

Ralf Kinscherf, Jürgen Metz

Die Bedeutung des oxidativen Stresses für Gefäßwandveränderungen

The importance of oxidative stress in the pathology of vessel wall alterations

Institut für Anatomie und Zellbiologie III, Universität Heidelberg (Leiter: Prof. Dr. J. Metz)

Zusammenfassung

Bewegung und Sport spielen eine immer wichtigere Rolle in der Prävention und Rehabilitation von Herz- und Kreislauferkrankungen. Neueste Untersuchungen zeigen, dass dem Pathomechanismus mehrerer Risikofaktoren, die durch sportliche Bewegung direkt oder auch indirekt günstig beeinflusst werden können, ein erhöhter oxidativer Stress zugrunde liegt, durch den Strukturen in der Gefäßwand langfristig und irreversibel geschädigt werden können. Ein oxidativer Stress wird nicht nur für eine endotheliale Dysfunktion verantwortlich gemacht, die den meisten Gefäßwandveränderungen vorausgeht, sondern auch oxidativ veränderte extrazelluläre Bestandteile der Intima, insbesondere Lipoproteine, die Makrophagen und glatten Muskelzellen anlocken und von diesen dann aufgenommen werden, können zu einer Dysbalance intrazellulärer Antioxidantiensysteme und dadurch zum Zelltod mit entzündlichen Folgereaktionen führen. Auch in der Gefäßmedia wird ein oxidativer Stress für Veränderungen der glatten Muskelzellen verantwortlich gemacht. Die funktionellen und strukturellen Veränderungen in den einzelnen Kompartimenten der Gefäßwand können schließlich zu einer akuten oder progredienten Einengung des Gefäßlumens führen, in deren Verlauf z. B. Durchblutungsminderungen eine Einschränkung bis hin zum Untergang des versorgten Gefäßbezirks verursachen können.

Schlüsselwörter: Apoptose, Atherosklerose, Makrophagen, oxidativer Stress

Oxidativer Stress und Atherogenese

Der Atherosklerose beim Menschen liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde, das durch Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hypertonie, Adipositas und Bewegungsmangel begünstigt wird. Nicht nur an der Entstehung, sondern auch am weiteren Wachstum atherosklerotischer Läsionen können sowohl Zellen aus der Arterienwand (u. a. Endothel-, Glattmuskelzellen) als auch aus dem Blut (u. a. Makrophagen [M ϕ], Thrombozyten, Lymphozyten) beteiligt sein (51). Als ein gemeinsamer Pathomechanismus dieses multifaktoriellen Geschehens wird ein oxidativer Stress in der Gefäßwand angesehen. Oxidativer Stress ist ein häufig verwendeter, allerdings ziemlich weitgefasster Begriff, der grundsätzlich das Ungleichgewicht zwischen der Rate, bei welcher der intrazelluläre Gehalt von

Summary

Physical activity and sports are becoming more and more important in prevention and rehabilitation of cardiovascular diseases. Most recent studies have shown that the underlying pathomechanism of several risk factors, which are directly or indirectly positively influenced by physical activity, is due to increased oxidative stress irreversibly damaging the different structures of the vessel wall. Oxidative stress is responsible not only for an endothelial dysfunction, preceding most of the alterations of the vessel wall, but also for oxidative alterations of extracellular material of the intima, especially lipoproteins, which attract macrophages and smooth muscle cells and are internalised by these cells, lead to a dysbalance of intracellular antioxidant systems and to cell death with inflammatory complications. Furthermore, altered reactions of smooth muscle cells in the media of the vessels have been shown to result from increased oxidative stress. The functional and structural alterations of the different compartments of the vessel wall may be complicated by a progressive stenosing of the vascular lumen. Impairment and degeneration of the tissue in the supplied vascular region is often the consequence.

Key words: Apoptosis, atherosclerosis, macrophages, oxidative stress

freien Radikalen ansteigt, relativ zur Kapazität der Zellen, freie Radikale zu eliminieren, beschreibt. Oxidativer Stress führt in den betroffenen Zellen der Gefäßwand zu Veränderungen von Signalkaskaden, Transkriptionsfaktoren, Expression und Synthese verschiedenster Substanzen, wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren, anti- und proapoptotischen Faktoren etc., die in Abhängigkeit von der jeweiligen Situation Gefäßwandveränderungen verursachen.

Als initiale Schritte von Intimaveränderungen werden i) eine endotheliale Dysfunktion, ii) eine vermehrte Ablagerung und Modifikation extrazellulärer Bestandteile, insbesondere von Low Density Lipoproteinen (LDL) in der Intima und iii) eine Ansammlung von Immunzellen dort angenommen (5, 6, 13, 43, 44, 58, 59) [Schema 1]. Eines der ersten Gene, von dem gezeigt wurde, dass es Redox reguliert wird, ist das VCAM-1 Gen in vaskulären Endothelzellen (34). VCAM-1 ist

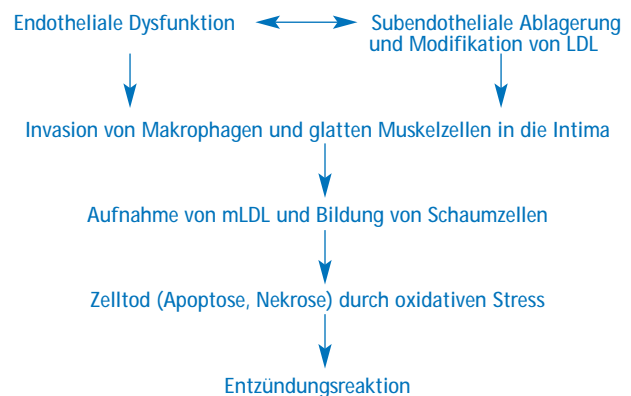
ein Monozyten- und Lymphozyten-spezifisches Adhäsionsmolekül, das höchstwahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Emigration dieser Zellen in den atherosklerotischen Plaque spielt. Als Mechanismen der oxidativen LDL-Modifikation in der Intima werden u. a. die Übergangsmetallkatalysierte Lipidperoxidation, die Einwirkung zellulärer Lipoxygenasen (19) sowie eine Superoxid (u. a. 17, 19) oder Peroxynitrit vermittelte Oxidation diskutiert (u. a. 37). Einerseits soll modifiziertes LDL (mLDL) chemotaktisch auf mononukleäre Zellen wirken (u. a. 11), die als Monozyten in den subendothelialen Raum emigrieren und dort zu M ϕ aktiviert werden. Andererseits kann die Oxidation von LDL durch M ϕ geschehen (42), die anschließend das modifizierte LDL über i) acLDL-Rezeptoren; ii) Scavenger-Rezeptoren; oder iii) Fc-Rezeptoren (IgG Fc-Rezeptor [Fc gamma-Rezeptor]) internalisieren können (u. a. 38, 56). Nach Aufnahme über Scavenger Rezeptoren gelangt der größte Anteil (60 - 90%) von mLDL (freies und verestertes Cholesterin) in Lysosomen (57), wobei aufgrund eines unzureichenden Abbaus Ceroid-enhaltende Schaumzellen mit typischen Lipidtropfen entstehen können (u. a. 32). Während frühe atherosklerotische Plaques im wesentlichen aus M ϕ bestehen, kommen später glatte Muskelzellen dazu.

Oxidativer Stress initiiert einen Zelltod im atherosklerotischen Plaque

Sowohl beim Menschen als auch in experimentellen Studien wurde beobachtet, dass das Plaquewachstum nur bedingt mit dem verursachenden Parameter, z. B. der Schwere der Hypercholesterinämie, korreliert. Als wesentliche pathophysiologische Variable könnte die aus dem oxidativen Stress resultierende unterschiedliche Reaktion der M ϕ und die folgende Entzündungsreaktion angenommen werden [Schema 1]. Ein programmierter Zelltod (Apoptose) nicht nur von M ϕ wurde in den letzten Jahren in der fibrösen Kappe und in den Schulterregionen humaner atherosklerotischer Plaques von mehreren Forschergruppen nachgewiesen (u. a. 4, 7, 26, 30). Diese Interpretation ist allerdings nicht unumstritten, da die Unterscheidung zwischen apoptotischen oder (sekundär) nekrotischen Zellen, bzw. solchen, in denen Reparaturvorgänge der DNA stattfinden, schwierig ist (u. a. 2, 3). Unabhängig von dieser Einschränkung wurde dem Zelltod in der Gefäßwand ein wesentlicher Anteil bei der Atherogenese zugeschrieben (u. a. 31, 32). So soll bei einer Hyperlipidämie die Apoptose in den aktiven Turn-over von Schaumzellen in frühen atherosklerotischen Läsionen involviert sein (18), eine Apoptose von Plaquezellen in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen soll zu azellulären Lipidschichten (u. a. 29) sowie zur Bildung instabiler, vor allem thrombogener Lipidherde führen (33). Während das Apoptoseprogramm bereits durch einen geringfügigen oxidativen Stress eingeleitet wird, schädigt erst ein starker oxidativer Stress Proteine, Lipide und Nukleinsäuren so stark, dass eine Nekrose resultiert (u. a. 52). Während ein programmierter Zelltod ohne weitere Begleiterscheinungen und Narbenbildung abläuft und damit das Plaquewachstum nur wenig beeinflusst, führt eine primäre bzw. sekundäre

Nekrose von Gefäßwandzellen aufgrund der durch sie induzierten fibroproliferativen Entzündung zu einer Potenzierung des Plaquewachstum und zu einer Destabilisierung der Plaqueoberfläche. Im Folgenden soll die Signaltransduktion des durch oxidativen Stress induzierten Zelltodes nach mLDL-Exposition dargestellt werden.

Schema 1: Pathogenese arteriosklerotischer Läsionen



Signaltransduktion des durch oxidativen Stress induzierten Zelltodes

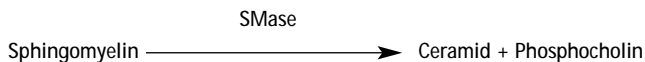
Aus in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass die Aufnahme von mLDL in Endothel-, Glattmuskelzellen oder M ϕ für seine Zytotoxizität von entscheidender Bedeutung ist (u. a. 8, 56) und dass sowohl eine Apoptose als auch eine Nekrose der M ϕ induziert werden kann (u. a. 15, 39 - 41).

Alle Substanzen, die in der Zelle prooxidative Verhältnisse verursachen, können einen Zelltod induzieren. Hierzu zählen nicht nur klassische Oxidantien wie H₂O₂ (52), Quinone und Diamide (u. a. 46, 52), auch Mediatoren wie TNF α oder Ceramid werden dazu gerechnet, da sie die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS), wie O₂⁻ und H₂O₂, in Mitochondrien anregen (48, 49, 60). Zur Verminderung eines oxidativen Stresses und seiner schädigenden Auswirkungen sind deshalb sowohl extra- wie auch intrazellulär antioxidative Schutzmechanismen von größter Bedeutung (u. a. 15).

TNF und APO-1/Fas/CD95 Rezeptor/Ligandensystem
Jovinge et al. (23) konnten zeigen, dass human-M ϕ nach Inkubation mit mLDL vermehrt TNF α produzieren, wobei mehrere Möglichkeiten einer Interaktion mit der Signalkaskade der Apoptose bestehen. Der TNF-Rezeptor (TNFR) ist Mitglied einer Rezeptorsuperfamilie, die im extrazellulären Teil charakteristische, (meistens vier) cysteinreiche Domänen besitzt und Mitglieder, wie den NGF-Rezeptor, die beiden TNF-Rezeptoren (TNFR1 [p55] und TNFR2 [p75]), das B-Zell-Aktivierungsgen CD40 und CD95/APO-1/Fas umfasst. Obwohl viele Signalwege bei der CD95/APO-1/Fas- und TNFR1-induzierten Apoptose identisch sind, wurden auch einige intrazelluläre Prozesse nach TNFR1 Aktivierung bekannt, die für erstere nicht beschrieben sind. So wird TNF α unabhängig von seiner Bindung an den TNFR1 in den Mitochondrien für die Entstehung von ROS verantwortlich gemacht (u. a. 48, 49).

Sphingomyelinasen (SMasen) und Ceramid

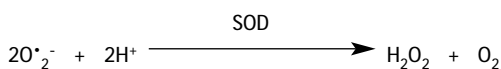
Intrazellulär erfolgt die Signaltransduktion des Apoptose-induzierenden Signals von CD95/APO-1/Fas und von TNF α über die Aktivierung einer sauren SMase (u. a. 47), die im Unterschied zur neutralen SMase in der Lysosomen-Fraktion nachgewiesen wurde.



Wir konnten erst kürzlich zeigen, dass mLDL in human-M ϕ durch Zunahme der Aktivität der sauren und neutralen Sphingomyelinasen eine signifikante Zunahme der intrazellulären Ceramidkonzentration bewirkt (25). Unabhängig davon, dass die Außenseite der Plasmamembran die höchsten SM-Konzentrationen aufweist, scheint die Innenseite der Plasmamembran und lysosomale/endosomale Kompartimente pathogenetisch wesentlich wichtiger für SM-Hydrolyse und Ceramidgenerierung nach mLDL Exposition zu sein (u. a. 55). Neben der SM-Hydrolyse wird auch die de novo Ceramidsynthese als alternativer Mechanismus diskutiert, um Ceramid für die intrazelluläre Signaltransduktion zur Verfügung zu stellen (1).

H₂O₂ Produktion in Mitochondrien

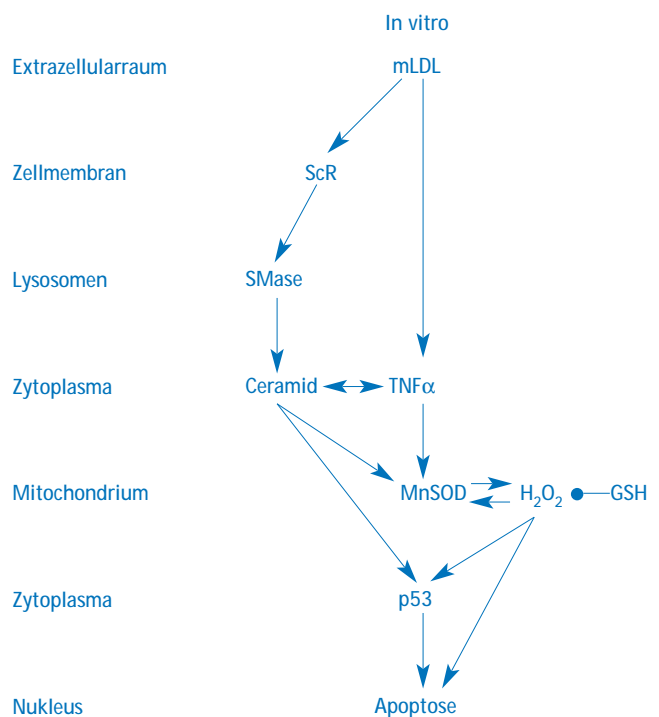
Bereits physiologischerweise in geringer Menge in der Atmungskette entstehende O₂⁻ Radikale werden durch die Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) zu H₂O₂ und O₂ metabolisiert (36):



Die MnSOD ist in erster Linie in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und stellt einen primären Abwehrmechanismus gegenüber O₂⁻-Schädigungen in Sauerstoff-metabolisierenden Zellen dar (u. a. 12). Wir fanden in human-M ϕ , dass im Gegensatz zu nativem LDL eine Behandlung mit mLDL, C₂-Ceramid oder TNF α sowohl die Expression von MnSOD auf RNA- (RT-PCR) und auf Proteinebene (Westernblot) induzierte (26) als auch zu einer deutlichen (2,3-fachen) Zunahme der MnSOD-Aktivität führte. Die Induktion der MnSOD ist somit als Reaktion auf einen intrazellulären, oxidativen Stress anzusehen (u. a. 27, 54). Einerseits kann MnSOD in erster Linie O₂⁻-Radikale abfangen, die im Rahmen der mitochondrialen Oxidation gebildet werden (u. a. 48, 49) und ist damit als antioxidatives 'Scavengerenzym' von großer Bedeutung für die Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien (u. a. 54). Andererseits jedoch entstehen durch die MnSOD selbst wiederum ROS, nämlich H₂O₂, das in Form einer autokatalytischen Amplifikation die MnSOD konzentrationsabhängig induzierte. Darüber hinaus muss H₂O₂ seinerseits über nachgeschaltete Antioxidantien, in den Mitochondrien stellt reduziertes Glutathion das einzige antioxidative Abwehrsystem gegen H₂O₂ dar, entgiftet werden (u. a. 14). Dieser Prozess scheint nach Behandlung von

human-M ϕ mit mLDL inadäquat abzulaufen, da wir eine signifikante Abnahme der intrazellulären GSH-Konzentrationen und eine signifikant (5-fach) erhöhte H₂O₂-Konzentration fanden, die zu einer deutlichen (ca. 5-fachen) Steigerung der Apoptoserate führte (26). Zusätzlich stellten wir eine Zunahme der p53 Expression sowohl auf RNA- (RT-PCR) als auch auf Proteinebene (Westernblot) fest (26).

Schema 2: Signaltransduktion der mLDL-induzierten Apoptose in Mf. Abkürzungen: GSH, Glutathion; LDL, Low-Density Lipoprotein; mLDL, modifiziertes LDL; MnSOD, Mangansuperoxiddismutase; ScR, Scavenger Rezeptor; SMase, Sphingomyelinase; TNF α , Tumornekrosefaktor alpha. \longrightarrow induziert; \bullet — inhiert.



Eine Vorinkubation der M ϕ mit NAC verminderte sowohl die durch die Mediatoren induzierte Abnahme der intrazellulären GSH-Konzentration, die p53 Expression als auch die Zunahme der Apoptoserate (26). Damit dürfte dem Gleichgewicht zwischen SOD und Peroxid-metabolisierenden Systemen in den Mitochondrien eine essentielle Bedeutung innerhalb des Zelltodprogrammes zukommen (u. a. 35). Zum anderen scheint auch das Tumorsuppressorgen p53, das bei der Regulation eines chromosomalen Schadens eine wichtige Rolle spielt, indem es zunächst die DNA Replikation von geschädigten Zellen blockiert, involviert zu sein. Die intrazelluläre Signaltransduktion der mLDL-induzierten Apoptose in M ϕ ist im Schema 2 zusammengefasst.

Als Bestätigung der von uns in vitro für mLDL gefundenen Schritte der Signalkaskade konnten wir in atherosklerotischen Läsionen sowohl vom Menschen als auch von experimentellen Tieren zeigen, dass in allen Stadien der Plaques M ϕ MnSOD enthielten (27). Interessanterweise fanden wir bei hypercholesterinämischen Tieren auch eine signifikante Zunahme derartiger MnSOD positiver M ϕ in der Herzmuskulatur (24). In denselben Plaque-M ϕ waren sehr häufig p53 und eine Apoptose nachweisbar (u. a. 4, 7, 28, 30). Aufgrund

der Erhöhung zytosolischer, z. B. Cu/ZnSOD, und mitochondrialer, z. B. MnSOD, GSH und GSH-Peroxidase, Antioxidantien im atherosklerotischen Plaque, ist deshalb von einem drastisch erhöhten oxidativen Stress in mehr als nur einem intrazellulären Kompartiment der Mφ auszugehen. Unabhängig davon, dass Apoptose als vorwiegende Form des Zelltodes im atherosklerotischen Plaque gefunden wurde (u. a. 30, 31), besteht die Möglichkeit, dass das Zelltodprogramm unvollständig ablaufen kann, so dass schließlich eine sekundäre Nekrose von Mφ mit all ihren Konsequenzen resultiert.

Körperliche Belastung zur Minderung des Arteriosklerosisrisikos

Sowohl bei zunächst nicht behandlungsbedürftigen Personen mit einem erhöhten atherogenen Risikofaktorenprofil, als auch zusätzlich zu einer therapeutisch notwendigen Intervention bei Grundkrankheiten wie Bluthochdruck, Hyperlipidämie oder Diabetes mellitus kann durch regelmäßige, adäquate körperliche bzw. sportliche Belastung dieses deutlich reduziert werden, wobei körperliche Aktivität einen erhöhten oxidativen Stress günstig beeinflusst, wie eine Auswahl von Veröffentlichungen zeigt. So steigerte eine regelmäßige (über mehrere Monate durchgeführte), intensive, aerobe Belastung die Resistenz von LDL gegenüber Oxidation (45, 50, 53). Zusätzlich war bei regelmäßig trainierenden Fußballspielern die totale antioxidative Kapazität (Ascorbinsäure, α-Tocopherol) im Plasma signifikant um 25 % gegenüber der nicht-sporttreibenden Kontrolle erhöht (9). Ein 8-wöchiges Ausdauertraining führte bei untrainierten, männlichen Probanden zu einer Erhöhung der GSH-Konzentration in Lymphozyten (16). In vorläufigen Untersuchungen fanden wir, dass in mononukleären Zellen von Patienten mit Lipidstoffwechselstörungen signifikant erniedrigte Gesamt-GSH- und red. GSH-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrollpersonen vorlagen und konnten gleichzeitig eine Induktion der MnSOD-Expression mittels RT-PCR nachweisen. Wir sehen diese Befunde als Indiz dafür an, dass Hyperlipidämie durch einen erhöhten oxidativen Stress zu einem vermindernden Redoxstatus in den Mitochondrien dieser Zellen führte.

Danksagung

Das Projekt wurde durch die DFG gefördert (Ki 695/1-1).

Literaturverzeichnis

- Ballou LR, Laulederkind SJF, Rosloniec EF, Raghov R: Ceramide signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta* 1301 (1996) 273-287.
- Bauriedel G, Schluckebier S, Hutter R, Welsch U, Kandolf R, Luderitz B, Prescott MF: Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis: implications for the pathogenesis of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (1998) 1132-1139.
- Bennett MR, Evan G, Schwartz SM: Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 95 (1995) 2266-2274.
- Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, Boyle JJ, Weissberg JJ: Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res* 82 (1998) 704-712.

- Bhakdi S: Complement and atherogenesis: the unknown connection [editorial]. *Ann Med* 30 (1998) 503-507.
- Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski J, Weise E, Trantum-Jensen J, Walev I, Wieland E: On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med* 182 (1995) 1959-1971.
- Björkerud S, Björkerud B: Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T-cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 149 (1996) 367-380.
- Björkerud B, Björkerud S: Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (1996) 416-424.
- Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basílico MJ, Wikinski RW, Llesuy SF: Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci Colch* 96 (1999) 381-385.
- Britten ME, Zeiher AM, Schachinger V: Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *J Intern Med* 245 (1999) 315-327.
- Couffinhal T, Duplaa C, Labat L, Moreau C, Bietz I, Bonnet J: Effect of low density lipoprotein on monocyte adhesiveness to endothelial cells in vitro. *Atherosclerosis* 99 (1993) 35-45.
- Das KC, Lewis-Molock Y, White CW: Thiol modulation of TNF alpha and IL-1 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biochem* 148 (1995) 45-57.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13 (1992) 341-390.
- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Arditte E, Morales A: GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol* 273 (1997) G7-G17.
- Gotoh N, Graham A, Niki E, Darley-Usmar VM: Inhibition of glutathione synthesis increases the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to human monocytes and macrophages. *Biochem J* 296 (1993) 151-154.
- Hack V, Weiss C, Friedmann B, Suttner S, Schykowski M, Erbe N, Benner A, Bärtsch P, Dröge PW: Decreased plasma glutamine level and CD4+ T cell number in response to 8 wk of anaerobic training. *Am J Physiol* 272 (1997) E788-95.
- Halliwell B: The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 23 (1993) 118-126.
- Harada K, Chen Z, Ishibashi S, Osuga J, Yagyu H, Ohashi K, Yahagi N, Shionoiri F, Sun L, Yazaki Y, Yamada N: Apoptotic cell death in atherosclerotic plaques of hyperlipidemic knockout mice. *Atherosclerosis* 135 (1997) 235-239.
- Heineke JW: Free radical modification of low density lipoprotein: mechanisms and biological consequences. *Free Rad Biol Med* 3 (1987) 65-73.
- Holvoet P, Collen D: Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J* 8 (1994) 1279-1284.
- Ihling C, Haendeler J, Menzel G, Hess RD, Fraedrich G, Schaefer HE, Zeiher AM: Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions. *J Pathol* 185 (1998) 303-312.
- Ihling C, Menzel G, Wellens E, Monting JS, Schaefer HE, Zeiher AM: Topographical association between the cyclin dependent kinases inhibitor p21, p53 accumulation, and cellular proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997) 2218-2224.
- Jovinge S, Ares MPS, Kallin B, Nilsson J: Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (1996) 1573-1579.
- Kinscherf R, Kamencic H, Deigner HP, Pill J, Schmiedt W, Schrader M, Metz J: Effect of alterations of blood cholesterol levels on macrophages in the myocardium of New Zealand White rabbits. *J Leukoc Biol* 62 (1997) 719-725.
- Kinscherf R, Claus R, Deigner HP, Nauen O, Gehrke C, Hermetter A, Rußwurm S, Daniel V, Hack V, Metz J: Modified low density lipoprotein delivers substrate for ceramide formation and stimulates the sphingomyelin-ceramide pathway in human macrophages. *FEBS Lett* 405 (1997) 55-59.
- Kinscherf R, Claus R, Wagner M, Gehrke C, Kamencic H, Hou D, Chen M,

- Nauen O, Schmiedt W, Kovacs G, Pill J, Metz J, Deigner HP: Apoptosis caused by Oxidized-LDL is manganese superoxide dismutase and p53-dependent. *FASEB J* 12 (1998) 461-467.
27. Kinscherf R, Deigner HP, Usinger C, Pill J, Wagner M, Kamencic H, Hou D, Chen M, Schmiedt W, Schrader M, Kovacs G, Kato K, Metz J: Induction of manganese superoxide dismutase by oxidized-LDL - Its Relevance in Atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. *FASEB J* 11 (1997) 1317-1328.
 28. Kinscherf R, Wagner M, Kamencic H, Bonaterra GA, Hou D, Schiele RA, Deigner HP, Metz J: Characterization of apoptotic macrophages in atherosclerotic tissue of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 144 (1999) 33-39.
 29. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Bult H, Bultinck J, Herman AG: Distribution of cell replication and apoptosis in atherosclerotic plaques of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 120 (1996) 115-124.
 30. Konstadoulakis MM, Kymionis GD, Karagiani M, Katergianakis V, Doundoulakis N, Pararas V, Koutselinis A, Sehas M, Peveretos P: Evidence of apoptosis in human carotid atheroma. *J Vasc Surg* 27 (1998) 733-739.
 31. Kubo N, Kikuchi J, Furukawa Y, Sakai T, Ohta H, Iwase S, Yamada H, Sakurabayashi I: Regulatory effects of aggregated LDL on apoptosis during foam cell formation of human peripheral blood monocytes. *FEBS Lett* 409 (1997) 177-182.
 32. Li W, Yuan XM, Olsson AG, Brunk UT: Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (1998) 177-184.
 33. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT: Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 7 (1996) 330-335.
 34. McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocoupein. *J Biol Chem* 244 (1969) 6049-6055.
 35. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM: Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 92 (1993) 1866-1874.
 36. McCord JM: The importance of oxidant-antioxidant balance, in: Montagnier L, Olivier R, Pasquier C (eds): *Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1997, 1-7.
 37. Moore KP, Darley-Usmar VM, Morrow J, Roberts LJ II: Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circ Res* 77 (1995) 335-341.
 38. Morganelli PM, Rogers RA, Kitzmiller TJ, Bergeron A: Enhanced metabolism of LDL aggregates mediated by specific human monocyte IgG Fc receptors. *J Lipid Res* 36 (1995) 714-724.
 39. Reid VC, Hardwick SJ, Mitchinson MJ: Fragmentation of DNA in P388D1 macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 332 (1993) 218-220.
 40. Reid VC, Mitchinson MJ, Skepper JN: Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein to mouse peritoneal macrophages: an ultrastructural study. *J Pathol* 171 (1993) 321-328.
 41. Reid VC, Mitchinson MJ: Toxicity of oxidised low density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages in vitro. *Atherosclerosis* 98 (1993) 17-24.
 42. Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinski W, Witztum JL: Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation-specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest* 87 (1991) 90-99.
 43. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362 (1993) 801-809.
 44. Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 (1999) 115-126.
 45. Sanchez-Quesada JL, Ortega H, Payes-Romero A, Serrat-Serrat J, Gonzalez-Sastre F, Lasuncion MA, Ordonez-Llanos J: LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. *Atherosclerosis* 132 (1997) 207-13.
 46. Sato N, Iwata S, Nakamura K, Hori T, Mori K, Yodoi J: Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. *J Immunol* 154 (1995) 3194-3203.
 47. Schütze S, Machleidt T, Krönke M: The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J Leukoc Biol* 56 (1994) 533-541.
 48. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W: Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 267 (1992) 5317-5323.
 49. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W: Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J* 12 (1993) 3095-3104.
 50. Shern-Brewer R, Santanam N, Wetzstein C, White-Welkley J, Parthasarathy S: Exercise and cardiovascular disease: a new perspective. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (1998) 1181-1187.
 51. Tsukada T, Rosenfeld ME, Ross R, Gown AM: Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis* 6 (1986) 601-613.
 52. Ueda N, Shah SV: Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells. *J Clin Invest* 90 (1991) 2593-2597.
 53. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, Ahotupa M: Reduced oxidized LDL levels after a 10-month exercise program. *Med Sci Sports Exerc* 30 (1998) 1496-501.
 54. Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS: regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 265 (1990) 2856-2864.
 55. Wiegmann K, Schütze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M: Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78 (1994) 1005-1015.
 56. Witztum JL, Steinberg D: Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88 (1991) 1785-1792.
 57. Yancey PG, Jerome WG: Lysosomal sequestration of free and esterified cholesterol from oxidized low density lipoprotein in macrophages of different species. *J Lipid Res* 39 (1998) 1349-1361.
 58. Ylä-Herttuala S, Jaakola O, Ehnholm C, Tikkanen MJ, Solakivi T, Särkioja T, Nikkari T: Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Lipid Res* 29 (1988) 563-572.
 59. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D: Evidence for the presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84 (1989) 1086-1095.
 60. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G: Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182 (1995) 367-377.

Anschrift des Verfassers:

Priv. Doz. Dr. Ralf Kinscherf
Institut für Anatomie u. Zellbiologie

Universität, Inf 307

69120 Heidelberg

Tel.: +49-6221-548306

Fax: +49-6221-544912

Email: Ralf.Kinscherf@urz.uni-heidelberg.de