die PAI-1-Serumkonzentration festgestellt. Für Tibolon war in der bisher einzigen Studie eine Reduktion gefunden worden, die im Bereich von ca. 30 % lag [3]. Für die E2/NETA-Kombination wurde in einer neueren Studie eine Reduktion der Plasmaspiegel von PAI-1 registriert [18].

Die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Selectin, VCAM und ICAM ist bei inflammatorischen Prozessen, wie z. B. der Atherosklerose, heraufreguliert [2]. Obwohl die pathophysiologische Rolle der löslichen Form dieser Adhäsionsmoleküle noch unklar ist, wurde in verschiedenen klinischen Studien darauf hingedeutet, dass die Konzentration dieser Moleküle bei atherosklerotischen Patienten erhöht sein könnte [4]. Es wird derzeit diskutiert, ob insbesondere ICAM als Prädiktor eines auftretenden kardiovaskulären Ereignisses wie Myokardinfarkt verwendbar ist [14]. Tibolon reduzierte in den vorliegenden Experimenten die Expression von E-Selectin, diejenige von ICAM wurde allerdings nicht beeinflusst. Dies steht im Einklang mit einer kürzlich publizierten Invitro-Studie, in der Tibolon keinen Einfluss auf die Lipopolysaccharid-induzierte Expression von ICAM-1 hatte, aber diejenige von E-Selectin und zusätzlich noch von VCAM-1 reduzieren konnte [17]. Im Gegensatz dazu konnte durch die E2/NET-Kombination beide Marker signifikant reduziert werden. Dies deutet daraufhin, dass die Estradiol/Gestagen-Kombination die Atherogenese über diesen Mechanismus verzögern kann. In wenigen klinischen Studien war auch schon beobachtet worden, dass eine Hormonsubstitution die Konzentration von Zelladhäsionsmolekülen reduzieren kann, wobei möglicherweise der Gestagentyp einen Einfluss auf die Größenordnung des Effektes hat [19].

Das Chemokin MCP-1 spielt ebenso wie die Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle im Frühstadium der Atherogenese und ist mit der Expression der Adhäsionsmoleküle eng verbunden. Es bewirkt eine Attraktion von Leukozyten, insbesondere von Monozyten in die Gefäßwand [13]. MCP-1 ist induzierbar durch verschiedene Zytokine wie TNF-α und IL-1 sowie durch atherogene Substanzen wie oxidiertes LDL [13]. In der vorliegenden Arbeit war durch Tibolon kein positiver Effekt auf die endotheliale Produktion von MCP-1 erzielbar. Demgegenüber war unter E2/NET-Gabe eine signifikante Reduktion von MCP-1 zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass eine Estrogen/Gestagen-Substitution auch diesen Faktor positiv beeinflussen kann und somit einer Atherogenese entgegenwirken dürfte. Allerdings bedarf der Einfluss des Gestagens noch der weiteren Abklärung, da in unseren Versuchen z. B. eine Estradiol/Medroxyprogesteron-Kombination wie Tibolon keinen signifikanten Effekt auf die MCP-1-Konzentrationen hatte (Publikation eingereicht). In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass die MCP-1-Plasmawerte in der Postmenopause gegenüber der Prämenopause ansteigen und durch eine Estradiol- bzw. Estradiol/NETA-Substitution gleichermaßen reduziert werden können [5].

Die Stabilität atherosklerotischer Plaques scheint insbesondere im Bereich der Koronargefäße eine wichtige Rolle zu spielen. Verschiedene Proteinasen dürften hierfür mitverantwortlich sein, unter ihnen die Kollagenase MMP-1 [6]. Die Synthese der Vorstufe von MMP-1, das Zymogen pro-MMP-1, wurde sowohl durch Tibolon als auch durch die E2/NET-Kombination gehemmt. Allerdings war hier die E2/NET-Kombination signifikant wirksamer als Tibolon. Durch diese Wirkung könnten beide Hormontherapien manifeste atherosklerotische Plaques stabilisieren und somit die akuten Koronarsyndrome wie Angina pectoris, Myokardinfarkt und Schlaganfall verzögern.

Die Migration und Proliferation der Gefäßmuskelzellen ist in der Frühentwicklung der Atherosklerose ein wichtiger Schritt [15]. Tibolon zeigte keine signifikante Wirkung auf das Wachstum von weiblichen Koronarmuskelzellen, wohingegen die E2/NET-Kombination eine signifikante Hemmung aufwies. Wie wir in anderen Untersu-

Heruntergeladen von: University of Pennsylvania Libraries. Urheberrechtlich geschützt.

chungen am gleichen Modell feststellen konnten, wird die Proliferation von glatten Muskelzellen auch durch eine Estradiol/Medroxyprogesteronacetat-Kombination nicht gehemmt [16]. Somit scheint dieser für die Pathogenese der Arteriosklerose wichtiger Schritt besonders sensitiv auf die unterschiedlichen Gestagene zu reagieren.

Zur generellen Beurteilung der durchgeführten In-vitro-Experimente ist zu vermerken, dass vergleichbare Untersuchungen, d. h. In-vitro-Experimente zur direkten Wirkung von Tibolon auf die Gefäßzellen, bisher nicht vorliegen. Bisher ist auch nicht bekannt, ob und zu welchen Metaboliten Tibolon in den vaskulären Zellen metabolisiert wird. Es ist durchaus vorstellbar, dass in vivo die Konzentrationen der Tibolon-Metaboliten aufgrund des intestinalen und hepatischen First-pass-Effektes anders verlaufen als in unseren In-vitro-Versuchen, je nach metabolischer Aktivität der Gefäßzellen. Somit werden möglicherweise in vivo die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Marker andersartig beeinflusst. Insgesamt erscheint unserer Ansicht nach zur Frage der Metabolisierung von Tibolon bzw. seiner Bioverfügbarkeit auch noch einiges unklar. Die als „gewebsspezifisch" bezeichneten Eigenschaften des Tibolon werden für eine Therapie in der Postmenopause als vorteilhaft gegenüber einer herkömmlichen Estrogen/Gestagen-Substitution betrachtet. Aus biochemischer Sicht können wir allerdings kaum nachvollziehen, dass ein derart spezifisches und in jeder Beziehung günstiges Metabolitenmuster entstehen soll, wie dies eingangs für die verschiedenen Indikationsbereiche beschrieben wurde. Die enzymatische Ausstattung der Gewebe ist individuell stark verschieden. Primär wird eine oral verabreichte Substanz in der Leber metabolisiert; die weiteren peripheren Abbauschritte sind nachgeordnet und für Pharmaka nur in Ausnahmefällen von Bedeutung. Diesbezüglich fehlen Angaben über das prozentuale Verteilungsmuster der Hauptmetabolite im Blut nach oraler Gabe. Aufgrund der chemischen Struktur von Tibolon und z. B. auch aufgrund seiner Effekte im Lipidprofil (starke Senkung von HDL-Cholesterin, Senkung der Triglyzeride und Apolipoprotein (a)) muss man annehmen, dass der Norethisteron-Metabolit bereits bei der hepatischen Passage entstehen kann. Darüber hinaus hat Tibolon auch unabhängig von den möglichen Metaboliten ausgeprägte Eigenwirkungen, z. B. in der Potenz, bestimmte Enzymaktivitäten im Brustgewebe zu hemmen [10]. In den vorliegenden Untersuchungen wird primär die Effektivität des Tibolon untersucht. Falls jedoch eine Metabolisierung erfolgt, sollten die verwendeten menschlichen Gewebezellkulturen diesbezüglich den In-vivo-Verhältnissen weitgehend entsprechen, ausgehend von gleicher Enzymausstattung.

Wie bei anderen vergleichbaren In-vitro-Untersuchungen so liegen auch in den vorliegenden Experimenten die effektiven Dosierungen im pharmakologischen Bereich. Es ist jedoch allgemein anerkannt, dass in Kurzzeitexperimenten, wie hier durchgeführt, zumeist hohe Dosierungen notwendig sind, um Effekte zu erzielen, die klinisch unter Langzeitbehandlung mit wesentlich niedrigeren Konzentrationen erreicht werden können. Desweiteren treten in vivo lokal im Gewebe häufig durch Anreicherung unter Dauerapplikation viel höhere Substanzkonzentrationen auf, als sie im Serum zu messen sind. Toxische Effekte durch die höchsten verwendeten Konzentrationen in den vorliegenden Experimenten wurden dadurch ausgeschlossen, dass entsprechende Zellviabilitäts-Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Versuchsanzahl pro Konzentration konnte auf Dreifachbestimmungen in zwei verschiedenen Experimenten beschränkt werden, da die Variationskoeffizienten unter 15 % lagen.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass Tibolon im gewählten Modell verschiedene Parameter der Endothelfunktion positiv beeinflussen kann. Gegenüber einer Estradiol/Norethisteron-Kombination hatte Tibolon in dieser Hinsicht aber keine Vorteile. Unseren Ergebnissen zufolge dürfte Tibolon vor allem bei pathophysiologischen Vorgängen im Frühstadium der Atherogenese einer Estradiol/Norethisteron-Kombination unterlegen sein, da es Marker wie Adhäsionsmoleküle und Chemokine sowie die Gefäßmuskelzellen-Proliferation nicht positiv beeinflussen konnte.

In-vitro-Experimente können keinesfalls klinische Studien ersetzen. Sie können jedoch wesentlich dazu beitragen, Wirkmechanismen aufzuklären. Bei unseren Experimenten wurden erstmals menschliche Zellen und mit den Koronararterien das für die Fragestellung wichtigste Gefäßbett verwendet. Dasselbe Modell haben wir auch für andere Fragestellungen wie zum Vergleich der Wirkungen der Gestagene Norethisteron und Medroxyprogesteronacetat auf die Muskelzellproliferation eingesetzt [16]. Unsere diesbezüglichen Ergebnisse haben David F. Archer zu einem Editorial „progestogen effects on coronary arteries: the need for definite clinical trials" [1] bewogen, mit der Folgerung, dass die wichtigste Konsequenz aus experimentellen Untersuchungen die Durchführung von klinischen Studien ist, wobei diejenigen Substanzen angewandt werden sollten, die in experimentellen Modellen die größte Aussicht versprechen. Nach den vorliegenden experimentellen Untersuchungen liegt die Forderung nahe, Tibolon versus Estradiol/Norethisteron in einer Interventionsstudie mit klinischen Endpunkten zu vergleichen.

Literatur

[1] Archer DF. Progestogen effects on coronary arteries: the need for definite clinical trials. Menopause 2001; 8: 1–2

[2] Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. Annu Rev Med 1994; 45: 361–378

[3] Bjarnason NH, Bjarnason K, Haarbo J, Bennink HJ, Christiansen C. Tibolone: influence on markers of cardiovascular disease. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 1752–1756

[4] Blann AD, McCollum CN. Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. Thromb Haemost 1994; 74: 151–154

[5] Brückmann M, Salbach B, Lang S, von Holst T, Kübler W, Salbach PB. Elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 in postmenopausal women – effect of hormone replacement therapy. J Am Coll Cardiol 2000; 35 (Suppl A): 254

Heruntergeladen von: University of Pennsylvania Libraries. Urheberrechtlich geschützt.

[6] George SJ. Therapeutic potenzial of matrix metalloproteinases inhibitors in atherosclerosis. Expert Opinion Invest Drugs 2000; 9: 993–1007
[7] Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA et al. Postmenopausal hormone therapy and mortality. N Engl J Med 1997; 336: 1769–1775
[8] Haenggi W, Bersinger NA, Mueller MD, Birkhäuser MH. Decrease of serum endothelin levels with postmenopausal hormone replacement therapy or tibolone. Gynecol Endocrinol 1999; 13: 202–205
[9] Hanke H, Hanke S, Brehme U, Bruck B, Finking G, Mueck AO, Schmahl FW, Haasis R, Hombach V. Inhibition of the protective effect of estrogen by progesterone in experimental atherosclerosis. Atherosclerosis 1996; 121: 129–138
[10] Kloosterboer HJ. Tibolone and ist metabolites: pharmacology, tissue specificity and effects in animal models of tumors. Gynecol Endocrinol 1997; 11: 63–68
[11] Mendelsson ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. New Engl J Med 1999; 340: 1801–1811
[12] Moore RA. Livial: a review of clinical studies. Br J Obstet Gynecol 1999; 106 (Suppl 19): 1–21
[13] Reape TJ, Groot TH. Chemokines and atherosclerosis. Atherosclerosis 1999; 147: 213–225
[14] Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentrations of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. Lancet 1998; 351: 88–92
[15] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. N Engl J Med 1986; 314: 488–500
[16] Seeger H, Wallwiener D, Mueck AO. Effect of medroxyprogesterone acetate and norethisterone on serum-stimulated and estradiol-inhibited proliferation of human coronary artery smooth muscle cells. Menopause 2001; 8: 5–9
[17] Simoncini T, Genazzani AR. Tibolone inhibits leucocyte adhesion molecule expression in human endothelial cells. Mol Cell Endocrinol 2000; 162: 87–94
[18] Teede HJ, McGrath BP, Smolich JJ, Malan E, Kotsopoulos D, Liang YL, Peverill RE. Postmenopausal hormone replacement therapy increases coagulation activity and fibrinolysis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1404–1409
[19] Van Baal WM, Emeis JJ, Kenemans P, Kessel H, Peters-Muller ERA, Schalklwijk CG, van der Mooren MJ, Stehouwer CDA. Short-term hormone replacement therapy: reduced levels of soluble adhesion molecules. Eur J Clin Invest 1999; 29: 913–921
[20] Winkler UH, Altkemper R, Kwee B, Helmond FA, Coelingh-Bennink HJ. Effects of tibolone and continuous combined hormone replacement therapy on parameters in the clotting cascade: a multicenter, double-blind, randomized study. Fertil Steril 2000; 74: 10–19
[21] Zandberg P, Peters JLM, Demacker PN, Smit MJ, de Reeder EG, Smit MJ, Meuleman DG. Comparison of the antiatherosclerotic effect of tibolone with that of estradiol and ethinyl estradiol in cholesterol-fed, ovariectomized rabbits. Menopause 2001; 8: 96–105

PD Dr. Dr. A.O. Mueck
Bereich Gynäkologische Endokrinologie und Menopause
Universitäts-Frauenklinik
Schleichstr. 4
D-72076 Tübingen
Fax: + 49-70 71/29 48 01
E-mail: endo.meno@med.uni-tuebingen.de

Heruntergeladen von: University of Pennsylvania Libraries. Urheberrechtlich geschützt.