

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie der  
Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss von chronischem Rauchen auf die vaskuläre Endothelfunktion  
bei gesunden jungen Frauen zu verschiedenen Zeitpunkten des  
physiologischen Menstruationszyklus**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Simone Müller

aus Jena

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. V. Stangl  
                             2. Prof. Dr. med. A. Staudt  
                             3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Dechend

Datum der Promotion:  04.02.2011

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
BMI	Body-Mass-Index
B-Mode	Brightness mode (Bild in verschiedenen Helligkeits- oder Graustufen)
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CrP	C-reaktives Protein
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
ED	Endotheliale Dysfunktion
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
E-Selektin	Endotheliales lektinähnliches Transmembranprotein (Adhäsionsprotein)
FMD	Flow-Mediated Dilation (flussvermittelte, endothelabhängige Vasodilatation)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HDL	High Density Lipoprotein
IMT	Intima Media Thickness (Intima-Media-Dicke)
ICAM	Intercellular Adhesion Moleculs (interzelluläre Adhäsionsmoleküle)
KHK	Koronare Herzkrankheit
LH	Luteinisierendes Hormon
LDL	Low Density Lipoprotein
L-NMMA	NG-monomethyl-L-arginine (NO-Synthase-Inhibitor)
M+1	1. Tag der Menstruationsblutung
M+3	Menstruationsphase (Tag 3 nach Einsetzen der Menstruation)
M+7	Mittlere Follikelphase (Tag 7 nach Einsetzen der Menstruation)
M-5	Mittlere Lutealphase (5 Tage vor Einsetzen der nächsten Menstruation)
MW	Mittelwert
NMD	Nitrate-Mediated Dilation (nitratvermittelte, endothelunabhängige Vasodilatation)
NO	Stickstoffmonoxid
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor-1)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHBG	Sex Hormone Binding Globuline (sexualhormonbindendes Globulin)

Tab.	Tabelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
t-PA	Tissue-Plasminogen-Activator (Gewebs-Plasminogen-Aktivator)
TSH	Thyroidea Stimulating Hormone (thyroideastimulierendes Hormon; Thyreotropin)
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecules (Gefäßzelladhäsionsmoleküle)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen	1
1.2	Atherogenese und Endothelfunktion	3
1.3	Östrogenwirkungen	5
1.3.1	Östrogene und Endothelfunktion	5
1.3.2	Östrogene und Lipide	6
1.3.3	Weitere Östrogenwirkungen	7
1.4	Risikofaktor Rauchen	8
1.4.1	Rauchen und kardiovaskuläre Erkrankungen	8
1.4.1.1	Rauchen und Endothelfunktion	9
1.4.1.2	Rauchen und Inflammation	9
1.4.1.3	Rauchen und Lipidprofil	10
1.4.1.4	Rauchen und Thrombogenität	11
1.4.2	Rauchen als Risikofaktor prämenopausaler Frauen	12
<b>2.</b>	<b>Ziel der Studie</b>	<b>13</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1	Studienpopulation	14
3.1.1	Rekrutierung der Probandinnen	14
3.1.2	Einschlusskriterien	14
3.1.3	Ausschlusskriterien	14
3.1.4	Eingangsvisite	15
3.2	Studienprotokoll	16
3.2.1	Studienvisite und Blutentnahme	17
3.2.2	Ablauf der Endothelfunktionsmessungen	18
3.2.3	Messung der endothelabhängigen Vasodilatation (FMD)	19
3.2.4	Messung der endothelunabhängigen Vasodilatation (NMD)	20
3.2.5	Messung der Intima-Media-Dicke (IMT)	21
3.3	Auswertung der Endothelfunktionsmessungen	22
3.4	Auswertung der Intima-Media-Dicke	23

3.5	Statistik	24
<b>4.</b>	<b>Resultate</b>	<b>25</b>
4.1	Studienpopulation	25
4.2	Zyklische Schwankungen der Sexualsteroidoide	29
4.3	Endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatation	31
4.4	Intra- und Inter-Untersucher-Variabilität	36
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>37</b>
5.1	Bewertung der Studienergebnisse im Kontext der gegenwärtigen Literatur	37
5.2	Limitationen	43
5.3	Kritische Betrachtung der Methode	44
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>63</b>
<b>10.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>65</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Epidemiologie**

Herz-Kreislaufkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. In Deutschland erlag 2007 fast jeder zweite Verstorbene (43,4 %) einer kardiovaskulären Erkrankung, wobei die meisten Todesfälle aufgrund ischämischer Herzkrankheiten (139 808 Todesfälle) verzeichnet wurden. Im Vordergrund stehen dabei in diesem Kollektiv der akute sowie der rezidivierende Myokardinfarkt mit insgesamt 61 040 Todesfällen (Statistisches Bundesamt 2007). Auch bei Frauen stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die bedeutendste Todesursache dar. In den Vereinigten Staaten versterben jährlich mehr als 460 000 Frauen an einer kardiovaskulären Erkrankung, wobei etwa 250 000 der Todesfälle auf eine koronare Herzerkrankung (KHK) zurückzuführen sind (Rosamond et al. 2007). Im Gegensatz zu einer kontinuierlichen Abnahme der Mortalität bei den Männern in den letzten Jahren ist dieser Trend bei den Frauen weniger zu beobachten. Seit 1984 versterben in den USA jährlich mehr Frauen als Männer an kardiovaskulären Erkrankungen (Rosamond et al. 2007).

Die Inzidenz der koronaren Herzkrankheit bei prämenopausalen Frauen liegt deutlich unter der von Männern, was der hormonellen Protektion durch endogene Östrogene zugeschrieben wird. Erst nach der Menopause kommt es zu einer Angleichung der Inzidenz aufgrund der Zunahme der KHK bei den Frauen. In der Framingham Studie zeigten beispielsweise Frauen über 55 Jahre eine zehnfache Inzidenz der koronaren Herzkrankheit verglichen mit Frauen im Alter von 35 - 54 Jahren (Lerner et al. 1986). Obwohl das Risiko für einen akuten Myokardinfarkt bei prämenopausalen Frauen gering ist, zeichnet sich seit einigen Jahren ein beunruhigender Trend hin zu einer Zunahme der Inzidenz und der Mortalität ab. Heute treten bereits circa 4 % der Herzinfarkte bei prämenopausalen Frauen auf (Waldecker et al. 2003). Dabei ist die Mortalitätsrate bei jungen Frauen deutlich höher als bei gleichaltrigen Männern (Vaccarino et al. 1998, Greenland et al. 1991). Dies wird einer längeren Prähospitalzeit aufgrund unspezifischerer Symptome, einer verzögerten Diagnostik und der verspäteten Einleitung adäquater Therapien zugeschrieben (Vaccarino et al. 1999).

Klassische Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie und familiäre Dispositionen sind maßgeblich an der Entstehung und

Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt. Waldecker et al. konnten in einer Studie bei prämenopausalen Frauen mit akutem Myokardinfarkt eine hohe Koinzidenz mit dem Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren (im Durchschnitt 2,9 Risikofaktoren) nachweisen (Waldecker et al. 2003). Khot und Kollegen fanden heraus, dass die Prävalenz von Risikofaktoren in Verbindung mit einer koronaren Herzerkrankung bei Frauen signifikant höher ist als bei Männern. 85-90 % der jungen Frauen mit KHK wiesen in dieser Untersuchung mindestens einen klassischen Risikofaktor auf. Es wurde gezeigt, dass dem Rauchen eine besondere Bedeutung in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen zukommt, da es den verfrühten Eintritt kritischer Ereignisse (etwa 10 Jahre eher) begünstigt (Khot et al. 2003). Studien zur Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren beschreiben einen sukzessiven Anstieg des Rauchens bei Frauen in Deutschland, insbesondere im Alter unter 40 Jahren, wohingegen bei Männern ein Rückgang des Zigarettenrauchens zu verzeichnen ist (Lampert et al. 2005). Dieser Trend führt zu einer beachtlichen Risikoerhöhung bei Frauen. Dass sie im Durchschnitt weniger Zigaretten pro Tag rauchen, bedeutet in diesem Zusammenhang keine wesentliche Entlastung. Beispielsweise zeigten in der Nurses Health Study Raucherinnen mit einem geringen Verbrauch von 1 bis 4 Zigaretten täglich bereits ein zweifach erhöhtes koronares Mortalitätsrisiko gegenüber Nichtraucherinnen (Willett et al. 1987).

Die vorzeitige Atherosklerose scheint auch bei jungen Frauen in der Pathogenese des akuten Myokardinfarktes ein entscheidender Faktor zu sein. So konnten bei 27 von 31 prämenopausalen Frauen mit akutem Myokardinfarkt Zeichen der Koronaratherosklerose nachgewiesen werden (Waldecker et al. 2003). Die Gefäßdurchmesser der Arterien sind bei Frauen im Vergleich zu Männern geringer, was in Verbindung mit der Entwicklung einer Atherosklerose einen zusätzlich nachteiligen Effekt bedeutet (Hu et al. 2008). Im Unterschied zu älteren Frauen und Männern, bei denen meist die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques zu einem kritischen Ereignis führt, scheint bei prämenopausalen Frauen die Plaqueerosion ausschlaggebend zu sein. Darüber hinaus wurden in dieser Altersgruppe weniger Koronarstenosen beobachtet. Dies führt zu der Annahme, dass neben der Atherosklerose geschlechts- und altersspezifische Mechanismen, beispielsweise Veränderungen von Koagulabilität, Rheologie und genetischen Dispositionen die Entstehung von akuten Myokardinfarkten bei jungen Frauen begünstigen (Vaccarino et al. 1999). Die Wirkungen von endogenem Östrogen scheinen in diesem Kontext einen wichtigen Stellenwert einzunehmen.

## 1.2 Atherogenese und Endothelfunktion

Kardiovaskuläre Erkrankungen entstehen im Wesentlichen auf dem Boden atherosklerotisch veränderter Gefäße. Unter Atherosklerose versteht man eine inflammatorische Systemerkrankung der Arterien. Bereits im frühen Lebensalter können erste Gefäßveränderungen nachgewiesen werden. Durch wiederholte Schädigungen über längere Zeiträume können sich irreversible Ablagerungen manifestieren, die zum klinischen Bild der Atherosklerose führen und entweder durch progressives Wachstum eine Lumeneinengung verursachen oder durch Ruptur oder Erosion thrombusbedingte akute Ischämien hervorrufen (Ross 1999, Stary et al. 1994).

Ein frühes Ereignis in der Entwicklung der Atherosklerose stellt die endotheliale Dysfunktion (ED) dar. Unter diesem Begriff werden sämtliche Störungen der Endothelfunktion zusammengefasst, insbesondere veränderte Vasoreaktivität, Verlust antikoagulatorischer und antiinflammatorischer Eigenschaften, Dysregulationen des vaskulären Remodeling und verstärkte Vaskulogenese (Poredoš 2002). Das vaskuläre Endothel, bestehend aus einer dünnen Schicht von Zellen in allen Blutgefäßen des Körpers, übernimmt zahlreiche auto- und parakrine Funktionen. Es spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der vaskulären Homöostase, da es eine Reihe von Substanzen synthetisiert und freisetzt, die sowohl Gefäßtonus und Gefäßwandstruktur modulieren, als auch die Interaktion von Komponenten des zirkulierenden Blutes mit der Gefäßwand steuern (Vane et al. 1990). Eine intakte Endothelfunktion ist gekennzeichnet durch das Überwiegen von antiadhäsiven, antithrombotischen und antiinflammatorischen Eigenschaften und schützt damit vor der Entstehung atherosklerotischer Läsionen. Eine besondere Bedeutung für die vaskuläre Homöostase kommt Stickstoffmonoxid (NO) zu, welches durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin gebildet wird. Es wirkt vasodilatatorisch durch cGMP-vermittelte Relaxation der subendothelialen glatten Gefäßmuskelschicht und gefäßprotektiv durch Hemmung von Adhäsion und Invasion inflammatorischer Zellen, der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und der Aggregation von Thrombozyten (Shimokawa 1999).

Nach Schädigung des endothelialen Zellverbandes, beispielsweise durch atherogene Risikofaktoren wie Hyperlipoproteinämie, freie Radikale aus Zigarettenrauch, Diabetes mellitus oder Bluthochdruck, kommt es zur endothelialen Dysfunktion. Die ED ist gekennzeichnet durch eine gestörte Balance zwischen vasokonstriktorisches und vasodilatatorischen Mediatoren,

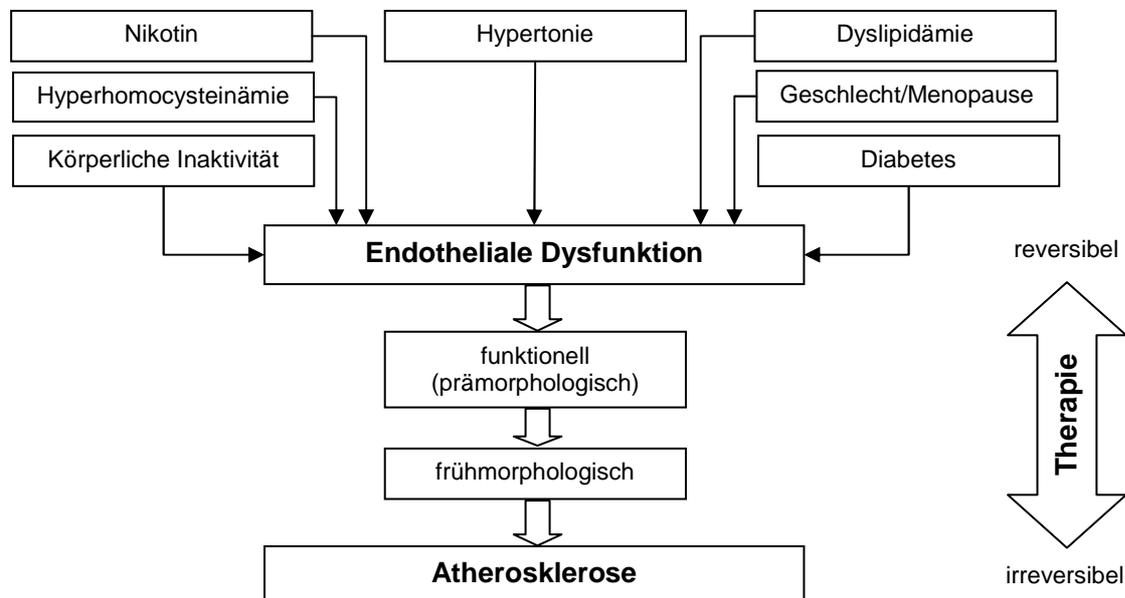
entzündungsmodulierenden Stoffen sowie pro- und antikoagulatorischen Mediatoren. Es resultiert ein pathologischer Zustand, der durch Vasokonstriktion, vermehrte Monozytenadhäsion, erhöhte Permeabilität der Endothelzellschicht für Monozyten, Makrophagen und Lipoproteine, erhöhte Thrombozytenaggregation und verstärkte Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen gekennzeichnet ist (Widlansky et al. 2003). Ursächlich kommt der verminderten Aktivität und Bioverfügbarkeit von NO hierbei eine besondere Bedeutung zu. Verschiedene Pathomechanismen, wie die reduzierte Expression und Verfügbarkeit der endothelialen NO-Synthase, der Mangel an Co-Substraten oder der gesteigerte Abbau von NO durch die Wirkung von reaktiven Sauerstoffradikalen und oxidierten Lipiden können zugrunde liegend sein.

Korrelat einer ED ist die Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation, die bereits frühzeitig bei beschwerdefreien Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen werden kann (Celermajer et al. 1994, 1992). Neben der invasiven Bestimmung mittels Koronarangiographie nach intraarterieller Gabe von Acetylcholin konnte, durch die Quantifizierung der flussvermittelten Dilatation der Arteria brachialis (FMD) mit Hilfe hochauflösendem Ultraschalls, ein nicht-invasives Verfahren entwickelt werden, das einen breiteren klinischen Einsatz erlaubt und beliebig wiederholbar ist. Im Mittelpunkt dieser Methode steht die Messung der Dilatation der Arteria brachialis nach Induktion von Scherstress durch Erzeugung einer reaktiven Hyperämie. Als Reaktion auf den postischämisch erhöhten Blutfluss durch die Arterie kommt es über die gesteigerte endotheliale Bildung des Mediators Stickstoffmonoxid zu einer Dilatation der Arterie. Die Zunahme des Gefäßdiameters gilt als Maß der endothelialen Funktion (Moens et al. 2005, Celermajer et al.1994). Vergleichende Studien zeigen eine signifikante Korrelation zwischen peripherer und koronarer Endothelfunktion (Anderson et al. 1995). Deshalb stellt die Messung der endothelabhängigen Vasodilatation der Arteria brachialis eine geeignete Möglichkeit zur Diagnostik der endothelialen Dysfunktion, beziehungsweise zur Stratifizierung des kardiovaskulären Risikos dar (Celermajer et al. 1994).

Die endotheliale Dysfunktion ist ein potentiell reversibler Zustand. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass die Umstellung von Lebensgewohnheiten (Nikotinkarenz, körperliche Aktivität) oder die Einnahme von Medikamenten (Statine, ACE-Hemmer, Hormonersatz, Vitamin C) zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führt (Widlansky et al. 2003, Kelm et al.1999, Celermajer 1997). Diesem Sachverhalt kommt im Hinblick auf die Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen eine besondere Bedeutung zu.

Abb. 1 veranschaulicht die Bedeutung der endothelialen Dysfunktion im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose.

**Abb. 1:** Bedeutung der endothelialen Dysfunktion im Kontext der Atherogenese (nach Balletshofer et al. 2003)



Als struktureller Marker des kardiovaskulären Risikos gilt darüber hinaus die Bestimmung der Intima-Media-Dicke (IMT). Sie kann nicht-invasiv mittels hochauflösenden Ultraschalls der Arteria carotis communis gemessen werden und wird in der Literatur als Indikator einer generalisierten Arteriosklerose dargestellt (Grobee et al. 1994, Pignoli et al. 1986).

### 1.3 Östrogenwirkungen

#### 1.3.1 Östrogene und Endothelfunktion:

Östrogene beeinflussen den Gefäßtonus durch gesteigerte Freisetzung von NO und Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen. Im Tiermodell konnte durch Östrogenbehandlung eine Vasodilatation in verschiedenen Gefäßarealen einschließlich der Koronararterien beobachtet werden (Keaney et al. 1994, Jiang et al. 1991, Williams et al. 1990, Gisclard et al. 1988).

Prämenopausale Frauen zeigen im Zyklusverlauf Änderungen der Endothelfunktion, die mutmaßlich auf der vasoprotektiven Wirkung endogener Östrogene beruhen (Williams et al.

2001). So konnten Hashimoto et al. in ihrer Untersuchung junger Frauen eine positive Korrelation zwischen Serum-Östrogenwerten und FMD demonstrieren. Die endothelabhängige Vasodilatation der Arteria brachialis war in der Menstruationsphase am geringsten, mit einem signifikanten Anstieg in Follikel- und Lutealphase. Dies reflektierte in dieser Studie die Veränderungen des Östrogens im Zyklusverlauf, mit niedrigen Werten während der Menstruationsphase und einem Peak in der Follikelphase (Hashimoto et al. 1995). Klinisch spiegeln sich diese Zyklusschwankungen der Gefäßfunktion in der Tatsache, dass koronare Ereignisse bei prämenopausalen Frauen gehäuft in der Menstruationsphase des Zyklus beobachtet werden können (Hamelin et al. 2003, Mukamal et al. 2002). Darüber hinaus ist in dieser Phase bei jungen Frauen mit angiographisch nachgewiesener KHK die ergometrische Belastungszeit bis zum Einsetzen von Brustschmerz und Veränderungen der ST-Strecke im EKG am kürzesten (Lloyd et al. 2000). Eine gefäßrelaxierende Wirkung ist auch bei postmenopausalen Frauen unter Hormonersatztherapie nachweisbar. So konnten Bush et al. zeigen, dass die orale Gabe von Östrogenen bei postmenopausalen Frauen zu einer signifikanten Verbesserung der FMD führte, mit einem Maximum der Wirkung nach 6 Monaten (Bush et al. 1994). Lieberman et al. wiesen bei 13 postmenopausalen Frauen 9 Wochen nach Beginn einer Östrogentherapie eine Zunahme der FMD von 6,8 % auf 13,5 % nach (Lieberman et al. 1994). Außerdem verzögerte die sublinguale Gabe von Östradiol das Auftreten belastungsinduzierter Ischämien bei postmenopausalen Frauen mit angiographisch nachgewiesener KHK, was ebenfalls auf den vasodilatierenden Effekt zurückzuführen ist (Rosano et al. 1993).

### **1.3.2 Östrogene und Lipide**

Frauen weisen vor der Menopause ein günstigeres Lipidprofil mit höheren HDL- und niedrigeren LDL-Cholesterinwerten auf. Verschiedene Studien zeigen, dass sich diese Konstellation postmenopausal häufig umkehrt, was zu einer Erhöhung des kardiovaskulären Risikos beiträgt. In der Framingham Studie wurden Frauen im Alter zwischen 29 und 62 Jahren über einen Zeitraum von 18 Jahren untersucht. Es konnte ein signifikanter Anstieg des Gesamtcholesterins zwischen prä- und postmenopausaler Untersuchung festgestellt werden, wobei der größte Anteil der Zunahme kurze Zeit nach Einsetzen der Menopause zu verzeichnen war (Hjortland et al. 1976). Diese Beobachtungen stützten die Hypothese, dass Sexualsteroid eine direkte Wirkung auf den Lipoproteinspiegel haben. Zahlreiche Untersuchungen postmenopausaler Frauen bestätigten diese Behauptung. So konnte unter postmenopausaler enteraler Östrogensubstitution eine Senkung von Gesamtcholesterol- und LDL-Spiegeln zwischen 15-20 % und eine Steigerung

des HDL-Spiegels um 10 % nachgewiesen werden (Mercurio et al. 2003, Darling et al. 1997, PEPI-Trial 1995, Kuller et al. 1990, Knopp et al. 1988, Cauley et al. 1983). Die beschriebenen Wirkungen von Östrogen auf die Lipoproteinfraktionen zeigen sich auch bei prämenopausalen Frauen (Pahwa et al. 1998, Lussier-Cacan et al. 1991). So konnten Lyons-Wall und Kollegen bei 11 jungen Frauen signifikante Änderungen im Lipidprofil während des Menstruationszyklus, vornehmlich in der Follikelphase, finden. Die HDL-Spiegel zeigten bis zur Ovulation einen mittleren Anstieg um 12 % und waren in diesem Zeitraum signifikant positiv mit den Östrogenwerten korreliert. Gesamtcholesterol und LDL-Cholesterol wiesen einen präovulatorischen Anstieg um ca. 10 % und einen postovulatorischen Abfall auf, ohne Korrelation mit den Sexualhormonen. Auch die Triglyceride zeigten einen, wenn auch nicht signifikanten, Anstieg zum Zeitpunkt der Ovulation (Lyons-Wall et al. 1994). Die Studienlage bezüglich zyklischer Schwankungen der HDL-Werte ist jedoch nicht einheitlich. So wiesen Barnett und Kollegen eine geringe Erhöhung der HDL-Werte (+ 2,5 %) in der Lutealphase gegenüber der Follikelphase nach (Barnett et al. 2004). In anderen Studien bestätigten sich diese Änderungen des HDL-Cholesterins im Zyklusverlauf nicht (Tikkanen et al. 1986). Initial wurde die atheroprotektive Wirkung von Östrogenen ausschließlich über die günstigen Einflüsse auf das Lipidprofil erklärt. Durch die Identifikation anderer Östrogenwirkungen (vasodilatierend, antiproliferativ) wurde dies aber korrigiert, so dass heute nur 25-50 % des protektiven Östrogeneffekts auf die genannten positiven Veränderungen des Lipidprofils zurückgeführt werden.

### **1.3.3 Weitere Östrogenwirkungen**

Die Wirkungen von Östrogenen auf das Blutsystem sind komplex und betreffen pro- und anti-koagulatorische, wie auch pro- und antiinflammatorische Aspekte. Prämenopausale Frauen weisen im Vergleich zu Frauen nach der Menopause niedrigere Fibrinogenkonzentrationen auf (Bonithon-Kopp et al. 1990, Meade et al. 1983). Gleichmaßen waren die Fibrinogenspiegel in einer Untersuchung bei postmenopausalen Frauen sowohl unter Östrogen-Monotherapie als auch unter kombinierter Östrogen/Progesteron-Therapie niedriger als bei Therapie mit einem Placebo (The writing Group for the PEPI-Trial 1995). Fibrinogen gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer KHK. Erhöhte Fibrinogenkonzentrationen führen zu Hyperkoagibilität und damit zu einem erhöhten Risiko thrombembolischer Ereignisse (Kannel et al. 1987). Östrogen steigert die Fibrinolyse durch Anstieg von tissue-plasminogen-activator (t-PA) und Abnahme des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1). Dies konnte sowohl bei prämenopausalen Frauen im

Zyklusverlauf (Giardina et al. 2004) als auch bei postmenopausalen Frauen unter Hormonersatztherapie (Koh et al. 1997) beobachtet werden. Als ungünstige Effekte hinsichtlich der Thromboseneigung sind der Anstieg von Prothrombinfragmenten sowie der Abfall von Antithrombin III und Protein S unter Hormonersatztherapie zu nennen. In der HERS-Studie und der WHI-Studie zeigten sich unter einer Östrogen-Progesteron-Kombinationstherapie signifikant erhöhte Inzidenzen für venöse thrombembolische Ereignisse (Manson et al. 2003, Hulley et al. 1998).

Antiinflammatorische Effekte der Östrogene resultieren aus einer Verringerung von lokalen und zirkulierenden Adhäsionsmolekülen (ICAM, VCAM, E-Selektin), der gesteigerten Bildung des vascular-endothelial-growth-factors (VEGF), der Thrombozytenaggregationshemmung sowie der Hemmung von Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen. Im Zusammenhang resultiert eine anti-atherosklerotische Wirkung (Störk et al. 2002, Mendelsohn et al. 1999). Demgegenüber konnten unter Hormonersatztherapie erhöhte Werte des C-reaktiven Proteins (CrP) beobachtet werden, was einer gesteigerten Entzündungsaktivität entspricht und das kardiovaskuläre Risiko vergrößert (Pradhan et al. 2002, Ridker et al. 1999). Zahlreiche weitere Östrogenwirkungen wurden identifiziert, darunter Veränderungen im Renin-Angiotensin-System (Fischer et al. 2002) sowie die Steigerung von Schlagvolumen und koronarem Blutfluss (Babiker et al. 2001).

## **1.4 Risikofaktor Rauchen**

### **1.4.1 Rauchen und kardiovaskuläre Erkrankungen**

Nikotinabusus gilt als der wichtigste vermeidbare Risikofaktor für Arteriosklerose. In Deutschland rauchten im Jahr 2003 33,2 % der männlichen und 22,1 % der weiblichen Bevölkerung (Statistisches Bundesamt 2003). Obwohl in den letzten Jahren ein leicht rückläufiger Trend bei den Männern feststellbar war, raucht immer noch mehr als 1/3 der männlichen Bevölkerung. Bei den Frauen konnte sogar ein zunehmender Raucheranteil beobachtet werden (Lampert et al. 2005, Junge et al. 1999). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass chronischer Nikotinkonsum eine Schlüsselrolle in der vorzeitigen Entwicklung der koronaren Herzkrankheit einnimmt. Dementsprechend zeigen Raucher erhöhte Inzidenzen für koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt (Law et al. 2003, Willett et al. 1987, Doll et al. 1980). Laut Burns et al. sind 30 % der tabakbedingten Todesfälle den Herz-

Kreislaufkrankungen zuzuschreiben (Burns et al. 2003). Dabei ist das KHK-Risiko bei aktiven Rauchern um 80 % und bei Passivrauchern um 30 % erhöht (Glantz et al. 1995). Beim Bestehen weiterer Risikofaktoren wie Hypertonus, Hyperlipoproteinämie oder Diabetes wird das kardiovaskuläre Risiko potenziert. Die pathophysiologischen Mechanismen, durch die Rauchen zur Induktion und Progression der Arteriosklerose führen, sind komplex und noch nicht völlig aufgeklärt.

#### **1.4.1.1 Rauchen und Endothelfunktion**

Rauchen führt zu einer Schädigung des Endothels, sowohl in peripheren Arterien als auch in Koronargefäßen. Es kommt zu funktionellen und strukturellen Veränderungen, die sich in Störungen der endothelabhängigen Vasodilatation äußern (Yufu et al. 2009, Esen et al. 2004). Beispielsweise konnten Celermajer et al. bei 80 Rauchern eine signifikant verminderte flussvermittelte Vasodilatation der Arteria brachialis (FMD) im Vergleich zu Nichtrauchern feststellen. Außerdem bewiesen sie einen Dosis-Wirkungs-Effekt. Demnach war die FMD bei Rauchern mit mehr als 20 pack years am stärksten eingeschränkt (Celermajer et al. 1993). Eine Verminderung der endothelabhängigen Vasodilatation findet sich bei Aktiv- und Passivrauchern (Celermajer et al. 1996). Auch bei Nichtrauchern konnte nach akuter Einwirkung von Zigarettenrauch eine herabgesetzte FMD nachgewiesen werden (Lekakis et al. 1998). Durch dauerhafte Einstellung des Nikotinkonsums ist eine Verbesserung der Endothelfunktion erreichbar. Im Vergleich zu Nichtrauchern zeigen ehemalige Raucher dennoch eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation (Celermajer et al. 1993).

#### **1.4.1.2 Rauchen und Inflammation**

Nikotinabusus bewirkt eine chronisch entzündliche Reaktion und ist damit unmittelbar an der Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen beteiligt. So konnte bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern eine um 20-25 % erhöhte Leukozytenzahl festgestellt werden (Petitti et al. 1986). Verschiedene inflammatorische Marker, beispielsweise CrP, Interleukin-6, Tumornekrose-Faktor- $\alpha$ , Fibrinogen und Adhäsionsmoleküle wie VCAM, ICAM und E-Selektin sind bei Rauchern ebenfalls erhöht (Bermudez et al. 2002, Tuut et al. 2001, Mazzone et al. 2001, Tracy et al. 1997). Experimentell wurde gezeigt, dass Zigarettenrauch zu einer gesteigerten Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten führt. In Verbindung mit einer bestehenden endothelialen Dysfunktion wird dadurch der vaskuläre Entzündungsprozess weiter stimuliert

(Weber et al. 1996, Shen et al. 1996). Oxidativer Stress durch freie Radikale wird als Hauptursache für die proinflammatorischen Wirkungen des Zigarettenrauchs angenommen. So bewiesen in vivo und in vitro Studien eine gesteigerte Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen unter dem Einfluss von oxidiertem LDL und anderen Produkten der Lipidperoxidation. Durch die Gabe von Antioxidantien konnte dieser Effekt reduziert werden (Weber et al. 1996, Lehr et al. 1994). Zusätzlich scheint Nikotin die Inflammation durch eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten zu unterstützen. Nach Wechsel vom Zigarettenrauchen zur transdermalen Applikation von Nikotin konnte allerdings eine signifikante Abnahme der Leukozytenzahl beobachtet werden. Es zeigten sich unter transdermaler Applikation von Nikotin keine Veränderungen des Fibrinogenspiegels. Deshalb geht man davon aus, dass die Wirkung von Nikotin nicht die Hauptkomponente für den bei Rauchern beobachtbaren systemischen inflammatorischen Zustand ist (Benowitz et al. 1993).

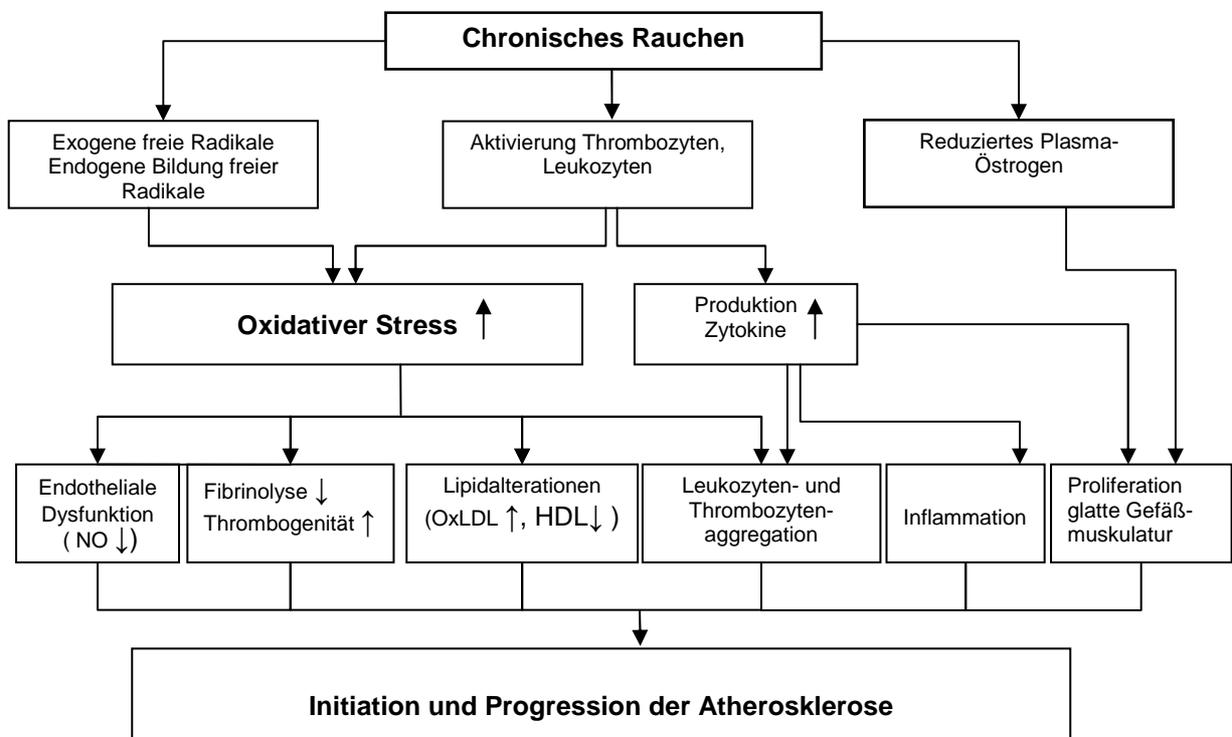
#### **1.4.1.3 Rauchen und Lipidprofil**

Rauchen führt zu Veränderungen im Lipidprofil, die proatherogen wirken. Verschiedene Studien zeigen bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern erniedrigte HDL- sowie erhöhte Gesamtcholesterin-, LDL-, Triglycerid- und Apolipoprotein-A1-Plasmaspiegel (Freeman et al. 1995, Craig et al. 1989). Dabei konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der Intensität des Nikotinkonsums und dem Anstieg des Gesamtcholesterins, beziehungsweise der Abnahme des HDL-Spiegels festgestellt werden (Muscat et al. 1991, Criqui et al. 1980). Eine potentielle Reversibilität zeigt sich im Anstieg der HDL-Konzentrationen bei Personen, die das Rauchen längerfristig aufgaben (Stubbe et al. 1982). Rauchen steigert die Bildung von oxidativ modifiziertem LDL-Cholesterin, welches einerseits proinflammatorisch wirkt und auf der anderen Seite nach Aufnahme in Makrophagen die Atheroskleroseentstehung durch Bildung von Schaumzellen fördert (Frei et al. 1991). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht eindeutig geklärt. Da nach transdermaler oder oraler Gabe von Nikotin keine Veränderungen der Plasmalipide festgestellt werden konnten, werden freie Radikale aus dem Zigarettenrauch primär für die Veränderungen des Lipidprofils verantwortlich gemacht (Thomas et al. 1995, Quensel et al. 1989).

#### 1.4.1.4 Rauchen und Thrombogenität

Bei Rauchern werden signifikant erhöhte Fibrinogenspiegel sowie gesteigerte Blut- und Plasmaviskositäten beobachtet (Wannamethee et al. 2005, Fröhlich et al. 2003, Kannel et al. 1987). Rauchen erhöht die Expression und Aktivität von Tissue-Faktor, ein Bestandteil atherosklerotischer Plaques mit prokoagulatorischer Wirkung, und erniedrigt die Plasmakonzentrationen von Tissue-Faktor-Inhibitor-1, was einer Steigerung der Thrombogenität entspricht (Matetzky et al. 2000). Darüber hinaus führt chronisches Rauchen zu einer Abnahme der endogenen Fibrinolysekapazität, was sich in einer verminderten Sekretion von t-PA und einer erhöhten Plasmakonzentration von PAI-1 zeigt (Newby et al. 2001, 1999, Simpson et al. 1997). Die Aktivierung von Thrombozyten zu vermehrter Adhäsion dürfte außerdem eine wichtige Rolle in der Entstehung thrombotischer Ereignisse bei Rauchern spielen (Rival et al. 1987). Abb. 2 zeigt zusammenfassend die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Wirkungen von chronischem Nikotinkonsum im Hinblick auf die Pathogenese einer Atherosklerose.

**Abb. 2:** Einfluss von Rauchen in der Entstehung der Atherosklerose



## **1.4.2 Rauchen als Risikofaktor prämenopausaler Frauen**

Obwohl Nikotinkonsum in jedem Lebensalter schädlich ist, scheint es besonders bei jungen Frauen, die eine vergleichbar niedrige Gefährdung für kardiovaskuläre Erkrankungen zeigen, zu einer deutlichen Erhöhung des Erkrankungsrisikos durch chronisches Rauchen zu kommen. Khot und Kollegen konnten beispielsweise nachweisen, dass 70 % der Frauen mit koronaren Herz-erkrankungen, die jünger als 45 Jahre alt waren, rauchten (Khot et al. 2003).

Rauchen führt bei prämenopausalen Frauen zu einer Beeinflussung des Menstruationszyklus und der Sexualhormone. Tierexperimentell konnte unter dem Einfluss von Nikotin eine Zunahme regressiver Follikel in den Ovarien und eine Hemmung von Konversionsenzymen nachgewiesen werden, mit daraus folgender verringerter Bildung von Östrogenen (Blackburn et al. 1994). Die verminderte Produktion endogener Östrogene zeigte sich auch in der reduzierten renalen Ausscheidung von Östron, Östradiol und Östriol in der Lutealphase bei jungen Raucherinnen (Mac Mahon et al. 1982). Darüber hinaus treten Raucherinnen 1 - 2 Jahre früher in die Menopause ein und leiden häufiger unter menopausalen Beschwerden (Schmeiser-Rieder et al. 1995; Andersen et al. 1982). Junge Raucherinnen zeigen, verglichen mit Nichtraucherinnen, signifikant niedrigere Serumwerte der Sexualsteroiden, besonders in der Follikel- und Lutealphase des Zyklus (Westhoff et al. 1996). Auch unter oraler Hormonersatztherapie sind die Serumspiegel von Östradiol und Östron bei Raucherinnen im Vergleich zu Nichtraucherinnen signifikant vermindert (Jensen et al. 1988, 1985).

## 2. Ziel der Studie

Obwohl junge Frauen von einer hormonellen Protektion durch endogene Östrogene profitieren, zeigt sich seit einigen Jahren ein beunruhigender Trend hin zu einer Zunahme der Inzidenz von koronaren Herzerkrankungen in dieser Altersgruppe. Dies wird auf eine hohe Koinzidenz mit kardiovaskulären Risikofaktoren zurückgeführt. Dabei scheint chronisches Rauchen einen wichtigen Stellenwert einzunehmen. In der Literatur finden sich derzeit nur wenige Untersuchungen über den Einfluss von Rauchen auf die Endothelfunktion und die Sexualsteroiden bei jungen, prämenopausalen Frauen. Vor diesem Hintergrund untersucht diese Studie den Einfluss von Rauchen auf pathogenetisch relevante Mediatoren der Atherosklerose. Es soll geprüft werden, ob chronisches Rauchen bei gesunden, prämenopausalen Frauen ohne weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren die Endothelfunktion und die Sexualsteroiden im Verlauf eines Menstruationszyklus beeinflusst. Folgende Fragestellungen sollen geklärt werden:

- Beeinflusst chronisches Rauchen die vaskuläre Endothelfunktion bei jungen gesunden Frauen zu verschiedenen Zeitpunkten eines physiologischen Menstruationszyklus?
- Unterscheiden sich vaskuläre Endothelfunktion und Sexualsteroiden bei gesunden Raucherinnen und Nichtraucherinnen während der Menstruationsphase, der mittleren Follikelphase und der mittleren Lutealphase eines physiologischen Menstruationszyklus?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Studienpopulation**

##### **3.1.1 Rekrutierung der Probandinnen**

Die Rekrutierung der Probandinnen erfolgte, nach Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Charite, über Zeitungsannoncen. Es wurden gesunde Frauen im Alter zwischen 25 und 35 Jahre gesucht. Über Telefoninterviews mit 646 Interessentinnen wurden die Frauen vorselektioniert und den Studiengruppen Raucherinnen und Nichtraucherinnen zugeordnet. Es erfolgte die Aufklärung der Interessentinnen bezüglich des Studiendesigns und der geplanten Ultraschalluntersuchungen. Im Weiteren wurde eine umfassende Anamnese bezüglich Gesundheitsstatus, Körpergewicht, Menstruationszyklus und Nikotinkonsum erhoben. Die Auswahl der Probandinnen erfolgte nach Definition zahlreicher Ein- und Ausschlusskriterien, um eine homogene Zusammensetzung der Studiengruppen zu gewährleisten und zusätzliche, das Untersuchungsergebnis beeinträchtigende, Faktoren auszuschließen.

##### **3.1.2 Einschlusskriterien**

- Alter zwischen 25 - 35 Jahre
- regelmäßiger, dokumentierter Menstruationszyklus zwischen 26-32 Tagen
- normale Blutungsdauer von 3-6 Tagen
- Normalgewichtigkeit (BMI 19 - 24 kg/m<sup>2</sup>)
- Raucherinnen: mind. 15 Zigaretten/ Tag seit mindestens 1 Jahr
- Nichtraucherinnen: ohne Nikotinanamnese

##### **3.1.3 Ausschlusskriterien**

- Zyklusunregelmäßigkeiten / Zwischenblutungen
- gynäkologische Erkrankungen
- Einnahme hormoneller Kontrazeptiva/ Hormonspirale
- Chronische Erkrankungen
- Übergewicht

- Medikamenteneinnahme
- kardiovaskuläre Erkrankungen bei Familienangehörigen 1. Grades
- Fettstoffwechselstörungen
- Hypertonie
- Störungen der Blutgerinnung
- Arbeit im Schichtdienst mit Nachtschichten
- Linkshändigkeit
- sportliche Aktivität > 1 Stunde / Woche

### **3.1.4           Eingangsvisite**

Nach erfolgreichem Telefoninterview und Zuordnung der Frauen zu einer der beiden Studiengruppen wurde mit 122 Probandinnen ein Voruntersuchungstermin in der mittleren Lutealphase des folgenden Menstruationszyklus, 5 Tage vor der nächsten zu erwartenden Menstruation (M), vereinbart (M-5). Die Eingangsvisite beinhaltete die Beantwortung eines Fragebogens, eine orientierende klinische Untersuchung, ein Ruhe-EKG, eine Blutdruckmessung und eine Nüchternblutentnahme.

Der Fragebogen enthielt die Familienanamnese mit dem Schwerpunkt der Evaluation von kardiovaskulären Ereignissen, Fragen zur Sozialanamnese sowie eine ausführliche Eigenanamnese. Ziel war es hierbei, möglichst viele Daten zur Vorgeschichte und Lebensweise der Probandin zu erhalten. Schwerpunkte wurden entsprechend den Auswahlkriterien auf Angaben zur Menarche, zu Schwangerschaften, Geburten, Kontrazeption, Gewichtsverlauf, Nikotinabusus, Erkrankungen, Operationen, Ernährung und körperlicher Aktivität gelegt. Für den Studieneinschluss mussten die klinische Untersuchung, das EKG, die Blutdruckmessung sowie die im Rahmen der Nüchternblutentnahme erfassten Laborparameter (siehe Aufzählung Laborparameter Eingangsvisite) Normalbefunde aufweisen. Als weiteres Kriterium zum Studieneinschluss war ein der Lutealphase entsprechendes typisches Profil der Sexualsteroiden (Östrogen, Progesteron, LH, FSH) obligat. Ein Progesteron-Spiegel von >18 nmol/l wurde gefordert, um das Vorliegen eines ovulatorischen Menstruationszyklus zu sichern. Nach der Evaluation der Probandinnen mittels Telefoninterview und Eingangsvisite erfolgte unter der Voraussetzung der schriftlichen Einverständniserklärung der Probandinnen der Studieneinschluss.

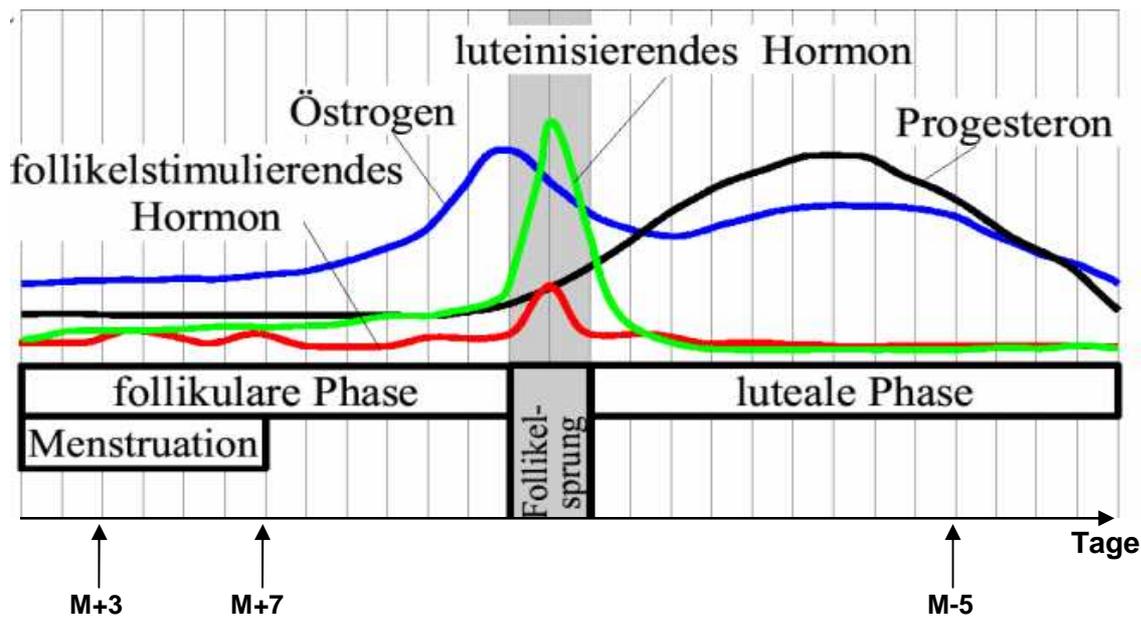
## **Aufzählung Laborparameter Eingangsvisite**

- kleines Blutbild
- Elektrolyte
- Lipoproteine ( Gesamt- Cholesterol, HDL, LDL, Triglyceride )
- Homocystein
- Lipoprotein (a)
- Thyroidea stimulierendes Hormon (TSH)
- Östrogen
- Testosteron
- Progesteron
- Sexualhormon bindendes Hormon (SHBG)
- Dehydroepiandrosteron (DHEAS)
- Luteinisierendes Hormon (LH)
- Follikel stimulierendes Hormon (FSH)
- Prolaktin
- Cortisol

### **3.2 Studienprotokoll**

Nach erfolgreichem Studieneinschluss wurden mit 45 Probandinnen im folgenden Menstruationszyklus drei Studientermine vereinbart (Abb. 3). Diese lagen, ausgehend vom ersten Tag des Menstruationszyklus (M+1) in der Menstruationsphase (M+3), der mittleren Follikelphase (M+7) und der mittleren Lutealphase (M-5) des Zyklus. Der Termin für die Messung in der mittleren Lutealphase (M-5) wurde 5 Tage vor Beginn der nächsten erwarteten Menstruationsblutung vereinbart. Der Ablauf der drei Studienvisiten verlief nach einem standardisierten Schema.

**Abb. 3:** Untersuchungszeitpunkte während des Menstruationszyklus



### 3.2.1 Studienvsiste und Blutentnahme

Die Probandinnen wurden am Studientag um 8:00 Uhr morgens, nach zwölfstündiger Nahrungs- und Nikotinkarenz, in die Abteilung für kardiovaskuläre Funktionsdiagnostik der Charité einbestellt. Es erfolgte eine kurze Evaluation des derzeitigen Gesundheitszustandes und des aktuellen Zyklusverlaufes. Abweichungen im Zyklusverlauf wie Zwischenblutungen, akute Erkrankungen sowie ein erniedrigter Progesteronwert zum Zeitpunkt M-5 ( $<18\text{nmol/l}$ ) führten zum vorzeitigen Studienausschluss. Im Anschluss an die Anamnese erfolgte die Blutentnahme aus einer Antekubitalvene des nichtdominanten Armes. Die Bestimmung von Routineparametern, Sexualsteroiden, endokriner Parameter, inflammatorischer und prokoagulatorischer Mediatoren sowie Mediatoren der Endothelfunktion wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité durchgeführt. Zusätzliche Blutproben wurden zur späteren Aufarbeitung für 15 min bei  $4000\text{ g}$  zentrifugiert und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Danach erfolgte zum Zeitpunkt M+3 die Messung der Intima-Media-Dicke mittels Ultraschall der A. carotis communis. Anschließend wurde die Untersuchung der Endothelfunktion mittels Ultraschall der Arteria brachialis durchgeführt. Sie umfasste die Quantifizierung der endothelabhängigen (flussvermittelte Dilatation; FMD) und der endothelunabhängigen Dilatation (nitrat-vermittelt; NMD) nach oraler Gabe von  $0,4\text{ mg}$  Glyceroltrinitrat.

### **3.2.2 Ablauf der Endothelfunktionsmessung**

Die Endothelfunktion wurde nicht-invasiv mit hochauflösendem Ultraschall (Sonoline Antares, Siemens) bestimmt. Dabei wurde jeweils zuerst die Messung der endothelabhängigen FMD und nach fünfzehnminütiger Pause die Messung der endothelunabhängigen NMD vorgenommen.

Um den Einfluss von Störfaktoren zu minimieren, erfolgten die Untersuchungen in einem abgedunkelten, klimatisierten Raum mit Temperaturen zwischen 20-22 °C. Vor Beginn der Messungen von FMD und NMD wurde der Probandin während einer zwanzigminütigen Ruhephase in liegender Position eine elektrische Blutdruckmanschette am nicht dominanten Oberarm angelegt, um regelmäßige Blutdruckmessungen in fünfminütigen Abständen über den gesamten Untersuchungszeitraum zu gewährleisten. Zusätzlich wurde den Probandinnen, im Hinblick auf die spätere Auswertung der Messung zu identischen Zeitpunkten im Herzzyklus ein kontinuierliches EKG angelegt. Danach erfolgte der Aufbau der Versuchsanordnung.

Zuerst wurde die Arteria brachialis des dominanten Armes unter Verwendung eines hochauflösenden 13 MHz Linearschallkopfes aufgesucht und längs, möglichst über die gesamte Bildbreite, zweidimensional dargestellt (B-Mode). Dazu wurde der Ultraschallkopf ca. 5 cm oberhalb der Ellenbeuge auf der Oberarmbeugeseite longitudinal positioniert. Um die gesamte Messung an derselben Lokalisation des Gefäßes durchzuführen, wurde der Schallkopf sowie der Arm der Probandin in einem extra konstruierten Halteapparat fixiert (Abb. 4). Durch Winkelangaben auf der Halterung und dem gemessenen Abstand von der Regio cubitalis anterior nach proximal ließ sich auch in den Folgeuntersuchungen ein exaktes Wiederauffinden des untersuchten Gefäßabschnittes gewährleisten. Zur Induktion von Scherstress wurde am dominanten Unterarm eine Blutdruckmanschette angelegt. Anschließend wurde der sonographisch dargestellte Gefäßabschnitt mit der Zoomfunktion vergrößert. In der optimalen Einstellung waren Intima, Media und Gefäßlumen der A. brachialis gut zu erkennen. Die Identifikation von anteriorer und posteriorer Arterienwand der Intima war Voraussetzung, um sicher zu sein, dass das Gefäß im Längsschnitt getroffen wurde.

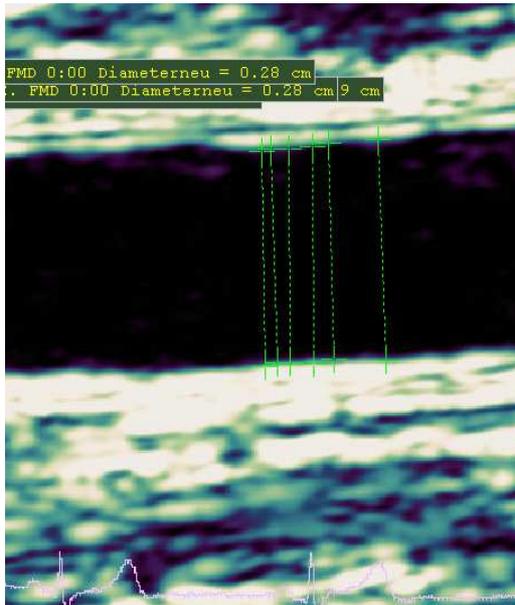
**Abb. 4:** Versuchsaufbau - Fixierung des Schallkopfes und des dominanten Armes in einem speziell angefertigten Halteapparat



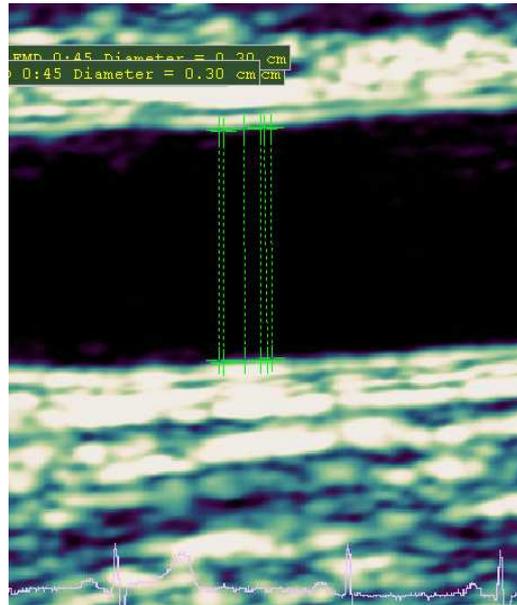
### **3.2.3 Messung der endothelabhängigen Vasodilatation (FMD)**

Vor jeder Messung erfolgte die Bestimmung des Basisdiameters der A. brachialis sowie die Messung der arteriellen Blutflussgeschwindigkeit unter Ruhebedingungen im gepulsten Dopplermodus, beides durch Aufnahme von Bildern in 5s-Clips (Loops). Zur Erzeugung einer reaktiven Hyperämie wurde die Blutdruckmanschette am dominanten Arm anschließend auf suprasystolische Werte (mindestens 50 mmHg über dem systolischen Druck der Probandin oder mindestens 250 mmHg) aufgepumpt. Nach fünf Minuten wurde die Manschette gelöst und der maximale hyperämische Fluss durch die Arterie durch Aufnahme eines 5s-Loops aufgezeichnet. Danach erfolgte die Aufnahme von 5s-Clips der Arteria brachialis jede 15 Sekunden über 2 Minuten, um die Veränderungen des Diameters im Verlauf zu erfassen (Abb. 5 und 6). Als FMD ist die maximale prozentuale Dilatation des Gefäßes im Vergleich zum Ruhediameter nach Okklusion definiert.

**Abb. 5:** Basisdiameter A. brachialis vor Ischämie



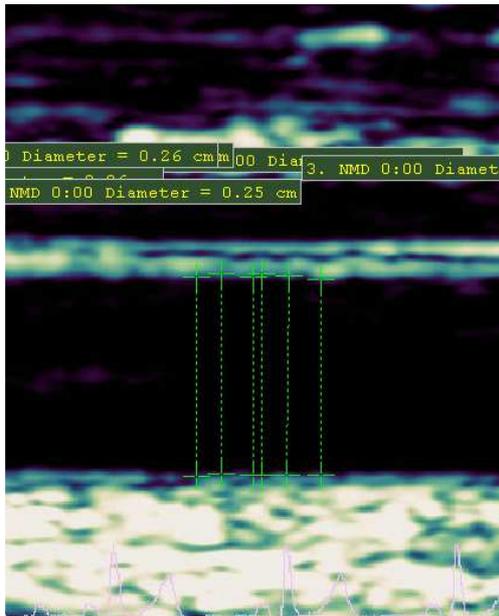
**Abb. 6:** Diameter nach Ischämie (45 s-Wert)



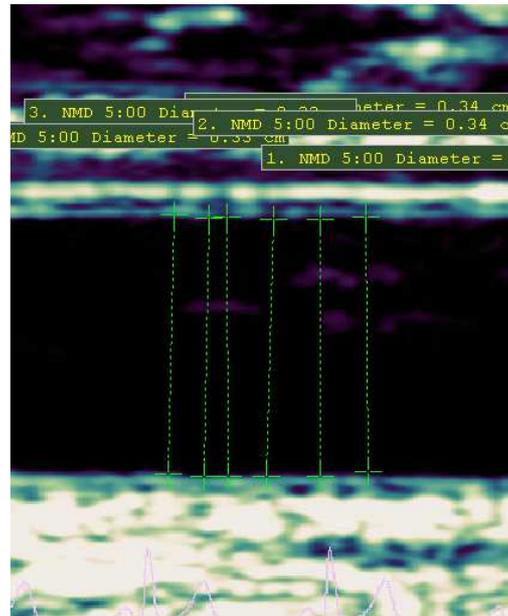
### 3.2.4 Messung der endothelunabhängigen Vasodilatation (NMD)

Nach der FMD-Messung und einer fünfzehnminütigen Erholungsphase wurden erneut Basisdiameter und Ruhedoppler der Arteria brachialis durch Aufnahme von 5s-Clips festgehalten. Zur Messung der endothelunabhängigen Dilatation wurde der Probandin ein Hub (0,4 mg) Nitroglycerinspray (Nitro-lingual®) sublingual verabreicht. Die Zunahme des Diameters der Arterie wurde durch Aufzeichnung von 5s-Loops jede 30 Sekunden über 5 Minuten erfasst, um die endothelunabhängige Vasodilatation im Verlauf messen zu können. Die NMD ist definiert als maximale prozentuale Veränderung des Diameters im Vergleich zum Ruhediameter nach Einnahme von Nitrospray (Abb. 7 und 8). Die gespeicherten Aufnahmen wurden für spätere Analysen im Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM)-Format gespeichert und auf einen Computer transferiert.

**Abb. 7:** Basisdiameter A. brachialis vor Verabreichung von 1 Hub Nitroglycerin



**Abb. 8:** Diameter 5 Minuten nach Verabreichung von 1 Hub Nitroglycerin



### 3.2.5 Messung der Intima-Media-Dicke (IMT)

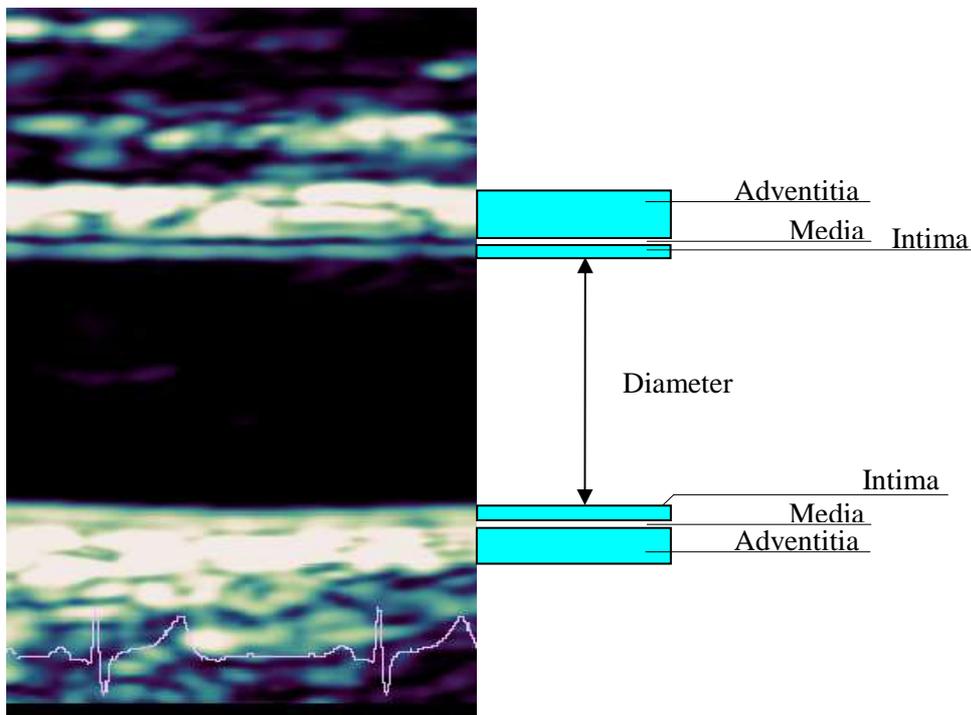
Die sonographische Messung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis erfolgte standardisiert nach der Methode von Wikstrand an der liegenden Probandin (Wikstrand 2007). Nach leichter Überstreckung und Seitneigung des Kopfes wurde der extrakranielle Abschnitt der rechten A. carotis communis mit einem 13 MHz Linear Array Schallkopf (Sonoline Antares, Siemens) duplexsonographisch aufgesucht und im Längsschnitt im B-Modus dargestellt. In der optimalen Einstellung ist sowohl die schallkopfnaher als auch die schallkopferne Gefäßwand klar vom Lumen abgrenzbar. Nach Vergrößerung des Bildausschnittes erfolgte die Aufzeichnung mehrerer Bilder. Diese wurden im Anschluss zum Zweck der späteren Auswertung auf CD-ROM gespeichert.

### 3.3 Auswertung der Endothelfunktionsmessungen

Die Auswertung der Funktionsmessungen erfolgte mittels spezieller Software (Tom Tec Imaging Systems, Unterschleissheim) durch zwei unabhängige, verblindete Untersucher. Nach Transfer des Bildmaterials auf den Computer erfolgte die Vermessung des Arteriendurchmessers der Arteria brachialis EKG-gestützt enddiastolisch, koinzident mit der R-Zacke.

Nach Auswahl eines optimalen Bildausschnittes mit guter Abbildung der klassischen Doppelkontur (Übergang Adventitia/Media, Media/Intima, Intima/Lumen) wurde die Messung des Arteriendurchmessers nach den Empfehlungen von Corretti und Jarvisalo et al. durchgeführt (Corretti et al. 2002, Jarvisalo et al. 2000). Grundlegend zur Verwendung dieser Messmethode ist der Einsatz von hochsensitivem Ultraschall. Als Eckpunkte der Diametermessungen dienen die I-Linien. Diese echoreichen Linien bezeichnen den Intima-Lumen-Übergang. Der arterielle Diameter wurde aus der Distanz zwischen der anterioren (schallkopfnah) und der posterioren (schallkopffern) I-Linie ermittelt. Damit wurde nach den aktuellen Empfehlungen gearbeitet (Corretti et al. 2002; Celermajer et al. 1992, 1994). Abb. 9 demonstriert die anatomischen Korrelate der Arteria brachialis anhand einer sonographischen Darstellung.

**Abb. 9:** Sonographie und anatomisches Korrelat der A. brachialis

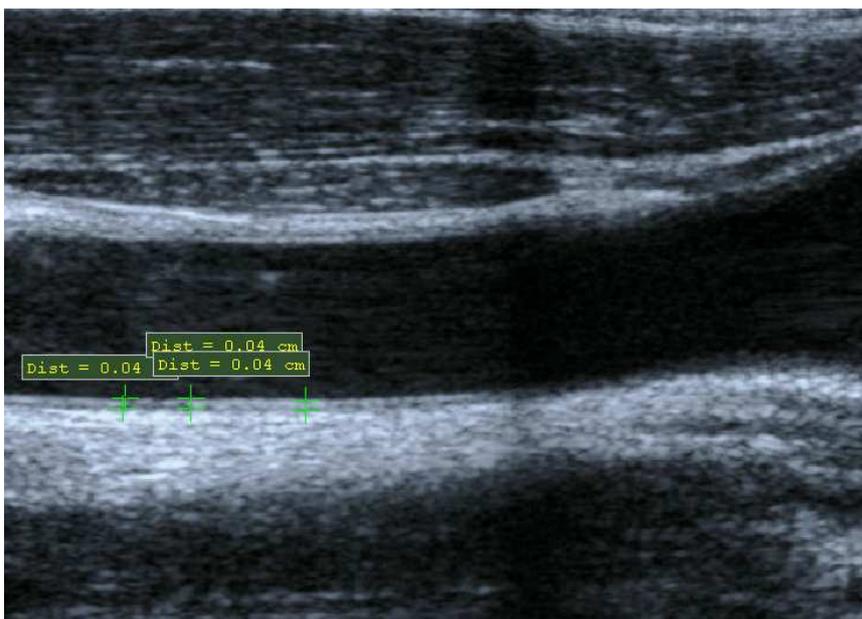


Die Bestimmung des Durchmessers der A. brachialis erfolgte jeweils enddiastolisch. Zeitgleich mit der R-Zacke des EKGs wurden jeweils 3 Diametermessungen durchgeführt, so dass bei zwei aufeinander folgenden R-Zacken pro Herzzyklus ein Mittelwert aus 6 Messungen gebildet werden konnte. Durch diese Vorgehensweise konnte die Variabilität der Messergebnisse reduziert werden. Das Ziel war, zu jedem Messzeitpunkt möglichst identische Bereiche der Arterie auszuwerten. Dies wurde durch die sorgfältige Auswahl des Bildausschnittes und das Aufsuchen gleicher anatomischer Strukturen gewährleistet.

### 3.4 Auswertung der Intima -Media- Dicke

Die Bestimmung der Intima-Media-Dicke wurde nach den Kriterien von Wikstrand et al. und Pignoli et al. vorgenommen (Wikstrand et al. 2007, Pignoli et al. 1986). Zuerst erfolgte die Auswahl eines geeigneten Längsschnittes der A. carotis communis mit optimaler Darstellung der dreischichtigen Gefäßwand. Dabei grenzt sich die Intima als eine echoreiche Linie im Kontrast zum Lumen ab. Nach peripher folgt dann eine schmalere echoarme Bereich, der mit der Media korreliert. Zur Bestimmung der Intima-Media-Dicke wurde die Distanz zwischen dem Übergang vom Lumen zur Intima und dem Übergang von der Media zur Adventitia vermessen (Abb. 10). Pro Bildausschnitt wurden 3 Messungen vorgenommen. Diese wurden im Anschluss gemittelt.

**Abb. 10:** Messung der Intima-Media-Dicke der A. carotis communis



### 3.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde in Kooperation mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité Berlin erarbeitet. Alle Daten wurden, soweit nicht anders aufgeführt, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung deskriptiv dargestellt. Sämtliche statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Normalverteilte Werte wurden anhand parametrischer Tests analysiert. Der Vergleich von klinischen Parametern, die nicht normal verteilt waren, erfolgte unter Verwendung nichtparametrischer Rangsummentests (gepaarter Wilcoxon Test, Mann-Whitney Test). Mit Hilfe von linearen Regressionsanalysen wurden die Änderungen des FMD errechnet ( $\Delta 1 = \text{FMD}_{M+7} - \text{FMD}_{M+3}$ ;  $\Delta 2 = \text{FMD}_{M-5} - \text{FMD}_{M+3}$ ). Dabei erfolgte eine Adjustierung an Alter, Glucose, Testosteron und Triglyceride. Korrelationsanalysen wurden zweiseitig nach Spearman durchgeführt. Als statistisch signifikant galt ein p-Wert  $<0,05$ . Zur statistischen Analyse diente das Computerprogramm SPSS 15.0 für Windows. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Excel (Microsoft Office).

## 4. Resultate

### 4.1 Studienpopulation

Es wurden initial 45 Frauen in die Studie eingeschlossen. Im Studienverlauf mussten 20 Probandinnen ausgeschlossen werden: 6 Frauen aufgrund schlechter sonographischer Darstellbarkeit der Arteria brachialis, 9 Frauen aufgrund von Zyklusunregelmäßigkeiten und 5 Frauen wegen akuter Erkrankungen.

25 Probandinnen mit ovulatorischen Menstruationszyklen beendeten die Studie, bestehend aus 12 Nichtraucherinnen und 13 Raucherinnen. Aus Gründen der sprachlichen Vereinfachung und zur besseren Lesbarkeit werden im Abschnitt 4 für die Studiengruppen die Bezeichnungen *Nichtraucher* und *Raucher* verwendet.

Tabelle 1 zeigt die Basischarakteristika der Studienpopulation, die im Rahmen der Voruntersuchung (Zeitpunkt M-5 (mittlere Lutealphase) des der Studie vorangegangenen Menstruationszyklus) erhoben wurden. Es bestanden geringfügige, aber signifikante Altersunterschiede zwischen der Gruppe der Raucher und der Gruppe der Nichtraucher. Die Raucher waren etwas älter als die nicht rauchenden Probandinnen ( $p < 0,05$ ). Bezüglich der Zykluslänge und des BMI waren beide Gruppen vergleichbar. In der Eingangsvsiste konnten signifikant höhere Werte von Glucose, Triglyzeriden und Gesamt-Testosteron bei den Rauchern festgestellt werden. Die weiterhin erhobenen Laborparameter zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Studiengruppen.

**Tab. 1:** Charakterisierung der Studienpopulation im Rahmen der Voruntersuchung (mittlere Lutealphase; M-5)

		<b>Nichtraucher (n = 12)</b>	<b>Raucher (n = 13)</b>
<b>Alter*</b>	(Jahre)	30.3 ± 3.2	34.2 ± 1.2
<b>Zykluslänge</b>	(Tage)	26.8 ± 1.6	27.2 ± 1.5
<b>BMI</b>	(kg/m <sup>2</sup> )	20.7 ± 1.9	21.2 ± 1.7
<b>Gesamtcholesterin</b>	(mg/dl)	157 ± 17.3	173 ± 27
<b>HDL</b>	(mg/dl)	68 ± 8.7	63 ± 9.5
<b>LDL</b>	(mg/dl)	79 ± 15.2	95 ± 27.5
<b>TG*</b>	(mg/dl)	53 ± 11.1	73 ± 28.9
<b>Lipoprotein (a)</b>	(mg/dl)	12.3 ± 9.1	8.1 ± 3.7
<b>Folsäure</b>	(mg/dl)	10.8 ± 3.0	8.5 ± 4.0
<b>hsCrP</b>	(mg/dl)	0.06 ± 0.05	0.09 ± 0.06
<b>Insulin</b>	(mg/dl)	4.5 ± 1.9	6.2 ± 2.5
<b>Glucose*</b>	(mg/dl)	85.6 ± 4.8	90.8 ± 5.3
<b>Homocystein</b>	(µmol/l)	8.0 ± 1.5	8.3 ± 1.7
<b>Harnsäure</b>	(mg/dl)	3.82 ± 0.61	4.09 ± 0.77
<b>TSH</b>	(mU/l)	2.54 ± 1.03	1.51 ± 0.50
<b>Testosteron*</b>	(nmol/l)	1.08 ± 0.36	1.75 ± 0.59
<b>SHBG</b>	(nmol/l)	65.7 ± 30.1	64.8 ± 14.5
<b>DHEAS</b>	(µmol/l)	4.63 ± 2.07	3.98 ± 1.62
<b>Cortisol</b>	(nmol/l)	489 ± 100	389 ± 160
<b>Prolaktin</b>	(µg/l)	11.9 ± 5.5	11.8 ± 4.8

\*p <0.05 für Nichtraucher vs. Raucher; MW ± SEM; BMI = Body Mass Index; DHEAS = Dehydroepiandrosteronsulfat, HDL = high density Lipoprotein; hsCRP = hochsensitives C-reaktives Protein; LDL = low density Lipo-protein; SHBG = Sexualhormon-bindendes Globulin; TG = Triglyzeride; TSH = Thyroidea stimulierendes Hormon

Aufgrund der, zwischen den beiden Studiengruppen im Rahmen der Voruntersuchung gefundenen, signifikanten Unterschiede einiger Laborparameter wurde die Auswertung für diese Parameter auf die 45 initial in die Studie eingeschlossenen Frauen ausgedehnt. Wie in Tabelle 2 ersichtlich, konnten die signifikanten erhöhten Werte von Testosteron und Triglyzeriden sowie das höhere Lebensalter bei den Rauchern auch bei Betrachtung der größeren Probandenzahl beobachtet werden. Im Gegensatz dazu waren die signifikant erhöhten Werte für Glucose bei Betrachtung der größeren Probandenzahl nicht nachweisbar.

**Tab. 2:** Charakterisierung der 45 initial eingeschlossenen Probandinnen im Rahmen der Voruntersuchung (mittlere Lutealphase; M-5)

		<b>Nichtraucher (n = 21)</b>	<b>Raucher (n = 24)</b>
<b>Alter*</b>	(Jahre)	29.3 ± 3.2	32.4 ± 3.1
<b>Zykluslänge</b>	(Tage)	27.1 ± 2.2	27.5 ± 3.1
<b>BMI</b>	(kg/m <sup>2</sup> )	21.1 ± 1.9	21 ± 1.5
<b>Gesamtcholesterin</b>	(mg/dl)	159 ± 15.4	171 ± 25.2
<b>HDL</b>	(mg/dl)	67 ± 9.2	64 ± 10.1
<b>LDL</b>	(mg/dl)	80 ± 12.6	92 ± 27.6
<b>TG*</b>	(mg/dl)	55 ± 10.6	73.3 ± 31.0
<b>Lipoprotein (a)</b>	(mg/dl)	9.6 ± 9.1	7.5 ± 3.7
<b>Folsäure</b>	(mg/dl)	10.2 ± 5.1	8.7 ± 3.4
<b>hsCrP</b>	(mg/dl)	0.06 ± 0.05	0.08 ± 0.05
<b>Insulin</b>	(mg/dl)	5.5 ± 2.0	5.8 ± 2.3
<b>Glucose</b>	(mg/dl)	87.2 ± 6.4	87.6 ± 6.1
<b>Homocystein</b>	(µmol/l)	8.5 ± 1.7	8.6 ± 1.8
<b>Harnsäure</b>	(mg/dl)	3.96 ± 0.82	4.09 ± 0.84
<b>TSH</b>	(mU/l)	2.19 ± 0.98	1.74 ± 0.56
<b>Testosteron*</b>	(nmol/l)	1.16 ± 0.47	1.88 ± 0.82
<b>SHBG</b>	(nmol/l)	68.9 ± 27.1	70.1 ± 19.4
<b>DHEAS</b>	(µmol/l)	4.61 ± 1.99	4.83 ± 1.75
<b>Cortisol</b>	(nmol/l)	466 ± 117	420 ± 136
<b>Prolaktin</b>	(µg/l)	12.7 ± 5.6	12.8 ± 5.3

\*p <0.05 für Nichtraucher vs. Raucher; MW ± SEM; BMI = Body Mass Index; DHEAS = Dehydroepiandrosteronsulfat, HDL = high density Lipoprotein; hsCRP = hochsensitives C-reaktives Protein; LDL = low density Lipoprotein; SHBG = Sexualhormon-bindendes Globulin; TG = Triglyzeride; TSH = Thyroidea stimulierendes Hormon

## 4.2 Zyklische Schwankungen der Sexualsteroid

Tabelle 3 zeigt die Schwankungen der Sexualsteroid im Zyklusverlauf in beiden Studiengruppen. Im untersuchten Menstruationszyklus zeigten die Steroidhormone bei den Rauchern und Nichtrauchern einen typischen Zyklusverlauf mit signifikant höheren Werten von Östradiol und Progesteron in der mittleren Lutealphase verglichen mit der Menstruations- und der mittleren Follikelphase. Die Östradiol-Spiegel waren bei den Rauchern in der mittleren Lutealphase signifikant niedriger als bei den Nichtrauchern ( $495 \pm 105$  pg/ml vs.  $668 \pm 176$  pg/ml;  $p < 0,05$ )

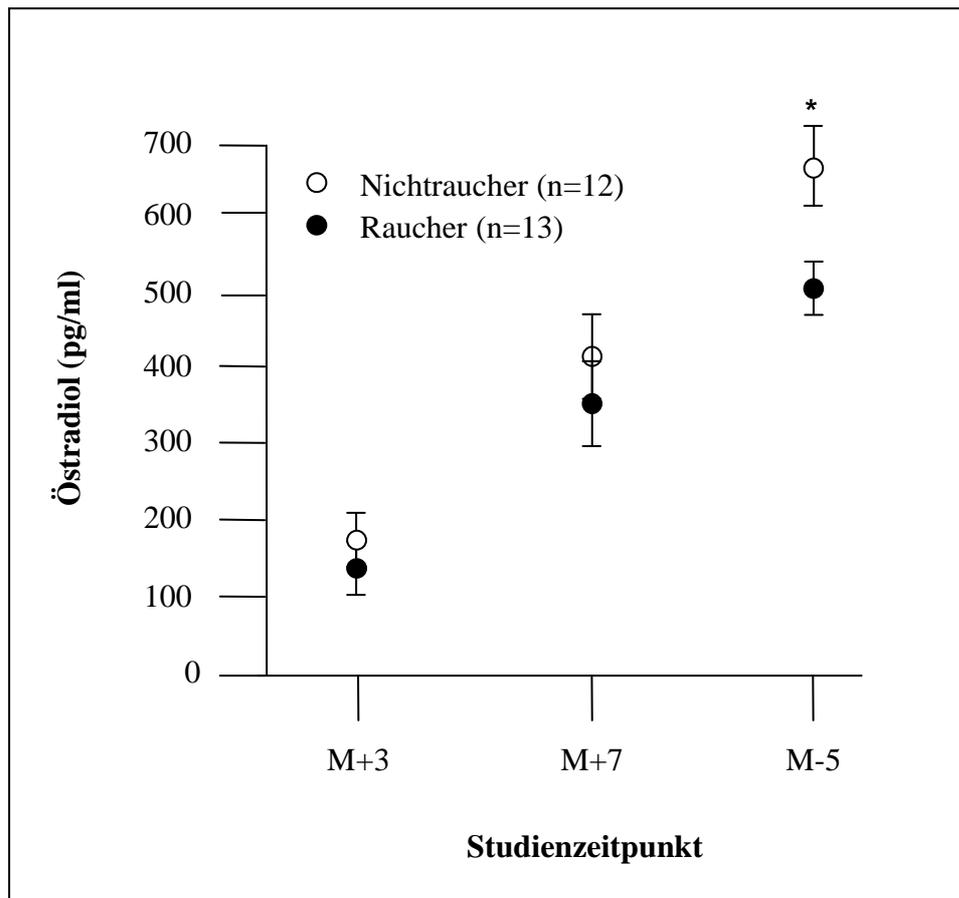
**Tab. 3:** Sexualhormone im Zyklusverlauf – Vergleich beider Studiengruppen (Raucher n = 13; Nichtraucher n = 12)

	Menstruationsphase		Mittlere Follikelphase		Mittlere Lutealphase	
	Nichtraucher	Raucher	Nichtraucher	Raucher	Nichtraucher	Raucher
<b>Östradiol</b> (pg/ml)	$183 \pm 94$	$155 \pm 114$	$414 \pm 267$	$347 \pm 188$	$668 \pm 176^*$	$495 \pm 105$
<b>Progesteron</b> (pg/ml)	$3.0 \pm 1.1$	$4.0 \pm 2.0$	$2.1 \pm 1.2$	$2.6 \pm 1.0$	$60 \pm 34$	$44 \pm 15$
<b>LH</b> (IE/l)	$4.8 \pm 1.3$	$6.0 \pm 2.2$	$5.15 \pm 1.23$	$6.5 \pm 2.2$	$4.9 \pm 2.7$	$5.5 \pm 2.4$
<b>FSH</b> (IE/l)	$6.3 \pm 1.1$	$6.9 \pm 2.0$	$5.03 \pm 1.32$	$6.1 \pm 1.4$	$2.4 \pm 1.0$	$3.1 \pm 0.9$

\* $p < 0,05$  für Nichtraucher vgl. Raucher in mittlerer Lutealphase; MW  $\pm$  SEM; FSH = Follikel stimulierendes Hormon; LH = luteinisierendes Hormon

Zur besseren Veranschaulichung werden die hormonellen Unterschiede zwischen beiden Studiengruppen in Abb. 11 dargestellt.

**Abb. 11:** Östradiol im Zyklusverlauf – Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern



\*p <0,05 für Nichtraucher vs. Raucher, MW ± SEM; M+3 = Menstruationsphase; M+7 = mittlere Follikelphase; M-5 = mittlere Lutealphase

Da für die 45 initial in die Studie eingeschlossenen Probandinnen die Messergebnisse für den Zeitpunkt M+3 (Menstruationsphase) komplett vorlagen, werden diese gesondert dargestellt.

Tabelle 4 zeigt die Sexualsteroiden beider Gruppen zum Zeitpunkt M+3. Bei Betrachtung der größeren Probandenzahl waren während der Menstruationsphase die Östradiol-Werte der Raucher signifikant niedriger als die der Nichtraucher ( $133 \pm 93$  pg/ml vs.  $188 \pm 86$  pg/ml;  $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu waren die Werte von Progesteron, LH und FSH auch bei Untersuchung der größeren Probandenzahl vergleichbar.

**Tab. 4:** Sexualhormone in der Menstruationsphase in beiden Studiengruppen (n = 45)

	<b>Nichtraucher</b> (n= 21)	<b>Raucher</b> (n=24)
<b>Östradiol</b> (pg/ml)	188 ± 86 *	133 ± 93
<b>Progesteron</b> (pg/ml)	3.3 ± 1.4	3.9 ± 1.6
<b>LH</b> (IE/l)	5.2 ± 1.5	6.1 ± 2.2
<b>FSH</b> (IE/l)	6.5 ± 1.6	6.9 ± 1.6

\*p <0,05 für Nichtraucher vgl. Raucher in der Menstruationsphase; Werte sind MW ± SEM; FSH = Follikel stimulierendes Hormon; LH = luteinisierendes Hormon

### **4.3 Endothelabhängige (FMD) und –unabhängige Vasodilatation (NMD)**

Die Schwankungen von FMD und NMD im Zyklusverlauf in beiden Studiengruppen zeigt Tabelle 5. Es konnten große intraindividuelle Unterschiede in der endothelabhängigen Vasodilatation der einzelnen Probandinnen (FMD zwischen 3,33 % - 20,83 %) festgestellt werden. Bei den Nichtrauchern zeigte sich ein Trend hin zu einem Anstieg des FMD während mittlerer Follikel- und mittlerer Lutealphase im Vergleich zur Menstruationsphase. Bei den Rauchern wurde ein Trend zu niedrigeren FMD-Werten während der mittleren Lutealphase verglichen mit der Menstruationsphase sichtbar.

Während der Menstruations- und der mittleren Follikelphase ließ sich bei den Rauchern und Nichtrauchern kein signifikanter Unterschied der FMD erkennen. In der mittleren Lutealphase war die endothelabhängige Vasodilatation bei den Rauchern signifikant niedriger als bei Nichtrauchern ( $7.1 \pm 3.0$  % vs.  $10.7 \pm 4.5$  %,  $p < 0.05$ ).

**Tab. 5:** FMD und NMD im Verlauf des Menstruationszyklus in beiden Studiengruppen (Nichtraucher n = 12; Raucher n = 13)

	Menstruationsphase		Mittlere Follikelphase		Mittlere Lutealphase	
	Nichtraucher	Raucher	Nichtraucher	Raucher	Nichtraucher	Raucher
FMD <sub>bas</sub> (mm)	2.93 ± 0.20	2.94 ± 0.33	2.94 ± 0.27	2.98 ± 0.25	2.90 ± 0.26	2.93 ± 0.26
FMD <sub>max</sub> (mm)	3.18 ± 0.24	3.21 ± 0.29	3.24 ± 0.31	3.24 ± 0.26	3.22 ± 0.28	3.13 ± 0.28
FMD <sub>max</sub> (%)	8.9 ± 5.3	9.7 ± 4.3	10.3 ± 4.4	8.6 ± 3.0	10.7 ± 4.5*	7.1 ± 3.0
NMD <sub>bas</sub> (mm)	2.85 ± 0.21	2.91 ± 0.33	2.84 ± 0.24	2.90 ± 0.29	2.81 ± 0.27	2.88 ± 0.26
NMD <sub>max</sub> (mm)	3.58 ± 0.26	3.63 ± 0.29	3.57 ± 0.32	3.68 ± 0.27	3.67 ± 0.40	3.62 ± 0.30
NMD <sub>max</sub> (%)	25.6 ± 6.7	26.0 ± 9.0	26.0 ± 4.3	27.2 ± 7.1	27.3 ± 8.9	29.0 ± 5.1

\* p < 0.05 für Nichtraucher vs. Raucher in mittlerer Lutealphase; MW ± SEM

FMD bas (mm) = Basisdiameter vor Hyperämie

FMD max (mm) = maximale Dilatation nach Hyperämie

FMD max (%) = maximale prozentuale Änderung des Diameters nach Hyperämie

NMD bas (mm) = Basisdiameter vor Applikation von Nitroglycerin

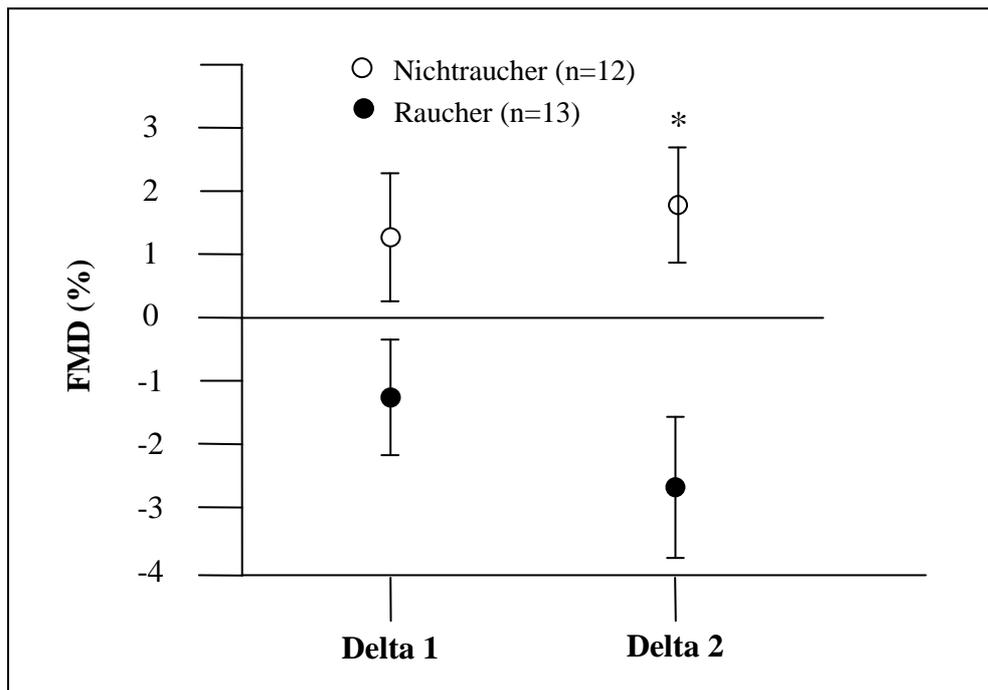
NMD max (mm) = maximaler Diameter nach Nitroglycerin-Gabe

NMD max (%) = maximale prozentuale Änderung des Diameters nach Nitroglycerin-Gabe

Zur besseren Darstellbarkeit der Unterschiede der endothelabhängigen Vasodilatation in beiden Gruppen im Zyklusverlauf wurden die Änderungen der FMD (Delta) zwischen den definierten Zyklusphasen berechnet und in Abb. 12 dargestellt.

Es zeigte sich, dass Delta 2 (Änderung FMD mittlere Lutealphase vgl. mit Menstruationsphase) bei Rauchern signifikant geringer als bei Nichtrauchern war. Darüber hinaus konnte bei den Rauchern und Nichtrauchern kein signifikanter Unterschied zwischen Delta 1 und Delta 2 (Änderung der FMD zwischen den Zyklusphasen) festgestellt werden. Die Adjustierung der FMD-Werte an Alter, Glucose, Triglyceride und Testosteron konnte keine Beeinflussung der Ergebnisse durch diese Variablen aufzeigen.

**Abb. 12:** Änderungen des FMD zwischen den verschiedenen Zyklusphasen in beiden Studiengruppen

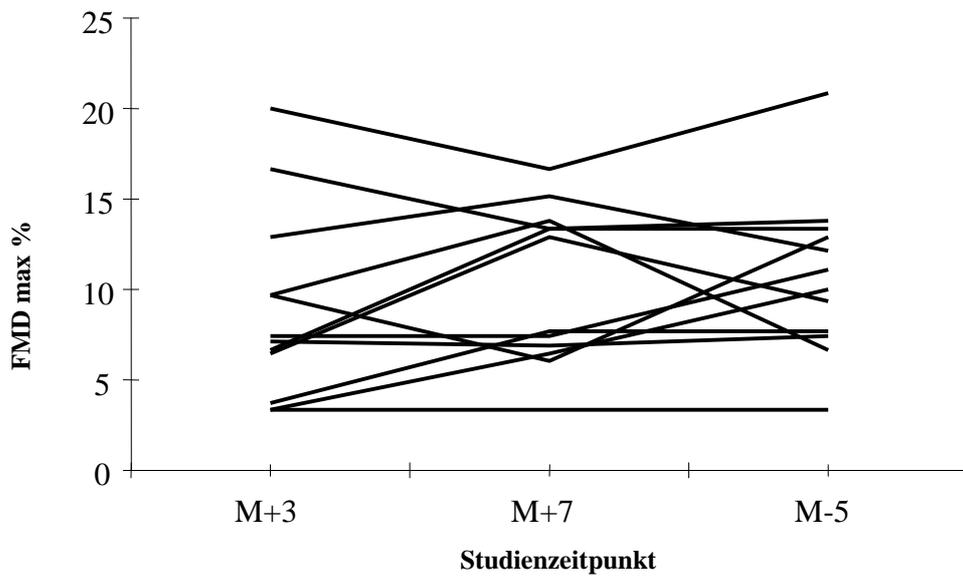


\*  $p < 0,05$  für Nichtraucher vs. Raucher;  $MW \pm SEM$ ; Delta 1 =  $FMD_{M+7} - FMD_{M+3}$ ; Delta 2 =  $FMD_{M-5} - FMD_{M+3}$ ; Delta 1 und 2 nach Adjustierung an Alter, Glucose, Triglyceride und Testosteron

Signifikante Korrelationen zwischen FMD und Östradiol konnten in den verschiedenen Zyklusphasen bei Rauchern oder Nichtrauchern nicht nachgewiesen werden.

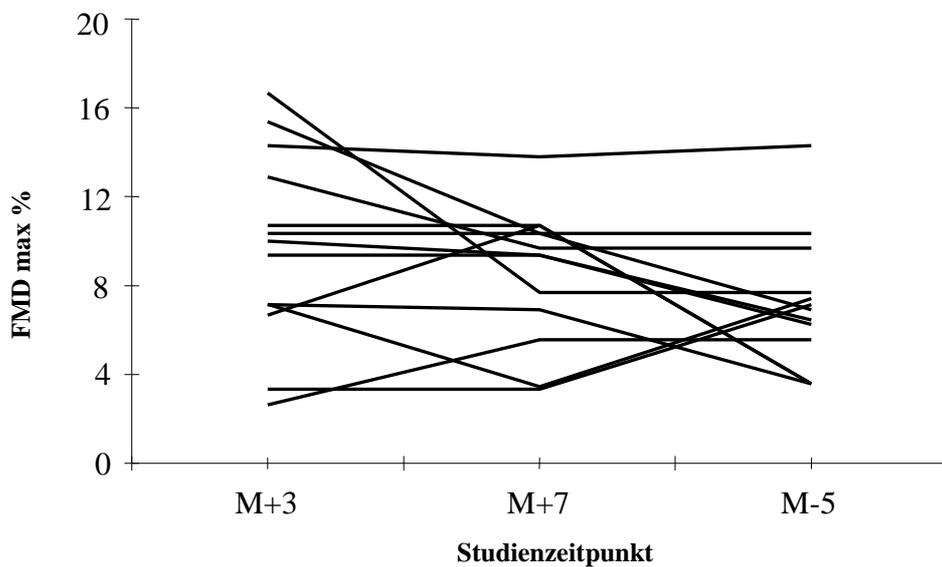
Bei Betrachtung der einzelnen Verläufe der FMD beider Studiengruppen über den Zyklus bilden sich die großen intraindividuellen Schwankungen ab. Bei den Nichtrauchern zeigt sich im Trend ein Anstieg der FMD in der mittleren Lutealphase verglichen mit der Menstruationsphase. In der Gruppe der Raucher fiel im Trend eine Reduktion der FMD-Werte im Zyklusverlauf auf (Abb. 13 und 14).

**Abb. 13:** FMD max (%) aller Nichtraucher (n = 12) im Zyklusverlauf



M+3 = Menstruationsphase, M+7 = mittlere Follikelphase; M-5 = mittlere Lutealphase

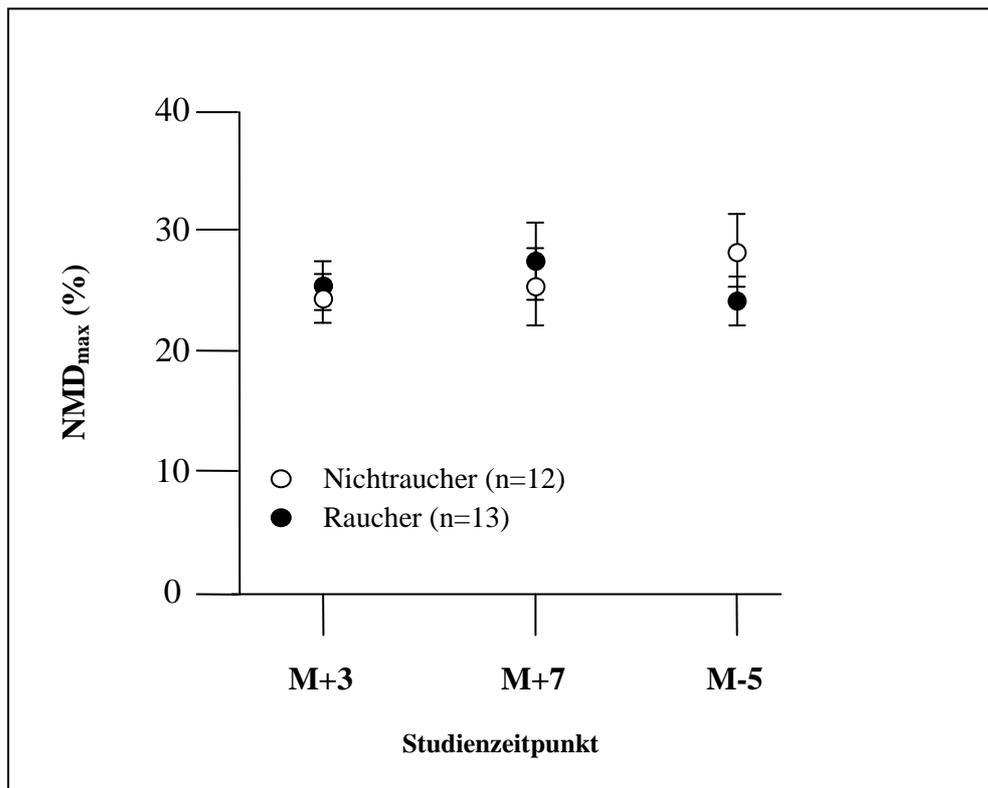
**Abb. 14:** FMD max (%) aller Raucher (n = 13) im Zyklusverlauf



M+3 = Menstruationsphase, M+7 = mittlere Follikelphase; M-5 = mittlere Lutealphase

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der NMD zwischen den Rauchern und den Nichtrauchern sowie keine signifikanten Veränderungen der NMD zwischen den 3 Zeitpunkten im Zyklus (Abb. 15).

**Abb. 15:** NMDmax (%) im Zyklusverlauf – Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern



M+3 = Menstruationsphase; M+7 = mittlere Follikelphase; M-5 = mittlere Lutealphase; MW  $\pm$  SEM

Da zum Zeitpunkt M+3 die FMD-, NMD- und IMT-Messungen an einer größeren Probandenzahl (initial in die Studie eingeschlossene Probandinnen, n = 45) durchgeführt wurden und die Messergebnisse komplett vorlagen, werden sie für diesen Zeitpunkt im Anschluss gesondert demonstriert (Tab. 6).

Auch bei Betrachtung der größeren Probandenzahl konnte während der Menstruationsphase kein signifikanter Unterschied im Basisdurchmesser der Arteria brachialis sowie in der endothel-abhängigen und -unabhängigen Vasodilatation zwischen Rauchern und Nichtrauchern nachgewiesen werden.

**Tab. 6:** FMD und NMD in der Menstruationsphase in beiden Studiengruppen (n = 45)

	<b>Nichtraucher (n = 21)</b>	<b>Raucher (n = 24)</b>
FMD <sub>bas</sub> (mm)	2.9 ± 0.23	2.9 ± 0.30
FMD <sub>max</sub> (mm)	3.2 ± 0.29	3.2 ± 0.26
FMD <sub>max</sub> (%)	9.5 ± 4.8	8.6 ± 4.2
NMD <sub>bas</sub> (mm)	2.8 ± 0.21	2.9 ± 0.30
NMD <sub>max</sub> (mm)	3.6 ± 0.28	3.6 ± 0.31
NMD <sub>max</sub> (%)	26.7 ± 6.6	26.8 ± 7.8
IMT (mm)	0.46 ± 0.07	0.45 ± 0.05

MW ± SEM

FMD bas (mm) = Basisdiameter vor Hyperämie

FMD max (mm) = maximale Dilatation nach Hyperämie

FMD max (%) = maximale prozentuale Änderung des Diameters nach Hyperämie

NMD bas (mm) = Basisdiameter vor Applikation von Nitroglycerin

NMD max (mm) = maximaler Diameter nach Nitroglycerin-Gabe

NMD max (%) = maximale prozentuale Änderung des Diameters nach Nitroglycerin-Gabe

Die Intima-Media-Dicke (IMT) der A. carotis interna, gemessen bei allen Probandinnen in der Menstruationsphase, unterschied sich zwischen beiden Studiengruppen nicht signifikant.

#### **4.4 Intra- und Inter-Untersucher-Variabilität**

Um eine valide Bestimmung der FMD zu gewährleisten, wurden die Variabilitäten für diese Messung an der Arteria brachialis in Voruntersuchungen ermittelt. Hierzu erfolgte eine Doppelauswertung von 20 FMD-Messungen durch einen Untersucher sowie eine parallele Auswertung von 20 FMD-Messungen durch 2 Untersucher. Bei der Bestimmung der FMD war der Korrelationskoeffizient für die Intra-Untersucher-Variabilität 0,99 und die Inter-Untersucher-Variabilität 0,96 (p <0,01).

## **5. Diskussion**

Das wesentliche Ergebnis dieser Studie ist, dass die flussvermittelte Vasodilatation, ein Marker der vaskulären Endothelfunktion, bei gesunden jungen Raucherinnen im Vergleich zu Nichtraucherinnen während der mittleren Lutealphase (M-5) erniedrigt ist, während der Menstruations- (M+3) und der mittleren Follikelphase (M+7) jedoch keine signifikanten Unterschiede der Endothelfunktion zwischen Raucherinnen und Nichtraucherinnen gefunden werden. Bei Nichtraucherinnen zeigte sich während des Menstruationszyklus ein Trend hin zu höheren FMD-Werten während der mittleren Lutealphase verglichen mit der Menstruationsphase. Bei Raucherinnen konnte ein Trend zu reduzierten FMD-Werten beobachtet werden. Darüber hinaus wurden in dieser Probandengruppe in der mittleren Lutealphase signifikant verminderte Östradiolwerte im Vergleich zu den Nichtraucherinnen ermittelt. Es fanden sich keine Unterschiede der NMD zwischen beiden Gruppen oder zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten während des Menstruationszyklus. Ebenso konnten keine Unterschiede bei der Untersuchung der Intima-Media-Dicke der A. carotis communis während der Menstruationsphase (M+3) zwischen beiden Probandengruppen festgestellt werden.

### **5.1 Bewertung der Studienergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur**

Die Daten der vorliegenden Arbeit demonstrieren den Einfluss von Rauchen auf die Endothelfunktion bei gesunden, prämenopausalen Frauen während unterschiedlicher Zeitpunkte eines Menstruationszyklus. Erstaunlicherweise konnte nur zum Zeitpunkt der mittleren Lutealphase ein Unterschied der FMD zwischen Raucherinnen und Nichtraucherinnen nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine signifikant verminderte FMD bei den Raucherinnen im Vergleich zu den Nichtraucherinnen. Während der Menstruations- und der mittleren Follikelphase war die FMD beider Gruppen hingegen nicht signifikant unterschiedlich. Auch bei Auswertung der initial eingeschlossenen größeren Probandenzahl zum Zeitpunkt der Menstruationsphase konnte kein Unterschied in der FMD zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden. Eine reduzierte FMD bei Raucherinnen nur während der Lutealphase legt den Einfluss physiologischer Hormonschwankungen nahe. Die Feststellung, dass in der vorliegenden Untersuchung der Anstieg der Östradiolwerte im Zyklusverlauf bei Raucherinnen geringer als bei Nichtraucherinnen war, könnte eine Erklärung für diesen Sachverhalt sein.

Zahlreiche Untersuchungen belegen die gefäßmodulierenden Wirkungen von Östrogenen. Endogenes, aber auch exogen verabreichtes Östrogen führt über eine gesteigerte Freisetzung von NO und die Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen zu einer Vasodilatation (Chen et al. 1999, Mendelsohn et al. 1999). Dies hat eine Verbesserung der FMD des Gefäßes zur Folge. Verschiedene Mechanismen sind für die gefäßmodulatorischen Effekte von Östrogenen verantwortlich. In der Literatur werden sowohl endothelabhängige als auch –unabhängige Prozesse beschrieben. Da ein vasodilatierender Effekt bereits 5-20 Minuten nach Gabe von Östrogenen einsetzt, geht man primär von einer nicht-genomischen Wirkung aus. Östrogen führt, durch Aktivierung des in der Endothelzellmembran nachgewiesenen Östrogenrezeptors- $\alpha$ , zu einer schnellen Aktivierung der eNOS (Mendelsohn et al. 1999). Durch verschiedene Signalwege (u.a. Tyrosin-Kinase, mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK), Serin-Threonin-Kinase (Akt), Protein-Kinase A und C) kommt es zur gesteigerten Produktion von NO und damit zur Vasodilatation (Li et al. 2007, Chen et al. 2004, Ho et al. 2002). Endothelunabhängig kommt es östrogenvermittelt zu einer schnellen Stimulation von calcium-abhängigen Kaliumkanälen in der Zellmembran glatter Gefäßmuskelzellen. Dies führt zu deren Hyperpolarisation und Relaxation und begünstigt dadurch die Vasodilatation (Ho et al. 2002). Längerfristig wird die gefäßrelaxierende Wirkung durch Steigerung der Genexpression der endothelialen NO- und Prostazyklinsynthese erreicht. Unterstützend wirken außerdem die östrogenvermittelten Verringerungen von Renin, ACE, Endothelin-1 und die Abnahme der Angiotensin-II-Rezeptoren Typ 1 (Fischer et al. 2002; Mendelsohn et al. 1999).

Untersuchungen prämenopausaler Frauen konnten zyklusabhängige Änderungen der flussvermittelten Vasodilatation nachweisen, die sich simultan zu den Schwankungen der Östrogenwerte verhielten (Kawano et al. 2001, Hashimoto et al. 1995). Beispielsweise zeigten Williams et al. in ihrer Untersuchung von 15 prämenopausalen Nichtraucherinnen, dass die FMD mit steigenden Östradiolwerten in der Follikelphase ansteigt, nach der Ovulation abfällt und dann wieder langsam ansteigt (Williams et al. 2001). Gleichermäßen konnte bei einer Untersuchung von 10 prämenopausalen Frauen mit nachgewiesener Angina Pectoris Symptomatik ein gehäuftes Auftreten von Ischämien am Ende der Lutealphase und zu Beginn der Menstruationsphase festgestellt werden. Entsprechende Beobachtungen zeigten sich in dieser Studie bei der Messung der Endothelfunktion im Zyklusverlauf. So war die FMD am niedrigsten in der Menstruations- und Lutealphase und am höchsten in der Follikelphase, simultan mit den Östrogenwerten im Zyklusverlauf (Kawano et al. 2001). In Übereinstimmung mit der Literatur konnten diese Zyklusschwankungen in der vorliegenden Arbeit im Trend für die Gruppe der

Nichtraucherinnen ebenfalls gezeigt werden. Die flussvermittelte Vasodilatation war demnach in dieser Gruppe in der mittleren Lutealphase, der Phase mit den höchsten Östrogenwerten, am größten. Insgesamt zeigte sich in der Gruppe der Nichtraucherinnen im Verlauf eines Menstruationszyklus ein Trend hin zu einem Anstieg des FMD während der mittleren Lutealphase im Vergleich zur Menstruationsphase. Eine Steigerung des FMD im Zyklusverlauf konnte in der Gruppe der Raucherinnen nicht gezeigt werden. Hier war ein Trend hin zu einer Reduktion der FMD in der mittleren Lutealphase, verglichen mit der Menstruationsphase, beobachtbar.

Chronisches Rauchen ist neben arteriellem Hypertonus, Adipositas, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie einer der Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und die Entwicklung einer Atherosklerose. Eine Einschränkung der FMD ist für alle diese Risikofaktoren bekannt (Kawano et al. 1999; Celermajer et al. 1996; Sorensen et al. 1994; Panza et al. 1990). Eine Verschlechterung der endothelialen Funktion findet sich bei jungen gesunden Erwachsenen sowohl durch aktives als auch durch passives Rauchen (Poredos et al. 1999; Celermajer et al. 1993). Einen Nachweis dafür erbrachten Celermajer et al. in ihrer Untersuchung an 200 Probanden. Sie beobachteten darüber hinaus sowohl eine Dosis-Wirkungs-Beziehung als auch eine partielle Reversibilität nach Aufgabe des Nikotinkonsums (Celermajer et al. 1993). Maßgeblich für die endotheliale Dysfunktion bei Rauchern scheinen oxidative Effekte des Zigarettenrauches zu sein. Es kommt zu einer gesteigerten Inaktivierung von NO durch freie Sauerstoffradikale mit Bildung von Peroxynitrit, einem stark oxidierend wirkenden Reaktionsprodukt (Beckman et al. 1996). Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass die Gabe von Antioxidantien, wie zum Beispiel Vitamin C und E, bei Rauchern zu einer Verminderung der Konzentration freier Radikale und einer Verbesserung der Endothelfunktion führt (Raitakari et al. 2000, Heitzer et al. 1996). Neben der gesteigerten Inaktivierung spielt auch die verminderte endotheliale Synthese von NO durch Mangel an Tetrahydrobiopterin eine Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion. Tetrahydrobiopterin kann als redox-sensitiver Co-Faktor der NO-Synthase durch Oxidantien im Zigarettenrauch inaktiviert werden (Heitzer et al. 2000). Aus dem Mangel an Stickstoffmonoxid resultiert ein eingeschränktes vasodilatatorisches Potenzial der Gefäße, was sich in einer Verminderung der FMD äußert. Auch Nikotin selbst übt schädliche Wirkungen auf das Endothel aus. Dies zeigt sich in einer Verminderung der FMD nach Verabreichung von Nikotinspray bzw. Nikotinkaugummi (Neunteufl et al. 2002, Sarabi et al. 2000). Darüber hinaus scheint chronisches Rauchen einen antiöstrogenen Effekt zu haben. Dies konnte in mehreren Studien an jungen, gesunden Frauen

nachgewiesen werden (Michnovicz et al. 1986, Mac Mahon et al. 1982). So zeigten in der Untersuchung von Westhoff et al. junge Raucherinnen im Vergleich zu Nichtraucherinnen signifikant niedrigere Östrogenspiegel im Zyklusverlauf (Westhoff et al. 1986). Als Ursache für diese antiöstrogene Wirkung des Nikotins wird ein Eingriff in den hepatischen Östrogenmetabolismus diskutiert. Michnovicz et al. beobachteten bei prämenopausalen Frauen eine verstärkte hepatische Hydroxylierung von 17 $\beta$ -Östradiol (Michnovicz et al. 1986). Dies führt zu einem Anstieg von 2-Hydroxyöstrogen, einem Abbauprodukt mit geringerer Wirkpotenz und kurzer Halbwertszeit (Meek et al. 1999). Durch die verminderte Verfügbarkeit von Östrogen kommt es zu einer Reduktion der vorteilhaften Wirkung auf die Gefäßfunktion, was zu einer verminderten FMD führen könnte. Die diesbezügliche Studienlage ist jedoch nicht eindeutig. In der Literatur finden sich allerdings auch Studien, die keinen Unterschied in den Serum-Östrogenwerten zwischen Raucherinnen und Nichtraucherinnen nachweisen konnten (Key et al. 1991, Longcope et al. 1988, Friedman et al. 1987).

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Michnovicz et al. und Westhoff et al. zeigten die Raucherinnen in der vorliegenden Studie einen geringeren Anstieg der Östradiolwerte im Zyklusverlauf als die Nichtraucherinnen. Zum Zeitpunkt der mittleren Lutealphase war der Östradiolspiegel bei den rauchenden Probandinnen signifikant niedriger als bei den Nichtraucherinnen. Dies könnte eine Erklärung für die zu diesem Zeitpunkt bei den Raucherinnen ebenfalls signifikant verminderte flussvermittelte Vasodilatation sein (Jochmann et al. 2009). Der antiöstrogene Effekt, der die vorteilhafte Wirkung des Östrogens auf die Gefäßfunktion abschwächt, scheint in Kombination mit den Oxidantien aus dem Zigarettenrauch, die zu einer verminderten Bildung und gesteigerten Inaktivierung von NO und damit zu einer endothelialen Dysfunktion führen, die signifikant verminderte Endothelfunktion in dieser Studie herbeizuführen (Jochmann et al. 2009). Dies konnte allerdings bei der gesonderten Betrachtung der größeren Probandenzahl während der Menstruationsphase nicht gezeigt werden. Hier war zwar der Östradiolspiegel bei den Raucherinnen signifikant niedriger als bei den Nichtraucherinnen, in den FMD-Werten konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Studiengruppen nachgewiesen werden.

Trotz der eindeutigen Daten zu den Auswirkungen des Rauchens auf die vaskuläre Endothelfunktion werden die negativen Effekte in der vorliegenden Untersuchung gesunder prämenopausaler Frauen erst mit steigenden Sexualsteroiden sichtbar. In der Literatur finden

sich zu dieser Thematik nur wenige Untersuchungen. In den meisten klinischen Studien zum Einfluss von Rauchen auf die Endothelfunktion wurde bei weiblichen Probandinnen der Menstruationszyklus nicht berücksichtigt. Vor diesem Hintergrund untersuchten Garcia-Fernandez et al. die Endothelfunktion von 17 Probandinnen unmittelbar nach dem Rauchen einer Zigarette an zwei verschiedenen Zeitpunkten im Zyklus. Übereinstimmend mit der Literatur (Kato et al. 2006, Neunteufl et al. 2002) konnten sie nachweisen, dass das Rauchen einer Zigarette akut zu einer deutlichen Reduktion der FMD führt. Hinsichtlich dieser Verschlechterung der Endothelfunktion konnten allerdings keine Unterschiede zwischen Menstruations- und Follikelphase beobachtet werden (Garcia-Fernandez et al. 2004). In der vorliegenden Studie waren die FMD-Werte während der Menstruations- und der mittleren Follikelphase bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen vergleichbar, nur während der mittleren Lutealphase, der Phase mit den höchsten Östradiolwerten, zeigte sich eine signifikante Verminderung bei den Raucherinnen im Vergleich zu den Nichtraucherinnen.

Ein wichtiger Ansatz zur Erklärung dieses Sachverhaltes ist die genaue Betrachtung des untersuchten Studienkollektivs. Durch die sorgfältige Formulierung von Ein- und Ausschlusskriterien zeichneten sich alle Probandinnen durch ein extrem niedriges kardiovaskuläres Risikoprofil aus. Die untersuchten Nichtraucherinnen wiesen keinen bekannten Risikofaktor für eine Herz-Kreislaufkrankung auf. Auch bei den rauchenden Probandinnen durfte außer Rauchen kein weiterer bekannter Risikofaktor für eine Herz-Kreislaufkrankung bestehen. Als Ausdruck des gesunden Probandenkollektivs konnte zwischen beiden untersuchten Probandengruppen kein signifikanter Unterschied der Intima-Media-Dicke, einem subklinischen Marker für Atherosklerose, nachgewiesen werden.

In der Literatur unterscheiden sich die kardiovaskulären Risikoprofile der untersuchten Studienkollektive häufig voneinander. Beispielsweise wurden in der Untersuchung von Celermajer et al. zum Einfluss von Rauchen auf die Endothelfunktion zwar 50 % Frauen mit einem mittleren Alter von 33 +/- 9 Jahren eingeschlossen, jedoch erfolgte keine Deskription von Zyklusphasen bzw. oraler Kontrazeption. Außerdem wurde keine Aussage zum BMI, als wichtigen Marker einer Adipositas, getroffen und es erfolgte keine geschlechtsspezifische Subgruppenanalyse (Celermajer et al. 1993). Auch bei der Untersuchung von Yufu et al. zur Wirkung von chronischem Rauchen auf die Endothelfunktion bei jungen gesunden Probanden wurden zwar junge Frauen in die Untersuchung eingeschlossen, es erfolgte aber ebenso keine geschlechtsspezifische Subgruppenanalyse oder eine Beschreibung von Zyklusphasen während

der Messung (Yufu et al. 2007). In den in der Literatur existierenden Untersuchungen zu Schwankungen der Endothelfunktion während eines Menstruationszyklus bei jungen Frauen wurden ausschließlich Nichtraucherinnen untersucht (Hashimoto et al. 1995; Kawano et al. 2001). Dadurch sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie nur begrenzt mit vorhandenen Daten vergleichbar.

In bisher unpublizierten Daten einer weiteren Arbeit unserer Studiengruppe untersuchten wir während eines Menstruationszyklus bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen die Serumspiegel zirkulierender Progenitorzellen (Ludwig et al. 2009, in Revision). Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen steuern die Endothelregeneration und die Gefäßneubildung (Asahara et al. 1997). In klinischen Studien fanden sich Hinweise dafür, dass eine Verminderung der Zahl und/oder Beeinträchtigung der Funktion von endothelialen Vorläuferzellen bei kardiovaskulären Ereignissen möglicherweise eine besonders wichtige Rolle spielen (Fadini et al. 2006; Hill et al. 2003). In einigen Untersuchungen an Patienten mit oder ohne KHK korrelierte die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen invers mit dem Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren und konnte durch eine therapeutische Einstellung oder Veränderungen von Lebensgewohnheiten positiv beeinflusst werden (Steinmetz et al. 2009; Vasa et al. 2001).

Bei der Untersuchung der Progenitorzellkonzentrationen während eines Menstruationszyklus zeigte sich in der Arbeit unserer Studiengruppe bei den Raucherinnen im Vergleich zu den Nichtraucherinnen während Menstruations-, mittlerer Follikel- und mittlerer Lutealphase eine signifikante Reduktion der Konzentrationen dieser Zellen (Ludwig et al. 2009, in Revision). Im Hinblick auf dieses Ergebnis stellt die FMD-Messung bei den an unserer Studie beteiligten, sehr jungen und gesunden Frauen unter Umständen einen nicht ausreichend sensitiven Marker zur kardiovaskulären Risikostratifizierung während der Menstruations- und Follikelphase dar. Möglicherweise waren in der untersuchten Probandengruppe der Raucherinnen die Reparationsmechanismen durch zirkulierende Progenitorzellen noch ausreichend, so dass keine messbare Verschlechterung der Endothelfunktion resultierte. Ob dies hinsichtlich der kardiovaskulären Risikostratifizierung in dieser Altersgruppe von Bedeutung sein könnte, ist durch weitere Studien zu klären.

## 5.2 Limitationen

Die vorliegende Studie hat verschiedene Einschränkungen. Es wurde eine relativ kleine Probandenzahl untersucht. Trotz 646 Telefoninterviews und nachfolgend 122 Voruntersuchungen konnten, aufgrund zahlreicher Ein- und Ausschlusskriterien, nur 45 Frauen in die Studie eingeschlossen werden. Im Studienverlauf mussten dann weitere 20 Teilnehmerinnen wegen schlechter sonographischer Darstellbarkeit der A. brachialis, Zyklusunregelmäßigkeiten oder akuter Erkrankungen ausgeschlossen werden. Ziel war es, homogene Studiengruppen ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren (mit Ausnahme des Nikotinkonsums) zu untersuchen. Es ist möglich, dass die Untersuchung einer größeren Probandenzahl eine Beeinflussung des Studienergebnisses zur Folge hat. Dies zeigte sich bei der gesonderten Betrachtung der initial in die Studie eingeschlossenen größeren Probandenzahl (n = 45) zum Zeitpunkt M+3 für die Östradiolwerte. Diese waren im Gegensatz zur Betrachtung der tatsächlichen Studiengruppen bei den Raucherinnen signifikant geringer als bei den Nichtraucherinnen. Ein signifikanter Unterschied in den FMD-Werten konnte allerdings auch bei Betrachtung der größeren Probandenzahl zum Zeitpunkt M+3 nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren die Raucherinnen etwas älter als die Nichtraucherinnen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das höhere Alter bei den Raucherinnen eine Auswirkung auf die Endothelfunktion hat. Da sich aber in der Menstruationsphase kein signifikanter Unterschied in der FMD zwischen beiden Gruppen nachweisen ließ, scheint die modulierende Wirkung des Alters unwahrscheinlich. Zudem war der Altersunterschied zwischen beiden Gruppen gering.

In Übereinstimmung mit anderen Studien (Barbieri et al. 2005, Manjer et al. 2005, Lee et al. 2005, Eliasson et al. 1996) sind in der vorliegenden Untersuchung einige Blutwerte, beispielsweise Triglyceride und Testosteron bei Raucherinnen etwas höher als bei Nichtraucherinnen. Diese Unterschiede zeigten sich auch bei Betrachtung der 45 initial in die Studie eingeschlossenen Frauen. Im Hinblick auf die Testosteronwerte korrelieren die Beobachtungen der vorliegenden Studie mit anderen Studienergebnissen (Barbieri et al. 2005, Manjer et al. 2005). So wiesen Sowers et al. ebenfalls erhöhte Werte für Testosteron bei Raucherinnen im Vergleich zu Nichtraucherinnen nach (Sowers et al. 2001). In der Literatur finden sich nur wenige Untersuchungen mit eingeschränkter Aussagekraft bezüglich Endothelfunktion und Testosteronspiegeln bei Frauen. In einer Studie postmenopausaler Frauen konnte eine positive Korrelation zwischen FMD und Testosteron gezeigt werden (Montalcini et al. 2006). Chronisches Rauchen kann zu einer Insulinresistenz und damit zur Entwicklung eines

metabolischen Syndroms führen. Verschiedene Untersuchungen demonstrierten Veränderungen im Lipidprofil bei Rauchern. In diesem Kontext zeigten sich auch erhöhte Serumwerte für Triglyceride bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern (Freeman et al. 1995, Craig et al. 1989). Dies konnte auch in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden. Die Serumwerte für Glukose wurden in der vorliegenden Studie zu jedem Studienzeitpunkt gemessen und zeigten während der einzelnen Zyklusphasen, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Baseline-Messungen, keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der Raucherinnen und der Nichtraucherinnen. Daraus lässt sich schließen, dass der signifikante Unterschied zum Zeitpunkt M-5 des der Studie vorangegangenen Zyklus (Voruntersuchung, siehe Tab. 1)) als Zufallsbefund betrachtet werden muss. Da die Unterschiede der aufgezählten Laborparameter gering sind und alle Werte innerhalb des Normalbereichs liegen, ist eine Einwirkung auf die Endothelfunktion im Zusammenhang mit dem Rauchen nicht anzunehmen. Die Adjustierung der FMD-Werte im Rahmen der linearen Regressionsanalyse konnte darüber hinaus keine Beeinflussung der Studienergebnisse durch die oben genannten Parameter nachweisen.

### **5.3 Kritische Betrachtung der Methode**

Als Goldstandard zur Quantifizierung der Endothelfunktion gilt die Koronarangiographie mit intrakoronarer Gabe von vasoaktiven Substanzen. Aufgrund der Invasivität und der Verwendung pharmakologischer Stimuli ist diese Methode jedoch nur begrenzt routinemäßig einsetzbar. Darüber hinaus ist mittels venöser Unterarmverschlußplethysmographie semiinvasiv die Messung des Unterarmblutflusses und des Gefäßwiderstandes möglich. Die endothelvermittelte Zunahme des Unterarmblutflusses wird durch die Infusion von Acetylcholin in die Arteria brachialis erreicht. Die Infusion von Natriumnitroprussid bewirkt eine endothelunabhängige Zunahme des Unterarmblutflusses und gilt als Maß der NO-vermittelten vasodilatatorischen Kapazität. Auch diese Untersuchung ist aufgrund ihrer Technik (Infusion der vasoaktiven Substanzen über arteriellen Zugang) in der Praxis nur eingeschränkt einsetzbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die endothelabhängige Vasodilatation mit Hilfe der nicht-invasiven Messung der FMD der Arteria brachialis ermittelt. Dieses Verfahren beruht auf einer scherkraftinduzierten Stimulation der NO-Synthese. Im Einzelnen bewirkt eine Änderung der Schubspannung eine Konformationsänderung des endothelialen Zytoskeletts, welches zu einer Phosphorylierung der eNOS führt. Daraus resultiert eine Steigerung der Kalziumsensitivität, so dass die endotheliale NO-Synthase schon bei niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentrationen

eine maximale Aktivität erreicht (Dimmeler et al. 1999, Corson et al. 1996). Die daraus resultierende gesteigerte NO-Produktion kann als Dilatation der Arterie sonographisch gemessen werden. Joannides et al. bewiesen in ihrer Untersuchung das die FMD peripherer Arterien spezifisch durch endothelial gebildetes und freigesetztes NO vermittelt wird, dadurch, dass nach Vorbehandlung der Probandinnen mit L-NMMA, einem kompetitiven Inhibitor der eNOS, die FMD fast vollständig unterdrückt werden konnte (Joannides et al. 1995). Verschiedene Studien zeigen eine enge Korrelation zwischen dem Ausmaß der koronaren Gefäßveränderungen und der Einschränkung der peripheren Endothelfunktion (Takase et al. 1998, Neunteufl et al. 1997, Anderson et al. 1995). Somit stellt die Bestimmung der FMD ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion dar, welches sich besonders durch Nichtinvasivität, Wiederholbarkeit und Praktikabilität auszeichnet.

Zahlreiche Studien belegten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Reduktion der FMD und nahezu allen klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren. So zeigten sich Störungen der Endothelfunktion bei Patienten mit Hyper- bzw. Dyslipidämie (Sorensen et al. 1994), arterieller Hypertonie (Panza et al. 1990), Diabetes mellitus (Kawano et al. 1999) und Nikotinkonsum (Celermajer et al. 1996, 1993). Auch im höheren Lebensalter (Corretti et al. 2000), bei positiver Familienanamnese bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen (Clarkson et al. 1997, Celermajer et al. 1994) oder bei bekannter koronarer Herzkrankheit (Neunteufl et al. 1997, Celermajer et al. 1992) konnte eine Verminderung der FMD nachgewiesen werden. Aus diesem Grund erfolgte in der vorliegenden Untersuchung eine ausführliche Anamnese der Probandinnen. Das Vorliegen einer der genannten kardiovaskulären Risikofaktoren, mit Ausnahme des Nikotinkonsums, führte im Vorfeld zum Studienausschluss.

Darüber hinaus kann eine Vielzahl biologischer Variablen das Ausmaß der FMD beeinflussen. So besteht eine negative Korrelation zwischen dem Basisdiameter der Arteria brachialis und der FMD. Demnach dilatieren Arterien, die einen kleineren Diameter als 2,5 mm haben, im Verhältnis zu größeren Arterien stärker (Adams et al. 1998, Celermajer et al. 1992). Außerdem konnte eine zirkadiane Rhythmik mit einem Maximum der FMD am späten Nachmittag festgestellt werden (Etsuda et al. 1999). Auch die Nahrungsaufnahme führt zu einer Beeinflussung der FMD. Beispielsweise vermindern eine akute Hyperglykämie (Kawano et al. 1999) oder fettreiche Nahrung (Vogel et al. 1997) die FMD signifikant. Ebenso haben Kaffee- und Teegenuss (Jochmann et al. 2008; Papamichael et al. 2005), Einnahme von Vitamin C (Balletshofer et al. 2003) und akuter psychischer Stress (Ghiadoni et al. 2000) eine direkte

Wirkung auf die Höhe der FMD. Um den Einfluss der genannten Faktoren auf die Bestimmung der FMD möglichst gering zu halten, wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit immer zur gleichen Tageszeit, morgens zwischen 8:00 und 10:00 Uhr, nach einer zwölfstündigen Nahrungs- und Nikotinkarenz vorgenommen. Die Untersuchungen erfolgten in einem abgedunkelten, klimatisierten Raum mit Temperaturen zwischen 20-22 °C in entspannter Körperhaltung nach einer mindestens 20-minütigen Ruhephase. Der Basisdiameter der Arteria brachialis musste zudem mindestens 2,5 mm betragen.

Verschiedene methodische Varianten können im Weiteren einen zusätzlichen Einfluss auf die Höhe der FMD haben. Beispielsweise herrscht in der Literatur keine Übereinstimmung darüber, welche Positionierung der Blutdruckmanschette am Arm zu bevorzugen ist (Corretti et al. 2002). In manchen Untersuchungen konnte nach Anlage der Blutdruckmanschette am proximalen Oberarm eine größere FMD gemessen werden. Dies erklärt sich durch ein größeres ischämisches Gebiet (Ober- und Unterarm) und den zusätzlichen Einfluss einer Vielzahl von Ischämie-metabolite im untersuchten Gefäßabschnitt. Bei der distalen Okklusion (Unterarm) können diese Faktoren ausgeschaltet werden, da sich die Substanzen nicht auf den zu untersuchenden Gefäßabschnitt auswirken. Außerdem ist die Messung mit Oberarmstauung technisch schwieriger durchzuführen da es während der Stauung zu einem Gefäßkollaps und kompressionsbedingten Gewebeverschiebungen kommt (Coretti et al. 2002). Unter Berücksichtigung dieser Sachverhalte wurde die Blutdruckmanschette in der vorliegenden Arbeit distal der Ellenbeuge angelegt. Darüber hinaus ist die Höhe der FMD von der Dauer der Okklusion abhängig. Eine maximale Dilatation wird erst nach einer 4,5-minütigen Staudauer erreicht und kann auch durch eine längere Ischämiezeit nicht signifikant gesteigert werden (Leeson et al. 1997). Daher wurde in dieser Untersuchung mit einer gut tolerierbaren Dauer von 5 Minuten gearbeitet. Die Diametermessungen der vorliegenden Arbeit wurden von der anterioren zur posterioren I-Linie vorgenommen, welche dem anatomischen Intima-Lumen-Übergang entspricht. Damit wurde nach den aktuellen Empfehlungen gearbeitet (Corretti et al. 2002). Die Dilatation wurde nach Beendigung der Ischämie über einen Zeitraum von zwei Minuten in 15-sekündigen Abständen bestimmt. Aus diesen Messergebnissen wurde die maximale Dilatation ermittelt, die sich variabel zwischen 45 s und 90 s nach Abbruch der Ischämie zeigte. Diese Vorgehensweise wurde aufgrund neuerer Untersuchungsergebnisse gewählt, die darauf hinweisen, dass die maximale Dilatation nach Beseitigung der Ischämie individuell sehr voneinander abweichen kann (Berry et al. 2000). Alle Messungen wurden EKG getriggert, enddiastolisch, koinzident mit der R-Zacke durchgeführt, um Fehler durch pulsatil

bedingte Lumenschwankungen zu reduzieren. Insgesamt wurde damit in der vorliegenden Untersuchung nach den in Leitlinien empfohlenen Standards gearbeitet (Corretti et al. 2002).

## 6. Zusammenfassung

Nikotinabusus gilt als der wichtigste vermeidbare Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Besonders bei jungen Frauen, die durch den vasoprotektiven Effekt endogener Östrogene eine vergleichbar niedrige Gefährdung für Herz-Kreislaufkrankungen zeigen, scheint chronisches Rauchen insbesondere durch Schädigung des Endothels und seinen antiöstrogenen Effekt zu einer deutlichen Erhöhung des kardiovaskulären Risikos zu führen. Vor diesem Hintergrund untersucht diese Studie den Einfluss von chronischem Rauchen auf die Endothelfunktion und die Sexualsteroiden im Verlauf eines Menstruationszyklus bei gesunden, jungen Frauen ohne weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren durch Messung der endothel-abhängigen (FMD) und -unabhängigen Vasodilatation (NMD) der A. brachialis.

Hierzu wurden insgesamt 25 junge, gesunde Frauen im Alter von 26 bis 36 Jahren in 2 Studiengruppen an 3 Zeitpunkten eines Menstruationszyklus untersucht: in der Menstruationsphase (M+3), der mittleren Follikelphase (M+7) und der mittleren Lutealphase (M-5). Zu jedem Zeitpunkt wurde die FMD und die NMD der Arteria brachialis mittels des etablierten, nicht-invasiven Verfahrens sonographisch bestimmt, zusätzlich erfolgten Blutentnahmen und während der Menstruationsphase die Bestimmung der Intima-Media-Dicke (IMT). Die Gruppe der Nichtraucherinnen bestand aus 12 Frauen, die keinen kardiovaskulären Risikofaktor aufwiesen. Die Gruppe der Raucherinnen bestand aus 13 Frauen, die außer dem regelmäßigen Nikotinkonsum keinen weiteren kardiovaskulären Risikofaktor aufwiesen.

In der Auswertung zeigten die Sexualhormone in beiden Studiengruppen einen typischen Zyklusverlauf. Die Östradiol-Spiegel waren bei den Raucherinnen zum Zeitpunkt M-5 signifikant niedriger als bei Nichtraucherinnen ( $495 \pm 105$  pg/ml vs.  $668 \pm 176$  pg/ml;  $p < 0.05$ ). Bei den Nichtraucherinnen konnte ein Trend hin zu einem Anstieg der FMD während der mittleren Lutealphase im Vergleich zur Menstruationsphase festgestellt werden. In der Gruppe der Raucherinnen war ein Trend zu einer Reduktion der FMD im Zyklusverlauf zu beobachten. Zum Zeitpunkt M-5 zeigte sich eine signifikant verminderte FMD bei den Raucherinnen verglichen mit den Nichtraucherinnen ( $7.1 \pm 3.0$  % vs.  $10.7 \pm 4.5$  %,  $p < 0.05$ ). Es fanden sich keine Unterschiede in NMD und IMT zwischen beiden Gruppen oder zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten während des Menstruationszyklus. Ebenso waren keine signifikanten Korrelationen zwischen Östradiol und FMD/NMD nachweisbar.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Studie, dass Rauchen mit der physiologischen hormonellen Regulation bei prämenopausalen Frauen interagiert. Die negativen Effekte des Rauchens auf die Endothelfunktion wurden in der vorliegenden Untersuchung jedoch lediglich zum Zeitpunkt M-5, der Zyklusphase mit den höchsten Sexualhormonen, relevant. Während dieser Phase war außerdem der Östradiolspiegel bei den rauchenden Probandinnen signifikant niedriger als bei den Nichtraucherinnen. Dies könnte als Erklärung für die verminderte FMD dienen. Der antiöstrogene Effekt des Rauchens, der die vorteilhafte Wirkung des Östrogens auf die Gefäßfunktion abschwächt, könnte in Kombination mit den Oxidantien aus dem Zigarettenrauch, die zu einer verminderten Bildung und gesteigerten Inaktivierung von NO und damit zu einer endothelialen Dysfunktion führen, die signifikant verminderte Endothelfunktion zu diesem Zeitpunkt hervorrufen. Warum eine Verminderung der FMD bei den Raucherinnen in den anderen Zyklusphasen nicht messbar war ist unklar. Möglicherweise stellte die FMD-Messung bei den an unserer Studie beteiligten, sehr jungen und gesunden Frauen unter Umständen einen nicht ausreichend sensitiven Marker zur kardiovaskulären Risikostratifizierung dar.

Die Studie unterstreicht darüber hinaus die Notwendigkeit einer genauen Deskription von Zyklusphasen und eines eventuellen Nikotinabusus bei Studien, in denen prämenopausale Frauen untersucht werden, um die Studienergebnisse richtig bewerten und einordnen zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 **Adams MR**, Robinson J, McCredie R, et al. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1997; 32:123-7
- 2 **Andersen FS**, Transbøl I, Christiansen C. Is cigarette smoking a promotor of the menopause? *Acta Med Scand* 1982; 212(3):137-9
- 3 **Anderson TJ**, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26(5):1235-41
- 4 **Asahara T**, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302):964-7
- 5 **Babiker FA**, De Windt LJ, van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res* 2002 ; 53(3):709-19
- 6 **Balletshofer BM**, Rittig K, Stock J, Häring HU. Indikatoren einer beginnenden Atherosklerose: Erfassung der endothelialen Dysfunktion mittels hochauflösendem Ultraschall. *Ultraschall Med* 2003; 24(3):153-61
- 7 **Barnett JB**, Woods MN, Lamon-Fava S, et al. Plasma lipid and lipoprotein levels during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(2):776-82
- 8 **Beckman JS**, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271(5 Pt 1):C1424-37
- 9 **Benowitz NL**, Fitzgerald GA, Wilson M, Zhang Q. Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22(4):1159-67
- 10 **Bermudez EA**, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol* 2002; 89(9):1117-9
- 11 **Berry KL**, Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clin Sci (Lond)* 2000; 99(4):261-7
- 12 **Blackburn CW**, Peterson CA, Hales HA, et al. Nicotine, but not cotinine, has a direct toxic effect on ovarian function in the immature gonadotropin-stimulated rat. *Reprod Toxicol* 1994; 8(4):325-31
- 13 **Bonithon-Kopp C**, Scarabin PY, Darne B, Malmejac A, Guize L. Menopause-related changes in lipoproteins and some other cardiovascular risk factors. *Int J Epidemiol* 1990; 19(1):42-8

- 14 **Burns DM.** Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; 46(1):11-29
- 15 **Bush DE,** Jones CE, Bass KM, Walters GK, Bruza JM, Ouyang P. Estrogen replacement reverses endothelial dysfunction in postmenopausal women. *Am J Med* 1998; 104(6):552-8
- 16 **Carr BR,** MacDonald PC, Simpson ER. The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. *Fertil Steril* 1982; 38(3):303-11
- 17 **Cauley JA,** LaPorte RE, Kuller LH, Bates M, Sandler RB. Menopausal estrogen use, high density lipoprotein cholesterol subfractions and liver function. *Atherosclerosis* 1983; 49:31-9
- 18 **Celermajer DS.** Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997; 30(2):325-33
- 19 **Celermajer DS,** Adams MR, Clarkson P, et al. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996; 334(3):150-4
- 20 **Celermajer DS,** Sorensen KE, Bull C, et al. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1468-1474
- 21 **Celermajer DS,** Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88(5 Pt 1):2149-55
- 22 **Celermajer DS,** Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1111-1115
- 23 **Chen DB,** Bird IM, Zheng J, Magness RR. Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 2004; 145(1):113-25
- 24 **Chen Z,** Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999; 103(3):401-6
- 25 **Clarkson P,** Celermajer DS, Powe AJ, et al. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation* 1997; 96:3378-3383
- 26 **Colditz GA,** Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1987; 316(18):1105-10

- 27 **Corretti MC**, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:257-265
- 28 **Corson MA**, James NL, Latta SE, et al. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79:984- 991
- 29 **Craig WY**, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ* 1989; 298(6676):784-8
- 30 **Criqui MH**, Wallace RB, Heiss G, Mishkel M, Schonfeld G, Jones GT. Cigarette smoking and plasma high-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. *Circulation* 1980; 62(4 Pt 2):IV70-6
- 31 **Darling GM**, Johns JA, McCloud PI, Davies SR. Estrogen and progestin compared with simvastatin for hypercholesterolemia in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997; 337:595-601
- 32 **Dimmeler S**, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399:601-605
- 33 **Doll R**, Gray R, Hafner B, Peto R. Mortality in relation to smoking: 22 years' observations on female British doctors. *Br Med J* 1980; 280(6219):967-71
- 34 **Esen AM**, Barutcu I, Acar M, et al. Effect of smoking on endothelial function and wall thickness of brachial artery. *Circ J* 2004; 68(12):1123-6
- 35 **Etsuda H**, Takase B, Uehata A, et al. Morning attenuation of endothelium dependent, flow-mediated dilation in healthy young men: possible connection to morning peak of cardiac events? *Clin Cardiol* 1999; 22:417- 421
- 36 **Fadini GP**, de Kreutzenberg SV, Coracina A, et al. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2006; 27:2247-2255
- 37 **Fischer M**, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2002; 53(3):672-7
- 38 **Ford ES**, Capewell S. Coronary heart disease mortality among young adults in the U.S. from 1980 through 2002: concealed leveling of mortality rates. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:2128 –32
- 39 **Freeman DJ**, Packard CJ. Smoking and plasma lipoprotein metabolism. *Clin Sci (Lond)* 1995; 89(4):333-42
- 40 **Frei B**, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem J* 1991; 277 (Pt 1):133-8

- 41 **Fröhlich M**, Sund M, Löwel H, Imhof A, Hoffmeister A, Koenig W. Independent association of various smoking characteristics with markers of systemic inflammation in men. Results from a representative sample of the general population (MONICA Augsburg Survey 1994/95). *Eur Heart J* 2003; 24(14):1365-72
- 42 **Ghiadoni L**, Donald AE, Cropley M, et al. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2000; 102:2473-2478
- 43 **Giardina EG**, Chen HJ, Sciacca RR, Rabbani LE. Dynamic Variability of Hemostatic and Fibrinolytic Factors in Young Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 6179–6184
- 44 **Gisclard V**, Miller VM, Vanhoutte PM. Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244(1):19-22
- 45 **Glantz SA**, Parmley WW. Passive smoking and heart disease. Mechanisms and risk. *JAMA* 1995; 273(13):1047-53
- 46 **Greenland P**, Reicher-Reiss H, Goldbourt U, Behar S. In-hospital and 1-year mortality in 1,524 women after myocardial infarction. Comparison with 4,315 men. *Circulation* 1991; 83(2):484-91
- 47 **Grobbee DE**, Bots ML. Carotid artery intima-media thickness as an indicator of generalized atherosclerosis. *J Intern Med* 1994; 236(5):567-73
- 48 **Haines CJ**, Cheung LP, Lam CW. Changes in atherogenic lipids and lipoproteins during natural and hyperstimulated cycles in healthy women. *Fertil Steril* 1997; 68:231-5
- 49 **Hamelin BA**, Méthot J, Arsenault M, et al. Influence of the menstrual cycle on the timing of acute coronary events in premenopausal women. *Am J Med* 2003; 114(7):599-602
- 50 **Hashimoto M**, Akishita M, Eto M, et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 1995; 92(12):3431-5
- 51 **Heitzer T**, Brockhoff C, Mayer B, et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000; 86(2):E36-41
- 52 **Heitzer T**, Just H, Münzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996; 94(1):6-9
- 53 **Hill JM**, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348:593–600
- 54 **Hjortland MC**, McNamara PM, Kannel WB. Some atherogenic concomitants of menopause: The Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1976; 103:304-11

- 55 **Ho KJ**, Liao JK. Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Mol Interv.* 2002; 2(4):219-28
- 56 **Hoffmeister H**, Mensink GB, Stolzenberg H, et al. Reduction of coronary heart disease risk factors in the German cardiovascular prevention study. *Prev Med* 1996; 25(2):135-45
- 57 **Hu R**, Wang WQ, Lau CP, Tse HF. Gender differences on brachial flow-mediated dilation and carotid intima-media thickness for prediction of spontaneous cardiovascular events. *Clin Cardiol.* 2008; 31(11):525-30
- 58 **Hulley S**, Grady D, Bush T, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998; 280(7):605-13
- 59 **Jensen J**, Christiansen C, Rødbro P. Cigarette smoking, serum estrogens, and bone loss during hormone-replacement therapy early after menopause. *N Engl J Med* 1985; 313(16):973-5
- 60 **Jensen J**, Christiansen C. Effects of smoking on serum lipoproteins and bone mineral content during postmenopausal hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159(4):820-5
- 61 **Jiang CW**, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol* 1991; 104(4):1033-7
- 62 **Jochmann N**, Müller S, Kuhn C et al. Chronic smoking prevents amelioration of endothelial function in the course of the menstrual cycle. *Circ J* 2009; 73(3):568-72
- 63 **Jochmann N**, Lorenz M, Krosigk A, et al. The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea. *Br J Nutr* 2008; 99(4):863-8
- 64 **Joannides R**, Haefeli WE, Linder L, et al. Nitric oxide is responsible for flow dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91:1314-1319
- 65 **Junge B**, Nagel M. Das Rauchverhalten in Deutschland. *Gesundheitswesen* 1999; 61 Spec No:S121-5
- 66 **Kannel WB**, D'Agostino RB, Belanger AJ. Fibrinogen, cigarette smoking, and risk of cardiovascular disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J* 1987; 113(4):1006-10
- 67 **Kawano H**, Motoyama T, Ohgushi M, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Menstrual cyclic variation of myocardial ischemia in premenopausal women with variant angina. *Ann Intern Med* 2001; 135(11):977-81

- 68 **Kawano H**, Motoyama T, Hirashima O, et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:146-154
- 69 **Keaney JF Jr**, Shwaery GT, Xu A, et al. 17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 1994; 89(5):2251-9
- 70 **Kelm M**, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion Therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist (Berl)* 1999; 40(12):1300-7
- 71 **Khot UN**, Khot MB, Bajzer CT, et al. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA* 2003; 290(7):898-904
- 72 **Koh KK**, Mincemoyer R, Bui MN, et al. Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997; 336:683-90
- 73 **Kuller LH**, Gutai JP, Meilahn E, Matthews KA, Plantinga P. Relationship of endogenous sex steroid hormones to lipids and apoproteins in postmenopausal women. *Arteriosclerosis* 1990; 10:1058-66
- 74 **Knopp RH**. The effects of postmenopausal estrogen therapy on the incidence of arteriosclerotic vascular disease. *Obstet Gynecol* 1988; 72:23S-30S
- 75 **Lampert T**, Burger M. Rauchgewohnheiten in Deutschland – Ergebnisse des telefonischen Bundes-Gesundheitssurveys 2003. *Gesundheitswesen* 2004; 66(8-9):511-7
- 76 **Law MR**, Wald NJ. Environmental tobacco smoke and ischemic heart disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; 46(1):31-8
- 77 **Leeson P**, Thorne S, Donald A, et al. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart* 1997; 78:22-27
- 78 **Lehr HA**, Frei B, Arfors KE. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(16):7688-92
- 79 **Lekakis J**, Papamichael C, Vemmos C, Stamatelopoulos K, Voutsas A, Stamatelopoulos S. Effects of acute cigarette smoking on endothelium-dependent arterial dilatation in normal subjects. *Am J Cardiol* 1998; 81(10):1225-8
- 80 **Lerner DJ**, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986; 111(2):383-90
- 81 **Li L**, Hisamoto K, Kim KH et al. Variant estrogen receptor-c-Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(42):16468-73

- 82 **Lieberman EH**, Gerhard MD, Uehata A, et al. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1994; 121(12):936-41
- 83 **Lloyd GW**, Patel NR, McGing E, Cooper AF, Brennand-Roper D, Jackson G. Does angina vary with the menstrual cycle in women with premenopausal coronary artery disease? *Heart* 2000; 84(2):189-92
- 84 **Ludwig A**, Jochmann N, Kertesz A et al. Smoking decreases the level of circulating CD34+ progenitor cells in young healthy women - a pilot study. *BMC Women's Health*, eingereicht und unter Revision.
- 85 **Lussier-Cacan S**, Xhignesse M, Desmarais JL, Davignon J, Kafrissen ME, Chapdelaine A. Cyclic fluctuations in human serum lipid and apolipoprotein levels during the normal menstrual cycle: comparison with changes occurring during oral contraceptive therapy. *Metabolism* 1991; 40(8):849-54
- 86 **Lyons Wall PM**, Choudhury N, Gerbrandy EA, Truswell AS. Increase of high-density lipoprotein cholesterol at ovulation in healthy women. *Atherosclerosis* 1994; 105:171-8
- 87 **MacMahon B**, Trichopoulos D, Cole P, Brown J. Cigarette smoking and urinary estrogens. *N Engl J Med* 1982; 307(17):1062-5
- 88 **Manson JE**, Hsia J, Johnson KC, et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2003; 349(6):523-34
- 89 **Matetzky S**, Tani S, Kangavari S, et al. Smoking increases tissue factor expression in atherosclerotic plaques: implications for plaque thrombogenicity. *Circulation* 2000; 102(6):602-4
- 90 **Mazzone A**, Cusa C, Mazzucchelli I, et al. Cigarette smoking and hypertension influence nitric oxide release and plasma levels of adhesion molecules. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(9):822-6
- 91 **Meade TW**, Haines AP, Imeson JD, Stirling Y, Thompson SG. Menopausal status and haemostatic variables. *Lancet* 1983; 1(8314-5):22-4
- 92 **Meek MD**, Finch GL. Diluted mainstream cigarette smoke condensates activate estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene transcription. *Environ Res* 1999; 80(1):9-17
- 93 **Mendelsohn ME**, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340(23):1801-11
- 94 **Mercuro G**, Vitale C, Fini M, Zoncu S, Leonardo F, Rosano GM. Lipid profiles and endothelial function with low-dose hormone replacement therapy in postmenopausal women at risk for coronary artery disease: a randomized trial. *Int J Cardiol* 2003; 89:257-265

- 95 **Michnovicz JJ**, Hershcopf RJ, Naganuma H, Bradlow HL, Fishman J. Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogenic effect of cigarette smoking. *N Engl J Med* 1986; 315(21):1305-9
- 96 **Moens AL**, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest* 2005; 127(6):2254-63
- 97 **Mukamal KJ**, Muller JE, Maclure M, Sherwood JB, Mittleman MA. Variation in the risk of onset of acute myocardial infarction during the menstrual cycle. *Am J Cardiol* 2002; 90(1):49-51
- 98 **Muscat JE**, Harris RE, Haley NJ, Wynder EL. Cigarette smoking and plasma cholesterol. *Am Heart J* 1991; 121(1 Pt 1):141-7
- 99 **Neunteufl T**, Heher S, Kostner K, et al. Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(2):251-6
- 100 **Neunteufl T**, Katzenschlager R, Hassan A, et al. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997; 129(1):111-8
- 101 **Newby DE**, McLeod AL, Uren NG, et al. Impaired coronary tissue plasminogen activator release is associated with coronary atherosclerosis and cigarette smoking: direct link between endothelial dysfunction and atherothrombosis. *Circulation* 2001; 103(15):1936-41
- 102 **Newby DE**, Wright RA, Labinjoh C, et al. Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99(11):1411-5
- 103 **Orth-Gomér K**, Mittleman MA, Schenck-Gustafsson K, et al. Lipoprotein(a) as a determinant of coronary heart disease in young women. *Circulation* 1997; 95(2):329-34
- 104 **Owens D**, Cox M, Caird J, et al. Altered regulation of cholesterol metabolism in type I diabetic women during the menstrual cycle. *Diabet Med* 1993; 10(7):647-53
- 105 **Pahwa MB**, Seth S, Seth RK. Lipid profile in various phases of menstrual cycle and its relationship with percentage plasma volume changes. *Clin Chim Acta* 1998; 273:201-7
- 106 **Panza JA**, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323(1):22-7
- 107 **Papamichael CM**, Aznaouridis KA, Karatzis EN, et al. Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109(1):55-60
- 108 **Parinaud J**, Perret B, Ribbes H, Chap H, Pontonnier G, Douste-Blazy L. High density lipoprotein and low density lipoprotein utilization by human granulosa cells for progesterone synthesis in serum-free culture: respective contributions of free and esterified cholesterol. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(3):409-17

- 109 **Petitti DB**, Kipp H. The leukocyte count: associations with intensity of smoking and persistence of effect after quitting. *Am J Epidemiol* 1986; 123(1):89-95
- 110 **Pignoli P**, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986; 74(6):1399-406
- 111 **Poredos P**. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:274-7
- 112 **Pradhan AD**, Manson JE, Rossouw JE. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. *JAMA* 2002; 288(8):980-7
- 113 **Quensel M**, Agardh CD, Nilsson-Ehle P. Nicotine does not affect plasma lipoprotein concentrations in healthy men. *Scand J Clin Lab Invest* 1989; 49(2):149-53
- 114 **Raitakari OT**, Adams MR, McCredie RJ, Griffiths KA, Stocker R, Celermajer DS. Oral vitamin C and endothelial function in smokers: short-term improvement, but no sustained beneficial effect. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(6):1616-21
- 115 **Ricci G**, Tamaro G, Simeone R, et al. Lipoprotein(a) changes during natural menstrual cycle and ovarian stimulation with recombinant and highly purified urinary FSH. *Hum Reprod* 2001; 16(3):449-56
- 116 **Ridker PM**, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JE. Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999; 100(7):713-6
- 117 **Rival J**, Riddle JM, Stein PD. Effects of chronic smoking on platelet function. *Thromb Res* 1987; 45(1):75-85
- 118 **Rosamond W**, Flegal K, Friday G, et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007; 115(5):e69-171
- 119 **Rosano GM**, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Beneficial effect of oestrogen on exercise-induced myocardial ischaemia in women with coronary artery disease. *Lancet* 1993; 342(8864):133-6
- 120 **Ross R**. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2):115-26
- 121 **Sarabi M**, Lind L. Short-term effects of smoking and nicotine chewing gum on endothelium-dependent vasodilation in young healthy habitual smokers. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35(3):451-6
- 122 **Scheuermann W**, Ladwig KH. Geschlechtsspezifische Unterschiede in Risiken und Versorgung der koronaren Herzerkrankung. *Z Kardiol* 1998; 87(7):528-36

- 123 **Schmeiser-Rieder A**, Schoberberger R, Kunze M. Women and smoking. *Wien Med Wochenschr* 1995; 145(4):73-6
- 124 **Shen Y**, Rattan V, Sultana C, Kalra VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* 1996; 270(5 Pt 2):H1624-33
- 125 **Shimokawa H**. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(1):23-37
- 126 **Simpson AJ**, Gray RS, Moore NR, Booth NA. The effects of chronic smoking on the fibrinolytic potential of plasma and platelets. *Br J Haematol* 1997; 97(1):208-13
- 127 **Sorensen KE**, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familiar hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest* 1994; 93(1):50-5
- 128 **Stary HC**. Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res Cardiol* 1994; 89:17-32
- 129 **Statistisches Bundesamt** Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12; Reihe 4; 2007
- 130 **Statistisches Bundesamt** Verteilung der Bevölkerung nach ihrem Rauchverhalten in Prozent. Mikrozensus - Fragen zur Gesundheit. [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
- 131 **Steinmetz M**, Nickenig G, Werner N. Perspektiven regenerativer Mechanismen bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen am Beispiel endothelialer Progenitorzellen. *Med Klin (Munich)* 2009; 104(4):287-95
- 132 **Störk S**, von Schacky C, Angerer P. The effect of 17beta-estradiol on endothelial and inflammatory markers in postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *Atherosclerosis* 2002; 165(2):301-7
- 133 **Stubbe I**, Eskilsson J, Nilsson-Ehle P. High-density lipoprotein concentrations increase after stopping smoking. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 284(6328):1511-3
- 134 **Su W**, Campos H, Judge H, Walsh BW, Sacks FM. Metabolism of Apo(a) and ApoB100 of lipoprotein(a) in women: effect of postmenopausal estrogen replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3267-76
- 135 **Takase B**, Uehata A, Akima T, et al. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 82(12):1535-9, A7-8
- 136 **The Writing Group for the PEPI Trial** Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *JAMA* 1995; 273(3):199-208

- 137 **Thomas GA**, Davies SV, Rhodes J, Russell MA, Feyerabend C, Säwe U. Is transdermal nicotine associated with cardiovascular risk? *J R Coll Physicians Lond* 1995; 29(5):392-6
- 138 **Tikkanen MJ**, Kuusi T, Nikkilä EA, Stenman UH. Variation of postheparin plasmatic hepatic lipase by menstrual cycle. *Metabolism* 1986; 35(2):99-104
- 139 **Tikkanen MJ**, Nikkilä EA. Regulation of hepatic lipase and serum lipoproteins by sex steroids. *Am Heart J* 1987; 113: 562-7
- 140 **Tracy RP**, Psaty BM, Macy E, et al. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(10):2167-76
- 141 **Tuut M**, Hense HW. Smoking, other risk factors and fibrinogen levels. evidence of effect modification. *Ann Epidemiol* 2001; 11(4):232-8
- 142 **Vaccarino V**, Horwitz RI, Meehan TP, Petrillo MK, Radford MJ, Krumholz HM. Sex differences in mortality after myocardial infarction: evidence for a sex-age interaction. *Arch Intern Med* 1998; 158(18):2054-62
- 143 **Vaccarino V**, Parsons L, Every NR, Barron HV, Krumholz HM. Sex-based differences in early mortality after myocardial infarction. National Registry of Myocardial Infarction 2 Participants. *N Engl J Med* 1999; 341(4):217-25
- 144 **Vane JR**, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36
- 145 **Vasa M**, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1-7
- 146 **Vogel RA**, Corretti MC, Plotnick GD. A comparison of brachial artery flow-mediated vasodilation using upper and lower arm arterial occlusion in subjects with and without coronary risk factors. *Clin Cardiol* 2000; 23(8):571-5
- 147 **Vogel RA**, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol.* 1997; 79:350-354
- 148 **Waldecker B**, Grepels E, Waas W, et al. Akuter Myokardinfarkt bei prämenopausalen Frauen. *Z Kardiol* 2003; 92(6):476-82
- 149 **Wannamethee SG**, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, Whincup PH. Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2005; 26(17):1765-73
- 150 **Weber C**, Erl W, Weber K, Weber PC. Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* 1996; 93(8):1488-92

- 151 **Westhoff C**, Gentile G, Lee J, Zacur H, Helbig D. Predictors of ovarian steroid secretion in reproductive-age women. *Am J Epidemiol* 1996; 144(4):381-8
- 152 **Widlansky ME**, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1149-60
- 153 **Wikstrand J**. Methodological considerations of ultrasound measurement of carotid artery intima-media thickness and lumen diameter. *Clin Physiol Funct Imaging* 2007; 27(6):341-5
- 154 **Willett WC**, Green A, Stampfer MJ, et al. Relative and absolute excess risks of coronary heart disease among women who smoke cigarettes. *N Engl J Med* 1987; 317(21):1303-9
- 155 **Williams JK**, Adams MR, Klopfenstein HS. Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1990; 81(5):1680-7
- 156 **Williams MR**, Westerman RA, Kingwell BA, et al. Variations in endothelial function and arterial compliance during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(11):5389-95
- 157 **Yufu K**, Takahashi N, Okada N, et al. Influence of systolic blood pressure and cigarette smoking on endothelial function in young healthy people. *Circ J* 2009; 73(1):174-8

## **8. Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und ihre konstruktive Kritik bin ich ihr sehr dankbar.

Frau Dr. med. Nicoline Jochmann danke ich für die hervorragende Betreuung und ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Besonders dankbar bin ich für die Selbstverständlichkeit, mit der sie sich trotz großer Arbeitsbelastung jederzeit Nachfragen und akuten Problemen gewidmet hat und in Zeiten des Zweifels für Motivation sorgte. Danke für die vielfältigen Anregungen.

Bei Frau Christine Gericke möchte ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten bedanken.

Vielen Dank auch an Frau Claudia Kuhn und Frau Kathrin Minkwitz für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei den Probanden bedanken, die sich im Dienste der Wissenschaft bereit erklärt haben, für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung zu stehen.

Bei meiner Familie und meinem Partner S. Tietz möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums und der Folgezeit. Danke für die Freiräume, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **9. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **10. Eidstattliche Erklärung**

„Ich, Simone Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Der Einfluss von chronischem Rauchen auf die vaskuläre Endothelfunktion bei gesunden jungen Frauen zu verschiedenen Zeitpunkten des physiologischen Menstruationszyklus, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

02. Dezember 2010

S. Müller