

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

**Untersuchungen zur pathogenetischen Rolle
bakterieller Mikroorganismen in der Atherogenese**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Constanze Bailer-Redl

aus

München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Markus G. Engelmann

Mitberichterstatter Priv. Doz. Dr. Stefan Holdenrieder

Priv. Doz. Dr. Hae-Young Sohn

Dekan: Prof. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.03.2009

1 ABSTRACT

Ziel der Dissertation: Etablierung von normocholesterinämischen und hypercholesterinämischen Kaninchenmodellen mit akuter und chronischer arterieller *Chlamydomphila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*, CP) – Infektion ±Antibiotikabehandlung zur Untersuchung der Rolle dieser gram-negativen Erreger im Zusammenhang mit der Atherogenese.

Methoden und Ergebnisse: Insgesamt wurden die Untersuchungen an 32 Kaninchen durchgeführt, wovon 25 Tiere in das Modell für chronische Inokulation aufgenommen wurden. Die Tiere erhielten cholesterinreiche Diät versus Standarddiät. Ihnen wurden *in vivo* wiederholt replikationsfähige versus hitze-inaktivierte CP oder Lipopolysaccharid lokal perivaskulär injiziert. Um die Effekte der wiederholten Applikation entsprechend einer chronischen Entzündung mit der einmaligen Inokulation mit dem Agens zu vergleichen wurden 7 weiteren Tieren jeweils einmalig CP, inaktivierte CP bzw. LPS verabreicht. Die vaskulären Gewebe (n=162) wurden morphometrisch und histologisch untersucht. CP wurde mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie und *nested* PCR nachgewiesen. Nur in hypercholesterinämischen aber nicht in normocholesterinämischen Kaninchen führte die Applikation sowohl von replikationsfähigen als auch von hitze-inaktivierten CP sowie von deren Komponenten zu einer signifikant vermehrten Bildung von atheromatösen Läsionen. CP persistierten in atheromatösen Läsionen und in vaskulärem Gewebe. Eine einmalige perivaskuläre Infektion sowohl mit replikationsfähigen CP als auch mit hitze-inaktivierten CP oder mit LPS konnte keine Bildung von atheromatösen Läsionen auslösen. Die vierwöchige Gabe eines Makrolidantibiotikums führte zu einer verminderten Bildung von atheromatösen Läsionen sowohl bei Inokulation mit replikationsfähigen CP als auch mit inaktivierten CP oder LPS.

Schlussfolgerung: CP und hitze-inaktivierte Bakterienbestandteile verstärken den atherogenen Effekt von bekannten Risikofaktoren, wie der Hyperlipidämie, aber führen nicht von sich aus zu einer Atherosklerose. Sie wirken damit eher als Kofaktor, denn als auslösendes Agens.

Förderung: Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (Reg.-Nr.126) und Sachmittelförderung durch die Fa. SanofiAventis.

2 INHALTSVERZEICHNIS

1	Abstract	3
2	Inhaltsverzeichnis.....	4
3	Abkürzungen	6
4	Einleitung	7
4.1	Mikrobiologie und Epidemiologie von <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	8
4.2	Evidenz für <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> als mitwirkender Faktor bei der Atherogenese.....	10
4.3	Seroepidemiologische Studien	10
4.4	Histopathologische Studien	12
4.5	Tiermodelle.....	13
4.6	Pathogenetischer Zusammenhang zwischen <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> und Atherosklerose.....	17
5	Fragestellung	20
6	Material und Methoden	21
6	Material und Methoden	21
6.1	Tiermodell	21
6.1.1	Versuchsaufbau und Studiendesign	21
6.1.2	LPS und <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	24
6.1.3	Inokulationen.....	24
6.1.4	Analgosedierung.....	24
6.2	Gewebeentnahme und Gewebepräparation	25
6.3	Gewebefixierungen.....	25
6.4	Färbungen	26
6.4.1	Hämalaun-Eosin(H&E)-Färbung	26
6.4.2	Elastika-Masson-Trichrom-Färbung (VanGiesson-Färbung)	26
6.5	Histopathologische Analysen	27
6.6	Klinische Untersuchungen.....	27
6.7	Laborparameter.....	28
6.8	Immunzytochemische Analysen.....	28
6.9	Immunfluoreszenz	30
6.10	DNA-Isolierung	31
6.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
6.12	Statistische Analyse	34
7	Ergebnisse	35
7.1	Klinische Befunde und Laborergebnisse.....	35
7.2	PCR und Immunfluoreszenz.....	37

7.3	Histopathologie und Immunzytochemische Analysen	39
7.3.1	Effekte von <i>Chlamydophila pneumoniae</i> auf die Entwicklung atheromatöser Läsionen	39
7.3.2	Effekte von LPS auf die Entwicklung atheromatöser Läsionen	40
7.3.3	Effekte der einmaligen Inokulation auf die Bildung atheromatöser Läsionen...	40
7.3.4	Effekte auf die Bildung atheromatöser Läsionen unter Normocholesterinämie	41
7.3.5	Effekte auf die Bildung atheromatöser Läsionen unter Antibiotikatherapie.....	41
8	Diskussion	48
8.1	Lokale Inokulation als alternatives in vivo-Modell.....	48
8.1.1	Pathogenetische Verbindung zwischen <i>Chlamydia pneumoniae</i> und Atherosklerose.....	49
8.1.2	Limitation des lokalen Inokulationsmodells	53
8.1.3	Einfluss einer Antibiotikagabe im Tierexperiment	53
8.2	Klinische Studien.....	54
9	Zusammenfassung	60
10	Danksagungen	61
11	Literaturverzeichnis.....	62

3 ABKÜRZUNGEN

-/-	Knock out
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AK	Antikörper
Apo-E	Apolipoprotein E
BKS	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CVD	zerebrovaskuläre Erkrankungen
CP	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i>
CRP	C-reaktives Protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
E-Selectin	Endothelium selectin
H&E	Hämalaun-Eosin
HSP	Heat shock protein
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMR	Intima-Media-Ratio
KHK	Koronare Herzerkrankung
LAI	Lesion area index
LDL	low-density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MI	Myokardinfarkt
MIF	Mikroimmunfluoreszenz
MOMP	Major outer membrane protein
OT	Objektträger
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
WBC	White blood count

4 EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen 38% der Todesfälle in Nordamerika und sind in Europa Haupttodesursache bei Männern unter 65 Jahre und die zweithäufigste Todesursache bei Frauen.(47) Es wird angenommen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen in den nächsten 15 Jahren wegen der schnell steigenden Prävalenz in den Entwicklungsländern und Osteuropa und der steigenden Inzidenz von Adipositas und Diabetes mellitus in der westlichen Welt Haupttodesursache weltweit sein werden. Für die koronare Herzerkrankung liegt die Lebenszeitprävalenz in Deutschland für Männer bei 30% und für Frauen bei 15%. Die Inzidenz für Herzinfarkte (Infarkte/100.000/Jahr) liegt in Deutschland bei ungefähr 300. Die Behandlung der koronaren Herzerkrankung und der arteriellen Verschlusskrankheit stellen eine enorme Belastung des Gesundheitssystems dar. Die Läsionen der Atherosklerose zeigen eine Reihe hochspezifischer zellulärer und molekularer Reaktionen, die zusammengefasst als inflammatorische Erkrankung beschrieben werden können.(108)

Unterschiedliche infektiöse Organismen werden verdächtigt, eine Rolle in diesem Prozess zu spielen.(31) Einer der bekanntesten Organismen ist das weltweite Humanpathogen *Chlamydomphila pneumoniae* (CP, früher klassifiziert als *Chlamydia pneumoniae*).(32) CP ist ein gramnegatives obligat intrazelluläres Bakterium, welches akute respiratorische Erkrankungen wie Pneumonie, Bronchitis, Pharyngitis oder Sinusitis verursacht.(71) Der mögliche Zusammenhang von CP mit koronarer Herzerkrankung (KHK) und anderen Formen von Atherosklerose wurde als Erstes im Rahmen einer seroepidemiologischen Studie, die 1988 in Finnland durchgeführt wurde, vermutet.(10) Diese zeigte, dass Patienten mit KHK erhöhte Antikörpertiter gegen CP hatten, was sich später auch durch den Nachweis von CP in atherosklerösen Plaques *in vivo* bestätigte.(1, 33, 109) Trotzdem ist die pathogenetische Rolle dieser Organismen für die Entwicklung von Atherosklerose und die Spezifität chlamydialer Effekte bisher immer noch wenig geklärt.

4.1 Mikrobiologie und Epidemiologie von *Chlamydophila pneumoniae*

CP ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, welches chronische oder persistierende Infektionen verursachen kann. Es wurde vor 20 Jahren zum ersten Mal als Ursache akuter Infektionen des oberen und unteren Respirationstrakts identifiziert.(69) CP besitzt einen einheitlichen Replikationszyklus mit zwei morphologischen Formen: dem Elementarkörperchen (elementary body; Größe 300 nm) und dem Retikularkörperchen (reticulate body; Größe 1000 nm). Das Elementarkörperchen ist die infektiöse Form, die extrazellulär überlebt, während das Retikularkörperchen die stoffwechselaktive und sich teilende Form ist, die sich intrazellulär multipliziert. Außerdem kann das Bakterium im Fall von Immunstress, wie beispielsweise bei Vorhandensein von IFN- γ ein „persistierendes Körperchen“ bilden, das intrazellulär stoffwechsellinaktiv und nicht-replizierend vorliegt, jedoch replikationsfähig bleibt, und das chronische Infektionen und Inflammationen, die an der Atherogenese mitwirken können, aufrecht erhält.(60, 79) CP-Infektionen kommen ubiquitär vor mit einer Antikörperprävalenz von 50% bei 20jährigen und 70-80% bei 60-70jährigen. Bis zu einem Alter von 15 Jahren erscheint die Seroprävalenz gleichgeschlechtlich verteilt, danach überwiegen deutlich männliche Personen.(102) Meist kommt es zu wiederholten Infektionen während des gesamten Lebens.(104) Sie sind für 10% der ambulant erworbenen Pneumonien und 5% der Pharyngitiden, Bronchitiden und Sinusitiden verantwortlich.(14)

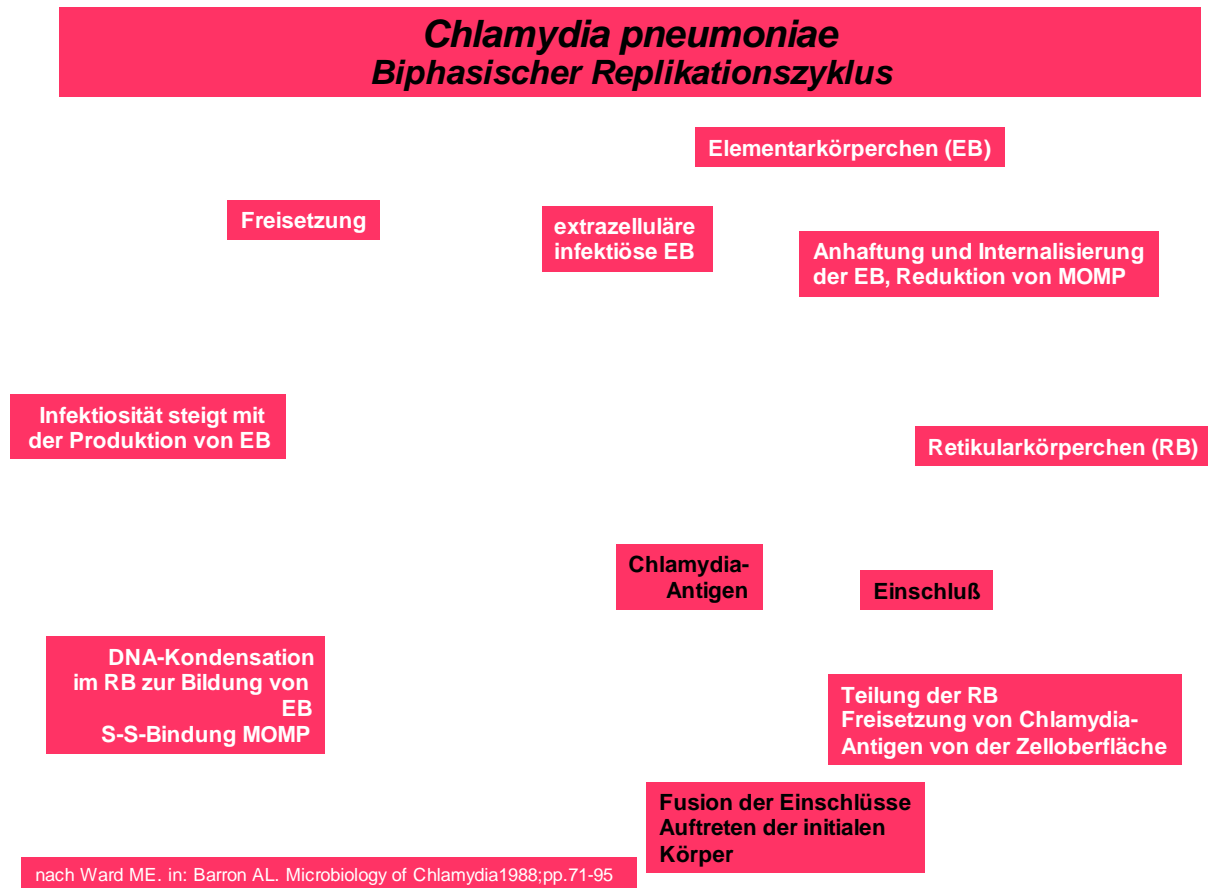


Abb.1 Biphasischer Replikationszyklus von *Chlamydomphila pneumoniae*

4.2 Evidenz für *Chlamydophila pneumoniae* als mitwirkender Faktor bei der Atherogenese

Obwohl CP-Infektionen mit Atherosklerose in Zusammenhang gebracht werden(68), ist die Rolle des Bakteriums bei der Atheroskleroseentstehung noch nicht ausreichend geklärt, um die klinische Relevanz beurteilen zu können.(16, 27) Bei Mäusen hatten CP-Infektionen eine selbstlimitierende Pneumonitis mit einem Maximum nach 2-4 Tagen zur Folge, die selten länger als 1 Woche dauerte. Histologische Studien zeigten eine peribronchiale und perivaskuläre Inflammation, in schweren Fällen mit bronchialem und alveolärem Exsudat, welches sich in 3-6 Wochen komplett zurückbildete.(61, 126, 129) Replikationsfähige CP-Organismen konnten bis zu 4 Wochen nach der Infektion aus der Lunge isoliert werden, wohin gegen CP-Antigen und -DNA bis zu 20 Wochen nach Infektion in alveolären Makrophagen und bronchialem Lymphgewebe nachgewiesen werden konnten.(87, 89) Diese Befunde und die Reaktivierung pulmonologischer Infektionen durch Kortikosteroidbehandlung legen nahe, dass eine latente Persistenz von CP besteht.(74) Wiederholte experimentelle Inokulationen zeigten eine prolongierte Dauer der histopathologischen Veränderungen bis zu 4 Monaten.(89) Der Wirt entwickelt eine partielle Immunität, da eine Reinfektion zu einer Reduktion der CP-Isolate führt.(61) Die CP-Infektion wurde im Respirationstrakt jedoch nicht gestoppt. Nach lokaler Inokulation konnten CP bis 20 Wochen nach Infektion in verschiedenen Geweben, unter anderen Milz, Leber, Herz und Aorta gefunden und daraus isoliert werden.(29, 89) Diese Ausbreitung könnte durch periphere Blutmonozyten oder Makrophagen vermittelt werden.(65, 91, 130) Die obligat intrazelluläre Replikation könnte CP vor multiplen Abwehrmechanismen des Wirts schützen. CP Infektionen führen zu einer unspezifischen Reaktion des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Granulozyten), der eine spezifischere Reaktion von Th1 CD8+ Lymphozyten folgt, welche zur Freisetzung verschiedener Zytokine, wie IFN- γ führt.(38)

4.3 Seroepidemiologische Studien

Eine mögliche Verbindung zwischen CP und Atherosklerose wurde anfänglich durch mehrere Fall-kontrollierte Studien aus Finnland aufgebracht. Der erste Bericht von Saikku *et al.* vor zwei Jahrzehnten beschreibt eine Fall-kontrollierte Studie (n=81) von Finnen, die einen akuten

Myokardinfarkt (MI) erlitten hatten. Mehr als 2/3 dieser MI-Patienten zeigten erhöhte IgG- und IgA-Titer gegen CP, vergleichbare Kontrollen nur bei 17%.⁽¹¹²⁾ Eine anschließende Kontroll-Substudie der Helsinki Heart Study (n=206) zeigte ein 1,8- bis 2,6-fach erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit chronischer Chlamydien-Infektion bei entsprechenden klassischen Risikofaktoren für Herz-Kreislaufkrankungen wie Alter, Bluthochdruck und Zigarettenrauchen.⁽¹¹³⁾ Eine andere Fall-Kontroll-Studie aus Finnland zeigte, dass persistierend erhöhte IgA-Antikörper gegen CP und humane Hitzeschock-Proteine 60 (Hsp60) in erhöhtem Maße mit koronaren Ereignissen bei Patienten mit erhöhtem C-reaktivem Protein (CRP) vergesellschaftet sind. Dies war nicht der Fall, wenn diese Antikörper nur kurzfristig erhöht waren.⁽⁵¹⁾ Die erste, ca. 2.700 Fälle und 5.000 Kontrollen umfassende Metaanalyse vor ca. 10 Jahren fasste 18 seroepidemiologischen Studien zusammen und beschrieb einen übereinstimmend positiven Zusammenhang zwischen CP-Antikörpern und KHK in 15 von 16 Studien und zwischen CP-Antikörpern und zerebrovaskulären Erkrankungen (CVD) in 2 von 2 Studien mit einer Odds-Ratio über 2,0 in den meisten dieser Studien.⁽²¹⁾

Neuere, prospektive Studien konnten den Zusammenhang zwischen CP-Seropositivität und Atherosklerose nicht bestätigen. Eine große, prospektive Fall-kontrollierte Studie über 16 Jahre zeigte an 496 Menschen mit letalem oder nicht-letalem Myokardinfarkt und 989 alters- und frequenzentsprechenden Kontrollen, dass 40% der Fälle und 33% der Kontrollen positive Antikörpertiter gegen CP hatten, was eine Odds-Ratio von 1,66 und 1,22 bei entsprechendem Zigarettenkonsum und sozio-ökonomischem Status ergab (p=NS).⁽²²⁾ Die neuere Metaanalyse von 15 prospektiven Studien, welche 3.169 Fälle mit nicht-letalem Myokardinfarkt oder Koronarerkrankungen analysierte, fand bei entsprechenden klassischen Risikofaktoren für Koronarerkrankungen eine kombinierte Odds-Ratio für Koronarerkrankungen von nur 1,15 (95%-Konfidenzintervall 0,97-1,36).⁽²³⁾ Eine aktuelle Metaanalyse von 38 seroepidemiologischen Studien zwischen Januar 1997 und Dezember 2000 zeigte mit einer Gesamt-Odds-Ratio von 1,6, dass die Odds-Ratio für Querschnittsstudien oder Fall-kontrollierte Studien signifikant höher ausfallen als für prospektive Studien (2,0 vs 1,1), was die Interpretierbarkeit dieser Studientypen deutlich erschwert.⁽¹¹⁾

Der serologische Zusammenhang zwischen CP und Gefäßerkrankungen wurde vor allem mittels Mikroimmunfluoreszenz (MIF) und ELISA untersucht. Auffallend ist, dass die Methode einen großen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen CP und Atherosklerose hat.(53) Inter- und intra-laboranalytische Unterschiede und wenig Übereinstimmung zwischen den verschiedenen *Chlamydomphila pneumoniae*-Tests wurden gezeigt.

4.4 Histopathologische Studien

Der Nachweis von CP in atherosklerotischen Plaques wurde zum ersten Mal vor fast 15 Jahren von einer Arbeitsgruppe aus Südafrika beschrieben.(118) In diesem Bericht wurden CP mit Hilfe von Elektronenmikroskopie in 100% beziehungsweise mit Hilfe von CP-Immunperoxidasefärbung mit genus- und speziesspezifischen monoklonalen Antikörpern in 71% post-mortaler Atherome, jedoch in keiner der Kontrollen, identifiziert. In einigen histopathologischen Studien konnten CP in atherosklerotischen Proben humaner Arterien mittels PCR, immunzytochemischen Färbungen, Immunfluoreszenz, *in situ* Hybridisierung oder direkter Kultur nachgewiesen werden.(19, 55, 70, 83, 84, 92, 96, 106) CP konnten 1996 mit direkter Kultur aus dem Atherom eines Patienten mit schwerer KHK isoliert werden. Die Anzahl der CP-Stämme, die aus Atheromen isoliert werden konnten, ist jedoch gering.(52) Bei Patienten nach Bypass-Operation wurden replikationsfähige CP in 16% (11/70) aus Atheromen und in 25% aus verschlossenen Saphenatransplantaten, jedoch aus keinem nicht-atherosklerotischen Kontrollgewebe isoliert.(6, 82)

In einer Untersuchung von 17 histopathologischen Studien konnten CP in 303 (50,8%) von 597 Proben mit Atherosklerose gegenüber in nur 5 (3,8%) von 131 Proben ohne Atherosklerose identifiziert werden.(39) Eine größere Übersichtsarbeit von 43 Studien mit insgesamt 2.644 atherosklerotischen Proben zeigte, dass die Prävalenz von CP in Atheromen signifikant von der verwendeten Nachweismethode abhängt.(12) Die Verwendung von Immunfärbungen entweder mit *Chlamydomphila* genus- oder *Chlamydomphila pneumoniae*-spezifischen Antikörpern führte in 45 bis 50% zu positiven Ergebnissen. Mit Hilfe von Elektronenmikroskopie konnten CP in 39% der Proben nachgewiesen werden. Die Prävalenz positiver PCR war signifikant niedriger (24%). Direkte Kultur

sowie *in situ* Hybridisierung zeigten nur 7,3% beziehungsweise 0,2% positive Atherome. Wenn man nur diejenigen Proben, welche bei 2 oder mehr unabhängigen Methoden positiv waren, als tatsächlich positiv wertet, reduziert sich die Prävalenz signifikant. Von den 502 Proben, die mittels 2 oder mehr Methoden analysiert wurden, waren nur 76 (16,7%) in mindestens 2 Analysen positiv.(12) Es herrscht ein deutlicher Mangel an Korrelation zwischen CP-Serologie und dem Nachweis von CP mittels PCR oder Immunhistochemie. Die Immunhistochemie kann durch Kreuzreaktionen zwischen anti-CP-Antikörpern und nicht-chlamydialen Proteinen in der Gefäßwand, was zu unspezifischen Signalen führt, limitiert sein.(52) Einige Gruppen konnten keine CP in Patienten nach Atherektomie (127) oder in autoptischen Endartherektomieproben der Karotiden oder Koronararterien (102) identifizieren. Zusammengefasst sprechen die histopathologischen Studien für einen Vaskulotropismus von CP und für die Fähigkeit von CP in Gefäßzellen und atheromatösen Plaques zu persistieren.(82, 84, 96) Der Vaskulotropismus von CP wurde kürzlich in einem *ex vivo* Modell an humanen Nierenarterien gezeigt, in dem CP-LPS nach lokaler Infektion in Arterien nachgewiesen wurde, während in dieser Studie die Reaktivierung replikationsfähiger Organismen in allen Fällen scheiterte.(104)

4.5 Tiermodelle

Es wurde eine Vielzahl von Tiermodellen mit CP-Infektionen publiziert. Vorwiegend wurden Mausmodelle, Modelle an Kaninchen, Schweinen und Primaten mit intranasaler Inokulation oder subkutanem, intravenösem, intrazerebralem oder lokal perivaskulärem Infektionsweg, verwendet.

(7, 29, 63, 69, 129, 130) In den Tab. 1a und 1b werden die wichtigsten Studien kurz zusammengefasst dargestellt. Die am besten untersuchten Modelle experimenteller Infektion sind unterschiedliche Mausmodelle, welche kürzlich in einer Übersichtsarbeit dargestellt wurden.(24) Swiss Webster-Mäuse und NIH/S-Mäuse zeigten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber CP, gefolgt von C57BL/6-Mäusen, wohingegen BALB/c-Mäuse am unempfindlichsten reagierten.(63, 129) Es wurden unterschiedliche CP-Stämme verwendet; am häufigsten AR-39, ein Stamm der ursprünglich 1983 aus Thoraxabstrichen von Patienten isoliert wurde.(107) Ein weiterer häufig verwendeter Stamm ist TW-183, der Stamm, der 1965 als erster isoliert wurde.(42) Der gewöhnliche Infektionsweg ist die intranasale Inokulation,

welcher in manchen Modellen wiederholt wurde, um eine chronische Infektion nachzuahmen.(89) Genetisch unveränderte Mäuse entwickelten eine frühe Atherosklerose, wenn die Tiere eine cholesterinangereicherte Diät erhielten, jedoch nicht unter normocholesterinämischen Bedingungen. Infizierte Wildtyp C57BL/6-Mäuse, die mit einer atherogenetischen Kost gefüttert wurden, entwickelten signifikant größere atherosklerotische Läsionen als nicht-infizierte Tiere.(10, 18) Apolipoprotein-E $-/-$ -Mäuse entwickelten eine fortgeschrittene Atherosklerose, wenn sie intranasal infiziert wurden.(88) In LDL-Rezeptor $-/-$ Mäusen wurde gezeigt, dass die atherogenen Effekte von CP abhängig vom Serumcholesterinspiegel und spezifisch für CP sind.(50) Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass CP-Infektionen den inflammatorischen Prozess durch Erhöhung der T-Lymphozyten in den Plaques steigern und die Bildung fortgeschrittener Atherosklerose, welche durch komplexere Läsionen charakterisiert ist, beschleunigen.(33, 50) Antibiotika beeinflussten die beschleunigte Bildung von Läsionen nicht, wenn sie den Mäusen 2 Wochen nach der letzten Infektion verabreicht wurden.(109) In 2 Mäusestudien förderten CP die Atherogenese nicht.(1, 13) Eine einmalige CP-Inokulation fördert die Atherogenese nicht, da in allen Studien multiple CP-Infektionen sowie Hyperlipidämie erforderlich waren, um eine Atheroskleroseförderung zu induzieren.

Auch bei New Zealand White-Kaninchen, welche eine hyperlipidämische Diät erhielten, wurde die Beziehung zwischen CP-Infektion und Atherosklerose untersucht.(34, 73, 94) CP-Infektionen führten zu atherosklerotischen Veränderungen in der Aorta dieser Tiere. Weiterhin verhinderten wiederholte Behandlungen mit dem Makrolidantibiotikum Azithromycin die beschleunigte Intimaverdickung, die in diesem Kaninchenmodell normalerweise beobachtet wird.(95) Normocholesterinämische Kaninchen zeigten eine Freisetzung von Wachstumsfaktor für glatte Muskelzellen, Proliferation glatter Muskelzellen und intimale Dickenzunahme durch eine Erhöhung der PDGF-B mRNA-Expression nach Infektion mit CP.(20) Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass chronisch perivaskuläre Applikationen sowohl replikationsfähiger als auch hitze-inaktivierter CP zur Bildung fortgeschrittener atheromathöser Läsionen bei hypercholesterinämischen Tieren führt.(29) Roxithromycin hemmt das Fortschreiten von Läsionen nach chronischer Applikation sowohl von replikationsfähigen als auch von hitze-inaktivierten CP.(28)

Schweinemodelle wurden ebenfalls verwendet, um den Effekt von CP zu klären. Ähnlich den Nagetiermodellen wurde im atherogenen Schweinmodell gezeigt, dass akute CP-Infektionen endotheliale Dysfunktionen induzieren, indem ein gerinnungsfördernder Status durch verminderte Vasodilatation, Vasospasmen und erhöhte Fibrinogenspiegel begünstigt wird. Zusätzlich wird dieser Status durch Stickoxid-Stoffwechselwege, welche teilweise durch Statine inhibiert werden können, unterstützt.(80, 81) Intrakoronare und intrapulmonale, jedoch nicht Makrophagen-vermittelte CP-Inokulationen ohne lipidreiche Diät wurden mit einer mäßigen Intimaproliferation in Zusammenhang gebracht.(103)

Für Paviane und Rhesusaffen sind *Chlamydomphila pneumoniae* nur wenig virulent. Die Inokulation von *Chlamydomphila pneumoniae* über nasopharyngeale, oropharyngeale oder intratracheale Wege konnte bei diesen Spezies keine Erkrankung induzieren.(7, 49)

Zusammengefasst zeigen diese aussagekräftigen Daten, dass CP vaskuläre Gewebe infizieren können, zu Inflammation führen und die Entwicklung atheromatöser Läsionen auslösen oder fördern.

TIERART	AUTOR/J/A	CP	INFEKTION	THERAPIE	ERGEBNIS
MÄUSE					
Swiss Webster	Kaukoranta-Talvonen <i>et al.</i> 1993 [136]	TW-183, K6, H12	intranasal		CP in Lunge u. BAL, ↑IgG 3.-6.W, ↑IgM 3.W
	Yang <i>et al.</i> 1993 [138,139]	AR-39	intranasal		CP in Lunge nach 42 d, Lungenveränd. > 60 d, ↑IgG
NIH/S	Kaukoranta-Talvonen <i>et al.</i> 1993 [136]	TW-183, K6, H12	intranasal		CP in Lunge u. BAL, ↑IgG 3.-6.W, ↑IgM 3.W
LDL R-/-	Hu <i>et al.</i> 1999 [99]	AR-39	intranasal		Atherosklerot. Veränderungen nur mit Hypercholesterinämie
C57BL/6	Yang <i>et al.</i> 1993 [138,139]	AR-39	intranasal		CP in Lunge nach 42 d, Lungenveränd. > 60 d, ↑IgG
	Moazed <i>et al.</i> 1997 [152]	AR-39	intranasal		CP in Lunge, Aorta (Läsion), Milz für 20W bei Hyperchol.
	Caligiuri <i>et al.</i> 2001 [181]	K6	intranasal		Keine Induktion oder Verstärkung von Atherosklerose
	Blessing <i>et al.</i> 2002 [176]	AR-39	intranasal		Keine atherosklerot. Veränderungen, wenn Hyperchol. nach Infektion
BALB/c	Kaukoranta-Talvonen <i>et al.</i> 1993 [136]	TW-183, K6, H12	intranasal		CP in Lunge u. BAL, ↑IgG 3.-6.W, ↑IgM 3.W
	Yang <i>et al.</i> 1993 [138,139]	AR-39	intranasal		CP in Lunge nach 42 d, Lungenveränd. > 60 d, ↑IgG
Apo E -/-	Moazed <i>et al.</i> 1997 [152]	AR-39	intranasal		CP in Lunge, Aorta (Läsion), Milz für 20W bei Hyperchol.
	Moazed <i>et al.</i> 1999 [178]	AR-39	intranasal		↑LAI 2,4fach nach 8W, 1,6fach nach 12W, ↔für Serumcholesterol
	Rothstein <i>et al.</i> 2001 [179]	A-03	intranasal	Azithromycin für 2W nach Infektion	10W (Hyperchol.): Läsion ↔mit CP, kein Effekt von AB; 16W: ↑Läsion mit CP, ↓Läsion mit AB
iNOS, eNOS -/-	Chesebro <i>et al.</i> 2003 [177]	AR-39	intranasal		↑LAI in iNOS-/- mit Hyperchol.

Tab.1a Übersicht über die wichtigsten Mausmodelle

J: Jahr; CP: *Chlamydomphila pneumoniae*; BAL: Bronchoalveoläre Lavage; W:Woche; d:Tag; Ig: Immunglobulin; ↑ Zunahme; ↓ Abnahme; ↔ keine Veränderung; AB: Antibiotikum

TIERART	AUTOR/J/A	CP	INFEKTION	THERAPIE	ERGEBNIS
KANINCHEN					
New Zealand White	Fong <i>et al.</i> 1997 [106]	ATCC VR1310	Intranasal		Normochol.: ↑IgG 7.-28.d, Bronchiolitis, Pneumonie; CP in Lunge, Schaumzellen, „intermediate lesion“ nur bei 1-2 von 11 Tieren
	Laitinen <i>et al.</i> 1997 [182]	AR-39	Intranasal		Normochol.: ↑Intimadicke, fibröse Läsionen
	Muhlestein <i>et al.</i> 1998 [183]	AR-39	Intranasal	Azithromycin für 7W nach Infektion	Hyperchol.: ↑Intimadicke, nicht jedoch mit AB
	Coombes <i>et al.</i> 2002 [184]	AR-39	Intranasal		Normochol.: ↑Intimadicke
SCHWEINE					
	Pislaru <i>et al.</i> 2003 [188]	AR-39	intra-vaskulär Koronarien		↑Intimadicke bei CP-Applikation, nicht bei infizierten Makrophagen
	Liuba <i>et al.</i> 2006 [187]	AR-39	intra-tracheal	Simvastatin 80mg/d 2W vor bis 2W nach Inokulation	↑IgM; Endotheldysfunktion in infizierten Tieren, z.T. Einfluss von Simvastatin ohne ↓Lipide

Tab.1b Übersicht über die wichtigsten Kaninchen- und Schweinemodelle

J: Jahr; CP: *Chlamydomphila pneumoniae*; BAL: Bronchoalveoläre Lavage; W:Woche; d:Tag; Ig: Immunglobulin; ↑ Zunahme; ↓ Abnahme; ↔ keine Veränderung; AB: Antibiotikum

4.6 Pathogenetischer Zusammenhang zwischen *Chlamydomphila pneumoniae* und Atherosklerose

Der Mechanismus, über welchen CP in Verbindung mit Atherosklerose steht, ist noch unzureichend bekannt; die Atheroskleroseförderung durch CP wird aktuell folgendermaßen vermutet: Experimentelle Daten sprechen dafür, dass CP die initiale Verletzung, die den atherogenetischen Prozess in Gang setzt, verursachen können. CP kann die Progression der Atherosklerose fördern und zu ihren Komplikationen wie Plaqueruptur und Myokardinfarkt führen.(14, 60) Der Organismus dringt während lokaler Infektionen des Respirationstrakts in das vaskuläre Gewebe. Infizierte Leukozyten, wie z.B. Monozyten können die Bakterien im Körper verteilen. Aktivierte Makrophagen, welche die

Bakterien transportieren, infiltrieren hierbei die subendotheliale Schicht der Koronararterien und wandern in die atheromatösen Läsionen.(85) Multiple Zellen wie Endothelzellen, Makrophagen und aortale glatte Muskelzellen, die gewöhnlich in Atheromen gefunden werden, können mit CP infiziert werden.(40, 62, 65, 76) Infizierte humane Monozyten adhären verstärkt an humane aortale glatte Muskelzellen.(58) Weiterhin könnten CP direkt die Plaquezusammensetzung ändern, da Lipopolysaccharide (LPS) über eine Komplexierung mit LDL-Cholesterin Endothelzellen zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren stimulieren und selbst über Makrophagen-Scavenger-Rezeptoren aufgenommen werden, was zur Umwandlung der Makrophagen in Schaumzellen führen kann.(57, 58, 59) CP zeigen immunpathogenetische Eigenschaften, die zu einer Anziehung und Infiltration inflammatorischer Zellen wie T-Zellen und damit zu Gewebeschäden führen.(33, 125)

Ein anderer wichtiger Mechanismus könnte das Auslösen einer Autoimmunreaktion auf humane Hsp60 durch antigentische Mimikry und nachfolgende Atherogeneseförderung sein.(5, 66, 67) Liegt eine Atherosklerose vor, könnten CP und Hsp60 Plaques destabilisieren, indem sie Matrixmetalloproteinasen stimulieren, welche die fibröse Kappe vermindern.(4, 67, 121) Die Thrombogenität könnte durch Stimulierung von Gerinnungsfaktoren und Expression von Gewebefaktor gesteigert werden.(25, 36, 121) Die Infektion mit CP regt die Expression einer Vielfalt von Leukozyten-Adhäsions-Molekülen (E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1) oder inflammatorischen Zytokinen in atheromassoziierten Zellen an, was eine Anheftung und Migration von Leukozyten sowie eine intimale Inflammation fördern könnte.(56, 64) Die Induktion atheromatöser Läsionen durch CP hängt nicht vom Replikationsstatus der Bakterien ab, da sowohl replikationsfähige und hitze-inaktivierte Organismen als auch gramnegative Membrankomponenten wie LPS gleiche Effekte *in vivo* verursachten.(29, 30) Neue Untersuchungen lassen vermuten, dass CP-Antigene eher als replikationsfähige Bakterien in humanen atherosklerotischen Läsionen verbleiben, da CP-Antigene ohne die Anwesenheit von DNA oder 16SrRNA nachgewiesen wurden.(86)

CP-Infektionen fördern ein proliferatives Erscheinungsbild vaskulärer glatter Muskelzellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Egr-1, was zu fortgeschrittenem Plaquewachstum führt.(111) Die lokale Anwesenheit von CP führte bei LDL-/- Mäusen vor allem zu umschriebenen atherosklerotischen Läsionen mit einer empfindlicheren Morphologie, begleitet von einer

ausgeprägten Hochregulierung von MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1) und ICAM-1, bestimmt auf mRNA- und Proteinebene.(48)

Weitere pathogenetische Mechanismen schließen die Induktion der zellvermittelten Immunität in Atheromen mit ein, da CP-spezifische T-Lymphozyten in Plauegewebe nachgewiesen wurden.(93) Interferon- γ , welches die persistierenden Organismen angriff, wurde aus solchen T-Lymphozyten freigesetzt.(114)

Auch wenn klare Beweise vorliegen, dass CP verschiedene atherogenetische Abläufe beeinflussen und fördern, ist es fraglich, ob die Organismen für die Auslösung einer Atherosklerose allein verantwortlich sind oder als Kofaktor, der weitere stark atherogene Stimuli benötigt, wirken.

5 FRAGESTELLUNG

Zur Klärung der Hypothese, ob CP oder Bakterienbestandteile eine spezifische Atherogenese induzieren können oder nur zu einer unspezifischen Gefäßreaktion führen, etablierte ich in der vorliegenden Arbeit ein lokales Inokulationsmodell am Kaninchen. Dabei wurde die Gefäßreaktion auf lokal perivaskulär injiziertes LPS (als unspezifischer bakterieller Bestandteil) und *Chlamydophila pneumoniae* (inaktiv vs replikationsfähig) analysiert. In dem entwickelten Tiermodell können der kontrollierte lokale Effekt von LPS und *Chlamydophila pneumoniae* auf die Gefäßwand *in vivo* mit und ohne Atheroskleroseinduktion untersucht werden. Die Versuche wurden hierzu unter normocholesterinämischen und hypercholesterinämischen Bedingungen durchgeführt.

Eine bestimmte Anzahl von Tieren wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen mit dem Makrolidantibiotikum Roxithromycin behandelt, um den therapeutischen Effekt hinsichtlich der Atherosklerose zu untersuchen.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Tiermodell

6.1.1 Versuchsaufbau und Studiendesign

Insgesamt 32 weibliche New Zealand White (NZW) Kaninchen (E. Stock, Zuchtbetrieb, Gelnhausen, Deutschland), mit einem mittleren Gewicht von $3,8 \pm 0,4$ kg wurden untersucht.

25 Tiere wurden in einem Modell für chronische perivaskuläre Inokulation analysiert. Abb.2 zeigt eine Übersicht über das Studiendesign und die Versuchsgruppen.

22 Tiere wurden auf vier Hauptgruppen und eine Nebengruppe randomisiert (HG A-D und NG A1).

Die 3 zusätzlichen Tiere des chronischen Inokulationsmodells dienten als Medikamentengruppe (MG).

15 Tiere (HG A (n=4 Tiere), HG B (n=4 Tiere), NG A1(n=4 Tiere) sowie die MG (n=3 Tiere)) erhielten über 16 Wochen eine atherogene Diät, die mit 0.5% Cholesterin angereichert wurde, 10 Tiere (HG C (n=5 Tiere) und HG D (n=5 Tiere) erhielten Standarddiät.

Bei Tieren der HG A und C wurden vermehrungsfähige CP neben die *A.carotis*, *A.auricularis* sowie *A.femoralis superficialis* der rechten Körperseite appliziert. Auf der kontralateralen Seite wurden hitze-inaktivierte CP (1 Std. bei 56°C) verabreicht.(98)

Versuchstiere der HG B und D erhielten wiederholte perivaskuläre Injektionen von *E.coli*-LPS neben die *A. carotis*, *A. auricularis* sowie *A. femoralis superficialis* der rechten Körperseite und von Kochsalz neben die entsprechenden Gefäße der kontralateralen Körperseite.

Tieren der NG A1 wurden auf der rechten Körperseite entweder vermehrungsfähige CP (n=6 Arterien) oder hitze-inaktivierte CP (n=6 Arterien) neben die *A.carotis*, *A.auricularis* sowie *A.femoralis superficialis* und als Kontrolle (n=6 Arterien) neben entsprechende Gefäße der linken Körperseite Kochsalz appliziert.

Tiere der MG wurden ab Tag 5 nach der ersten Applikation von CP, LPS oder Kochsalz (Kontrolle) mit 30mg/kgKG/d Roxithromycin behandelt. Das Antibiotikum wurde dem täglichen Futter zugesetzt.

Die Applikationen von CP, LPS oder Kochsalz fanden in allen Gruppen zu den Zeitpunkten Woche 3, 7 und 11 statt und die Tiere wurden am Tag 90 abgetötet.

7 Tiere, die nicht in das Modell für chronische Inokulation aufgenommen wurden (nicht in Abb.2 abgebildet) dienten dem Reaktionensnachweis bei einmaliger Inokulation. Diese Tiere wurden zu den Zeitpunkten Tag 1,6 und 18 (Kurzzeitreaktion) oder 70 (Langzeitreaktion) nach Injektion abgetötet. Davon erhielten 4 Tiere Standarddiät und 3 Tiere eine mit 0,5% Cholesterin angereicherte Diät. Bakterielle Komponenten wurden auf der rechten Körperseite, Kochsalz als Kontrolle auf der linken Körperseite unter gleichen Bedingungen wie im Modell für chronische perivaskuläre Inokulation inokuliert.

Alle Versuche wurden nach den geltenden Regularien beantragt und von der Regierung Oberbayern genehmigt (Az. 210.2-2455-4/88 V).

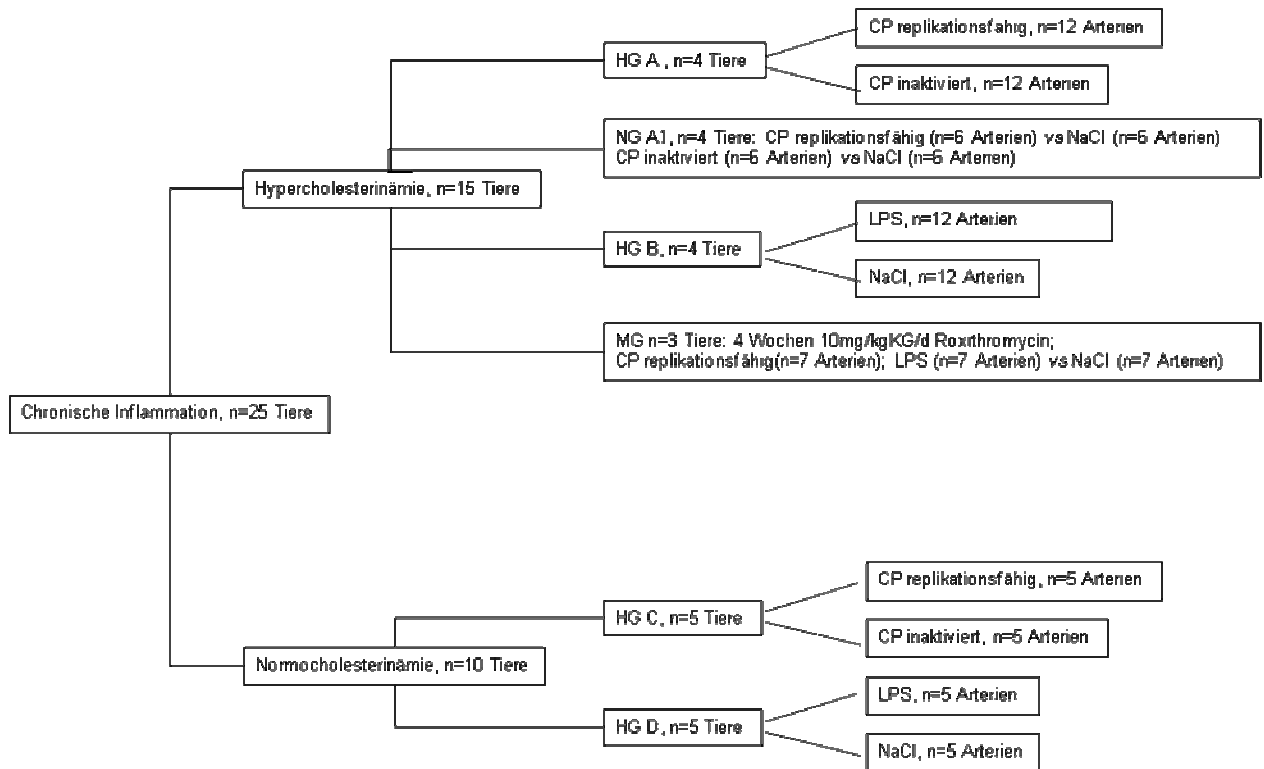


Abb.2 Tiere des chronischen Inokulationsmodells

Hauptgruppen A und B, die Nebengruppe A1 sowie die Medikamentengruppe erhielten eine cholesterinangereicherte Diät, Hauptgruppen C und D erhielten eine Standardkost. Um die Unterschiede zwischen chronischer und einfacher Inokulation darzustellen wurden zusätzlich 7 Tiere mit cholesterinangereicherter Kost gefüttert und erhielten bakterielle Komponenten oder Kochsalz einmalig 3 Wochen nach der ersten angereicherten Kost (nicht in der Abbildung gezeigt).

HG=Hauptgruppe, NG=Nebengruppe, MG=Medikamentengruppe

6.1.2 LPS und *Chlamydomphila pneumoniae*

Für die LPS-Inokulationen verwendeten wir LPS von *E. coli* (*Escherichia coli*) Stamm J5, Rc Mutante der Firma Sigma (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland). Den CP Stamm AR-39 erhielten wir von der Washington Research Foundation (Washington Research Foundation, Seattle, USA). Die Chlamydien wurden in Kooperation mit Frau Dr. med. Corinna Barz vom Max von Pettenkofer-Institut für Medizinische Mikrobiologie (unter Leitung von Prof. Dr. med. J. Heesemann) unter entsprechenden Sicherheitskautelel verwaht und für die entsprechenden Inokulationen prozessiert.

6.1.3 Inokulationen

Die Inokulationen wurden mit einer 1ml-Spritze (B. Braun, Melsungen, Deutschland) unter Verwendung von 25-Gauge-Kanülen (B. Braun, Melsungen, Deutschland) vorgenommen. Die Inokulation neben die Auriculararterie wurde unter Sicht, die Inokulationen neben die *A. carotis* und die Femoralarterie wurden mit Hilfe eines 8 MHz Dopplergerätes (KMS 5041, Doppler 762; Kranzbühler, Solingen, Deutschland) durchgeführt. Neben die Auriculararterie wurde ein Volumen von 100µl, neben die anderen Gefäße ein Volumen von 200µl, jeweils mit einer Gesamtmenge von 1µg LPS bzw. 10⁶ IFU CP appliziert. Bei der Applikation von Kochsalz wurden für die Auriculararterie 100µl, für die *A. carotis* und die Femoralarterie wurde ein Volumen von 200µl verwendet.

6.1.4 Analgosedierung

Zur perivaskulären Applikation sowie zur Abtötung wurde eine Analgosedierung mit Ketamin (150-200mg) und Midazolam (1,5-2mg) intramuskulär durchgeführt. Die perivaskulären Injektionen wurden an einer Ohrarterie vorgenommen, nachdem die Injektionsstelle mit einem Hautanästhetikum betäubt worden war.

Die Versuchstiere wurden mit einem intravenösen Thiopental-Bolus (75-100mg), gefolgt von einer letalen Kardioplegie mittels Kaliumchlorid getötet, welches zu einem sofortigen Herzstillstand des vollständig betäubten Tieres führte.

6.2 Gewebeentnahme und Gewebepräparation

Nach schmerzloser Abtötung wurden den Versuchstieren Femoralarterie, *A. carotis*, Auriculararterie sowie die Aorta (direkt distal des Aortenbogens) unter Erhalt des umgebenden Adventitiagewebes entnommen. Die Gewebe wurden sofort in transversale Segmente geteilt, in O.C.T (Sakura, Zoetervoude, Niederlande) eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Ein Teil der Gewebe, bei denen später PCR-Analysen durchgeführt wurden, wurde direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden serielle Gefrierschnitte von 10µm Dicke angefertigt und auf Objektträger (OT) aufgebracht. Für die PCR-Analysen wurden 40µm dicke Schnitte angefertigt und 2-3 Schnitte in Folge in Eppendorfgefäße gegeben und bei -80°C eingefroren.

6.3 Gewebefixierungen

Zur gefahrlosen Bearbeitung der Gewebeschnitte und Verhinderung einer akzidentellen Infektion des Laborpersonals mit replikationsfähigen Chlamydien wurde CP-infiziertes Material sofort 10min in Methanol fixiert und dann bei -80°C eingefroren. Mit LPS und inaktivierten CP behandeltes Gewebematerial wurde ohne Fixierung bei -80°C aufbewahrt und zu einem beliebigen Zeitpunkt vor der Weiterbearbeitung wie folgt mit 2,5%iger Glutaraldehydlösung fixiert: Fixierung in Glutaraldehydlösung für 3min, dreimaliges Waschen in PBS und abschließend kurzes Reinigen in destilliertem Wasser.

6.4 Färbungen

6.4.1 Hämalaun-Eosin(H&E)-Färbung

In saurer Hämalaunlösung wurden die Objektträger für 5-7min gefärbt, wobei sich die verwendete saure Hämalaunlösung aus 1,0g Hämatoxin, 0,2g Natriumjodat, 50,0g Kalilaunlösung, 12g H₂O, 50,0g Chloralhydrat und 1,0g Citronensäure zusammensetzte. Die Objektträger wurden daraufhin 10-20min in lauwarmem Leitungswasser gebläut. Nach Kontrolle des Färbungsgrades unter dem Lichtmikroskop folgte die Färbung in Eosinlösung für 30sec und danach kurzzeitiges Waschen in destilliertem Wasser. Das Eosin wurde in einer 0,1%igen wässrigen Lösung verwendet. Der Färbungsgrad wurde anschließend wieder unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Objektträger wurden der Reihe nach in 70%iges und 80%iges Ethanol kurz eingetaucht und danach für zweimal 1min in 96%iges und 100%iges Ethanol überführt. Um das Gewebe vor dem Eindecken komplett zu entwässern, wurden die Objektträger einmal für 1min und anschließend für 1-30min mit Xylollösung behandelt. Die noch feuchten Objektträger wurden mit Eukitt beschichtet und das Gewebe mit Deckgläschen verschlossen.

Die H&E-gefärbten Präparate wurden zur computerunterstützten morphologischen Auswertung verwendet. Hierbei erscheint das Zytoplasma hellrosa und die Zellkerne blau.

6.4.2 Elastika-Masson-Trichrom-Färbung (VanGiesson-Färbung)

Die Objektträger wurden für 2min in einer Färbelösung nach Verhoff gefärbt, die aus 100ml alkoholischer Hämatoxylinlösung, 15ml Eisen-III-Chlorid-Lösung, 40ml Jod-Lösung (nach Weigert) und 25ml destilliertem Wasser bestand. Nach der ersten Färbung wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser gewaschen, woraufhin sie in einer Eisen-III-Chlorid-Lösung für 1min differenziert wurden, um Reste der Verhoff-Färbung zu entfernen. Diese Lösung setzte sich aus 15ml Eisen-III-Chlorid-Lösung und 185ml destilliertem Wasser zusammen. Die Objektträger wurden unter fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend der Färbungsgrad unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach Verbringen der Objektträger in einer 0,1%igen Na-Hypochloridlösung für 30sec wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser erneut gespült. Es folgte die Färbung der

Objektträger in einer Ponceau-Fuchsin-Lösung für 2,5min mit anschließender Spülung unter Leitungswasser, der die Kontrolle des Färbungsgrades unter dem Lichtmikroskop folgte. Die Ponceau-Fuchsin-Lösung bestand aus 1% Ponceau de Xylidine in 1% Essigsäure gelöst und 1% Säurefuchsin in 1% Essigsäure gelöst, welche im Verhältnis 3:1 gemischt wurden. Anschließend folgte die Färbung der Objektträger in einer Trichrom-Lichtgrün-Färbelösung für 3min. Daraufhin wurden die Objektträger in einer 0,5%igen Essigsäure-Lösung für 30sec gespült. Anschließend wurden die Objektträger wie bei der HE-Färbung einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen, in zwei Xylolbäder gegeben und eingedeckt.

Die Elastika-Masson-Trichrom-Färbung wurde verwendet, um Arterien-schichten darzustellen, wobei die *laminae elasticae* schwarzblau und das restliche Gewebe taubenblau erscheinen.

6.5 Histopathologische Analysen

Bei den angefärbten Objekten wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Nikon Optiphot 2; Nikon, Düsseldorf, Deutschland) die Ausdehnung von Intima und atheromatösen Läsionen quantitativ bestimmt. Zur exakten Vergleichsmöglichkeit wurde jeweils das Segment pro Gefäß mit der größten Fläche der Läsion ausgewählt und mit Hilfe einer CCD (charge-coupled device)-Kamera (Nikon 104; Nikon Düsseldorf, Deutschland) mit einer Vergrößerung von 10x0.8 (Auriculararterien) und 4x0.8 (*A. carotis* und *A. femoralis*) digitalisiert und computergestützt (Adobe Photoshop, Version 5.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA) vermessen. Ausgemessen wurden hierbei das Lumen des Gefäßes, die Dicke der Intima und der Media sowie die Fläche der Läsionen. Die Intima-Media-Ratio (IMR) wurde aus dem Verhältnis von gemessener Fläche der Intima zur Fläche der Media berechnet ($IMR = a_{intima} / a_{media}$). Der Lesion area index ($LAI = a_{lesion} / a_{media}$) wurde aus dem Verhältnis der Fläche der Läsion zur Fläche der Media berechnet. (30)

6.6 Klinische Untersuchungen

Um nach der perivaskulären Applikation der verschiedenen Applikationslösungen (CP, LPS, NaCl) die lokale Entzündungsreaktion zu beurteilen, wurden makroskopisch Longitudinal- und

Querdurchmesser des elliptischen Erythems der Ohrhaut über mehrere Tage nach Applikation vermessen. Die Fläche der Entzündungsreaktion wurde nach der Gleichung (Fläche der Ellipse = $a/2 \times b/2 \times \pi$) berechnet und über 10 Tage nach Applikation nachverfolgt.(30)

6.7 Laborparameter

Von den Tieren wurden während der Studie mehrmals Serumproben entnommen, die 15min bei 100% zentrifugiert und dann bei -20°C gelagert wurden. Um das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion zu beurteilen wurden Serumspiegel des CRP mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), unter Verwendung gereinigter Huhn-anti-Kaninchen-CRP-Antikörper konjugiert mit Meerrettichperoxidase und Tetramethylbenzidin/Hydrogen-Peroxid als chromogenes Substrat (Immunology Consultant Laboratory Inc., Newberg, OR, USA), bestimmt. Die Positivkontrolle enthielt 80 ng/ml Kaninchen-CRP. Die Absorption der letzten Reaktion wurde auf 450 nm festgelegt. Zusätzlich wurden die Anzahl der Leukozyten (white blood count, WBC) mit Differentialblutbild, Erythrozyten und Thrombozyten sowie die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS) nach perivaskulärer Applikation bestimmt. Die Cholesterinspiegel wurden vor Beginn der Applikation der jeweiligen Pathogene oder Kontrollen (baseline), am Tag 5, in Woche 4 (maximale lokale Reaktion) und in Woche 16 (vor Abtötung) bestimmt.

6.8 Immunzytochemische Analysen

Zur Analyse der zellulären Zusammensetzung der Läsionen, ihrer Proliferationsaktivität und Vorkommen von Makrophagen und Leukozyten im perivaskulären Gewebe, wurden diese an $10\mu\text{m}$ dicken Gewebeschnitten immunzytochemisch mittels Streptavidin-Biotin-Methode oder Alkalische Phosphatase-anti Alkalische Phosphatase-Methode angefärbt und bestimmt.

Hierzu wurde das Gewebe zunächst mit Pferdeserum inkubiert, um unspezifische Bindungen auf dem Gewebe abzublocken. Als primäre Antikörper (AK) wurden verschiedene monoklonale Antikörper aus der Maus verwendet. Tab.2 zeigt eine Übersicht der verwendeten Substanzen und Antikörper.

Zum Nachweis von Kaninchenmakrophagen wurde der Anti-Makrophagen-Antikörper RAM11 verwendet, der mit einem zytoplasmatischen Antigen in Kaninchenmakrophagen reagiert.

Zum Nachweis von Leukozyten verwendeten wir einen Antikörper, der mit der alpha-L-Untereinheit von LFA-1 (CD11a), einem heterodimeren Oberflächenglycoprotein, das von Leukozyten exprimiert wird, reagiert.

Als weiterer primärer Antikörper wurde ein anti-Muskelaktin-Antikörper verwendet. Dieser erkennt glatte Muskelzellen, Herz- und Skelettmuskelzellen.

Der monoklonale Antikörper MIB-5 reagiert mit dem Zellprotein Ki67, somit kann mit MIB-5 eine starke Kernfärbung proliferierender Zellen erreicht werden.

Zum Nachweis von zellulären Adhäsionsmolekülen diente ein Antikörper gegen VCAM-1.

Diente als Substrat alkalische Phosphatase, benutzten wir als Sekundärantikörper Fab-Fragmente eines Anti-Maus-Ig aus dem Schaf, konjugiert mit einer alkalischen Phosphatase. Zur Darstellung benutzten wir Fast-Red-Tabletten, die mit alkalischer Phosphatase eine Rotfärbung ergeben.

Diente eine Peroxidase als Substrat, wurde ein biotinylierter Zweitantikörper aus einem Kit (Vectastain Elite ABC) verwendet. Dieser affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper erkennt tierspezifische Ig-Ketten des Primärantikörpers. Über diesen Zweitantikörper als Brücke findet die Nachweisreaktion mit dem ABC-Komplex aus Avidin und biotinyliertem Enzym (biotinylierte Meerrettichperoxidase) statt.

Tab.2 Verwendete Substanzen und Antikörper für Immunzytochemie

SUBSTANZEN		
Pferdeserum		Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
Fast-Red-Tabletten	Fast-Red-TR/Naphtol-AS-MX	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
alkalische Phosphatase		Boehringer, Mannheim, Deutschland
PRIMÄR-ANTIKÖRPER		
RAM 11	anti-Makrophagen-AK	Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA
	CD11a-AK	PharMingen International (Becton Dickinson Company)
	anti-Muskelaktin-AK	Immunotech Vertriebsgesellschaft, Hamburg, Deutschland
MIB-5	monoklonaler AK geg. Ki67	Dianova, Hamburg, Deutschland
SEKUNDÄR- ANTIKÖRPER		
Vectastain Elite ABC	biotinylierter AK	CamonLabor-Service GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Anti-Maus-Ig mit alkalischer Phosphatase		Boehringer, Mannheim, Deutschland

6.9 Immunfluoreszenz

Wir konnten *Chlamydomphila pneumoniae* auch mittels Immunfluoreszenz (IF) nachweisen. Hierzu verwendeten wir einen spezifischen monoklonalen Antikörper gegen das äußere Membranprotein (MOMP) von CP, welcher mit einem Immunfluoreszenzfarbstoff beschickt war.

Zunächst wurden noch nicht fixierte Gewebe 10 min in Methanol fixiert. Gefrorene Gewebe wurden 15min aufgewärmt. Auf jeden Schnitt wurden 30µl verdünnter Antikörper (1:14) gegeben. Zur Kontrolle diente ein Tropfen PBS auf jeweils einem Schnitt/OT. Die Inkubation fand bei 37°C in einer feuchten Dunkelkammer statt. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser wurde für 5min mit PBS-Evans blue (1:50) gegengefärbt. Zur Positivkontrolle dienten mit CP beschichtete OT, als Negativkontrolle Gewebe mit negativem PCR-Ergebnis.

Tab.3 Verwendete Antikörper und sonstiges Material für Immunfluoreszenz

CP-AK	spezifischer AK gegen äußeres Membranprotein (MOMP) von <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	VIVA Diagnostik, Hamburg, Deutschland
CP-OT	(Positivkontrolle)	Bios GmbH, Gräfelfing, Deutschland

6.10 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung aus Geweben wurden Gewebestücke von 5 bis 10mg mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff homogenisiert und in 180µl Qiagen-Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurde Proteinase-K (Endkonzentration: 7-8µg/µl) zugegeben und die Mischung 1 bis 3h lang bei 56°C inkubiert. Nach dem Proteinverdau wurde weiter gemäß dem Herstellerprotokoll verfahren. Der Schritt zur Gewinnung RNA-freier DNA wurde hierbei ausgelassen. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt, wobei 95µl PCR-Wasser in die Küvette vorgelegt und anschließend 5µl der DNA-Lösung zugegeben wurden. Die isolierte DNA diente in einem weiteren Schritt für die Amplifikation mittels PCR und abschließender Sichtbarmachung.

6.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle Gewebe, die mit replikationsfähigen CP behandelt waren, wurden einer zweistufigen *nested* PCR unterzogen. Für die erste (äußere) PCR wurden 100ng der isolierten DNA verwendet. Für die zweite (innere) PCR dienten 5µl der amplifizierten DNA aus der ersten PCR. Für alle Amplifikationen wurde ein Ansatz von 50µl erstellt. Dieser bestand aus 5µl Taq-Pol- Puffer (10x), 2µl je Primer (10pmolar), 5µl dNTPs (200µM), 0,25µl Taq-Polymerase und 100ng isolierter DNA, aufgefüllt mit PCR-Wasser.

Mit der zweistufigen *nested* PCR wurde zunächst Chlamydien-DNA allgemein und danach speziell DNA des Stammes der *Chlamydomphila pneumoniae* amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer benutzt: Chl 32V, und Chl 843R (für Chlamydien-DNA), deren 16SrDNA-Produkt 828bp beträgt, sowie CP 105V und CP 656R (für DNA der *Chlamydomphila pneumoniae*) mit einem PCR-Produkt von 570bp. In Tab.4 sind die verwendeten Substanzen und Geräte verzeichnet, in Tab.5 die verwendeten Primer und deren Basenpaare.

Zur Amplifikation wurden in einem Thermocycler folgende Schritte durchlaufen:

Um die Spezifität zu erhöhen wurden beide PCRs mit einem Hotstart von 85°C über 2min begonnen. Nach Abkühlen auf 80°C, die für 5min gehalten wurden, folgte die Aufspaltung der Doppelstränge (Denaturierung) bei einer Temperatur von 94°C über 30sec. Die Anlagerung der Primer (*Annealing*) fand bei der ersten (äußeren) PCR bei 60°C, bei der zweiten (inneren) bei 52°C statt, wobei die Zeit von 1min (äußere PCR) bzw. 45sec (innere PCR) benötigt wurde. Um die Taq-Polymerase zu aktivieren und dadurch die Extension der Primer (Elongation) zu erwirken, wurde für 1,5min (äußere PCR) bzw. 1min (innere PCR) die Temperatur auf 72°C erhöht. Es wurden jeweils 30 Zyklen durchgeführt.

Zusätzlich führten wir eine zweistufige *nested* PCR mit den äußeren Primern Chl1-L und Chl2-R mit einem PCR-Produkt von 404bp sowie den inneren Primern CP1-L und CP1-R mit einem Amplifikationsprodukt von 214bp durch (siehe Tab.4). Die PCR wurde laut Protokoll von LaBiche durchgeführt.(72) Nach Aktivierung der PCR-Enzyme bei 95°C über 9min begannen wir mit der äußeren (ersten) PCR. Diese bestand aus 40 Zyklen mit 30sec bei 95°C zum Schmelzen, 50sec bei 60°C zum Anlagern und 30sec bei 72°C um die Primer zu erweitern. Für die innere PCR wurde 15sec eine Schmelztemperatur von 94°C gehalten, die Primer lagerten in einer Zeit von 1min bei 60°C an und wurden über 15sec bei 72°C erweitert. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt.

Die Qualität der DNA-Isolierung wurde durch Amplifikation eines GAPDH-Genfragments getestet.

Die Molekulargewichtsmarker VIII und VIIIa wurden zur Größenberechnung verwendet. Der Molekulargewichtsmarker VIII ist eine Mischung aus pUC21 mit HpaII und für den Bereich niedriger Molekulargewichte eine Mischung aus pUC21 mit HindIII/DraI.

Ausgewertet wurde das PCR-Produkt nach Zugabe eines Auftragspuffers (10µl) mittels Elektrophorese (30-50min, 100 Volt, 300 Watt und 0,12-0,16 Ampere) auf 1,5%igen bzw. 2%igen Agarosegelen.

Für 15-30min wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung geschwenkt, und anschließend das DNA-Fragment unter UV-Transillumination durch das interkalierende Ethidiumbromid über Computer sichtbar gemacht. Zur Herstellung einer Ethidiumbromidlösung wurden 1,5µl Ethidiumbromid in 1ml

PBS gelöst. Der PBS-Puffer bestand aus 150 mM NaCl, 2,47 mM NaH₂PO₄ und 7,24 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O.

Als Positivkontrolle verwendeten wir *Chlamydomonas reinhardtii*. Als Negativkontrolle diente steriles Wasser. Um die Spezifität für CP-DNA nachzuweisen wurden Gefäßgewebe von sicher CP-negativen Kaninchen verwendet.

Tab.4 Verwendete Substanzen und Geräte für PCR

SUBSTANZEN		
Taq-Pol- Puffer		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
dNTPs		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Taq-Polymerase		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
PCR-Wasser		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Primer		MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Molekular- Gewichtsmarker		Boehringer, Mannheim, Deutschland
Agarose		Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf, Deutschland
Ethidiumbromid		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CP-OT	(Positivkontrolle)	Bios GmbH, Gräfelfing, Deutschland
GERÄTE		
Thermocycler	Elmer Gene Amp; PCR-System 9600	Perkin, Oldendorf, Deutschland
Geldoc 2000	UV-Transilluminator	Bio-Rad, Deutschland

Tab.5 Verwendete Primer und deren Basensequenz

BEZEICHNUNG	FRAGMENT-LÄNGE	SEQUENZ (5´-3´)	TM
Chl 32V	828bp	ACGCTGGCGGCGTGGATG	60°C
Chl 843R		CGACACGGATA(G)GGGT TGAG	
CP 105V	570bp	GCGGAAGGGTTAGTAGTA	62°C
CP 656R		CCCTTTCCCCATCTATC	
Chl1-L	404bp	TTATCACCGTCCTACAGCAGAAA	60°C
Chl2-R		GGGGGTTTCAGGGATCATTGT	
CP1-L	214bp	TTACGAAACGGCATTACAACGGCTAGAAATC AAT	60°C
CP1-R		TATGGCATATCCGCTTCGGGAACGAT	

6.12 Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden als Mittelwert±Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der Läsionen in jeder Gruppe wurde mit dem χ^2 Test berechnet. IMR und LAI wurden zwischen den verschiedenen Gruppen mit einfaktorieller Varianzanalyse (Scheffé-Test) verglichen. Bei Annahme einer Differenz von 0.15 im LAI, einer 80%igen Power und einem α -Fehler von 5% wurde eine Fallzahl von n=6 Segmenten benötigt. Die statistische Signifikanz wurde bei p<0.05 angenommen (SPSS release 11.0.1, SPSS Inc., Chicago).

7 ERGEBNISSE

7.1 Klinische Befunde und Laborergebnisse

Die perivaskuläre Inokulation von LPS, replikationsfähigen oder inaktivierten CP resultierte am Ohr in einer transienten Entwicklung eines Erythems an der Applikationsstelle. Die stärkste Hautreaktion wurde am ersten Tag nach der Applikation beobachtet und unterschied sich im Durchmesser stark von der Hautreaktion der Kontrollseite mit Kochsalzapplikation ($4.42 \pm 0.52 \text{cm}^2$ vs $0.17 \pm 0.07 \text{cm}^2$, $p < 0.001$, Abb.3a). Ein leichtes Erythem hielt 4 Tage an und bildete sich bei allen Tieren vollständig zurück (Abb.3b).

Bei den hypercholestrinämischen Gruppen gab es keine Unterschiede des Serumcholesterins (Gruppe A $1440 \pm 320 \text{mg/dl}$, Gruppe B $1637 \pm 520 \text{mg/dl}$, $p = \text{NS}$).

Wiederholte Applikationen von LPS oder Kochsalz resultierten bei hypercholesterinämischen Kaninchen in einem leichten Anstieg der CRP-Werte, die bis zum Tod der Tiere anhielten (CRP zu Beginn: $0.003 \pm 0.001 \text{mg/dl}$; Woche 4: $0.28 \pm 0.13 \text{mg/dl}$; Woche 16: $0.28 \pm 0.009 \text{mg/dl}$, $p = 0.15$). Nach wiederholter Applikation von replikationsfähigen oder inaktivierten CP stieg bei hypercholesterinämischen Tieren das CRP in gleichem Maße an (CRP zu Beginn: $0.04 \pm 0.006 \text{mg/dl}$; Woche 4: $0.65 \pm 0.32 \text{mg/dl}$; Woche 16: $0.43 \pm 0.1 \text{mg/dl}$, $p = 0.13$). Die CRP-Werte LPS-behandelter und CP-behandelter Tiere unterschied sich nicht signifikant (Beginn: $p = 0.24$; Woche 4: $p = 0.32$; Woche 16: $p = 0.31$).

Weitere Laborparameter wurden nur qualitativ zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der Läsionen bestimmt.

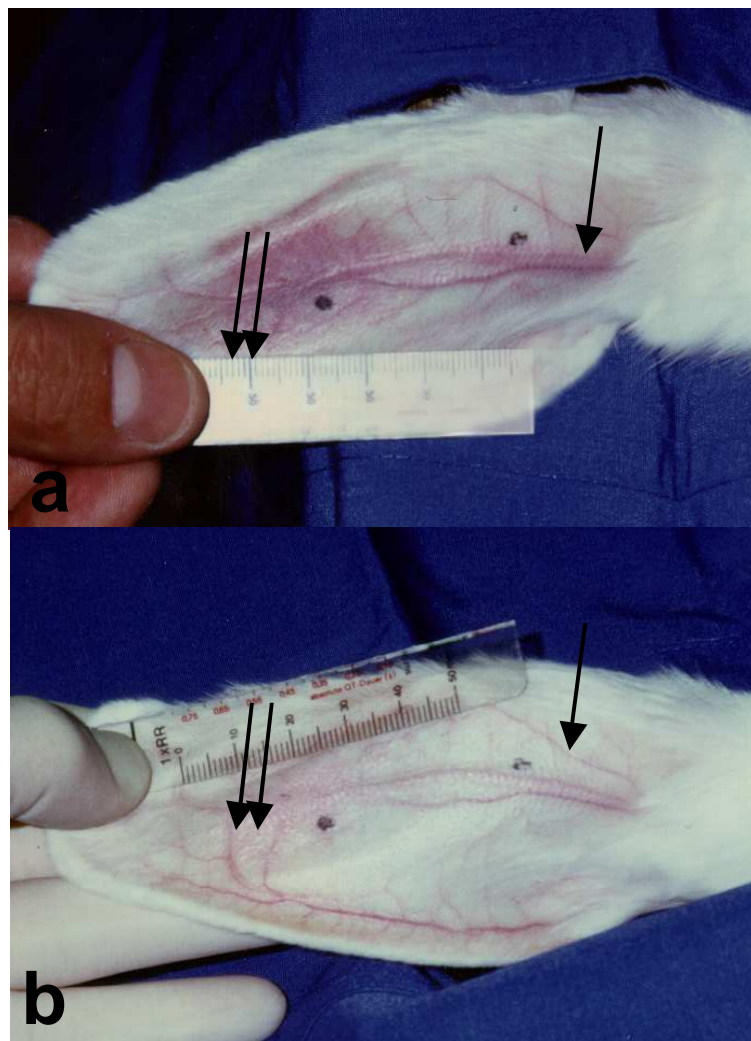


Abb.3 Transientes Erythem an der Applikationsstelle (Kaninchenohr)

Die stärkste Hautreaktion wurde am Tag 1 (**a**) nach LPS-Applikation (Doppelpfeil) beobachtet und unterschied sich in der Größe signifikant von der Injektionsstelle der Kontrolle (Pfeil). Das lokale Erythem war am Tag 4 (**b**) komplett verschwunden.

7.2 PCR und Immunfluoreszenz

CP wurden mit Hilfe der *nested* PCR und Immunfluoreszenz in 8 von 12 arteriellen Segmenten (67%), die wiederholt mit replikationsfähigen CP behandelt wurden, nachgewiesen (Abb.4 und 5). CP fanden sich vor allem in Makrophagen-reichen Läsionen (Abb.5a), aber auch in Media und Adventitia (Abb.5c und d). Bei 6 von 12 Segmenten (50%), die mit inaktivierten CP behandelt wurden, war der Nachweis von CP in der PCR ebenfalls positiv ($p=0.680$), während der Nachweis von CP-Antigen mittels Immunfluoreszenz in diesen arteriellen Geweben negativ oder sehr schwach ausfiel. In arteriellen Geweben, die wiederholt mit LPS oder Kochsalz behandelten Tiere, sowie der mit Antibiotika behandelten Tiere, konnten weder mittels PCR noch mittels Immunfluoreszenz CP nachgewiesen werden.

In der Testung auf CP mittels PCR in entfernten Gewebeproben (Lunge, Milz, Lymphknoten) konnte CP-DNA bei einem Tier in Lungen- und Lymphknotengewebe nachgewiesen werden.

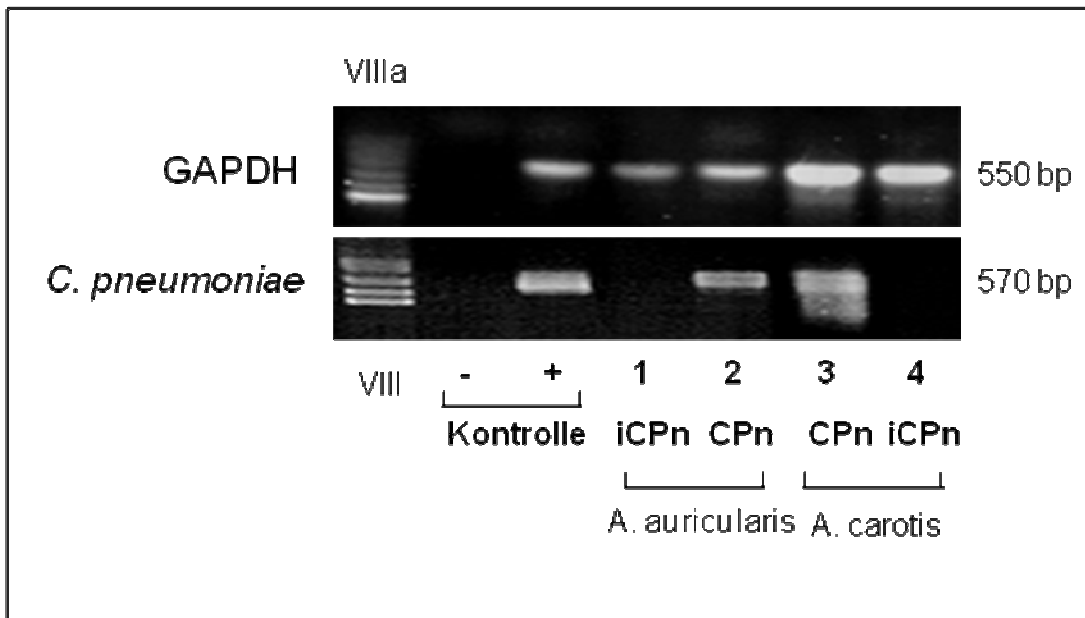


Abb.4 Nachweis von *Chlamydomphila pneumoniae* DNA in chronisch infizierten Arterien mittels *nested* PCR.

Nachgewiesen wird CP-DNA in Gefäßen nach Infektion mit replikationsfähigen Organismen (Spur 2 und 3), während nach Applikation inaktivierter CP keine DNA nachgewiesen werden konnte (Spur 1 und 4). VIII/VIIIa: Molekulargewichtsmarker.

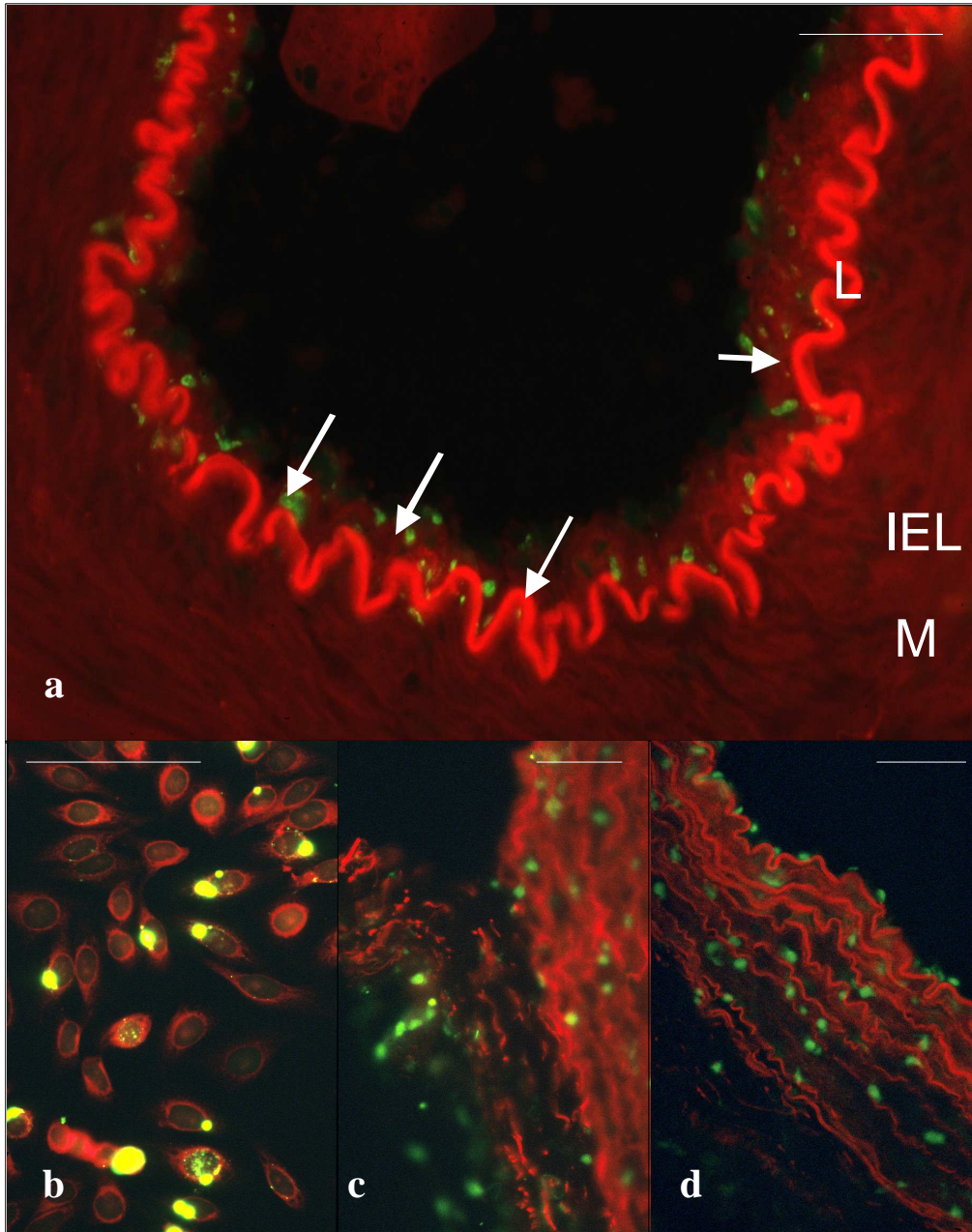


Abb.5 Nachweis von CP MOMP in chronisch infizierten Arterien mittels IF.

(a) Nachweis von CP major outer membrane protein (CP MOMP) in einer atheromatösen Läsion (L) eines hypercholesterinämischen Kaninchens (Pfeile). (b) Nachweis von CP Einschlusskörperchen in humanen Hep-2 Zellen (Positivkontrolle). CP wurden auch in Adventitiagewebe (c) und in der gesamten Media (d) nachgewiesen. Immunfluoreszenz, mit Evans' blue gegengefärbt. L: atheromatöse Läsion, IEL: innere elastische Membran, M: Media. Balken entsprechen 50µm.

7.3 Histopathologie und Immunzytochemische Analysen

7.3.1 Effekte von *Chlamydophila pneumoniae* auf die Entwicklung atheromatöser Läsionen

Wiederholte Applikation replikationsfähiger CP bei 16 wöchiger Cholesterinfütterung resultierte in einem Anstieg der Bildung atheromatöser Läsionen im Vergleich zu Kontrollen mit Kochsalz. In Gefäßen, die mit replikationsfähigen CP behandelt wurden, konnten in 9 von 12 Segmenten (75%) Läsionen nachgewiesen werden. Bei der Behandlung mit inaktivierten CP traten in 7 von 12 Segmenten (58%) Läsionen auf. Bei den 4 Tieren der Nebengruppe, jeweils mit Kochsalz kontrolliert, entwickelten sich bei der Behandlung mit replikationsfähigen CP in 5 von 6 Segmenten (83%), bei der Behandlung mit inaktivierten CP in 4 von 6 Segmenten (67%) und in der Kontrollgruppe in 2 von 12 Segmenten (17%) Läsionen ($p=0.014$). Abb.6b zeigt die Anzahl der aufgetreten atheromatösen Läsionen (in Prozent) bei chronischer Inokulation.

Die Läsionen bestanden vorwiegend aus Makrophagen und glatten Muskelzellen (VSMCs) (Abb.8b und d) entsprechend dem Stadium II der Sary-Klassifikation.(120) Die Makrophageninfiltration, wie sie bei inflammatorischen Reaktionen auftritt, wurde am stärksten am ersten Tag nach der Applikation von replikationsfähigen oder inaktivierten CP beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Ausprägung des Hauterythems am stärksten. Nach 6 Tagen konnten keine Makrophagen mehr in den arteriellen Gefäßwänden nachgewiesen werden. Leukozyten zeigten bei der Behandlung mit replikationsfähigen CP während der chronischen Infektion keine oder nur eine geringe Präsenz in der Adventitia und keine Infiltration der Media. Bei der wiederholten Applikation mit inaktivierten CP wurde keine zelluläre Infiltration beobachtet.

Der LAI (Lesion Area Index) war bei der Behandlung mit replikationsfähigen CP im Vergleich zur Behandlung mit Kochsalz signifikant erhöht (0.23 ± 0.08 vs 0.01 ± 0.01 , $p=0.006$, Abb.6a). Die Induktion atheromatöser Läsionen wurde auch in arteriellen Segmenten beobachtet, die mit inaktivierten CP behandelt wurden (0.25 ± 0.09 vs 0.01 ± 0.01 , $p=0.006$, Abb.6a), wobei die Entwicklung von Läsionen in Gefäßen, die mit replikationsfähigen CP behandelt wurden, deutlicher war. Auch in der Kochsalz-kontrollierten Nebengruppe war der LAI bei der Behandlung mit

replikationsfähigen oder inaktivierten CP gegenüber der Kontrollen signifikant erhöht (0.19 ± 0.06 ; 0.14 ± 0.08 vs 0.02 ± 0.01 , $p=0.017$). Abb.9 zeigt repräsentative H&E-Färbungen der *A.carotis* nach perivaskulärer Inflammation in hypercholesterinämischen Kaninchen.

7.3.2 Effekte von LPS auf die Entwicklung atheromatöser Läsionen

Bei der Behandlung mit LPS traten in 10 von 12 Segmenten (83%) Läsionen auf, in der Kochsalz-behandelten Kontrollgruppe in 2 von 12 Segmenten (17%) (Abb.6b). Wie bei der Behandlung mit inaktivierten CP war bei der Behandlung mit LPS keine Zellinfiltration in den Läsionen zu beobachten. Eine signifikante fokale Intimaverdickung trat am 18ten Tag in LPS-behandelten Arterien auf (IMR 0.077 ± 0.008 vs 0.051 ± 0.005 , $p=0.014$, Abb.7). Die verdickte Intima bestand vorwiegend aus glatten Muskelzellen, Entzündungszellen konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 8 a und c). Am 90ten Tag nach der LPS-Applikation waren die Intimaflächen der LPS- und Kochsalz-behandelten Gefäße gleich und wieder normal (IMR 0.042 ± 0.008 vs 0.039 ± 0.007 , $p=1.0$, Abb.7). Cholesterinfütterung kombiniert mit wiederholter LPS-Applikation über 90 Tage resultierte in signifikant erhöhter Ausprägung von Läsionen an den Stellen der Injektion (LAI 0.15 ± 0.05 vs 0.01 ± 0.01 , $p=0.06$). Abb.9 zeigt repräsentative H&E-Färbungen der *A.carotis* nach perivaskulärer Inflammation in hypercholesterinämischen Kaninchen.

7.3.3 Effekte der einmaligen Inokulation auf die Bildung atheromatöser Läsionen

Weder die einmalige Inokulation mit CP (replikationsfähig oder hitze-inaktiviert) noch mit LPS führten in hypercholesterinämischen Kaninchen zur Bildung von Läsionen (LAI: 0.03 ± 0.03 , 0.03 ± 0.02 , 0.04 ± 0.02 vs 0.03 ± 0.02 in Kochsalz-behandelten Kontrollen, $p=0.965$).

7.3.4 *Effekte auf die Bildung atheromatöser Läsionen unter Normocholesterinämie*

Unter normocholesterinämischen Bedingungen wurde weder eine Zunahme der Intimadicke noch die Bildung atheromatöser Läsionen bei wiederholten Applikationen beobachtet (LAI: 0.0 vs 0.0, $p=1.0$, replikationsfähige CP vs inaktivierte CP) (Abb.6a).

7.3.5 *Effekte auf die Bildung atheromatöser Läsionen unter Antibiotikatherapie*

Die Behandlung mit einem Makrolidantibiotikum (Roxithromycin) verminderte in allen Gruppen die Bildung atheromatöser Läsionen (LAI ohne Antibiotikum vs mit Antibiotikum: 0.23 ± 0.08 vs 0.034 ± 0.04 , $p=0.005$ für replikationsfähige CP; 0.15 ± 0.05 vs 0.003 ± 0.004 , $p=0.005$ für LPS; 0.008 ± 0.006 vs 0.002 ± 0.003 , $p=0.005$ für Kochsalz) (Abb.6a). Die Anzahl der aufgetreten Läsionen konnte durch die Antibiotikatherapie ebenfalls reduziert werden (75% vs 43% für replikationsfähige CP, 83% vs 14% für LPS und 17% vs 14% für Kochsalz; Abb.6b).

Tab.6 Vergleich der atheromatösen Läsionen nach perivaskulärer Inokulation

Inokulation	IMR	(%)	LAI	PCR	IF
Hypercholesterinämie, chronisch perivaskuläre Inokulation					
Kochsalz (n=12 Segmente)	0.11±0.01	17	0.01±0.01	0/12	0/12
LPS (n=12 Segmente)	0.25±0.05	83	0.15±0.05	0/12	0/12
CP replikationsfähig (n=12 Segmente)	0.28±0.08	75	0.23±0.08	8/12	8/12
CP inaktiviert (n=12 Segmente)	0.27±0.08	58	0.25±0.09	6/12	0/12
Kochsalz (n=12 Segmente)	0.11±0.03	17	0.02±0.01	0/12	0/12
CP replikationsfähig (n=6 Segmente)	0.31±0.06	83	0.19±0.06	4/6	4/6
CP inaktiviert (n=6 Segmente)	0.22±0.07	67	0.14±0.08	3/6	0/6
Hypercholesterinämie, chronisch perivaskuläre Inokulation+Antibiotikgabe					
Kochsalz (n=7 Segmente)	0.10±0.01	14	0.00±0.00	0/7	0/7
LPS (n=7 Segmente)	0.10±0.02	14	0.00±0.00	0/7	0/7
CP replikationsfähig (n=7 Segmente)	0.11±0.02	43	0.03±0.04	0/7	0/7
Normocholesterinämie, chronisch perivaskuläre Inokulation					
Kochsalz (n=5 Segmente)	0.04±0.01	0	0.0	/	/
LPS (n=5 Segmente)	0.04±0.01	0	0.0	/	/
CP replikationsfähig (n=5 Segmente)	0.03±0.01	0	0.0	/	/
CP inaktiviert (n=5 Segmente)	0.03±0.01	0	0.0	/	/
Hypercholesterinämie, einmalige perivaskuläre Inokulation					
Kochsalz (n=12 Segmente)	0.11±0.02	25	0.03±0.02	/	/
LPS (n=12 Segmente)	0.13±0.03	25	0.04±0.02	/	/
CP replikationsfähig (n=9 Segmente)	0.13±0.02	22	0.03±0.03	/	/
CP inaktiviert (n=9 Segmente)	0.11±0.02	22	0.03±0.02	/	/

IMR=Intima-Media-Ratio; LAI=Läsion-Fläche-Index; PCR=Polymerasekettenreaktion;
IF=Immunfluoreszenz;

Gewebe in IF wurden klassifiziert 0=negativ, 1=schwach positiv, 2=deutlich positiv; 0+1 wurden als negativ, 2 als positiv gewertet.

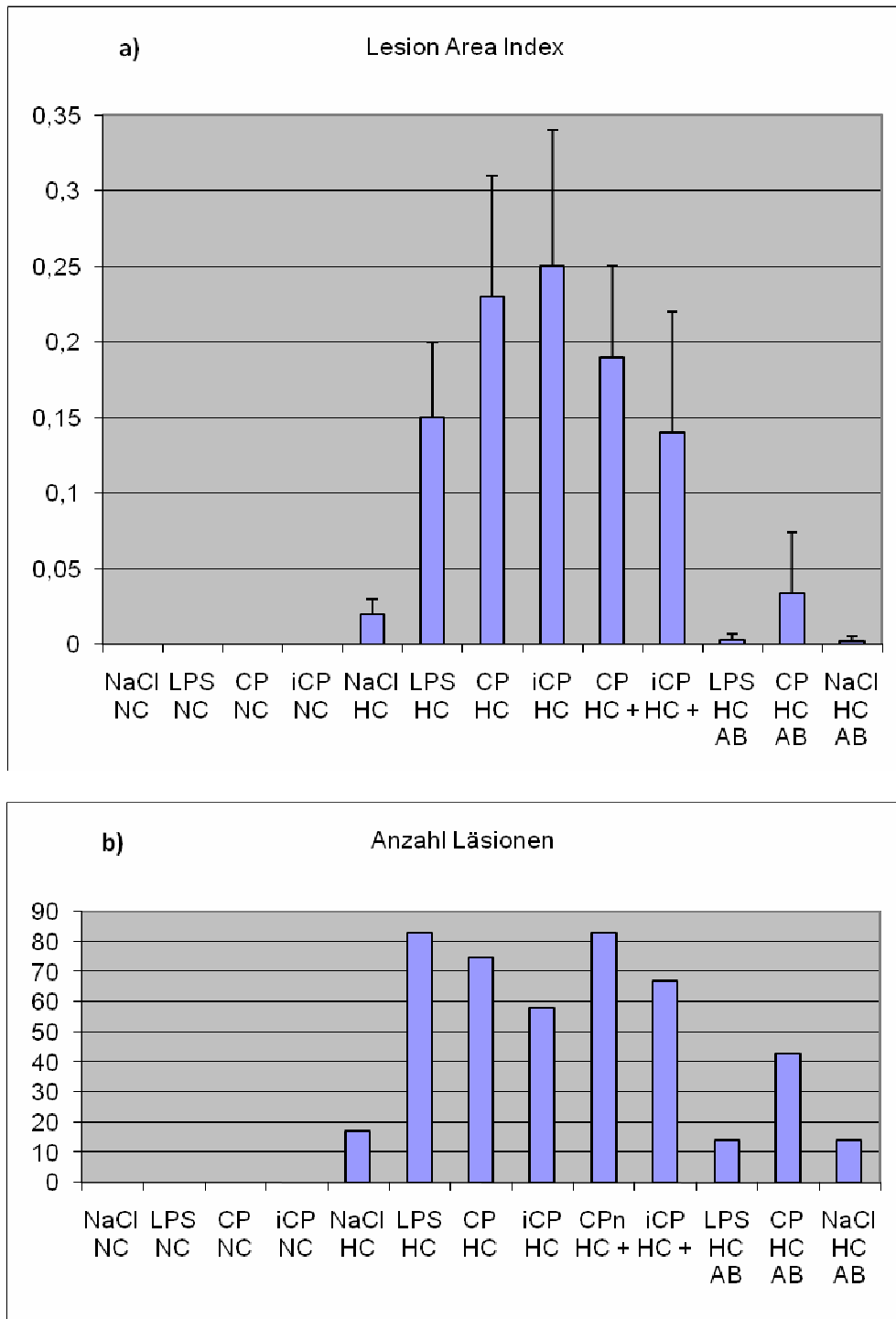


Abb.6 Bildung atheromatöser Läsionen nach chronischer Inokulation.

Die Grafik zeigt den Lesion Area Index (LAI) (a) und die Anzahl der aufgetretenen Läsionen (b) in normocholesterinämischen und hypercholesterinämischen Gruppen. NaCl: Kochsalzapplikation; LPS: Lipopolysaccharidapplikation; CP: Applikation replikationsfähiger *Chlamydomphila pneumoniae*; iCP: Applikation hitzeinaktivierter *Chlamydomphila pneumoniae*; AB: Antibiotikagabe; +: Lai und Anzahl der aufgetretenen Läsionen in der Nebengruppe, denen CP oder iCp neben den Arterien und neben den kontralateralen Arterien Kochsalz appliziert wurde um Einflüsse der Organismen auf die kontralaterale Seite auszuschließen. Der LAI in normocholesterinämischen Tieren betrug 0,0, da keine Läsionen aufgetreten sind.

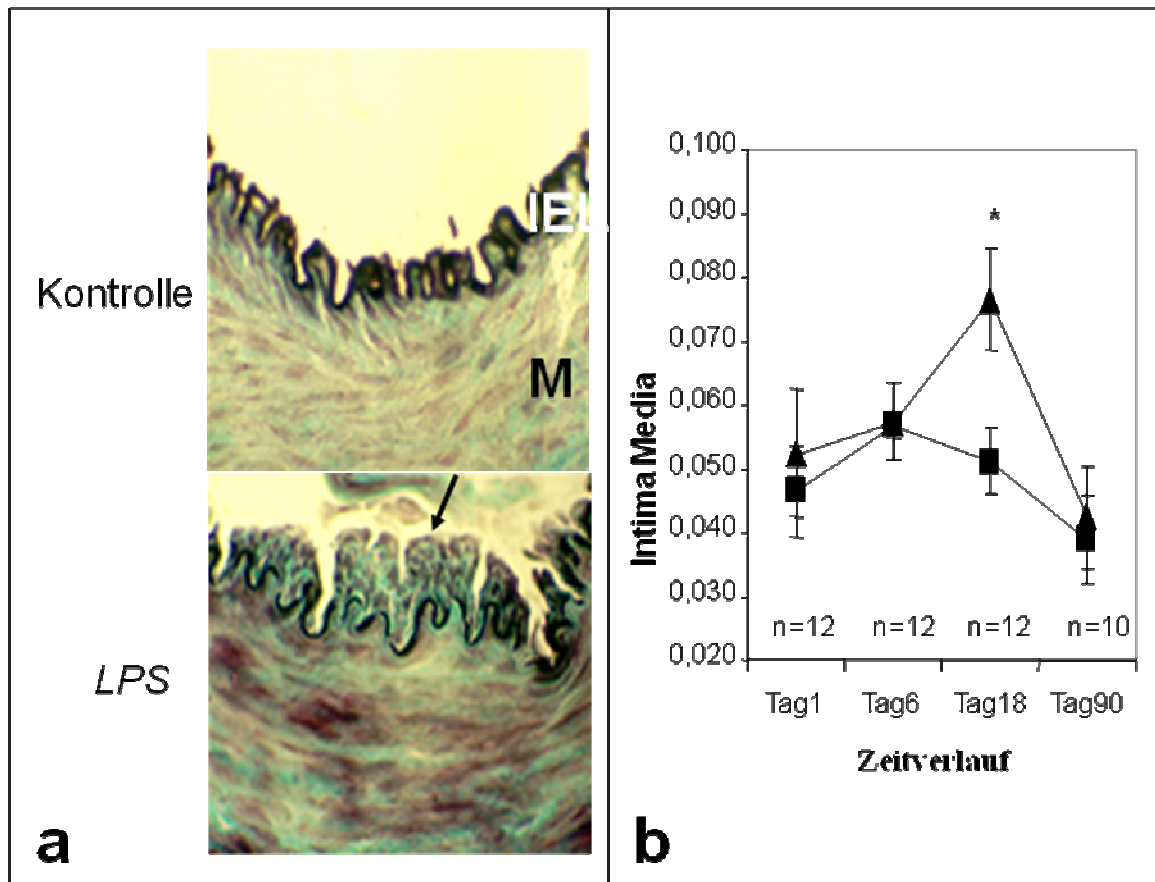


Abb.7 Intimaverdickung nach perivaskulärer LPS-Behandlung

In normocholesterinämischen Kaninchen entwickelte sich nach perivaskulärer LPS-Injektion eine transiente Intimaverdickung. (a) VanGieson-Färbung zeigt die Intimaverdickung (Pfeil) in einem LPS-behandelten Gefäß im Gegensatz zur Kontrollarterie. (b) Zeitliche Veränderung im Intima-Media-Verhältnis (+/-SE) zu den Zeitpunkten Tag 1, 6, 18 und 90 bei Tieren mit Standarddiät. Signifikantes Wachstum der Intima am Tag 18 in LPS-behandeltem Gefäßsegment (Dreiecke) im Gegensatz zu Kontrollarterien (Quadrate), $p=0.014$ (*).

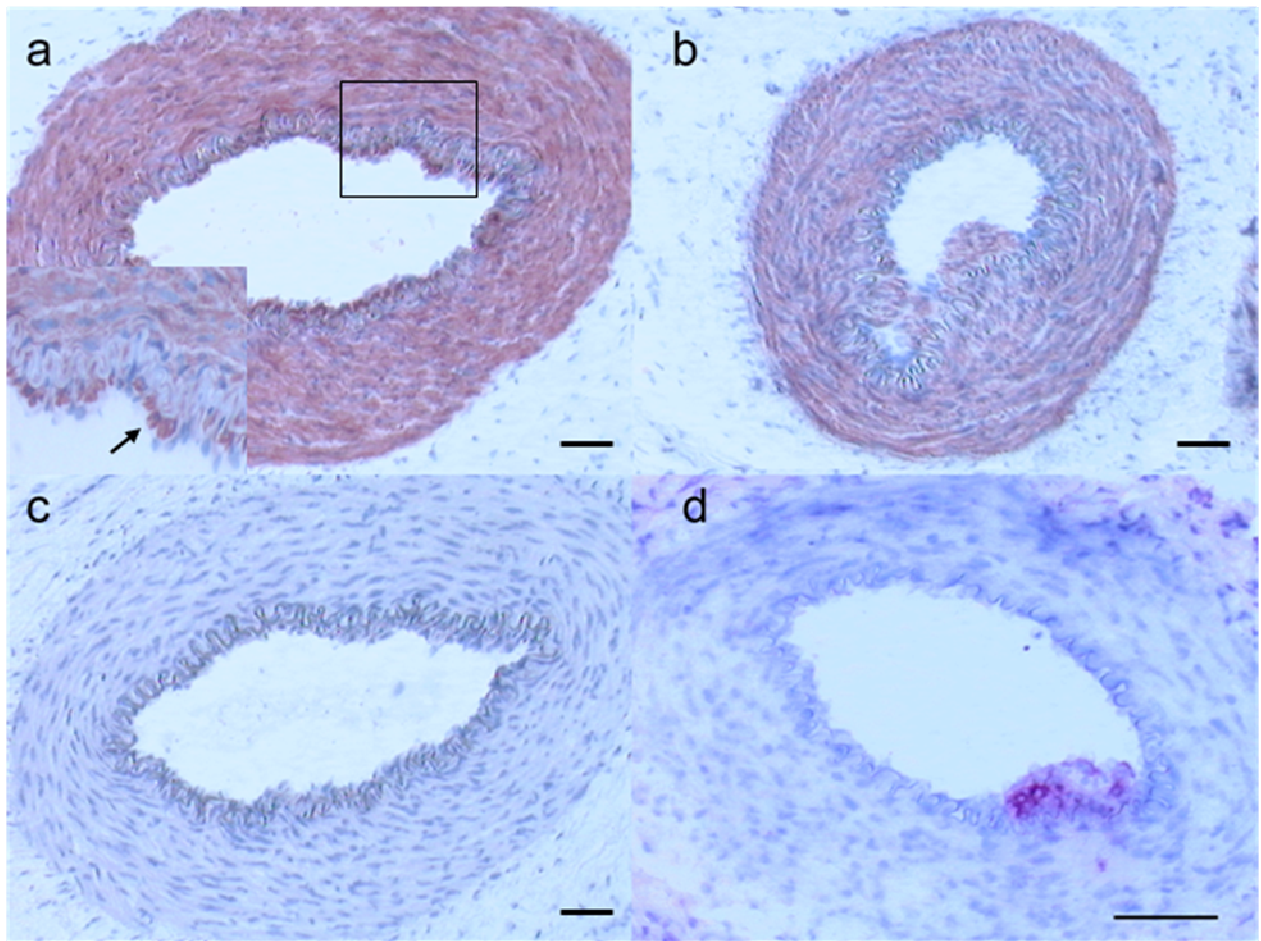


Abb.8 Zelluläre Zusammensetzung der Intima und der atheromatösen Läsion

a und c: Ohrarterie 18 Tage nach perivaskulärer *LPS*-Injektion. Die fokale Verdickung der Intima bestand vorwiegend aus glatten Muskelzellen wie durch Färbung mit Muskelaktin gezeigt wird (a). Der Einsatz zeigt die Muskelaktin-positive Zelle (Pfeil). In der Intima wurden keine Makrophagen gefunden (c). **b und d:** Hypercholesterinämische Tiere, die wiederholte *LPS*- oder *CP*-Injektionen erhielten.

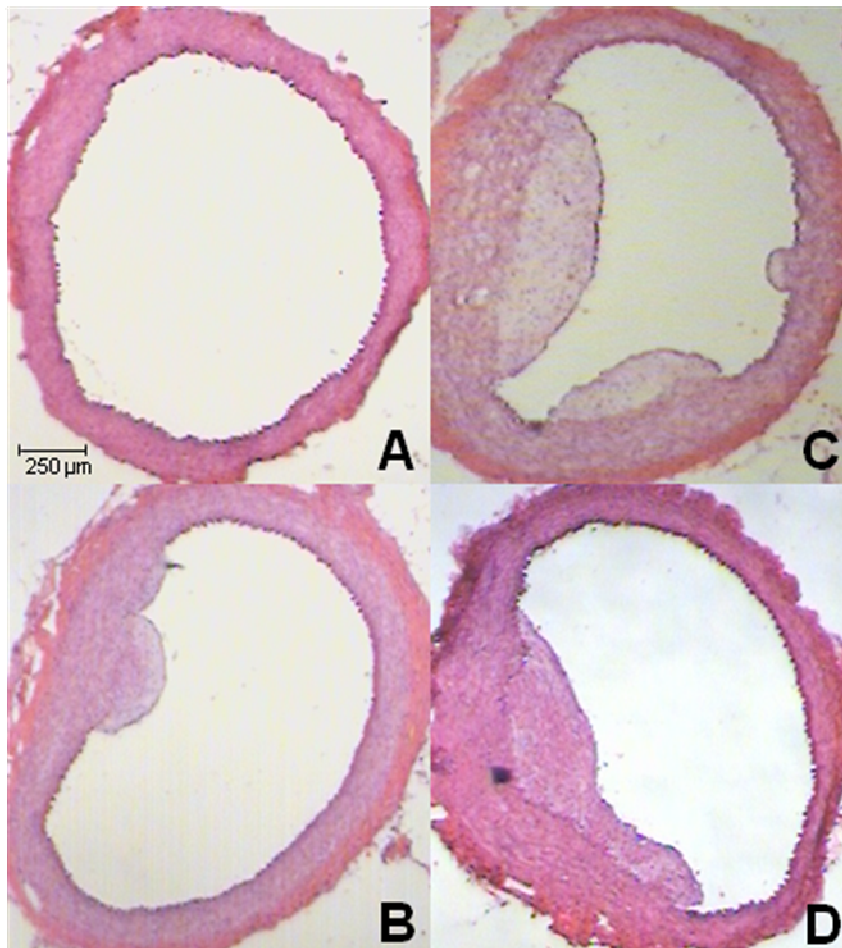


Abb.9 Histomorphologie der arteriellen Gefäße nach perivaskulärer Inflammation

Hämatoxylin & Eosin Färbung der *A.carotis* nach perivaskulärer Inflammation im hypercholesterinämischen Versuchstier. **A:** Kochsalz **B:** Lipopolysaccharide (LPS)-Behandlung **C:** chronische Inflammation durch replikationsfähige *Chlamydomphila pneumoniae* (CP) **D:** chronische Inflammation durch inaktivierte *Chlamydomphila pneumoniae* (iCp). Die Abbildung zeigt die signifikante Bildung von atheromatösen Läsionen in den Arterien, die mit LPS, replikationsfähigen CP oder inaktivierten CP behandelt wurden. Balken entsprechen 250 µm.

8 DISKUSSION

8.1 Lokale Inokulation als alternatives in vivo-Modell

Zahlreiche *in vivo* Tiermodelle - vor allem Kleintiermodelle - untersuchten den möglichen ursächlichen Zusammenhang zwischen CP und Atherosklerose. Eine Übersicht geben die Tabellen 1a und 1b. In fast allen Modellen wurde der natürliche, intranasale Inokulationsweg gewählt. *Chlamydomphila pneumoniae* kann unter Verwendung repetitiver hoher Infektionsdosen (intranasal inokuliert) pneumonische Krankheitsbilder bei Mäusen und Kaninchen hervorrufen, bei denen es unter cholesterinreicher Diät bei einem Teil der Tiere zu einer verstärkten Bildung atherosklerotischer Läsionen in Arterien kommt. Die bislang getestete intranasale Inokulation erfordert jedoch zum einen die Verwendung sehr hoher Tierzahlen, da lediglich ein Gefäßsegment pro Tier auswertbar ist und der Ort der Manifestation der infizierten Läsion nicht vorhersehbar ist.(34, 90, 94) Zudem kann eine mögliche Mischinfektion nicht immer ausgeschlossen werden. Der lokale intramurale Zugang durch Muhlestein *et al.*(94) und die perivaskuläre Applikation durch unsere Arbeitsgruppe in der vorliegenden Arbeit gingen dieses Problem an und testete die alternative Hypothese, ob das lokale Vorhandensein von *Chlamydomphila pneumoniae* oder anderen Bakterienkomponenten einen Einfluss auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen hat. Dieser experimentelle Ansatz erlaubt die Untersuchung einer größeren Zahl von arteriellen Segmenten pro Versuchstier. Durch die artifizielle perivaskuläre Inokulation wird bewusst nicht der natürliche Infektionsweg, sondern orientierend am „response to injury“-Modell die Spezifität der lokalen Wirkung von *Chlamydomphila pneumoniae* im Vergleich zu anderen bakteriellen Bestandteilen selektiv *in vivo* getestet werden. Aus diesen Gründen erscheint die lokale Applikation der Erreger in oder neben die Gefäßwand als ein besonders aussichtsreicher experimenteller Ansatz. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell ist limitiert durch die artifizielle Form der Einbringung des Erregermaterials, da dieses normalerweise über den Respirationstrakt aufgenommen wird, bzw. durch das Immunsystem modifiziert wird.

8.1.1 Pathogenetische Verbindung zwischen *Chlamydia pneumoniae* und Atherosklerose

Atherogene Eigenschaften von CP bei Mäusen wurden einheitlich in kontrollierten Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen beschrieben. Uneinigkeit besteht darin, ob nur CP oder auch andere Bakterien oder lediglich einzelne Erregerbestandteile diese Effekte bewirken. Hu *et al.* zeigten, dass in Mäusen mit LDL-Rezeptor-Mangel eine Infektion mit CP AR-39 in signifikanter Plaquebildung resultierte und dies spezifisch für CP ist.(50) Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Induktion atheromatöser Läsionen unabhängig vom Replikationszustand der Bakterien ist, da replikationsfähige und hitze-inaktivierte CP und auch LPS als Membrankomponente gramnegativer Bakterien *in vivo* ähnliche Effekte zeigten. Bisher wurden die direkten Auswirkungen inaktiverter CP auf die Gefäßwand nicht mit den Auswirkungen replikationsfähiger CP *in vivo* verglichen. Unsere Studie zeigt hierbei im Gegensatz zu einer kürzlich veröffentlichte Studie, dass hitze-inaktivierte CP atherosklerosefördernd sind.(117) Sharma *et al.* beschreiben die Exazerbation atherosklerotischer Läsionen in LDLR ^{-/-} Mäusen bei einer Infektion mit replikationsfähigen CP, jedoch nicht bei einer Infektion mit hitze-inaktivierten CP. Im Gegensatz zu unserem Modell benutzten Sharma *et al.* den intranasalen Inokulationsweg, was zu einer Veränderung, bzw. Degradation der inaktivierten Organismen durch die natürliche Immunantwort führen kann.

Der plaquefördernde Effekt nach lokaler Applikation konnte auch von Lehr *et al.* durch wiederholte systemische Darreichung von nahezu der doppelten kumulativen Dosis von LPS in Kaninchen beobachtet werden.(75) Die Tiere wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe unter hypercholesterinämischen Bedingungen vermehrt Atherosklerose auf. Entsprechend dieser Beobachtung induzierte LPS gram-negativer Bakterien (*E.coli*) *in vitro* Lipidakkumulation und Bildung von Schaumzellen aus Makrophagen.(37) Dieser Mechanismus könnte die gesteigerte Plaquebildung, wie es unsere und andere Gruppen (50, 77, 97, 98, 110) *in vivo* zeigen, erklären.

Die in der vorliegenden Arbeit durch CP oder deren Komponenten induzierten Läsionen unterschieden sich histomorphologisch in ihrer Zellularität nicht. Die Läsionen entsprachen dem Stadium II der Stary-Klassifikation, mit vorherrschenden Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen.(120) Die lokale Anwesenheit von CP führte bei LDL^{-/-} Mäusen vor allem zu umschriebenen

atherosklerotischen Läsionen mit einer empfindlicheren Morphologie, begleitet von einer ausgeprägten Hochregulierung von MCP-1 (makrophage chemoattractant protein-1) und ICAM-1, bestimmt auf mRNA- und Proteinebene.(48)

Der Effekt bakterieller Organismen oder deren Komponenten, die Bildung der Läsionen zu fördern, konnte nur unter hypercholesterinämischen Bedingungen beobachtet werden. In normocholesterinämischen Kaninchen waren weder replikationsfähige CP, inaktivierte CP oder LPS in der Lage, ohne andere atherogene Stimuli Läsionen zu induzieren. Das ist ein wichtiger Beleg dafür, dass infektiöse Erreger eher als sekundäre Kofaktoren wirken. Eine fokale Dickenzunahme der Intima und Leukozytenmigration nach der Gabe von LPS wurde in einem früheren Rattenmodell ohne Fütterung cholesterinreicher Kost beschrieben.(105) Die vorübergehende Migration vaskulärer glatter Muskelzellen in die Neointima, einer perivaskulären Inflammation durch LPS von *E.coli* folgend, wurde in einer früheren Studie in normocholesterinämischen Kaninchen durch unsere Gruppe beschrieben.(30) Im Gegensatz zur chronischen Infektion nach wiederholter bakterieller Applikation entwickelten hypercholesterinämische Kaninchen weder nach der einmaligen Applikation replikationsfähiger noch inaktiverter Organismen atheromatöse Läsionen.

Neuere Studien zeigen, dass CP-Antigen eher als replikationsfähige Bakterien in humanen atherosklerotischen Läsionen persistieren, da CP-Antigen in Abwesenheit von DNA oder 16S rRNA in den Läsionen nachgewiesen wurde.(87) Kalayoglu *et al.* demonstrierten, dass LPS von CP die Akkumulation von Cholesterylestern und die Bildung von Schaumzellen aus Makrophagen *in vitro* anregt.(57) Dies wurde durch unsere Kontrollgruppe, der wiederholt perivaskulär *E.coli* LPS appliziert wurde, bestätigt, was sich darin zeigte, dass die Bildung von Läsionen induziert wurde, aber weniger stark ausgeprägt war als bei der wiederholten CP-Applikation (Abb.6).

Es wurde gezeigt, dass andere bakterielle Komponenten wie *Chlamydomydia* Hitzeschockproteine (cHSP) 60 mit dem Auftreten von CP in atheromatösen Plaques assoziiert werden.(35) Kol *et al.*(66, 67) zeigten in humanen Atheromen, aktiviertem humanem vaskulärem Endothelium, glatten Muskelzellen und Makrophagen lokalisiertes cHSP 60.

Die gesteigerte Bildung von Läsionen nach chronischer CP Infektion könnte aus dem Vaskulotropismus und der Fähigkeit von CP, in vaskulären glatten Muskelzellen zu persistieren, resultieren,(83, 84, 96) während andere Bakterien wie *E.coli* oder *Chlamydophila trachomatis* noch nie in atheromatösen Geweben nachgewiesen wurden. Der Vaskulotropismus von CP wurde kürzlich in einem *ex vivo* Modell an humanen Nierenarterien, in dem LPS von CP nach lokaler Infektion allgemein in Arterien nachgewiesen werden konnte, demonstriert, während in dieser Studie die Reaktivierung von replikationsfähigen CP in allen Fällen misslang.(104) Der atherogene Effekt bakterieller Produkte der in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, hing nicht von einer systemischen inflammatorischen Antwort ab, was daran zu sehen war, dass hypercholesterinämische Tiere die wiederholte Applikationen erhielten, einen vergleichbar geringen Anstieg des CRP entwickelten.

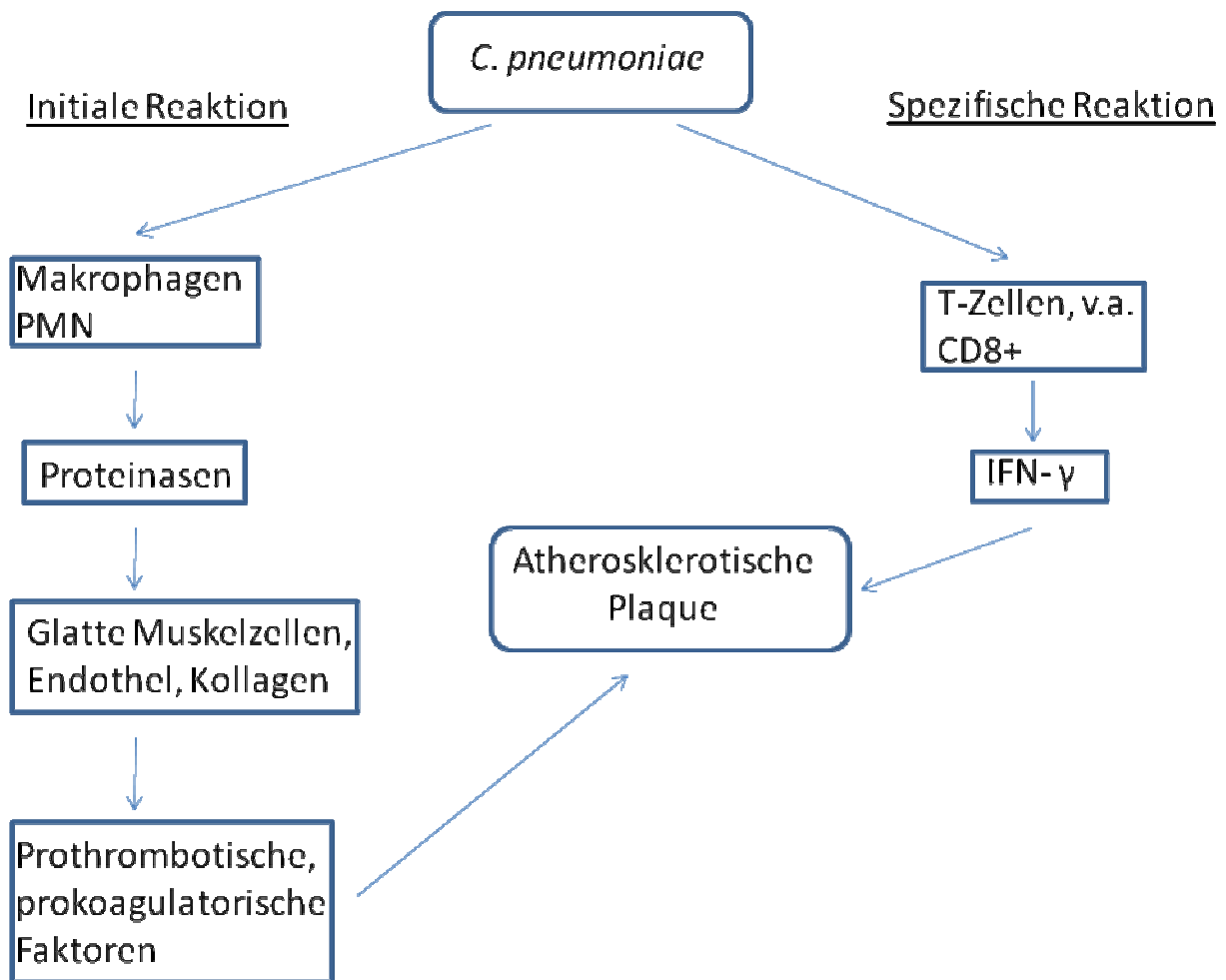


Abb.10 Pathogenetische Verbindung zwischen *C. pneumoniae* und Atherosklerose

Die initiale Immunität, repräsentiert durch polymorphkernige Zellen (PMN) und Makrophagen, spielt in den ersten Tagen der Infektion eine wichtige Rolle. Die Aktivierung von Makrophagen und PMN führt zur Freisetzung von Proteinasen. Diese regen glatte Muskelzellen, Endothel und Kollagen zur Bildung prothrombotischer und prokoagulatorischer Faktoren an. Die Bildung prothrombotischer und prokoagulatorischer Faktoren beschleunigt die Bildung eines Thrombus an der Stelle der Plaqueruptur.

Später überwiegen CD8+-T-Zellen, die vor allem das antichlamydiale IFN- γ stimulieren. Durch den Einfluss inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF wird die Plaque destabilisiert.

8.1.2 *Limitation des lokalen Inokulationsmodells*

Das vorgelegte perivaskuläre Inflammationsmodell erlaubt die Untersuchung des chronischen Einflusses definierter Mengen verschiedener bakterieller Pathogene auf zuvor festgelegte Areale der Gefäßwand im Kontext der Atherogenese. Das Modell ist limitiert durch den artifiziellen Weg, über den die bakteriellen Organismen an die Gefäßwand gebracht werden. Erreger, wie CP, die eine atherogene Wirkung haben, werden natürlicherweise über den Respirationstrakt übertragen. Der Nachweis von chlamydialem Major Outer Membrane Protein mittels Immunhistochemie in allen Schichten der inokulierten Arterien impliziert einen Transport der Organismen in intimale und mediale Kompartimente über Vasa vasorum oder Migration infizierter VSMC oder Makrophagen durch die Gefäßwand. CP ist in der Lage VSMC zu infizieren und eine Aponekrose von humanen aortalen glatten Muskelzellen zu induzieren, wie jüngst von Dumrese gezeigt werden konnte.(26)

8.1.3 *Einfluss einer Antibiotikagabe im Tierexperiment*

Unsere Ergebnisse über die Reduktion der atheromatösen Läsionen unter Antibiotikatherapie bei Kaninchen mit CP-Infektion, wurden durch andere Arbeitsgruppen bestätigt. Muhlestein *et al.* zeigten ebenfalls ein verringertes Auftreten atheromatöser Läsionen nach Antibiotikatherapie.(95) In diesem Modell erhielten die Kaninchen das Makrolidantibiotikum Azithromycin über 7 Wochen, wobei die Therapie sofort nach der ersten CP-Applikation begonnen wurde. Interessanterweise konnte trotz verminderter Ausbildung atherosklerotischer Läsionen CP-Antigen in der Gefäßwand mit Hilfe von Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, was mehr für einen allgemein antiinflammatorischen Effekt der Antibiotika als deren spezifische Wirkung auf CP hindeuten könnte. In unserem Modell konnte nach Antibiotikatherapie dagegen mittels Immunfluoreszenz oder PCR weder CP-Antigen oder CP-DNA in der Gefäßwand nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür könnte die längere Gabe bzw. die höhere Dosis sein. Die Behandlung mit Makrolidantibiotika führte auch in anderen Untersuchungen zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion, Plaquestabilisierung und Verminderung der Inflammation.(28, 95, 101, 115, 123) Chinolone scheinen nicht diesen antiinflammatorischen Effekt zu besitzen, wie Lehr *et al.*(75) in ihrem Kaninchenmodell zeigten.

8.2 Klinische Studien

Während der letzten zehn Jahre wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die den Effekt einer sekundären Prävention mittels antichlamydialer Antibiotika bei Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung (KHK), akutem Koronarsyndrom (ACS), peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) oder AVK der Hirnarterien untersuchten. Erste Studien mit meist kleinen Fallzahlen zeigten positive Effekte durch Makrolidbehandlung sowohl bei Patienten mit KHK, ACS oder pAVK. Nachfolgende größere prospektiv kontrollierte Studien konnten diese Effekte einer Antibiotikabehandlung nicht bestätigen. Eine kürzlich publizierte Meta-Analyse identifizierte mehr als 11 randomisierte kontrollierte Studien mit insgesamt 19.217 Patienten (9613 behandelt, 9604 Placebo).(3) Einschließlich der neuesten Studien und Studien an Patienten mit pAVK wurden mittlerweile mehr als 25.000 Patienten untersucht. Tabelle 6 zeigt einen Überblick über die wichtigsten Studien zur sekundären Prävention bei Patienten mit KHK oder akutem Koronarsyndrom.

In den Studien zur Behandlung einer Atherosklerose mit Antibiotika wurden fast ausschließlich Makrolide: Roxithromycin (45, 46, 78, 99, 115, 116, 128, 131), Azithromycin (2, 15, 17, 44, 100, 124), Clarithromycin (8, 119) verwendet, da bei diesen Antibiotika auch eine allgemein antiinflammatorische Wirkung bekannt ist und sie allgemein gut verträglich sind und somit auch für eine Langzeitbehandlung geeignet sind. Lediglich Cannon *et al.* benutzen in ihrer PROVE-IT Studie das Fluorchinolon Gatifloxacin.(15)

Koronare Herzerkrankung (KHK)

In der ersten randomisierten placebo-kontrollierten Doppelblindstudie mit sekundärer Prävention mittels Antibiotika bei KHK profitierten 60 stabile Postmyokardinfarktpatienten, seropositiv für CP, von einer 3- bis 6tägigen Behandlung mit Azithromycin. Die Rate für kardiovaskulärer Ereignisse in der Placebogruppe betrug das Vierfache der Antibiotikagruppe (odds ratio 4.2; 95% Konfidenzintervall 1.2-15.5; p=0.003).(44)

Auch wenn eine antibiotische Langzeitbehandlung bis zu einem Jahr durchgeführt wurde, konnten diese Ergebnisse in keiner der folgenden, größeren Studien reproduziert werden. Die ACADEMIC Studie schloss 302 Patienten mit bekannter KHK und einem positiven CP Antikörpertiter $\geq 1:16$ ein. Diese wurden randomisiert für 3 Monate mit Azithromycin behandelt und über 2 Jahre beobachtet.(2) Eine Azithromycinbehandlung reduzierte weder die Mortalität (odds ratio 1.28; 95%Konfidenzintervall 0.34-4.85) noch das Auftreten von Myokardinfarkt oder Akutem Koronarsyndrom. Eine Langzeitbehandlung mit Azithromycin senkte jedoch signifikant die CRP-Werte der Patienten. Die WIZARD Studie (100) war die größte Studie, welche KHK Patienten mit einem positiven CP Antikörpertiter $\geq 1:16$ (n=7722) einschloss und die Ergebnisse der ACADEMIC Studie bestätigte. Die Patienten erhielten randomisiert Azithromycin oder ein Placebo für 11 Wochen. Auf die Mortalität (odds ratio 0.93; 95%Konfidenzintervall 0.75-1.14), das Auftreten von Myokardinfarkt oder Akutem Koronarsyndrom hatte die Behandlung keinen Effekt. Die ACES Studie umfasste 4012 Patienten, die über ein Jahr entweder mit Azithromycin oder einem Placebo behandelt wurden.(41) Im Vergleich zur Placebogruppe konnte das Risiko hinsichtlich des primären Endpunkts (Risikoreduktion 0.93; 95%Konfidenzintervall -13 bis 13%) in der Azithromycingruppe nicht signifikant reduziert werden. Es gab auch keine signifikante Risikoreduktion im Hinblick auf Einzelkomponenten des primären Endpunkts, Tod durch andere Ursachen oder Schlaganfall. Die kürzlich veröffentlichte CLARICOR Studie(54) (n=4373) untersuchte den Effekt einer zweiwöchigen Behandlung mit Clarithromycin auf die Gesamtmortalität, Myokardinfarkt oder instabile AP in einem dreijährigen Follow-up. Wieder konnte kein Effekt auf das primäre Outcome (Risiko 1.15; 95%Konfidenzintervall 0.99-1.34) durch eine Antibiotikabehandlung gezeigt werden. Überraschenderweise war die Mortalität in der Clarithromycingruppe (Risiko 1.27; 95%Konfidenzintervall 1.03-1.54) als Ergebnis einer signifikant höheren kardiovaskulären Mortalität (Risiko 1.45; 95%Konfidenzintervall 1.09-1.92; p=0.01) signifikant höher.

Zwei klinische Studien untersuchten die Effekte einer Antibiotikabehandlung an Patienten mit KHK, an welchen Revaskularisationsmaßnahmen wie PTCA oder koronarer Bypass durchgeführt wurden. Der Effekt einer vierwöchigen Roxithromycinbehandlung auf die Restenoserate bei Patienten mit

Koronarstent wurde an 1010 Patienten in der ISAR-3 Studie(99) untersucht. Die angiographische Restenoserate lag in der Roxithromyningruppe bei 31% und in der Placebogruppe bei 29% (relatives Risiko 1.08; 95%Konfidenzintervall 0.92-1.26; $p=0.43$), entsprechend der Rate einer gezielten Gefäßrevaskularisation von 19 und 17% (relatives Risiko 1.13; 95%Konfidenzintervall 0.95-1.36; $p=0.30$). Bei Patienten mit hohen CP Titern ($\geq 1:128$) reduzierte Roxithromycin die Restenoserate. Eine Kurzzeitbehandlung mit Clarithromycin vor der Anlage eines koronaren Bypasses hatte keinen Effekt auf die Mortalität (relatives Risiko 1.10; 95%Konfidenzintervall 0.42-2.89; $p=1.0$) oder auf die Anzahl von Patienten, bei denen während des zweijährigen Follow-ups kardiovaskuläre Ereignisse auftraten (relatives Risiko 1.04; 95%Konfidenzintervall 0.55-1.98; $p=1.0$)(8). Eine Clarithromycinbehandlung vor der Bypassanlage zeigte auch keinen Effekt auf den Nachweis von CP MOMP Antigen oder die Höhe des CP spezifischen IgG-Spiegels.(9)

Akutes Koronarsyndrom (ACS)

Drei ältere Studien zeigten, dass eine sekundäre Prävention mit Antibiotika bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom sinnvoll ist. Die erste dieser Studien ist die ROXIS Studie.(46) Die Patienten mit Akutem Koronarsyndrom erhielten unabhängig der CP Seropositivität randomisiert über einen Monat Roxithromycin oder ein Placebo. Die Autoren zeigten eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse (9% in der Placebogruppe vs 2% in der Roxithromyningruppe; unkorrigiert $p=0.032$) (45, 46). Eine andere kleine Studie aus Finnland mit 148 Patienten, die einen Mykordinfarkt (ohne Q) oder eine instabile AP aufwiesen wurden 85 Tage mit Clarithromycin behandelt. In dieser Studie konnte das Risiko eines ischämischen kardiovaskulären Ereignisses während des einjährigen Follow-ups in der Clarithromyningruppe signifikant reduziert werden (Risikoratio 0.49; 95%Konfidenzintervall 0.26-0.92; $p=0.03$).(119) Eine Eradikationstherapie mit Azithromycin, Omeprazol und Metronidazol führte in der STAMINA Studie zu einer 36%igen Reduktion aller Endpunkte (Herztod und Wiederauftreten von akutem Koronarsyndrom).(122) Die Reduktion konnte auch während der einjährigen Nachbeobachtung nachgewiesen werden. Eine kleine Studie aus Thailand, die 48 Patienten mit Akutem Koronarsyndrom einschloss, konnte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich kardialer

Ereignisse zwischen der Roxithromycin- und der Placebogruppe nach einem dreimonatigen Follow-up zeigen.(78)

Dementsprechend zeigten auch die neueren, größer angelegten und kontrollierten Studien keinen Effekt einer antibiotischen Therapie auf das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse. In die ANTIBIO Studie wurden 868 Patienten mit akutem Myokardinfarkt eingeschlossen und erhielten über 6 Wochen Roxithromycin oder ein Placebo.(131) Die Gesamtmortalität lag nach 12 Monaten bei 6.5% in der Roxithromycingruppe und bei 6.0% in der Placebogruppe (odds ratio 1.1; 95%Konfidenzintervall 0.6-1.9; $p=0.739$). Auch für andere kardiovaskuläre Ereignisse gab es nach 12 Monaten keine Unterschiede. Durch eine Kurzzeitbehandlung mit Azithromycin konnte in der AZACS Studie ($n=1439$) keine Reduktion wiederholter ischämischer Ereignisse bei Patienten mit instabiler AP oder Myokardinfarkt erzielt werden (Risikoratio 0.94; 95%Konfidenzintervall 0.72-1.24; $p=0.664$). Die größte Studie die eine sekundäre Prävention bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom untersuchte ist die PROVE-IT Studie(15). 4162 Patienten, die in den vorhergehenden 10 Tagen wegen eines Akuten Koronarsyndroms in ein Krankenhaus eingeliefert wurden, erhielten eine Langzeitbehandlung mit Gatifloxacin 400mg/d für 10 Tage pro Monat über 24 Monate vs Placebo. Eine Kaplan-Meier Analyse zeigte, dass die Rate der primären Endpunkte nach 2 Jahren bei 23.7% in der Gatifloxacin und bei 25.1% in der Placebogruppe lag (Risikoratio 0.95; 95%Konfidenzintervall 0.84-1.08; $p=0.41$).

Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

Sekundäre Prävention mit Antibiotika wurde auch an Patienten mit pAVK untersucht. Eine kleine Studie zeigte eine geringere Anzahl invasiver Revaskularisationseingriffe, eine Verbesserung der Gehstrecke und eine Verringerung der Plaquearea in den Karotiden bei seropositiven Patienten mit pAVK.(128) Die umfangreichere SPACE-Studie konnte keinen Effekt einer Kurzzeitbehandlung mit Azithromycin auf das primäre Outcome an 509 Patienten mit pAVK zeigen(124). Die Anzahl an Komplikationen (131 in der Azithromycin- vs 121 in der Placebogruppe) und die Anzahl an Patienten bei denen Komplikationen auftraten (98 (38%) in der Azithromycin- vs 84 (33%) in der

Placebogruppe) waren in beiden Behandlungsgruppen vergleichbar. Analysen von Sterblichkeitstabellen zeigten keinen Effekt von Azithromycin auf Überleben oder Knöchel-/Oberarmdruck-Index. Ähnliche Ergebnisse konnten für Patienten mit CVD gezeigt werden.(115) Die Progression früher Atherosklerose in den Karotiden wird nach Roxithromycin nur temporär reduziert.(115, 116)

Trotz Unterschieden in Studiendesign, Einschlusskriterien wie Seropositivität oder antibiotischem Regime, zeigt die Mehrheit der größeren Studien, dass eine antichlamydiale, antibiotische Therapie von Patienten mit KHK oder Akutem Koronarsyndrom das Outcome nicht signifikant verbessert. Weder Kurzzeit- (AZACS, CLARICOR), mittellange (ANTIBIO, WIZARD) noch Langzeitbehandlung (ACES, PROVE-IT) mit Antibiotika brachten einen Vorteil für das Outcome. Keine der neueren 5 großen Studien mit gutem Studiendesign und entsprechendem Potential die Effekte von Antibiotika auf die kardiovaskulären Ereignisse zu untersuchen, zeigte eine Verbesserung des klinischen Outcomes. Es ist unwahrscheinlich, dass größere Studien zu anderen Ergebnissen führen.(3) Die prophylaktische Behandlung mit Makroliden zur Prävention einer Atherosklerose ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht gerechtfertigt.

Unsere Studie zeigte, dass für eine Entwicklung atheromatöser Läsionen bei Kaninchen sowohl eine wiederholte Gabe bakterieller Produkte (LPS) oder von CP und eine gleichzeitige cholesterinreiche Diät notwendig sind, damit sich atheromatöse Läsionen in den Arterien bilden und somit CP oder bakterielle Komponenten alleine nicht in der Lage sind, die Bildung atheromatöser Läsionen zu induzieren. Die vorliegende Arbeit zeigt auch, dass die Verletzung der Arterien im Rahmen der nichtspezifischen inflammatorischen Kaskade nach Präsenz von bakteriellen Produkten atherogen wirkt und nicht ein spezifisches Pathogen. Diese Befunde könnten das Versagen der Antibiotikatherapie bei KHK, ACS oder pAVK erklären.

STUDIE	N	POPULATION	F/U	BEHANDLUNG	ENDPUNKT	ERGEBNIS
ACADEMIC, 1999(2)	302	KHK/CP Titer \geq 1:16	2 J	Azithromycin 500 mg/d für 3 Tage gefolgt von 500 mg/W für 3 M vs Placebo	Verschiedene KVE CRP, IL-6	Kein Unterschied für KVE, \downarrow CRP/IL-6 nach 6 M
ACES, 2005(41)	4012	KHK	4 J	Azithromycin 600 mg/Woche für 1 J vs Placebo	Verschiedene KVE	Kein Unterschied für KVE
ANTIBIO, 2003(131)	868	Instabile AP oder MI	1 J	Roxithromycin 300 mg/d für 6 W vs Placebo	Verschiedene KVE	Kein Unterschied für KVE
AZACS, 2003(17)	1439	ACS	6 M	Azithromycin 500 mg/d am d 1 gefolgt von 250 mg/d für 4 d vs Placebo	Verschiedene KVE	Kein Unterschied für KVE
Berg, 2005(8)	473	Bypass	2 J	Clarithromycin 500 mg/d für 2 W vor Bypass-OP	Gesamt mortalität	Kein Unterschied für Mortalität oder KVE
CLARICOR, 2006(54)	4373	KHK	3 J	Clarithromycin 500 mg/d für 2 W	Verschiedene KVE	Kein Effekt von AB, \uparrow kardiovaskuläre Mortalität in AB-gruppe
CLARIFY, 2001(119)	148	ACS	1 J	Clarithromycin 500 mg/d für 85 Tage vs Placebo	Verschiedene KVE	AB- gruppe: \downarrow KVE nach 3 M
Gupta, 1997(43, 44)	60	KHK/CP Titer \geq 1:64	18 M	Azithromycin 500mg/d für 3 d vs Placebo	Verschiedene KVE, CP AK Titer	AB-gruppe: \downarrow KVE, \downarrow AK Titer
ISAR-3, 2001(99)	1010	KHK/Stent mit erhöhtem CP AK Titer	1 J	Roxithromycin 300mg/d für 28 d vs Placebo	ISR, MI, KV Tod	Kein Unterschied für ISR, MI, KV Tod, \downarrow ISR bei Pat. mit hohem CP AK Titer
Leowattana, 2001(78)	84	ACS	3 M	Roxithromycin 150 mg/d für 30 d vs Placebo	KV Tod, Bypass, PTCA, wiederauftretende AP/MI	Kein Unterschied für KVE
PROVE-IT, 2005(15)	4162	ACS in den letzten 10d	2 J	Gatifloxacin 400 mg/d für 10 d/M für 24 M vs Placebo	Verschiedene KVE	Kein Unterschied für KVE
ROXIS, 1999(46)	202	HTX oder ACS	6 M	Roxithromycin 300 mg/d für 30 d vs Placebo	Verschiedene KVE, CP AK Titer, CRP	AB-Gruppe: \downarrow KVE nach 1 M, keine Veränderung in AK Titer, \downarrow CRP
STAMINA, 2002(122)	218	ACS	1 J	Azithromycin 500 mg/d für 3 d + Omeprazol 40 mg/W für 1 W + Metronidazol 800 mg/d für 1 W vs Placebo	Mortalität, Wiederezulassung mit Akutem Koronarsyndrom	Azithromycin/Omeprazol-Metronidazolgruppe: \downarrow KVE nach 3 Monaten und 1 Jahr
WIZARD, 2003(100)	7722	KHK/CP Titer \geq 1:16	14 M	Azithromycin 600 mg/d für 3 d gefolgt von 600 mg/W für 11 W vs Placebo	Verschiedene KVE, CP AK Titer	Kein Unterschied für KVE

Tab.6 Überblick über die wichtigsten klinischen Studien mit Antibiotikabehandlung

KHK: Koronare Herzerkrankung; KVE: Kardiovaskuläre Ereignisse; d: Tag; W: Woche; M: Monat; J: Jahr; AP: Angina pectoris; MI: Myokardinfarkt; ACS: Akutes Koronarsyndrom; AB: Antibiotika; ISR: In-Stent-Restenose; HTX: Herztransplantation; CP: *Chlamydomphila pneumoniae*

9 ZUSAMMENFASSUNG

Die chronische perivaskuläre Inokulation von replikationsfähigen CP resultiert nur unter hypercholesterinämischen Bedingungen in signifikanter atheromatöser Plaquebildung im Kaninchenmodell. Diese Beobachtung war unabhängig vom Replikationsstatus der Bakterien, da nahezu identische Effekte auch bei der Applikation inaktivierter Organismen auftraten. Der Plaque-induzierende Effekt trat auch bei der wiederholten perivaskulären Gabe von *E.coli* LPS auf. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Verletzung der Arterien im Rahmen der nichtspezifischen inflammatorischen Kaskade nach Präsenz von bakteriellen Produkten atherogen wirkt und nicht ein spezifisches Pathogen. Die Daten belegen, dass die chronische Präsenz von CP oder CP-Komponenten nur als Kofaktoren in der Atherogenese zu sehen sind, die etablierte Risikofaktoren, wie eine Hypercholesterinämie benötigen. Das beschriebene perivaskuläre Inflammationsmodell ermöglicht die Analyse der chronischen Einwirkung einer definierten Dosis verschiedener bakterieller Pathogene auf ein definiertes Gefäßsegment in Zusammenhang mit der Atherogenese. Limitiert ist das Modell naturgemäß durch den artifiziellen Charakter, der sich aus der lokalen Inokulation ergibt, unabhängig vom natürlichen Infektionsweg.

10 DANKSAGUNGEN

Diese Dissertation entstand auf Anregung von Herrn Priv. Doz. Dr. med. Markus G. Engelmann, dem ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen möchte. Er garantierte eine hervorragende Betreuung und Ihm war es auch zu verdanken, dass ich die Möglichkeit hatte, meine Ergebnisse und wissenschaftlichen Publikationen auf Kongressen vorzutragen, was eine sehr wertvolle Erfahrung war. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Sigrid Nikol für die Bereitstellung Ihres Labors und die intensive wissenschaftliche Diskussion bedanken. Ich möchte mich auch bei Frau Dr. med. Corinna Barz und Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Heesemann für die gute Kooperation, Nutzung von infektionsspezifischen Räumlichkeiten und natürlich für die Aufbereitung der von uns verwendeten Erreger bedanken. Ferner gilt mein Dank allen Labormitarbeitern, und hier besonders Herrn Dr. rer. nat. Sorin Armeanu und Frau Brigitte Leitermeier, die mir mein Handwerkszeug beigebracht haben und mein Verständnis für labortechnisches Denken und Arbeiten schärfen konnten.

Und ganz besonders großen Dank möchte ich zu guter Letzt meinem Ehemann für sein Verständnis und seine immerwährende Unterstützung sowie meinen Eltern und Schwiegereltern für die Betreuung meiner Kinder in der Zeit meines wissenschaftlichen Arbeitens aussprechen.

11 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aalto-Setälä K, Laitinen K, Erkkilä L. *Chlamydia pneumoniae* does not increase atherosclerosis in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:578-84.
2. Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection: The Azithromycin in Coronary Artery Disease: Elimination of Myocardial Infection with *Chlamydia* (ACADEMIC) study [see comments]. *Circulation* 1999;99(12):1540-7.
3. Andraws R, Berger J, Brown D. Effects of Antibiotic Therapy on Outcomes of Patients With Coronary Artery Disease
A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *JAMA* 2005;293(21):2641-7.
4. Arno G, Kaski J, Smith D, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression is associated with the presence of *Chlamydia pneumoniae* in human coronary atherosclerotic plaques. *Heart* 2005;91:521-5.
5. Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, Penninger JM. *Chlamydia* infections and heart disease linked through antigenic mimicry [see comments]. *Science* 1999;283(5406):1335-9.
6. Bartels C, Maass M, Bein G, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* But Not Cytomegalovirus in Occluded Saphenous Vein Coronary Artery Bypass Grafts. *Circulation* 1999;99(7):879-82.
7. Bell TA, Kuo CC, Wang SP, Grayston JT. Experimental infection of baboons (*Papio cynocephalus anubis*) with *Chlamydia pneumoniae* strain 'TWAR'. *J Infect* 1989;19(1):47-9.
8. Berg H, Maraha B, Scheffer G, et al. Treatment with clarithromycin prior to coronary artery bypass graft surgery does not prevent subsequent cardiac events. *Clin Infect Dis* 2005;40:358-65 Epub 2005 Jan 6.
9. Berg H, Maraha B, van der Zee A, et al. Effect of clarithromycin treatment on *Chlamydia pneumoniae* in vascular tissue of patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Microbiol* 2005;43:1325-9.
10. Blessing E, Campbell L, Rosenfeld M, Chough N, Kuo C. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates hyperlipidemia induced atherosclerotic lesion development in C57BL/6J mice. *Atherosclerosis* 2001;158:13-7.
11. Bloemenkamp DG, Mali WP, Visseren FL, van der Graaf Y. Meta-analysis of sero-epidemiologic studies of the relation between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: does study design influence results? *Am Heart J* 2003;145(3):409-17.
12. Bomann J, Hammerschlag M. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:1-20.
13. Caligiuri G, Rottenberg M, Nicoletti A, Wigzell H, Hansson G. *Chlamydia pneumoniae* infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation* 2001;103:2834-8.
14. Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. *Emerg Infect Dis* 1998;4(4):571-9.
15. Cannon C, Braunwald E, McCabe C, et al. Antibiotic treatment of *Chlamydia pneumoniae* after acute coronary syndrome. *N ENGL J MED* 2005;352:1646-54.

16. Capron L. Chlamydia in coronary plaques--hidden culprit or harmless hobo? *Nat Med* 1996;2(8):856-7.
17. Cercek B, Shah PK, Noc M, et al. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003;361(9360):809-13.
18. Chesebro B, Blessing E, Kuo C, et al. Nitric oxide synthase plays a role in Chlamydia pneumoniae-induced atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2003;60:170-4.
19. Chiu B, Viira E, Tucker W, Fong IW. Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1997;96(7):2144-8.
20. Coombes BK, Chiu B, Fong IW, Mahony JB. Chlamydia pneumoniae infection of endothelial cells induces transcriptional activation of platelet-derived growth factor-B: a potential link to intimal thickening in a rabbit model of atherosclerosis. *J Infect Dis* 2002;185(11):1621-30.
21. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997;350:430-6.
22. Danesh J, Whincup P, Walker M. Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *BMJ* 2000;321:208-13.
23. Danesh J, Whincup P, Walker M. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *Bmj* 2000;321:199-204.
24. de Kruif MD, van Gorp EC, Keller TT, Ossewarde JM, ten Cate H. Chlamydia pneumoniae infections in mouse models: relevance for atherosclerosis research. *Cardiovasc Res* 2005;65:317-27.
25. Dechend R, Maass M, Gieffers J, et al. Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation* 1999;100:1369-73.
26. Dumrese C, Maurus C, Gygi D, et al. Chlamydia pneumoniae induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *BMC Microbiol* 2005;5:2.
27. Engelmann M, Nikol S. Atherosclerosis as inflammatory disease: Impact of Chlamydia pneumoniae and latest insights in whether or not prevention using antibiotics makes sense. *e-journal for Cardiology Practice* 2003 2003;2.
28. Engelmann M, Redl C, Nikol S. Roxithromycin inhibits plaque formation induced by recurrent lipopolysaccharide (LPS) inflammation in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:285A.
29. Engelmann M, Redl C, Pelisek J, Barz C, Heesemann J, Nikol S. Chronic perivascular inoculation with Chlamydia pneumoniae results in plaque formation in vivo. *Lab Invest* 2006;86:467-76.
30. Engelmann MG, Redl CV, Nikol S. Recurrent perivascular inflammation by lipopolysaccharide (endotoxin) results in the formation of atheromatous lesions in vivo. *Lab Invest* 2004;84:425-32.
31. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, et al. Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis. *Stroke* 2002;33(11):2581-6.
32. Everett K, Anderson A. Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int Sys Bacteriol* 1999;49:803-13.
33. Ezzahiri R, Nelissen-Vrancken HJ, Kurvers HA, et al. Chlamydia pneumoniae (Chlamydia pneumoniae) accelerates the formation of complex atherosclerotic lesions in Apo E3-Leiden mice. *Cardiovasc Res* 2002;56(2):269-76.

34. Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahony J. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1997;35(1):48-52.
35. Fong IW, Chiu B, Viira E, Tucker W, Wood H, Peeling RW. Chlamydial heat-shock protein-60 antibody and correlation with *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques. *J Infect Dis* 2002;186(10):1469-73.
36. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM. *Chlamydia* species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Investig Med* 1997;45(4):168-74.
37. Funk JL, Feingold KR, Moser AH, Grunfeld C. Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. *Atherosclerosis* 1993;98(1):67-82.
38. Geng Y, Berncsi K, Gyulai Z. Roles of interleukin-12 and gamma-interferon in murine *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect Immunol* 2000;68:2245-53.
39. Gibbs RG, Carey N, Davies AH. *Chlamydia pneumoniae* and vascular disease. *Br J Surg* 1998;85(9):1191-7.
40. Godzik KL, Er OB, Wang SK, Kuo CC. In vitro susceptibility of human vascular wall cells to infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2411-4.
41. Grayston J, Kronmal R, Jackson L, et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N ENGL J MED* 2005;352:1637-45.
42. Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR pneumonia. *Annu Rev Med* 1992;43:317-23.
43. Gupta S, Camm AJ. Chronic infection in the etiology of atherosclerosis--the case for *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Cardiol* 1997;20(10):829-36.
44. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, Mendall MA, Kaski JC, Camm AJ. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997;96(2):404-7.
45. Gurfinkel E, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellara B, Mautner B. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS Study [see comments]. *Eur-Heart-J* 1999;20(2):121-7.
46. Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, Beck E, Mautner B. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS Pilot Study. ROXIS Study Group [see comments]. *Lancet* 1997;350(9075):404-7.
47. Hansson G. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N ENGL J MED* 2005;352(16):1685-95.
48. Hauer A, de Vos P, Peterse N, et al. Delivery of *Chlamydia pneumoniae* to the vessel wall aggravates atherosclerosis in LDLr(-/-) mice. *Cardiovasc Res* 2005;17:17.
49. Holland SM, Taylor HR, Gaydos CA, Kappus EW, Quinn TC. Experimental infection with *Chlamydia pneumoniae* in nonhuman primates. *Infect Immun* 1990;58(3):593-7.
50. Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest* 1999;103(5):747-53.
51. Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Synergistic Effect of Persistent *Chlamydia pneumoniae* Infection, Autoimmunity, and Inflammation on Coronary Risk. *Circulation* 2003;12:12.
52. Ieven M, Hoymans V, Bosmans J. Early carotid atherosclerosis and *Chlamydia pneumoniae* positivity: are there arguments to treat with antibiotics? *Circulation* 2004;110:e74-5; author reply e-5.
53. Ieven MM, Hoymans VY. Involvement of *Chlamydia pneumoniae* in Atherosclerosis: More Evidence for Lack of Evidence. *J Clin Microbiol* 2005;43(1):19-24.

54. Jespersen C, Als-Nielsen B, Damgaard M, et al. Randomised placebo controlled multicentre trial to assess short term clarithromycin for patients with stable coronary heart disease. CLARICOR trial. *BMJ* 2006;332:22-7.
55. Juvonen J, Laurila A, Juvonen T, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in human nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* 1997;29(5):1054-9.
56. Kalayoglu MV. Chlamydial heat shock protein 60 and lipopolysaccharide: potential virulence determinants in atherogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1(3):249-55.
57. Kalayoglu MV, Byrne GI. A *Chlamydia pneumoniae* component that induces macrophage foam cell formation is chlamydial lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1998;66(11):5067-72.
58. Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 1998;177(3):725-9.
59. Kalayoglu MV, Indrawati, Morrison RP, Morrison SG, Yuan Y, Byrne GI. Chlamydial virulence determinants in atherogenesis: the role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 3:S483-9.
60. Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI. *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *Jama* 2002;288(21):2724-31.
61. Kaukoranta Tolvanen SE, Laurila AL, Saikku P, Leinonen M, Laitinen K. Experimental *Chlamydia pneumoniae* infection in mice: effect of reinfection and passive immunization. *Microb Pathog* 1995;18(4):279-88.
62. Kaukoranta Tolvanen SS, Laitinen K, Saikku P, Leinonen M. *Chlamydia pneumoniae* multiplies in human endothelial cells in vitro. *Microb Pathog* 1994;16(4):313-9.
63. Kaukoranta Tolvanen SS, Laurila AL, Saikku P, Leinonen M, Liesirova L, Laitinen K. Experimental infection of *Chlamydia pneumoniae* in mice. *Microb Pathog* 1993;15(4):293-302.
64. Kaukoranta Tolvanen SS, Ronni T, Leinonen M, Saikku P, Laitinen K. Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Pathog* 1996;21(5):407-11.
65. Kaukoranta Tolvanen SS, Teppo AM, Laitinen K, Saikku P, Linnavuori K, Leinonen M. Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microb Pathog* 1996;21(3):215-21.
66. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest* 1999;103(4):571-7.
67. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation* 1998;98(4):300-7.
68. Kuo C, Campbell LA. Is infection with *Chlamydia pneumoniae* a causative agent in atherosclerosis? *Mol Med Today* 1998;4(10):426-30.
69. Kuo CC, Chen HH, Wang SP, Grayston JT. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol* 1986;24(6):1034-7.
70. Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, Goo YA, Wissler RW, Benditt EP. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(15):6911-4.
71. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):451-61.

72. LaBiche R, Koziol D, Quinn T, et al. Presence of *Chlamydia pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke* 2001;32(4):855-60.
73. Laitinen K, Laurila A, Pyhala L, Leinonen M, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. *Infect Immun* 1997;65(11):4832-5.
74. Laitinen K, Laurila AL, Leinonen M, Saikku P. Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* infection in mice by cortisone treatment. *Infect Immun* 1996;64(4):1488-90.
75. Lehr HA, Sagban TA, Ihling C, et al. Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation* 2001;104(8):914-20.
76. Leinonen M. Pathogenetic mechanisms and epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl K:57-61.
77. Leirisalo Repo M, Jaattela M, Gylling H, Miettinen TA, Repo H. Phagocyte function in familial hypercholesterolaemia: peripheral blood monocytes exposed to lipopolysaccharide show increased tumour necrosis factor production. *Scand J Immunol* 1990;32(6):679-85.
78. Leowattana W, Bhuripanyo K, Singhaviron L, et al. Roxithromycin in prevention of acute coronary syndrome associated with *Chlamydia pneumoniae* infection: a randomized placebo controlled trial. *J Med Assoc Thai* 2001;84 Suppl 3:S669-75.
79. Liu C, Waters DD. *Chlamydia pneumoniae* and Atherosclerosis: From Koch's Postulates to Clinical Trials. *Progress in Cardiovascular Diseases* 2005;47(4):230-39.
80. Liuba P, Pesonen E, Forslid A, et al. Protective effects of simvastatin on coronary artery function in swine with acute infection. *Atherosclerosis* 2006;186:331-6 Epub 2005 Oct 11.
81. Liuba P, Pesonen E, Paakkari I, et al. Acute *Chlamydia pneumoniae* infection causes coronary endothelial dysfunction in pigs. *Atherosclerosis* 2003;167:215-22.
82. Maass M, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers HH. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(4):827-32.
83. Maass M, Bartels C, Kruger S, Krause E, Engel PM, Dalhoff K. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 1998;140 Suppl 1:S25-30.
84. Maass M, Krause E, Engel PM, Kruger S. Endovascular presence of *Chlamydia pneumoniae* in patients with hemodynamically effective carotid artery stenosis. *Angiology* 1997;48(8):699-706.
85. May A, Redecke V, Gruner S, et al. Recruitment of *Chlamydia pneumoniae*-infected macrophages to the carotid artery wall in non-infected, nonatherosclerotic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;789-794 Epub 2003 Mar 27.
86. Meijer A, Dagnelie CF, De Jong JC, et al. Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* among patients with symptoms of respiratory tract infections in Dutch general practices. *Eur J Epidemiol* 2000;16(12):1099-106.
87. Meijer A, Roholl PJ, Gielis-Proper SK, Ossewaarde JM. *Chlamydia pneumoniae* antigens, rather than viable bacteria, persist in atherosclerotic lesions. *J Clin Pathol* 2000;53(12):911-6.
88. Moazed TC, Campbell LA, Rosenfeld ME, Grayston JT, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Infect Dis* 1999;180(1):238-41.

89. Moazed TC, Kuo C, Grayston JT, Campbell LA. Murine models of *Chlamydia pneumoniae* infection and atherosclerosis. *J Infect Dis* 1997;175(4):883-90.
90. Moazed TC, Kuo C, Patton DL, Grayston JT, Campbell LA. Experimental rabbit models of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Am J Pathol* 1996;148(2):667-76.
91. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. *J Infect Dis* 1998;177(5):1322-5.
92. Molestina RE, Dean D, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT. Characterization of a strain of *Chlamydia pneumoniae* isolated from a coronary atheroma by analysis of the *omp1* gene and biological activity in human endothelial cells. *Infect Immun* 1998;66(4):1370-6.
93. Mosorin M, Surcel HM, Laurila A, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae*-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Arterioscler-Thromb-Vasc-Biol* 2000;20(4):1061-7.
94. Muhlestein JB. *Chlamydia pneumoniae*-induced atherosclerosis in a rabbit model. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 3):S505-7.
95. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, et al. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998;97(7):633-6.
96. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, et al. Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 1996;27(7):1555-61.
97. Netea MG, de Bont N, Demacker PN, et al. Lipoprotein(a) inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human mononuclear cells. *Infect Immun* 1998;66(5):2365-7.
98. Netea MG, Demacker PN, Kullberg BJ, et al. Low-density lipoprotein receptor-deficient mice are protected against lethal endotoxemia and severe gram-negative infections. *J Clin Invest* 1996;97(6):1366-72.
99. Neumann F, Kastrati A, Miethke T, et al. Treatment of *Chlamydia pneumoniae* infection with roxithromycin and effect on neointima proliferation after coronary stent placement (ISAR-3): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:2085-9.
100. O'Connor C, Dunne M, Pfeffer M, et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:1459-66.
101. Parchure N, Zouridakis EG, Kaski JC. Effect of azithromycin treatment on endothelial function in patients with coronary artery disease and evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Circulation* 2002;105(11):1298-303.
102. Paterson DL, Hall J, Rasmussen SJ, Timms P. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques of Australian patients. *Pathology* 1998;30(2):169-72.
103. Pislaru SV, Van Ranst M, Pislaru C, et al. *Chlamydia pneumoniae* induces neointima formation in coronary arteries of normal pigs. *Cardiovasc Res* 2003;57(3):834-42.
104. Poppert S, Schlaupitz K, Marre R. *Chlamydia pneumoniae* in an ex vivo human artery culture model. *Atherosclerosis* 2005;29:29.
105. Prescott MF, McBride CK, Court M. Development of intimal lesions after leukocyte migration into the vascular wall. *Am J Pathol* 1989;135(5):835-46.
106. Ramirez JA. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The *Chlamydia pneumoniae*/Atherosclerosis Study Group. *Ann Intern Med* 1996;125(12):979-82.

107. Read T, Brunham R, Shen C, et al. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1397-406.
108. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
109. Rothstein N, Quinn T, Madico G, Gaydos C, Lowenstein C. Effect of azithromycin on murine arteriosclerosis exacerbated by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 2001;183:232-8.
110. Rovers C, Netea MG, de Bont N, et al. LPS-induced cytokine production and expression of beta2-integrins and CD14 by peripheral blood mononuclear cells of patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1998;141(1):99-105.
111. Rupp J, Hellwig-Burgel T, Wobbe V, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3447-52 Epub 2005 Feb 18.
112. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988;2(8618):983-6.
113. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study [see comments]. *Ann Intern Med* 1992;116(4):273-8.
114. Sakash JB, Byrne GI, Lichtman A, Libby P. Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells: implications for persistent *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect Immun* 2002;70(7):3959-61.
115. Sander D, Winbeck K, Klingelhofer J, Etgen T, Conrad B. Reduced progression of early carotid atherosclerosis after antibiotic treatment and *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *Circulation* 2002;106(19):2428-33.
116. Sander D, Winbeck K, Klingelhofer J, Etgen T, Conrad B. Progression of early carotid atherosclerosis is only temporarily reduced after antibiotic treatment of *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *Circulation* 2004;109(8):1010-5. Epub 2004 Feb 9.
117. Sharma J, Niu Y, Ge J, et al. Heat-inactivated *C. pneumoniae* organisms are not atherogenic. *Mol Cell Biochem* 2004;260:147-52.
118. Shor A, Kuo CC, Patton DL. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S Afr Med J* 1992;82(3):158-61.
119. Sinisalo J, Mattila K, Valtonen V, et al. Effect of 3 months of antimicrobial treatment with clarithromycin in acute non-q-wave coronary syndrome. *Circulation* 2002;105:1555-60.
120. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92(5):1355-74.
121. Stintzing S, Heuschmann P, Barbera L, et al. Overexpression of MMP9 and Tissue Factor in Unstable Carotid Plaques Associated with *Chlamydia pneumoniae*, Inflammation, and Apoptosis. *Ann Vasc Surg* 2005;6:6.
122. Stone A, Mendall M, Kaski J, et al. Effect of treatment for *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction and Unstable Angina (STAMINA). *Circulation* 2002;106:1219-23.
123. Torgano G, Cosentini R, Mandelli C, et al. Treatment of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections decreases fibrinogen plasma level in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 1999;99(12):1555-9.

124. Vainas T, Stassen F, Schurink G, et al. Secondary prevention of atherosclerosis through *Chlamydia pneumoniae* eradication (SPACE Trial): a randomised clinical trial in patients with peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29:403-11.
125. van der Wal AC. *Chlamydia pneumoniae* inside the atherosclerotic plaque--does it affect plaque inflammation and plaque progression? *Cardiovasc Res* 2002;56(2):178-80.
126. Vuola J, Puurula V, Anttila M. Acquired immunity to *Chlamydia pneumoniae* is dependent on gamma interferon in two mouse strains that initially differ in this respect after primary challenge. *Infect Immun* 2000;68:960-4.
127. Weiss S, Roblin P, Gaydos C, et al. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *J Infect Dis* 1996;173:957-62.
128. Wiesli P, Czerwenka W, Meniconi A, et al. Roxithromycin treatment prevents progression of peripheral arterial occlusive disease in *Chlamydia pneumoniae* seropositive men: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 2002;105(22):2646-52.
129. Yang ZP, Kuo CC, Grayston JT. A mouse model of *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR pneumonitis. *Infect Immun* 1993;61(5):2037-40.
130. Yang ZP, Kuo CC, Grayston JT. Systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* following intranasal inoculation in mice. *J Infect Dis* 1995;171(3):736-8.
131. Zahn R, Schneider S, Frilling B, et al. Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study. *Circulation* 2003;107(9):1253-9.