

Aus der 1. Medizinischen Klinik
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Schömig)
und aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
(Direktor: Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)
der
Technischen Universität München

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. med. M. Gawaz

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. med. vet. E. Wolf)

**Die Rolle der Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der
Atherogenese
- eine *In-vivo*-Studie an der ApoE-Knock-out-Maus -**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Sabine Grüner
aus
Garmisch-Partenkirchen
München, 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
1.Referent:	Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
2.Referentin:	Prof. Dr. H. Roos
1.Koreferent:	Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz
2.Koreferent:	Prof. Dr. H. Petry
3.Koreferent:	Prof. Dr. W. Rambeck

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	2
2.1	Allgemeines zur Atherosklerose	2
2.2	Morphologie und Physiologie der Thrombozyten (Blutplättchen)	7
2.2.1	Struktur der Thrombozyten	7
2.2.2	Sekretorische Funktion der Thrombozyten.....	9
2.2.3	Physiologie der Thrombozytenaktivierung	10
2.2.4	Thrombozytenmembranrezeptoren.....	12
2.2.4.1	Integrine.....	13
2.2.4.2	Leucinreiche Glykoproteine	14
2.2.4.3	Selektine	14
2.2.4.4	Rezeptoren vom Immunglobulintyp	15
2.3	Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen.....	15
2.4	Thrombozyten und ihre Funktion im Entzündungsgeschehen.....	17
2.5	Hemmung der Thrombozyten-Adhäsion.....	17
2.6	Mausmodelle zur Atherosklerose	19
2.7	Methoden zur Charakterisierung der Atherosklerose mit der Duplex-Sonographie... 20	
2.8	Modell zur Quantifizierung der Atherosklerose.....	21
2.8.1	Charakterisierung der Zell-Zell-Interaktion mit Hilfe der Intravitalmikroskopie 21	
2.8.2	Immunhistologie/VCAM-1-Expression.....	22
3	Eigene Untersuchungen	23
3.1	Ziele der Arbeit	23
3.1.1	Morphologische Charakterisierung der Atherosklerose in ihrem Verlauf	23
3.1.2	Charakterisierung der für die Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand verantwortlichen Rezeptoren.....	23
3.1.3	Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression.....	24
3.2	Kinetik der Zell-Zell-Interaktion im Verlauf der Atherogenese	24
3.2.1	Allgemeines zum Versuchsaufbau.....	24
3.2.2	Versuchstiere	24
3.2.2.1	Das Knock-out-Modell	24
3.2.2.2	Haltung.....	25
3.2.2.3	Anzahl und Einteilung der Versuchsgruppen.....	25
3.2.2.3.1	Morphologische Charakterisierung der Atherosklerose in ihrem Verlauf	25

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.2.3.2	Charakterisierung der für die Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand verantwortlichen Rezeptoren.....	27
3.2.2.3.3	Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression.....	27
3.2.3	Allgemeines Vorgehen.....	28
3.2.4	Narkose.....	28
3.2.5	Duplex-Sonographie	29
3.2.6	Intravitalmikroskopie	29
3.2.7	Prinzipien der Fluoreszenzmikroskopie	30
3.2.7.1	Allgemeine Voraussetzungen.....	30
3.2.7.2	Aufbau des Arbeitsplatzes	33
3.2.8	Fluoreszenzfarbstoffe	34
3.2.9	Thrombozytenpräparation	36
3.2.10	Bestimmung der Thrombozytenzahl	36
3.2.11	Präparation des Empfängertieres	37
3.2.12	Mikroskopierraum	40
3.2.13	Dokumentation.....	41
3.2.13.1	Protokoll für die Auswertung der IVM	42
3.2.13.1.1	Datenblatt für Einzeltierauswertung.....	42
3.2.13.1.2	Datenblatt für Zusammenfassung einer OP-Gruppe	43
3.2.14	OP-Protokoll.....	43
3.2.15	Auswertung der Videoaufzeichnungen	44
3.2.16	Histologie	45
3.2.16.1	Pathologisch-anatomische Untersuchung (Sudan III-Färbung)	45
3.2.16.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H & E).....	46
3.2.17	Immunhistologie auf „vascular cellular adhesion molecule-1“ (VCAM-1).....	46
3.3	Molekulare Mechanismen der Thrombozytenadhäsion.....	47
3.3.1	Glykoprotein Ib α	47
3.3.2	Glykoprotein IIb-IIIa	47
3.3.3	Hemmung der Thrombozytenadhäsion in der Intravitalmikroskopie	48
3.4	Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atherogenese	48
3.4.1	Chronische Blockade des GPIb α	48
3.4.2	Histomorphometrie	49
3.5	Statistische Berechnungen und Dokumentation.....	50
3.6	Ergebnisse	52

INHALTSVERZEICHNIS

3.6.1	Morphologische Charakterisierung der Atherosklerose in ihrem Verlauf unter Verwendung der Histologie	52
3.6.1.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung	52
3.6.1.2	Nachweis der Fetteinlagerung in atherosklerotische Gefäße	53
3.6.1.3	Nachweis der Entzündungsreaktion.....	54
3.6.1.4	Charakterisierung der Gefäßfunktion mittels Doppler-Sonographie	55
3.6.1.5	Charakterisierung der Zelladhäsion an die Gefäßwand <i>in vivo</i>	57
3.6.1.5.1	Thrombozytenadhäsion	57
3.6.1.5.2	Leukozytenadhäsion.....	60
3.6.2	Charakterisierung der für die Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand verantwortlichen Rezeptoren.....	63
3.6.2.1	Die Blockade des GPIIb/IIIa mittels anti-GPIIb/IIIa.....	64
3.6.2.1.1	Intravitalmikroskopie	64
3.6.2.1.2	Transient-adhärente Thrombozyten bei Adhäsionshemmung	64
3.6.2.1.3	Permanente Thrombozytenadhäsion bei Adhäsionshemmung.....	66
3.6.3	Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression.....	68
3.6.3.1	Allgemeines zum Versuchsaufbau.....	68
3.6.3.2	Charakterisierung der Gefäßfunktion mit der Duplex-Sonographie	68
3.6.3.3	Morphologische Charakterisierung der Atheroprogression nach chronischer Blockade des GPIIb/IIIa.....	69
3.6.3.4	Histomorphometrie	71
3.7	Verwendete Reagenzien.....	72
3.7.1	Tyrode-Puffer	72
3.7.2	Paraformaldehyd 4%	72
4	Diskussion	73
4.1	Einleitung und Zielsetzung.....	73
4.2	Diskussion der angewandten Methoden.....	74
4.2.1	Das Mausmodell.....	74
4.2.2	Duplex-Sonographie	74
4.2.3	Charakterisierung der Zell-Zell-Interaktion mittels Intravitalmikroskopie.....	75
4.2.4	Morphologische Charakterisierung und Quantifizierung der Atherosklerose.....	76
4.3	Ergebnisse	77
4.3.1	Die Atherosklerose in ihrem Verlauf	77
4.3.2	Molekulare Mechanismen der Adhäsion.....	78

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.3	Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression.....	79
4.4	Ausblick	80
5	Zusammenfassung	81
6	Summary	82
7	Literaturverzeichnis	83
8	Tabellenverzeichnis	99
9	Abbildungsverzeichnis	100
10	Abkürzungsverzeichnis	102
11	Danksagung	104
12	Lebenslauf	106

EINLEITUNG

Die „Gefäßverkalkung“ (Atherosklerose) stellt sich durch eine komplexe Ätiologie dar. Charakterisiert ist die Atherogenese durch einen chronisch-inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand, der durch die langjährige Einwirkung pathologischer Stimuli (z.B. Bluthochdruck, erhöhte Cholesterinwerte, Nikotin, Diabetes mellitus usw.) entsteht.

Für die Entwicklung der Atherosklerose und deren Manifestation ist aber neben diesen Stimuli vor allem die Rekrutierung von Leukozyten, im Speziellen Monozyten, die später zu Makrophagen differenzieren, entscheidend. Die ins Subendothel ausgewanderten Monozyten/Makrophagen führen zur Freisetzung einiger proinflammatorischer Chemokine, Zytokine und Wachstumshormone, die zur Proliferation glatter Muskelzellen und somit zur Einengung des Gefäßlumens führen. Allerdings sind bislang die Mechanismen, die den Prozess der Monozyteninfiltration einleiten nur unzureichend geklärt. Ähnlich wie Leukozyten setzen auch Thrombozyten, wenn sie an aktivierten Endothelzellen adhären, Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Mediatoren frei und steigern so die Expression von Adhäsionsmolekülen. Die Adhäsion von Thrombozyten könnte daher in der frühen Phase der Atherosklerose eine entscheidende pathogenetische Rolle spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle der Thrombozyten und Leukozyten in der Entwicklung der Atherosklerose darzustellen. Durch die angewandte Methode der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, *in vivo* das Verhalten dieser beiden Zellpopulationen während der Atherogenese in der ApoE-Knock-out-Maus sichtbar zu machen und so ihre Bedeutung für die Atherogenese zu zeigen.

1 SCHRIFTTUM

1.1 Allgemeines zur Atherosklerose

Unter Atherosklerose versteht man die variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. Das derzeit diskutierte Modell sieht die Atherogenese als zelluläre, entzündlich-proliferative Reaktion der Gefäßwand auf eine chronische Reizung, beziehungsweise Verletzung^{17,38,39,83,122}.

Der Prozess der Atherogenese vollzieht sich in mehreren Schritten:

Die frühesten Veränderungen, die bei Atherosklerose entstehen, finden sich im Endothel. Dies zeigt sich in gesteigerter Permeabilität der Endothelzellen für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile^{15,96,124}. Dieser Prozess der Exsudation von Plasmabestandteilen, insbesondere von oxidiertem low density lipoprotein (LDL) treibt die endotheliale Dysfunktion weiter voran. Es kommt zu einer Beeinträchtigung der Sekretion antihäsiver Metabolite, wie Stickstoffmonoxyd (NO) und zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1) und mehrerer Selektine (P-, L-, und E-Selektin). Hieraus resultiert eine vermehrte Chemotaxis und Migration von Leukozyten in die Gefäßwand^{15-17,96,119,130}. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung ortsständiger Zellen, vor allem glatter Muskelzellen, somit typischer erster Anzeichen einer Entzündung^{97,124}.

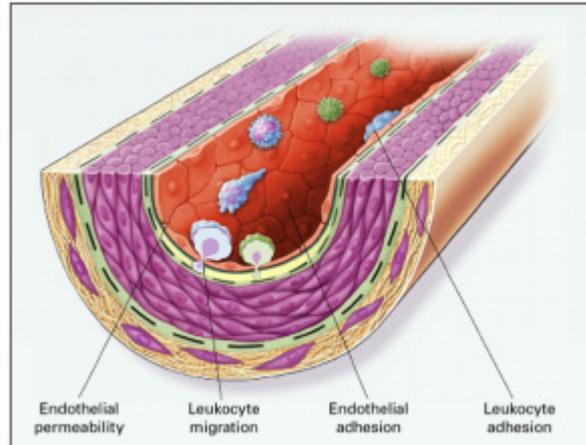


Abbildung 1

Schematischer Gefäßschnitt mit adhätierenden Leukozyten, die in Begriff sind, durch Migration in das Subendothel einzuwandern¹²⁴.

Der nächste Schritt in der Entstehung der Atherosklerose ist die Bildung der sogenannten „fatty streaks“. In die Intima eingewanderte Monozyten und Makrophagen nehmen lipidreiche Partikel aus dem Subendothel auf und differenzieren durch oxidierte LDL-Partikel zu Schaumzellen¹²⁴. Begleitet wird diese Erscheinung durch ein vermehrtes Auftreten glatter Muskelzellen, gefördert durch monozytäre, aber auch endotheliale Freisetzung von platelet derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) und transforming growth factor- β (TGF- β). Der Prozess der Rekrutierung von Monozyten, deren Transformation zu Schaumzellen und die Akkumulation und Proliferation von glatten Muskelzellen induziert die Verdickung der Gefäßintima^{14,124}.

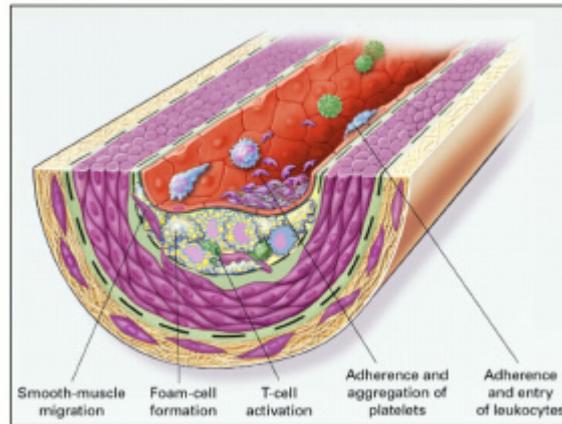


Abbildung 2

Es kommt durch eingewanderte und zu Schaumzellen differenzierten Makrophagen zur Bildung von „fatty streaks“. Die Proliferation von glatten Muskelzellen bewirkt eine Intimaverdickung¹²⁴.

Diese „fatty streaks“ entwickeln sich im Verlauf der Atheroprogression weiter zu manifesten Läsionen. Die so entstandenen atherosklerotischen Plaques besitzen eine fibröse Kappe. Diese kann im Laufe der Zeit an Stärke abnehmen und im schlimmsten Falle rupturieren. Je nach Verhalten dieser Kappe spricht man von einer stabilen bzw. instabilen Plaque.

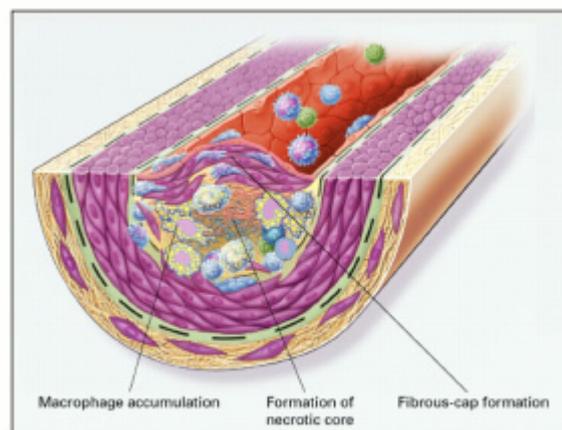


Abbildung 3

Plaquebildung im atherosklerotischen Gefäß: Die sogenannten „fatty streaks“ entwickeln sich weiter zu manifesten Läsionen. Es kommt zur Ausbildung eines Plaques mit fibröser Kappe¹²⁴.

Aktivierung der Makrophagen in den Plaques führt zu einer Freisetzung von verschiedenen proteolytischen Enzymen (z.B. Metalloproteinasen), die auf die fibröse Kappe einwirken. Dadurch kann es zur Plaquedestabilisierung und zur plötzlichen Plaqueruptur kommen. Durch

Ruptur der atherosklerotischen Läsion mit Freilegen der subendothelialen Matrix, kommt es zur Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten^{124,130}. Dieses Geschehen induziert den arteriellen Gefäßverschluss und führt somit zum Herzinfarkt oder Schlaganfall.

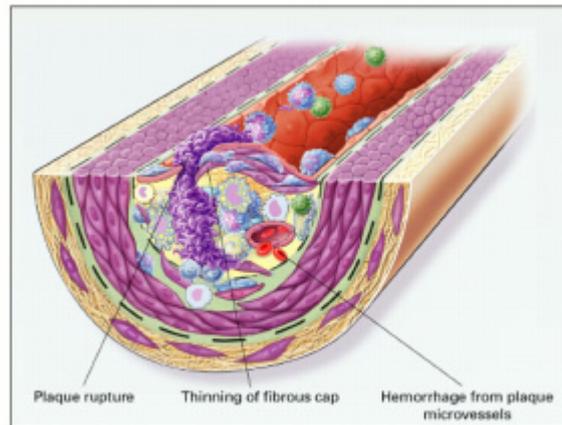


Abbildung 4

Plaqueruptur:

Im Plaque befindliche aktivierte Makrophagen setzen proteolytische Enzyme frei, die in der Lage sind, die fibröse Kappe anzugreifen. Folge davon ist die plötzliche Plaqueruptur mit anschließender Thrombosierung¹²⁴.

Bei einem inkompletten Gefäßverschluss werden durch Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten im Bereich subendothelialer Fasern eine Vielzahl thrombozytärer proinflammatorischer Mediatoren in das Mikromilieu freigesetzt. Der Thrombozyt vermittelt also die Komplikationen der Atherosklerose und kann den inflammatorischen Prozess der Atherosklerose weiter vorantreiben^{2,37}.

Thrombozyten adhären jedoch nicht nur im Bereich des Subendothels. Sie sind, ähnlich wie Leukozyten, darüber hinaus in der Lage, direkt mit Endothelzellen in Kontakt zu treten^{35,87,88}. Dort setzen sie proinflammatorische Mediatoren frei und aktivieren Endothelzellen⁴⁸. Eine in den frühen Stadien der Atherosklerose auftretende Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion könnte daher den proinflammatorischen Prozess in der Gefäßwand vorantreiben.

Stimulation von Thrombozyten führt vor allem an Gefäßbifurkationen zu einer erhöhten Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen Thrombozyten und Endothelzellen, was die Voraussetzung für deren Adhäsion am Endothel darstellt. Nach Adhäsion kommt es zu einer

verstärkten Degranulation der Plättchen mit Freisetzen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche eine Veränderung der adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften des Endothels bewirken. Hierdurch wird unter anderem die Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten an das Endothel, sowie die Migration von Monozyten in das Subendothel begünstigt - beides frühe Schritte im derzeit diskutierten Modell der Atherogenese⁴⁸.

Lokale chemische Stimuli^{124,126} (oxidiertes oder glykosiliertes LDL), sowie physikalische Stimuli¹²⁰ (niedrige oder turbulente Scherkräfte) führen an der luminalen Seite des Endothels zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Diese bewirken, dass Monozyten aus dem Zentrum des Blutstromes zum Rand hin wandern, auf der Endotheloberfläche rollen und schließlich adhären^{77,98,113,142}. Wichtige Adhäsionsmoleküle sind hier die Selektine (P-, E-, L-Selektin)^{41,98,113}, die Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1^{41,81,150} und der Vitronektinrezeptor^{24,39,45,76}. Die Wanderung der Monozyten durch das Endothel in die Gefäßintima wird durch chemotaktische Substanzen, wie monocyte chemoattractant proteine-1 (MCP-1), colony-stimulating factor (CSF) oder oxidiertes LDL gefördert^{81,124,126,142}. Im Subendothel differenzieren die Monozyten zu Makrophagen aus, werden durch Aufnahme von LDL zu Schaumzellen und bilden zusammen mit eingewanderten T-Lymphozyten die sogenannten Lipidplaques^{38,39,124,126}. Die aktivierten Makrophagen der Gefäßintima schütten ebenso wie adhärierende Plättchen eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus, was zur Proliferation von glatten Muskelzellen und Bindegewebe in der Gefäßintima führt^{25,38,39,124,126}.

Eine der ersten nachweisbaren Zellantworten bei der Bildung atherosklerotischer Veränderungen ist die Leukozytenadhärenz an das Endothel an ganz bestimmten Lokalisationen. Wie bei anderen entzündlichen Reaktionen migrieren die Leukozyten durch die Endothelzellbarriere und akkumulieren im subendothelialen Raum. Dort nehmen die Monozyten Lipidpartikel durch Ingestion auf und werden zu Schaumzellen^{81,97,124}.

Atherosklerose scheint eine spezielle entzündliche Reaktion zu zeigen, bei der Leukozyten-Rekrutierung vor allem in läsionsnahen Gebieten stattfindet und in subendothelialer Akkumulation von Monozyten und Lymphozyten, nicht jedoch von Granulozyten, endet.

Während dieser Zeit erscheint die Gefäßauskleidung jedoch intakt, sie trägt allerdings durch Expression spezifischer Leukozytenadhäsionsmoleküle zu deren Rekrutierung bei. Die Leukozytenmigration/-immigration ist ein mehrstufiger Prozess, an dem mindestens drei molekulare Signale, die entweder zusammen oder in Folge auftreten, beteiligt sind^{48,125}.

Der erste Schritt beinhaltet das Ereignis der transienten Adhäsion, dies ermöglicht die erste Kontaktaufnahme mit dem Endothel. An diesem Schritt sind endotheliales P- und E-Selektin beteiligt, außerdem das spät reagierende Antigen 4, das mit dem endothelial exprimierten VCAM-1 interagiert. Dieser erste Schritt erlaubt den fließenden Zellen, am Endothel entlang zu rollen. Erst im zweiten Schritt adhärirt die Zelle. Dies geschieht durch chemotaktische Substanzen, die direkt aus dem Gewebe stammen, oder auf der Endotheloberfläche lokalisiert sind und Signale übertragen, die wiederum Integrine aktivieren^{81,124}.

VCAM-1 und ICAM-1, Adhäsionsmoleküle aus der Immunglobulinfamilie, vermitteln die feste Adhäsion. Im letzten Schritt kommt es schließlich zur Chemotaxis und Transmigration, die unter anderem durch PECAM-1/CD31 vermittelt wird¹⁰².

Es resultiert also zum einen eine Verdickung der Gefäßwand durch Proliferation von glatten Muskelzellen und Bindegewebe, was zur Einengung des Gefäßlumens führt. Zum anderen ist die Gefäßwand an den Stellen der Lipidplaques sehr vulnerabel und thrombogen, wodurch es vor allem nach Plaqueruptur durch Thrombusbildung zum Verschluss des Gefäßes kommen kann^{29,38,39,58,124}.

Die Degranulation der Thrombozyten spielt sich nicht nur im Bereich von Thrombenbildung mit entzündlich verändertem oder verletztem Endothel ab. Bekannt ist, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus, Nikotinabusus, arterieller Hypertonus und Hypercholesterinämie mit einer erhöhten basalen Thrombozytenaktivität einhergehen^{38,39,55,124}.

Pathophysiologisch gesehen ist der zentrale Auslösemechanismus der Intimaveränderung die Monozytenchemotaxis, deren Adhäsion an die Gefäßwand, die Transmigration, Makrophagendifferenzierung, die Phagozytose von oxidierten LDL-Partikeln und Bildung von Schaumzellen¹²⁵. Weitestgehend ungeklärt ist jedoch der Auslösemechanismus, der zur Monozyteneinwanderung in die Gefäßwand führt.

1.2 Morphologie und Physiologie der Thrombozyten (Blutplättchen)

1.2.1 Struktur der Thrombozyten

Thrombozyten entstehen im Knochenmark als Abschnürungen der Megakaryozyten. Mit einer Gesamtzahl von etwa 150 000 bis 300 000/ μl zirkulieren sie durchschnittlich sieben Tage im Blut. Im nicht aktivierten Zustand zeigen sie eine typische diskoide Form mit einer Größe von ca. $3 \times 0,75 \mu\text{m}$. Die Aktivierung der Thrombozyten, durch Agonisten wie z.B.

Adenosindiphosphat (ADP) oder Thrombin, bzw. Adhäsion führt zu einer Formveränderung, dem sogenannten „shape change“. Hierbei bilden sich Pseudopodien aus, wodurch sich die Oberfläche des Plättchens vergrößert^{49,132}.

In ultrastrukturellen/elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen Plättchen einen komplexen Aufbau, der sich in vier Bereiche (siehe Abb.5) einteilen lässt⁴⁹:

- **Periphere Zone**
- **Strukturelle Zone**
- **Membransysteme und**
- **Zone der Organellen**

In der **peripheren Zone** befindet sich die Plasmamembran, eine polarisierte Phospholipidschicht. Sie stellt die Substrate für die Signaltransduktion (sog. „second messenger“) und den Arachidonsäurestoffwechsel, sowie nach Aktivierung die prokoagulatorische Aktivität in Form von Plättchenfaktor 3 zur Verfügung. Ferner sind in der Plasmamembran eine Vielzahl von Proteinen integriert, welche als Rezeptoren für Agonisten, z.B. Adenosindiphosphat (ADP) und Thrombin, oder für Adhäsionsproteine (z.B. Fibrinogen) fungieren^{49,132}.

In der **strukturellen Zone** befindet sich das Zytoskelett, welches aus Mikrotubuli, Aktin und weiteren Strukturproteinen besteht. Dieses in der Zellmembran verankerte fibrilläre, kontraktile System spielt eine entscheidende Rolle für die Aktivierung und Formveränderung (Pseudopodienbildung, „shape change“) der Thrombozyten^{49,132}.

Die **Zone der Membransysteme** besteht aus dem offenen kanalikulären System, welches ein weit in das Plättcheninnere hineinreichendes, mit der Plasmamembran verbundenes Kanalsystem darstellt. Es wird bei der Plättchenaktivierung nach außen verlagert und trägt zur Oberflächenvergrößerung bei. Das dichte tubuläre System ist ein Hauptspeicherort für freie Kalziumionen, welche eine entscheidende Rolle bei der Plättchenaktivierung spielen⁴⁹. Zu den **Organellen** der Plättchen zählen Mitochondrien, Glykogenspeicher und drei verschiedene Formen von Speichergranula⁴⁹.

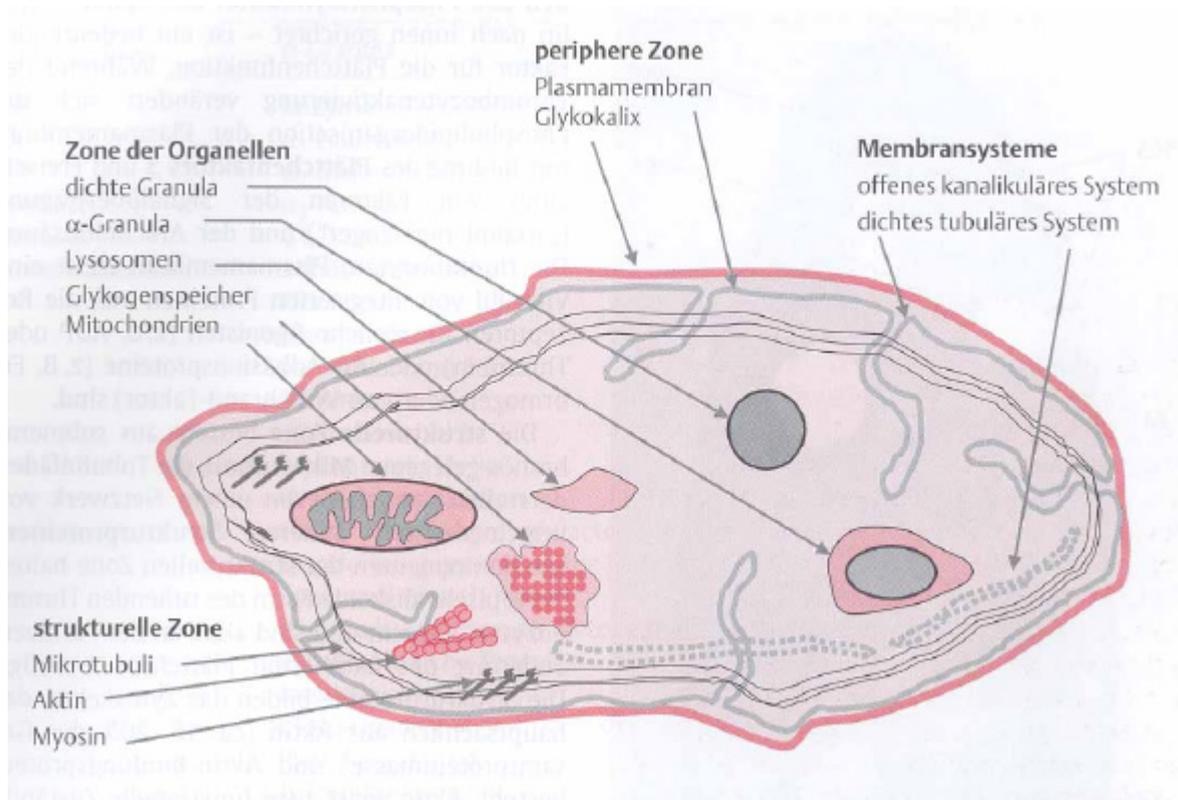


Abbildung 5

Aufbau und strukturelle Einteilung des Thrombozyten⁴⁹.

1.2.2 Sekretorische Funktion der Thrombozyten

Im Thrombozyt existieren drei unterschiedliche Formen von Speichergranula. Diese lassen sich einteilen in:

- **Dichtgranula („dense bodies“)**
- **α -Granula und**
- **Lysosomen**

Die Inhaltsstoffe dieser Granula werden bei Aktivierung der Zelle in den Extrazellulärraum abgegeben⁴⁹.

Die **Dichtgranula** (benannt nach ihrer elektronenoptischen Dichte) enthalten Nukleotide (ADP, ATP), Serotonin und Kalziumionen, also Stoffe, die hauptsächlich für die Aggregation von Plättchen entscheidend sind^{49,60,132}.

In den am häufigsten vorkommenden **α -Granula** sind eine Reihe von Proteinen enthalten, welche die Adhäsion und Aggregation von Plättchen, sowie die sekundäre Hämostase fördern. Diese wirken proliferativ als Wachstumsfaktoren oder sind über zytokinähnliche Wirkung an Chemotaxis und Inflammation beteiligt^{49,64}.

Die **lysosomalen Granula** enthalten, wie die Lysosomen anderer Zellen, hydrolytische Enzyme⁴⁹.

1.2.3 Physiologie der Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten können durch eine Vielzahl von Agonisten (ADP, Kollagen, Thrombin, Adrenalin, Thromboxan) stimuliert werden. Hierbei können die Stoffe zum Teil vom Plättchen selbst (autokrin) oder vom umliegenden Gewebe gebildet oder freigesetzt werden^{49,132}.

Die Agonisten binden an spezifische Rezeptoren und führen über Signaltransduktion zur Bildung von intrazellulären Botenstoffen („second messenger“). Als sogenannte „second messenger“ fungieren Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃), Diazylglyzerol und Thromboxan, deren Konzentration bei Plättchenaktivierung erhöht ist. Weiterhin besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Aktivierungszustand der Plättchen und der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Diese nimmt bei Stimulation zu^{12,49}.

Mit steigendem Aktivierungsgrad kommt es zu folgenden Veränderungen an den Plättchen:

1. Aktivierung des Fibrinogenrezeptors, so dass lösliches Fibrinogen gebunden und die Plättchenaggregation ausgelöst werden kann.
2. Formveränderung mit Pseudopodienbildung, was zu einer Vergrößerung der Plättchenoberfläche und verstärkter Reagibilität führt.
3. Freisetzung von Arachidonsäure mit Bildung von Thromboxan.
4. Änderung der Phospholipidorientierung in der Plasmamembran, wodurch die Anlagerung von Gerinnungsfaktoren ermöglicht wird.

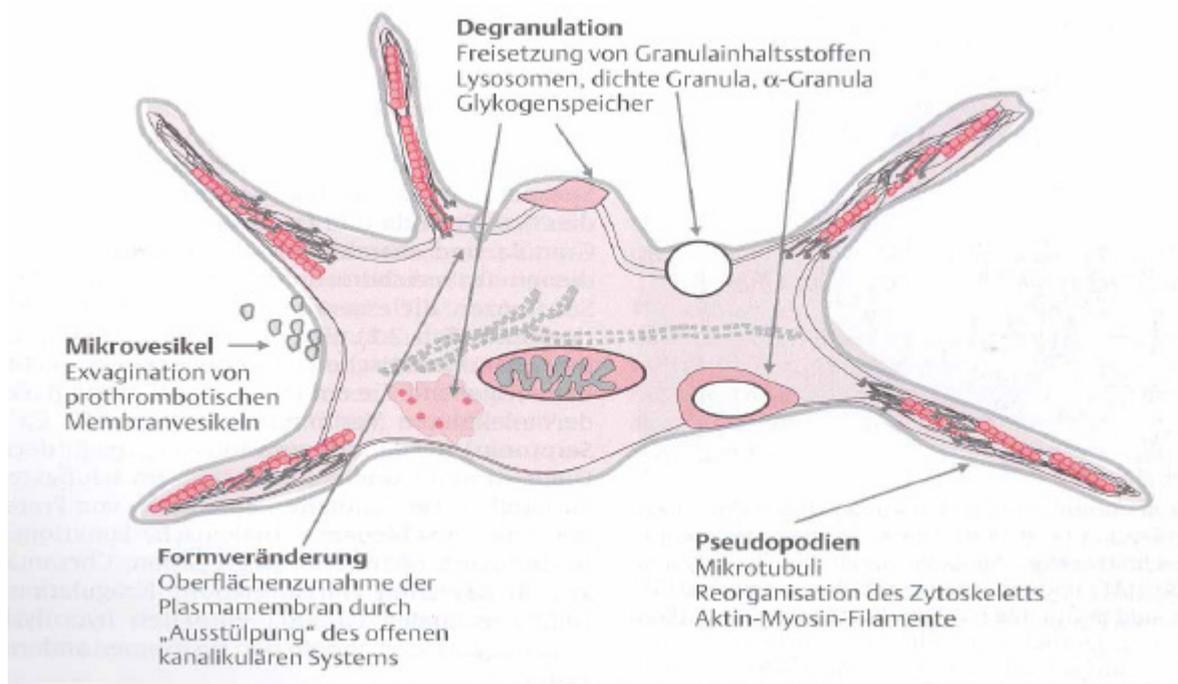


Abbildung 6

Aktivierter Thrombozyt mit Pseudopodienbildung⁴⁹.

Bei noch stärkerer Aktivierung kommt es zur Freisetzung von gespeicherten Plättchensubstanzen, was als Sekretion beziehungsweise Degranulation bezeichnet wird. Dies bewirkt hohe lokale Konzentrationen dieser Stoffe an Orten mit verstärkter Plättchenaktivierung. Freigesetzt werden zuerst die Substanzen der Dichtegranula, dann die der α -Granula und zuletzt die lysosomalen Enzyme^{49,132}.

Die Inhaltsstoffe der Dichtegranula haben vor allem Einfluss auf Plättchenaggregation und Vasokonstriktion und fördern somit im Bereich von Gefäßverkalkungen die Bildung eines Plättchenthrombus^{49,132}.

α -Granula setzen eine Vielzahl von Substanzen frei, die neben ihrer Wirkung auf die Plättchenadhäsion und -aggregation auch Einfluss auf Umbauvorgänge im Bereich der Gefäßwand haben^{58,60,64}. Wachstumsfaktoren, wie platelet derived growth factor (PDGF) oder transforming growth factor- β (TGF- β) fördern die Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Zytokinähnliche Substanzen, wie β -Thromboglobulin und Plättchenfaktor 4 bewirken die Chemotaxis von Leukozyten und Fibroblasten. Interleukin-1^{59,131} und CD40-Ligand⁶², in Plättchen nachgewiesen und dort vermutlich in den α -Granula lokalisiert¹³¹, verändern die adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften des Endothels.

Eine verstärkte endotheliale chemotaktische Aktivität stellt einen frühen Schritt der Atherogenese dar^{42,44,59}.

1.2.4 Thrombozytenmembranrezeptoren

Die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel wird über verschiedene spezifische Rezeptoren reguliert. Das Blutplättchen besitzt membranständige Glykoproteine (GP), die für die Interaktion der Plättchen untereinander (GPIIb-IIIa), mit der subendothelialen Matrix (vWF, Kollagenrezeptor), mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren (vWF), mit Endothelzellen (GPIIb-IIIa) sowie mit Leukozyten (P-Selektin) verantwortlich sind⁴⁷. Aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Struktur werden diese Adhäsionsrezeptoren in vier Gruppen eingeteilt⁴⁹:

- **Integrine**
- **Leucinreiche Glykoproteine**
- **Selektine**
- **Rezeptoren vom Immunglobulintyp**

Tabelle 1

Übersicht über die Rezeptoren auf der Plättchenmembran⁴⁷.

Klassifizierung	Elektrophoret. Klassifizierung	Rezeptorzahl pro Plättchen	Ligand
Integrine			
$\alpha_2\beta_1$	GP Ia-IIa	1.000	Kollagen
$\alpha_5\beta_1$	GP Ic-IIa	1.000	Kollagen, Fibrinogen, Vitronectin
$\alpha_6\beta_1$	GP Ic`-IIa	1.000	Kollagen, Fibronectin, Vitronectin

SCHRIFTTUM

$\alpha_{IIb}\beta_3$	GP IIb-IIIa	60.000- 100.000	Fibrinogen
$\alpha_v\beta_3$	GP α_v -IIIa	100	Vitronectin
Leucinreiche Glykoproteine			
	GP Ib-V-IX	25.000	vWF
	GP IV	15.000-25.000	Kollagen
Selektine			
	P-Selektin	12.000	PSGL-1, GPIb
Rezeptoren vom Immunglobulintyp			
	ICAM-1	5.000	Fibrinogen, Mac-1
	PECAM-1	3.000	PECAM-1

1.2.4.1 Integrine

Die **Integrine** sind auf fast allen Zellen des Körpers zu finden und bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, die zusammen einen funktionellen Rezeptor bilden. Die α -Untereinheit bezeichnet die Spezifität, die β -Untereinheit dient zur strukturellen Einteilung. Diese Integrine interagieren mit verschiedenen Glykoproteinen, wie z.B. Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, oder von Willebrand Faktor (vWF). Durch Plättchenagonisten (z.B. ADP, Thrombin, Thromboxan) kommt es zur intrazellulären Signalübertragung, die über zytoplasmatische Anteile des Rezeptors zur Aktivierung der Integrine führt („inside-out signaling“). Die Bindung von Liganden (z.B. Fibrinogen) oder Antikörpern z.B. ligand induced binding site (LIBS) bewirkt ebenfalls eine Konformationsänderung des Integrinrezeptors mit nachfolgender Aktivierung intrazellulärer Signale („outside-in signaling“). So kann der integrinvermittelte Adhäsionsvorgang mit Mechanismen der Zellaktivierung kommunizieren⁴⁷.

Bisher wurden fünf verschiedene Integrine auf dem Thrombozyten beschrieben (siehe Tab.1). Eines davon ist das Glykoprotein IIb-IIIa, welches zu den β_3 -Integrinen gehört. GPIIb-IIIa ist ein Bestandteil der α -Granula und der thrombozytären Plasmamembran. Mengemäßig ist es das häufigste Membranglykoprotein des Thrombozyten. Die Aufgabe dieses Membranrezeptors, dem sogenannten Fibrinogenrezeptor, ist die Bindung von Fibrinogen an

die Thrombozytenoberfläche und stellt somit den ersten Schritt der Plättchenaggregation dar. Ist ein Thrombozyt in einem nichtaktivierten Zustand, so ist der GPIIb-IIIa-Rezeptor an dessen Oberfläche in einem Ruhezustand und bindet an immobilisiertem Fibrinogen, nicht aber an in Plasma gelöstem. Wird der Thrombozyt jedoch aktiviert, so kommt es zu einer raschen Konformationsänderung des Rezeptors mit Übergang in einen aktivierten Funktionszustand. Der aktivierte Rezeptor ist dann in der Lage, auch lösliches Fibrinogen aus dem Plasma an den Thrombozyten zu binden¹¹.

Weitere Integrinrezeptoren, die die Adhäsion von Thrombozyten an die Gefäßwand vermitteln, sind der Vitronektinrezeptor ($GP\alpha_v\beta_3$) und die Familie der β_1 -Integrine⁴⁷.

1.2.4.2 Leucinreiche Glykoproteine

In dieser Gruppe sind die Rezeptoren GPIb-V-IX und GPIV von Interesse. Der Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex bildet den Rezeptor für den vWF und vermittelt so indirekt auch die Adhäsion zirkulierender Thrombozyten an Kollagen. Diese Bindung findet auch unter hohen Scherkräften, wie sie z.B. in Arterien herrschen, statt. Der GPIb-V-IX-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten, wobei die $GPIb\alpha$ -Untereinheit eine zentrale Bedeutung für die Rezeptorfunktion besitzt⁴⁷.

1.2.4.3 Selektine

Bisher sind drei Selektine in der Literatur beschrieben. Auf aktivierten Endothelzellen findet man E-Selektin, welches die Granulozytenadhäsion vermittelt. L-Selektin ist auf der Leukozytenoberfläche lokalisiert und ist beteiligt an der Interaktion zwischen Leukozyt und Endothel. P-Selektin ist sowohl in Plättchen, als auch in Endothelzellen zu finden. Dieses Selektin liegt beim Thrombozyten in den α -Granula und im Endothel in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert vor. Sind diese Zellen im Ruhezustand, so findet sich dieser Rezeptor nicht an der Zelloberfläche. Nach Aktivierung kommt es jedoch zu einer schnellen Freisetzung. P-Selektin auf Thrombozyten und Endothel fördert zudem die Adhäsion von Leukozyten an beschädigtes Endothel bzw. bereits adhärenente Thrombozyten und ruft im Leukozyten inflammatorische Reaktionen hervor⁴⁷.

Tabelle 2

Einteilung der Selektine nach Vorkommen und Funktion
Modifiziert nach:⁴⁹

Selektin	Vorkommen	Funktion
E-Selektin	Endothel	Adhäsion von Granulozyten und Thrombozyten an Endothel
L-Selektin	Leukozyten	Leukozytenadhäsion an Endothel
P-Selektin	Endothel, Thrombozyten	Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten und Endothel

1.2.4.4 Rezeptoren vom Immunglobulintyp

Bislang sind zwei Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulintyp im Plättchen beschrieben. Dies sind platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) und intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)^{8,69,71,146}. Deren Funktion für die Thrombozytenadhäsion ist im Detail jedoch noch nicht vollständig bekannt.

PECAM-1 spielt eine Rolle bei der Plättchenadhäsion an das Subendothel und ist zudem an der Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten beteiligt. ICAM-1 ist auf aktivierten Thrombozyten zu finden und trägt ebenfalls zur Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion bei^{11,42,44,47,106}.

1.3 Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen

Das Gefäßendothel besteht aus einer kontinuierlichen, einreihigen Zellschicht, welche die Innenseite von Gefäßen auskleidet. Sie stellt die strukturelle und funktionelle Barriere zwischen der Gefäßwand und dem Blut dar. Endothelzellen produzieren eine Vielzahl von Substanzen, welche in die Physiologie und Pathophysiologie der Gefäßwand involviert sind^{28,41,50,115}. Dazu zählen prokoagulatorische Faktoren, wie von Willebrand Faktor (vWF) oder Thromboxan A₂ (TxA₂)¹¹⁹, antithrombotische Faktoren, wie Prostaglandin I₂ (PGI₂) oder Heparansulfat, Substanzen, welche den Gefäßtonus beeinflussen, Wachstumsfaktoren, sowie Entzündungsmediatoren, wie Interleukine oder Chemokine. Plättchen interagieren mit

aktivierten oder dysfunktionellen Endothelzellen^{25,50,58}. Wie unter 2.1 bereits dargestellt, könnte diese Interaktion zwischen Thrombozyt und Endothel für die Initiierung des atherosklerotischen Prozesses von herausragender Bedeutung sein⁴⁹.

In unstimuliertem Zustand zirkulieren Plättchen im Blut ohne am Endothel zu adhären, weil das intakte, unstimulierte Endothel eine antithrombogene Oberfläche darstellt^{41,50}. Dies ist Folge einer hohen negativen Membranladung des Endothels auf der luminalen Seite, welche durch einen hohen Anteil von Heparansulfat und Chondroitinsulfat an den Membranproteinen bedingt ist. Darüber hinaus produzieren unstimulierte Endothelzellen eine Reihe von Substanzen, die den Stimulationsgrad, die Adhäsion und die Aggregation von Plättchen vermindern können: PGI₂ bewirkt eine Steigerung der cAMP-Konzentration im Thrombozyten und vermindert so die Bildung von Thromboxan und die Degranulation von Plättchen, zwei wichtige Schritte bei der Plättchenaggregation. Ähnlich wirkt Stickstoffmonoxyd (NO), indem es die cGMP-Konzentration im Thrombozyten erhöht. NO führt zudem zur Vasodilatation. Ferner besitzen Endothelzellen Membranproteine mit ADPase-Aktivität, welche ADP, einen starken Agonisten für die Thrombozytenaggregation, zu AMP und Adenosin abbauen. Thrombozytenaktivierung und Fibrinbildung werden durch Thrombomodulin verhindert, ein für Endothelzellen typisches Membranprotein⁴⁷.

Verletzung und Stimulation des Endothels führen zu Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten^{25,43,45,46,76,124}. Plättchen adhären dabei über ihren Membranrezeptor Glykoprotein Ib α an endothelial und subendothelial gebundenen vWF^{41,60}. Weiter kann die Adhäsion via Fibrinogen über Glykoprotein IIb-IIIa an den Plättchen und am Vitronektinrezeptor (α_v) von seiten des Endothels erfolgen^{20,21,32,45,66,144}. Die Adhäsion führt zu einer Aktivierung der Plättchen mit Bildung, bzw. Freisetzung von ADP, ATP, Serotonin, Thrombin, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. ADP und Thrombin fördern die Aktivierung und Aggregation weiterer Plättchen. Thrombin ist ferner ein wichtiges Enzym der plasmatischen Gerinnung, indem es die Bildung von Fibrin katalysiert und somit den Plättchenthrombus stabilisiert. Zytokine und Wachstumsfaktoren führen zur inflammatorischen Reaktion des Endothels^{58,60,132}.

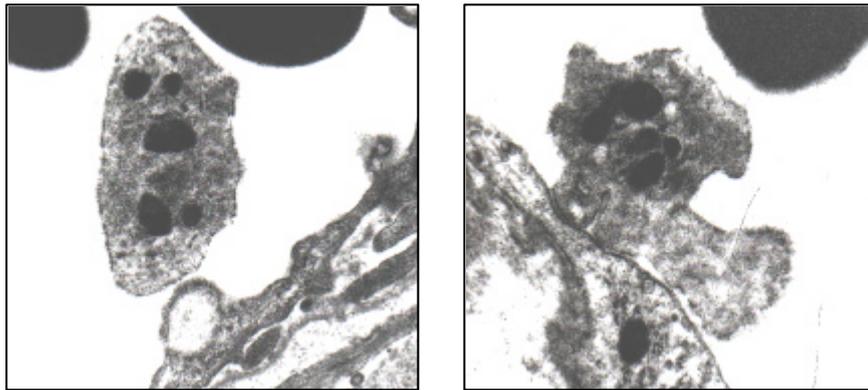


Abbildung 7

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Thrombozyten. Links ein nicht aktiviertes Plättchen vor Kontakt mit dem Endothel, rechts ein bereits adhärrierender und somit aktivierter Thrombozyt⁴⁹.

1.4 Thrombozyten und ihre Funktion im Entzündungsgeschehen

Plättchen spielen nicht nur beim thrombotischen Verschluss eines Gefäßes als Folge der Atherosklerose eine entscheidende Rolle^{27,40,46-48,103,124}.

Bei der Aktivierung von Thrombozyten werden eine Reihe von proinflammatorischen Substanzen, wie Eicosanoide, Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt^{42,44,62}. Diese Substanzen sind in großer Menge in den Plättchenvesikeln gespeichert oder werden durch die Aktivierung gebildet⁶⁰. Bei hohen lokalen Konzentrationen dieser Substanzen, z.B. an Orten von Gefäßverletzungen mit Mikroaggregat- oder Thrombusbildung, werden in den Endothelzellen Gene der sogenannten frühen Entzündungsreaktion exprimiert. Wie *in vitro* bereits nachgewiesen, verändern sie unter anderem die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften des Endothels. Die Interaktion zwischen Thrombozyt und Endothel könnte somit erste Schritte der Atherosklerose-Entstehung (Atherogenese) einleiten^{42,44,48,59,60,70,124}.

1.5 Hemmung der Thrombozyten-Adhäsion

Unter physiologischen Bedingungen adhärrieren zirkulierende Thrombozyten nicht am Endothel^{2,79,92,127}. Der Vorgang der Adhäsion wird durch verschiedene Glykoproteine auf der Membran der Thrombozyten reguliert. Plättchen besitzen eine Reihe von membrangebundenen Adhäsionsrezeptoren, die spezifische Strukturen auf subendothelialer

Matrix (und Media) erkennen. Der erste Kontakt zwischen zirkulierenden Thrombozyten im Blut und der Gefäßwand wird durch die Interaktion von Glykoprotein Ib α (im GPIb-IX-V-Komplex) mit dem vWF vermittelt^{22,30,48,56,105,107,108,152,153}. Der vWF ist das größte lösliche Protein im Blutplasma^{117,127,128}. Zu finden ist der vWF in Endothelzellen, Megakaryozyten, Thrombozyten und subendothelialer Matrix^{117,128,145}. Seine Aufgabe ist es, bei der Plättchenadhäsion mit den beiden Hauptrezeptoren GPIb-IX-V und GPIIb-IIIa zu interagieren. Wobei GPIb α eher für die transiente Adhäsion und das Rollen der Plättchen, GPIIb-IIIa jedoch für die feste Adhäsion verantwortlich ist^{1,117,152,156}.

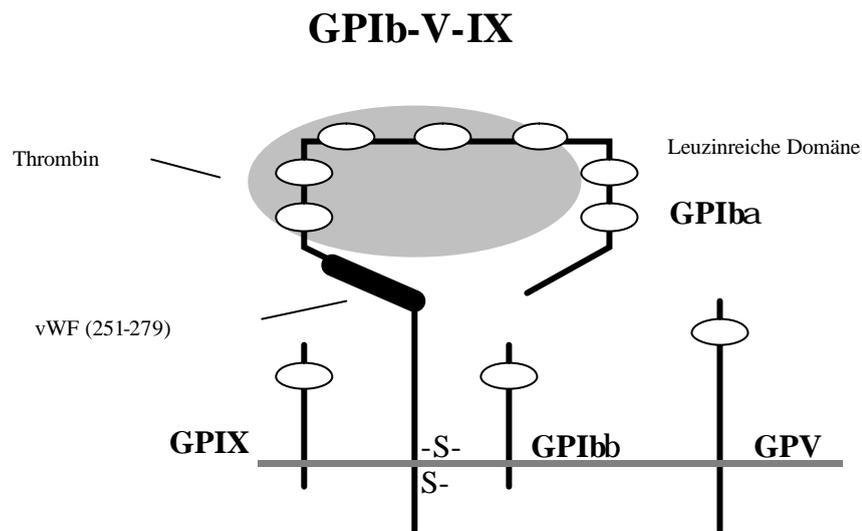


Abbildung 8

Schematische Darstellung des GPIb-V-IX-Komplexes.
Modifiziert nach: ¹⁵⁴

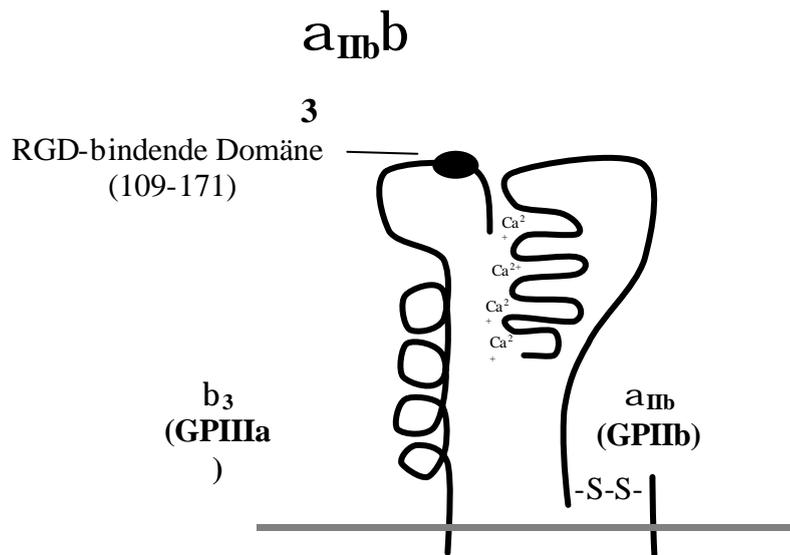


Abbildung 9

Schematische Abbildung des GPIIb-IIIa-Rezeptors.
Modifiziert nach: ¹⁵⁴

1.6 Mausmodelle zur Atherosklerose

Um komplexe kardiovaskuläre Krankheiten wie Atherosklerose oder Hypertension aufzuklären, bedarf es eines Tiermodells⁵. Tiermodelle, die zur Aufklärung der kardiovaskulären Krankheiten dienen, basierten lange Zeit auf größeren Tieren/Spezies. Diese sind allerdings aufgrund ihrer genetischen Variabilität und schwierigen Zugänglichkeit für Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene nur bedingt geeignet. Deswegen begannen einige Forscher, sich der Maus als klassischem Versuchsmodell für kardiovaskuläre Fragestellungen zuzuwenden. Fortschritte in der Gentechnik, der Mäusegenetik und mikrochirurgischer Technologie initiierten eine Revolution, die zur unerwarteten Kombination von *In-vivo*-Molekularphysiologie mit genetisch veränderten Mäusen führte⁵.

Vor 10 Jahren war noch kein Mäusestamm verfügbar, der spontan komplexe atherosklerotische Läsionen entwickelte. Nur durch extrem fette und cholesterinreiche Nahrung über lange Zeit konnten bei C57/Bl/6 Mäusen kleine Läsionen (sog., „fatty streaks“) induziert werden^{73,110,112,140}. Die Möglichkeit Gene gezielt zu beeinflussen änderte die Situation schlagartig¹³³.

Inzwischen gibt es mehrere Mausmodelle zur Atherosklerose. Die bis heute gängigsten sind die LDL-Rezeptor-defiziente und die Apolipoprotein E-defiziente Maus (im Folgenden ApoE-Knock-out-Maus genannt). Das Modell der ApoE-Knock-out-Maus entstand 1992 und ist weit besser validiert, als das der LDL-Knock-out-Maus^{13,67,102,114,159}. Die bei dieser Maus (ApoE-Knock-out) entstehenden atherosklerotischen Läsionen gleichen denen des Menschen^{18,84,136,159}.

Bei der ApoE-Knock-out Maus liegt das Apolipoprotein E, ein wichtiges Protein im Fettstoffwechsel⁷², inaktiv vor. Apolipoprotein E ist ein Hauptbestandteil der Plasmalipoproteine und spielt eine wichtige Rolle im Schutz vor Atherosklerose. Das Apolipoprotein E wird hauptsächlich in der Leber gebildet und ist ein Oberflächenbestandteil von Lipoproteinpartikeln, sowie Ligand für die Erkennung und Clearance durch Lipoproteinrezeptoren^{13,72}. Die antiatherogene Eigenschaft des ApoE beruht auf seiner Fähigkeit, die Beseitigung der Lipide aus dem Plasma und den Cholesterolefflux aus den peripheren Zellen für den Cholesterintransport zu beeinflussen^{85,136,137}. ApoE besitzt zudem antioxidative Eigenschaften. Damit wird angenommen, dass es, die Lipidoxidation limitierend, antiatherosklerotisch wirkt⁶⁸. ApoE-defiziente Mäuse haben eine verminderte Clearance von Lipoproteinen¹³⁶. Sie zeigen bei normaler Fütterung (cholesterin- und fettarm) einen Plasmacholesterinspiegel von 400 bis 600 mg/dl, verursacht durch eine Anreicherung

von Chylomikronen, very low density lipoprotein-Resten (VLDL) und freiem Cholesterol¹³⁶. Im Vergleich dazu liegt der Plasmacholesterinspiegel von Wildtypmäusen bei gleicher Fütterung unter 100 mg/dl^{13,102}. Füttert man diese ApoE-defizienten Mäuse nun mit einer fett- und cholesterinreichen Diät¹⁰², so steigt der Cholesterinspiegel auf 1500 bis 2000¹³, manchmal bis über 4000 mg/dl¹⁰² an. Wildtypen (z.B. C57Bl/6) mit fett- und cholesterinreicher Fütterung erreichen dagegen nur Werte zwischen 150-300 mg/dl¹⁰². Bei normaler (fettarmer) Fütterung zeigen sich in der ApoE-Maus im Alter von 8-10 Wochen am Endothel adhärierende Monozyten. Sogenannte „fatty streaks“ werden frühestens nach zehn Wochen, Läsionen mit Schaumzellen nach 15 und fibröse Plaques nach 20 Wochen beobachtet. Bei fett- und cholesterinreicher Diät sind diese Veränderungen bereits erheblich früher zu sehen^{13,100,102}. Wildtypen hingegen entwickeln selbst bei extrem fett- und cholesterinreicher Diät nur geringe^{73,110,112,140}, oder keine atherosklerotischen Veränderungen^{13,102}.

Die ApoE-Knock-out-Maus entwickelt also komplexe atherosklerotische Läsionen, die denen des Menschen sehr ähnlich sind, und verspricht somit ein gutes und praktikables Atherosklerose-Modell zu sein¹³. Die Entwicklung dieser Läsionen kann durch fett- und cholesterinreiche Nahrung, wie oben erwähnt, zusätzlich beschleunigt werden. Die Ausdehnung dieser Veränderungen nimmt ihren Ursprung in der proximalen Aorta und breitet sich dann nach und nach weiter in die Peripherie aus. Speziell betroffen sind Gebiete, in denen die laminare Blutströmung gestört ist, z.B. an Gefäßabzweigungen wie der Carotisbifurkation⁷³.

1.7 Methoden zur Charakterisierung der Atherosklerose mit der Duplex-Sonographie

Der klassische Weg atherosklerotische Veränderungen nachzuweisen war bislang die Anfertigung von histologischen Schnitten und deren Beurteilung. Diese Methode bringt aber den Nachteil mit sich, dass mit ihr alleine keine funktionelle Aussage möglich ist. Mit der technischen Weiterentwicklung der Ultraschalldiagnostik wurde in den letzten Jahren die Duplex-Sonographie etabliert.

Eine Untersuchung von Gefäßen durch Duplex-Sonographie liefert in der Diagnostik der Herz-Kreislauf-Krankheiten sehr wichtige Parameter. Diese Untersuchungsmethode bietet die Möglichkeit, die Elastizität der Gefäße zu beurteilen und gibt darüber hinaus noch Gelegenheit, Strömungsveränderungen festzustellen. Im Rahmen der Atherosklerose kommt

es zu einer messbaren Reduktion der Gefäßelastizität, die eine Aussage über den Grad der Atherosklerose zulässt. Somit ist die Duplex-Sonographie eine nicht-invasive und eine nicht-traumatische Methode, hämodynamische Parameter zu beurteilen^{19,52,63,121,138,155}. Gemessen werden können dabei unter anderem die Flussgeschwindigkeit, die Wandstärke, der Gefäßdurchmesser und die Elastizität der Gefäßwand^{57,63,121}.

Bisher wurden jedoch im Mausmodell meist nur Messungen an Herz^{3,19,138,155}, proximaler Aorta^{3,57,116} und in der Mikrozirkulation^{23,52} vorgenommen.

1.8 Modell zur Quantifizierung der Atherosklerose

1.8.1 Charakterisierung der Zell-Zell-Interaktion mit Hilfe der Intravitalmikroskopie

Die Methode der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie erlaubt es, physiologische und pathologische Vorgänge im intakten Organismus, sogar in einzelnen Zellpopulationen und -systemen darzustellen. Dies bringt sehr viele Vorteile gegenüber *In-vitro*-Versuchen, da sich die zu untersuchenden Zellen in ihrem physiologischen Milieu und unter den dort üblich vorherrschenden Bedingungen befinden. Das Prinzip der Intravitalmikroskopie wird weltweit an verschiedenen Organsystemen angewendet. Vor allem am Darm^{2,37,74,87,90,134} und im System der Rückenhautkammer bei Hamstern und Mäusen wurde bislang gearbeitet, aber auch die Leber¹⁰ und andere Organe, wie z.B. das Auge⁶, das Ohr¹⁴⁸ und die Milz⁵⁴ wurden direkt untersucht.

Die Untersuchung des Blutflusses durch die Intravitalmikroskopie ist eine geeignete Methode, um komplexe biologische Interaktionen zwischen Blutbestandteilen und der Gefäßwand besser zu verstehen. Durch diese Beobachtungen können Krankheitsmechanismen erkannt und daraufhin neue prophylaktische und therapeutische Ansätze getestet werden⁹⁴. Diese Methode ist deswegen sehr gut geeignet, die Erkenntnisse über Atherosklerose und Thrombose weiter auszubauen.

Es ist zur Intravitalmikroskopie an der *A. carotis communis* keine Literatur verfügbar.

1.8.2 Immunhistologie/VCAM-1-Expression

VCAM-1 ist neben ICAM-1 das wichtigste Adhäsionsmolekül, welches die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beeinflusst. VCAM-1 ist für die feste Adhäsion der Leukozyten verantwortlich. Es ist zusammen mit P- und E-Selektin beim ersten Schritt der Leukozytenadhäsion, der transienten Adhäsion und dem Rollen beteiligt. Die Besonderheit des VCAM-1 besteht darin, als einziges der drei Adhäsionsmoleküle (VCAM, ICAM, PECAM) sowohl beim ersten Schritt der Kontaktaufnahme, als auch bei der stationären Adhäsion beteiligt zu sein¹⁰².

Zudem spielt es aber auch bei der Vermittlung der festen Adhäsion eine wichtige Rolle.

Eine vermehrte Expression von VCAM-1 findet sich vor allem in läsionsnahen Gebieten im Atherosklerosemodell. In der Immunhistologie lassen sich VCAM-1 exprimierende Zellen darstellen. Zu Beginn der Atherosklerose zeigen sich nur einzelne Zellen positiv, später sind ganze Zellverbände anfärbbar. Diese positiven Zellen liegen vor allem nahe an bereits fortgeschrittenen Läsionen. Die Lage dieser Zellen korreliert mit der Lokalisation von Schaumzellen. Somit lässt sich nachweisen, dass im Laufe der Atherogenese immer mehr Endothelzellen positiv auf die VCAM-1-Färbung reagieren^{27,78}.

2 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1 Ziele der Arbeit

2.1.1 Morphologische Charakterisierung der Atherosklerose in ihrem Verlauf

In der vorliegenden Arbeit soll die Entwicklung der Atherosklerose im Tiermodell der ApoE-Knock-out-Maus genauer untersucht werden. Dazu werden mehrere Untersuchungsmethoden angewendet.

Ziel des ersten Abschnittes ist es, die morphologischen Veränderung in der Atherogenese in der Maus darzustellen. Bislang stützten sich diese Untersuchungen vorwiegend auf die Histologie. In dieser Arbeit werden die Tiere mit Hilfe der Duplex-Sonographie und der Intravitalmikroskopie an der Arteria carotis communis untersucht. Von Vorteil ist dabei, dass alle Veränderungen der Blutphysiologie im Gefäß während der Atheroprogression noch *in vivo* betrachtet werden können. Sowohl die Duplex-Sonographie an Aorta und Carotis der Maus, als auch die bislang an der Carotis noch nicht vorgenommene intravitale Fluoreszenzmikroskopie sollen in der vorliegenden Arbeit entwickelt und etabliert werden. Anschließend nützt man zusätzlich die Histologie zur Beurteilung des Ausmaßes der Atherosklerose.

2.1.2 Charakterisierung der für die Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand verantwortlichen Rezeptoren

Durch die Methode der Intravitalmikroskopie ist es möglich, die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion während der Atherogenese genau zu beobachten.

An diesem Modell gilt es anschließend im zweiten Abschnitt, die molekularen Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion durch Einsatz blockierender monoklonaler Antikörper zu charakterisieren.

2.1.3 Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogession

Im dritten Abschnitt folgt dann die Untersuchung, ob die Thrombozytenadhäsion Einfluss auf das Fortschreiten der Atherosklerose zeigt und ob die Atheroprogession durch langfristige Adhäsionshemmung durch Antikörperbehandlung verhindert oder zumindest eingedämmt werden kann.

2.2 Kinetik der Zell-Zell-Interaktion im Verlauf der Atherogenese

2.2.1 Allgemeines zum Versuchsaufbau

Um den Verlauf der Atherogenese im Detail darzustellen, werden mehrere verschiedene Untersuchungsmethoden angewendet. Folgende Vorgehensweise wird bei jedem Versuchstier verfolgt:

Zunächst werden alle Tiere mit Duplex-Sonographie an der Aorta abdominalis und der Carotis communis untersucht. Anschließend stellt man die Thrombozyten- bzw. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie dar. Am Ende jedes Versuches werden Organe und Gefäße bei -80°C gefrierkonserviert und später histologisch aufgearbeitet. In der Histologie werden zunächst Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Aorta und der Carotis vorgenommen. Der direkte Nachweis der Atherosklerose in den Gefäßen erfolgt durch Fettfärbung (Sudan III) in der pathologisch-anatomischen Untersuchung. Für das Messen der Ausdehnung arteriosklerotischer Veränderungen in der Histomorphometrie verwendet man die van Giesson-Färbung.

2.2.2 Versuchstiere

2.2.2.1 Das Knock-out-Modell

Es werden insgesamt 120 Tiere für die vorliegenden Untersuchungen eingesetzt.

Als Kontrolle dienen Wildtyp-Mäuse (C57Bl/6J, Charles River, Frankreich). Beim Knock-out handelt es sich um C57Bl/6-ApoE^{-/-} (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Im Versuch werden ausschließlich männliche Tiere verwendet, da sich beim Knock-out-Modell hier die atherosklerotischen Läsionen wesentlich früher und auffälliger zeigen als bei weiblichen Tieren^{13,102}.

2.2.2.2 Haltung

Wildtypen und ApoE-Mäuse werden aus den kommerziell erworbenen Pärchen (siehe oben) nachgezüchtet. Hierzu werden die Elterntiere (jeweils sechs weibliche und drei männliche Tiere) regelmäßig verpaart und die Jungtiere im Alter von vier Wochen abgesetzt. Ab diesem Zeitpunkt beginnt bei den ApoE-defizienten Mäusen die cholesterinreiche Fütterung. Die Knock-out-Nachzucht wird stichprobenweise genotypisiert, um das Vorhandensein der homozygoten Genveränderung zu kontrollieren.

Die Mäuse werden alle in Gruppen zu jeweils 6 bis 10 Tieren in Käfigen vom Makrolon-Typ III gehalten. Wasser und Futter stehen den Mäusen ad libitum zur Verfügung, wobei die Wildtypen herkömmliches Erhaltungsfutter (Erhaltungsdiet, Fa. Altromin, Lage), die ApoE-defizienten Tiere jedoch cholesterinreiche Diät (Western-type-diet, Harlan-Winkelmann, Niederlande) erhalten.

Die Einstreu besteht aus entkeimtem und entstaubtem Weichholzgranulat (Tiereinstreu „Faser“, Fa. Altromin, Lage), welches zweimal wöchentlich gewechselt wird. Weiterhin stehen allen Versuchstieren entkeimte Kriechröhren aus Pappe und Nestbaumaterial aus sterilisiertem Zellstoff zur Verfügung. Die Raumtemperatur beträgt bei konstantem Luftwechsel 20 bis 25°C, die Luftfeuchtigkeit 60 bis 70%. Die Tiere werden bei regeltem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden Dauer gehalten. Die Lichtintensität bei Tag beträgt 50 bis 100 Lux.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 25.05.1998) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2.2.3 Anzahl und Einteilung der Versuchsgruppen

2.2.2.3.1 Morphologische Charakterisierung der Atherosklerose in ihrem Verlauf

In Vorversuchen zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Wildtypen unabhängig von ihrem Alter im hier angeführten Untersuchungszeitraum bei handelsüblichem Erhaltungsfutter keinerlei atherosklerotische Veränderungen nachweisen. Deswegen werden die in den folgenden Versuchen verwendeten Wildtypen nach Absetzen von der Mutter (im Alter von vier Wochen) für die Dauer von acht Wochen mit cholesterinarmen Futter versorgt, dies liegt im Mittel der zu untersuchenden ApoE-Knock-out-Gruppen. Die in den Versuchen aufgeführten Wildtypen (WT) beziehen sich ausschließlich auf die eben genannte Gruppe.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die ApoE-Knock-out-Mäuse setzt man im Alter von vier Wochen von der Mutter ab und füttert sie von diesem Zeitpunkt an für unterschiedliche Dauer mit einer cholesterinreichen Diät. Die Versuchsgruppen sind nach der Anzahl der Fütterungswochen geordnet (siehe Tab. 3). Sie werden im folgenden mit Wildtyp (WT) oder mit Knock-out (ApoE) und Anzahl der Wochen cholesterinreicher Fütterung bezeichnet, z.B. zwei Wochen cholesterinreiche Fütterung: ApoE-2Wo, vier Wochen Fütterung: ApoE-4Wo usw..

Als Bezugsgröße dient der Mäusestamm C57/Bl/6J, der genetische Hintergrund der ApoE -/- Maus.

Tabelle 3

Gruppeneinteilung und Erklärung der folgend verwendeten Abkürzungen

Gruppenbezeichnung	Wildtyp	ApoE-Knock-out 2 Wochen Cholesterinfutter	ApoE-Knock-out 4 Wochen Cholesterinfutter	ApoE-Knock-out 6 Wochen Cholesterinfutter	ApoE-Knock-out 12 Wochen Cholesterinfutter	ApoE-Knock-out 18 Wochen Cholesterinfutter
Abkürzung	WT	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo

Zur duplex-sonographische Untersuchung (Duplex) der Atheroprogression werden jeweils 20 Mäuse verwendet. Anschließend werden diese 20 Tiere pro Gruppe der Intravitalmikroskopie (IVM) zugeführt. Dabei werden zehn Mäuse zur Mikroskopie präpariert, die verbleibenden zehn Tiere dienen als Blutspender.

Tabelle 4

Tierzahlen und Verwendung pro Gruppe

Gruppe	WT	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-8Wo	ApoE-10Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
Duplex	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20
IVM								
Spend.	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10			n = 10	n = 10
Empf.	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10			n = 10	n = 10

Spend. = Spendertier für die Intravitalmikroskopie

Empf. = zur Intravitalmikroskopie präpariertes Tier, dem die Blutzellen eines Spendertieres verabreicht werden.

2.2.2.3.2 Charakterisierung der für die Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand verantwortlichen Rezeptoren

In dieser Versuchsreihe werden die Thrombozyten von Tieren aus der ApoE-6Wo Gruppe mit verschiedenen Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle behandelt. Als Vergleich dienen sechs Wochen cholesterinreich gefütterte ApoE-Mäuse ohne vorbehandelte Thrombozyten (ApoE-6Wo aus Kap. 3.2.2.3.1).

Tabelle 5

Molekulare Mechanismen der Thrombozytenadhäsion
Gruppen und Anzahl der verwendeten Tiere

Gruppe	ApoE-6Wo Thrombozyten unbehandelt	ApoE-6Wo Thrombozyten + anti-GPIba	ApoE-6Wo Thrombozyten + anti-GPIIb-IIIa
Anzahl	n = 8 (9+10 verst.)	n = 4	n = 4

2.2.2.3.3 Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression

In dieser Versuchsreihe werden die ApoE-Knock-out-Mäuse nach Beginn der cholesterinreichen Fütterung für 12 Wochen mit dem Antikörper gegen GPIIb/IIIa behandelt. Als Kontrolle dienen mit einem für die Adhäsion irrelevanten Antikörper (IgG) behandelte und unbehandelte 12 Wochen cholesterin-gefütterte ApoE-Mäuse.

Tabelle 6

Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression.

Gruppe	ApoE-12Wo	ApoE-12Wo + 12 Wo IgG	ApoE-12Wo + 12 Wo anti-GPIIb-IIIa
Duplex	n = 20	n = 4	n = 4
Histomorphometrie	n = 4	n = 4	n = 4

Anzahl und Art der Untersuchung. Für die Duplex-Sonographie werden die Werte der unter 3.2.2.3.1 beschriebenen ApoE-12Wo-Tiere verwendet. Zur histomorphometrischen Auswertung werden aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes nur vier Tiere herangezogen.

2.2.3 Allgemeines Vorgehen

Am Tag vor der eigentlichen Operation untersucht man alle Tiere einer Gruppe mit der Duplex-Sonographie an der abdominalen Aorta und der A. carotis. Tags darauf erfolgt dann die Präparation und Intravitalmikroskopie der Tiere. Am Ende jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung werden die Tiere durch Entbluten getötet und anschließend beide Carotiden, die Aorta, sowie Herz, Lunge, Milz, Leber, Nieren und Gehirn für histologische Untersuchungen entnommen und eingefroren.

2.2.4 Narkose

Die Mäuse werden für kurzfristige und nicht schmerzhaftige Untersuchungen (z.B. Duplex-Sonographie) durch Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene[®], Abbott) (Verdampfer: Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickemeyer, Tuttlingen) und Sauerstoff anästhesiert. Für die Präparation zur Intravitalmikroskopie wird jedoch eine Kombinationsanästhesie aus Fentanyl (0,05 mg/kg, Fa. CuraMed Pharma GmbH) Midazolam (5 mg/kg, Fa. Ratiopharm) und Medetomidin (0,5 mg/kg, Fa. Pfizer) intraperitoneal appliziert⁶¹. Bei dieser Art der Injektionsnarkose ist eine anhaltende Wirkung über zwei bis drei Stunden, somit über die ganze Dauer des Versuches gesichert.

Während der gesamten Operation wird dem Versuchstier zur besseren Oxygenierung Sauerstoff über die Nasenmaske zugeführt.

Tabelle 7

Übersicht der Narkose-Anwendung bei verschiedenen Eingriffen.

Art des Versuchs	Narkose
Injektion von Antikörpern, Blutentnahme	Isofluran-Narkose
Duplex-Sonographie	Isofluran-Narkose
Intravitalmikroskopie	Einleitung mit Isofluran, Erhaltung durch Injektion der Medetomidin-Midazolam-Fentanyl-Kombination

2.2.5 Duplex-Sonographie

Zur Ultraschalluntersuchung erhält jede Maus eine Inhalationsnarkose. Das schlafende Tier wird auf einer Wärmematte (39 °C) (Fa. Dehner) mit Klebestreifen in Rückenlage fixiert¹⁹. Über eine Nasenmaske wird durchgehend ein Sauerstoff-Isfluran-Gemisch verabreicht. Zur Narkose-Einleitung liegt der Isflurangehalt bei 5%, bei ausreichender Anästhesietiefe wird die Narkose bei 1,5% aufrechterhalten. Anschließend wird das Fell an den zu untersuchenden Stellen, also in der Bauchregion und lateral am Hals, mit warmer Seifenlösung befeuchtet, um Lufteinschlüsse zwischen Haut, Fell, Ultraschallgel und Schallkopf zu vermeiden. Daraufhin wird Ultraschallgel aufgetragen¹⁹. Die Duplex-Sonographie erfolgt mit einem Acuson Sequoia-Gerät 512 und einem hochauflösenden 15 Megahertz-Schallkopf (beides Acuson, Denver, USA)^{52,93,155}. Gemessen werden sodann die Flussraten (V) am Ende der Diastole (V_{dia}) und in der Systole (V_{sys}) in m/s, sowie der sog. „Resistance Index“ (RI), der sich aus der Differenz zwischen V_{sys} und V_{dia} geteilt durch V_{sys} zusammensetzt.

$$\text{RI} = (V_{\text{sys}} - V_{\text{dia}}) / V_{\text{sys}}$$

Diese drei Werte (V_{sys} , V_{dia} und RI) werden zur Auswertung in eine Excel-Tabelle übertragen (Microsoft Office 2000, Excel). Der RI ist ein Mass für die Elastizität der Gefäße. Mit Zunahme der Atherosklerose nimmt die Elastizität der Gefäße, z.B. durch Plaque-Bildung und Kalkeinlagerungen ab und der RI steigt an.

Von der Aorta abdominalis werden an jedem Tier sechs Messwerte evaluiert und später gemittelt, von der A. carotis hingegen werden drei Messwerte gemittelt. Pro Gruppe werden jeweils 20 Tiere untersucht und von diesen ein Mittelwert gebildet.

2.2.6 Intravitalmikroskopie

Die Untersuchung des Blutflusses in der A. carotis erfolgt durch ein Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop (Axiotech^{vario} 100 HD, Fa. Zeiss, Göttingen). Als Lichtquelle dient eine Quecksilber-Kurzbogen-Höchstdrucklampe (Hg-Höchstdrucklampe, HBO 100W, Fa. Zeiss, Göttingen), die ein für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (siehe unter 4.5) entsprechendes Strahlenspektrum aufweist. Im Mikroskop befinden sich die für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe geeigneten Filter (siehe unter 3.1.8).

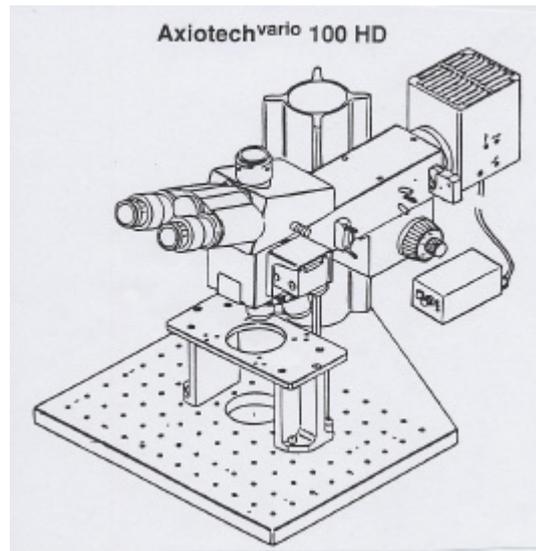


Abbildung 10

Mikroskop für die Intravitalmikroskopie, Axiotech^{vario} 100 HD (Zeiss, Göttingen) ¹⁵⁷

2.2.7 Prinzipien der Fluoreszenzmikroskopie

2.2.7.1 Allgemeine Voraussetzungen

In der Fluoreszenzmikroskopie werden die zu untersuchenden Zellen mit speziellen Reagenzien behandelt, die in der Lage sind, Licht für kurze Zeit aufzunehmen und dann wieder abzustrahlen. Fluoreszierende Zellen absorbieren in das Anregungslicht in einem bestimmten Spektrallichtbereich (λ_1) und emittieren das Licht in einer 20 bis 50 nm größeren Wellenlänge (λ_2). Dieses Phänomen wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet.

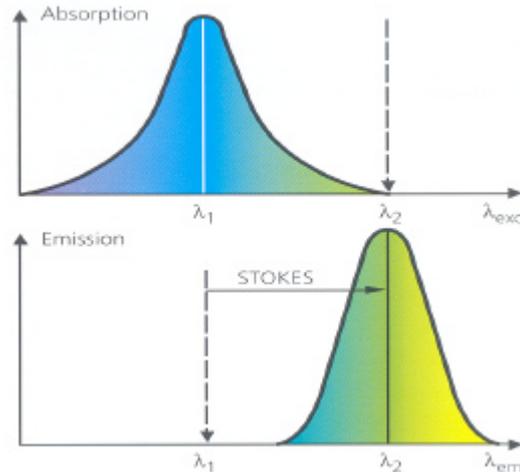


Abbildung 11

Fluorophore absorbieren in einem schmalen Spektralbereich das Anregungslicht (λ_1) und emittieren Licht in einem Bereich mit größerer Wellenlänge (λ_2). Dazwischen liegt die Stokes-Verschiebung¹⁵⁸.

Diesen Effekt macht man sich im Strahlengang des Mikroskopes zur Auftrennung von Anregungslicht (kurzwellig) und Emissionslicht (langwellig) zu Nutze. Die untenstehende Abbildung (Abb. 12) zeigt den Strahlengang in einem Fluoreszenzmikroskop. Von einer starken Lichtquelle (HBO 100W) gelangt das kurzwellige Licht über einen Kollektor zum Anregungsfilter (Exzitationsfilter, SP = „short pass“, wie der Name sagt, lässt dieser Filter kurzwelliges Licht passieren). Der Farbteiler reflektiert das kurzwellige Anregungslicht über das Objektiv auf die zu untersuchenden Zellen. Das durch die Fluoreszenzfarbstoffe entstehende Emissionslicht ist langwelliger und kann den Farbteiler ungehindert passieren. Um evtl. noch vorhandenes Restanregungslicht, welches in der Detektion der Fluoreszenz störend wirken würde, zu vermeiden, wird vor die Kamera ein Sperrfilter eingebaut. Dieser Filter wird auch als Emissionsfilter (oder LP = „long pass“, lässt nur langwellige Strahlen passieren) bezeichnet, weil er nur das vom Objekt emittierte Licht passieren lässt.

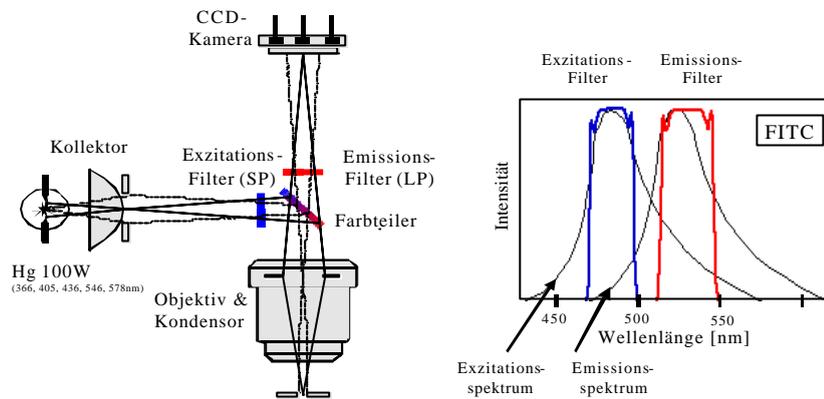


Abbildung 12

Allgemeiner Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskopes.

Rechts im Bild: Der Strahl aus der Lichtquelle wird durch einen Exzitationsfilter und einen Farbteiler auf das Objekt gelenkt. Vom Objekt emittierte Strahlen gelangen durch den Emissionfilter in die CCD-Kamera (charged coupled device). Links im Bild: Aufschlüsselung von Exzitations- und Emissionsspektrum zur Festlegung der Filterwahl am Beispiel des Fluoreszenzfarbstoffes FITC (Fluoresceinisothiocyanat). Modifiziert nach:¹⁵⁸

2.2.7.2 Aufbau des Arbeitsplatzes

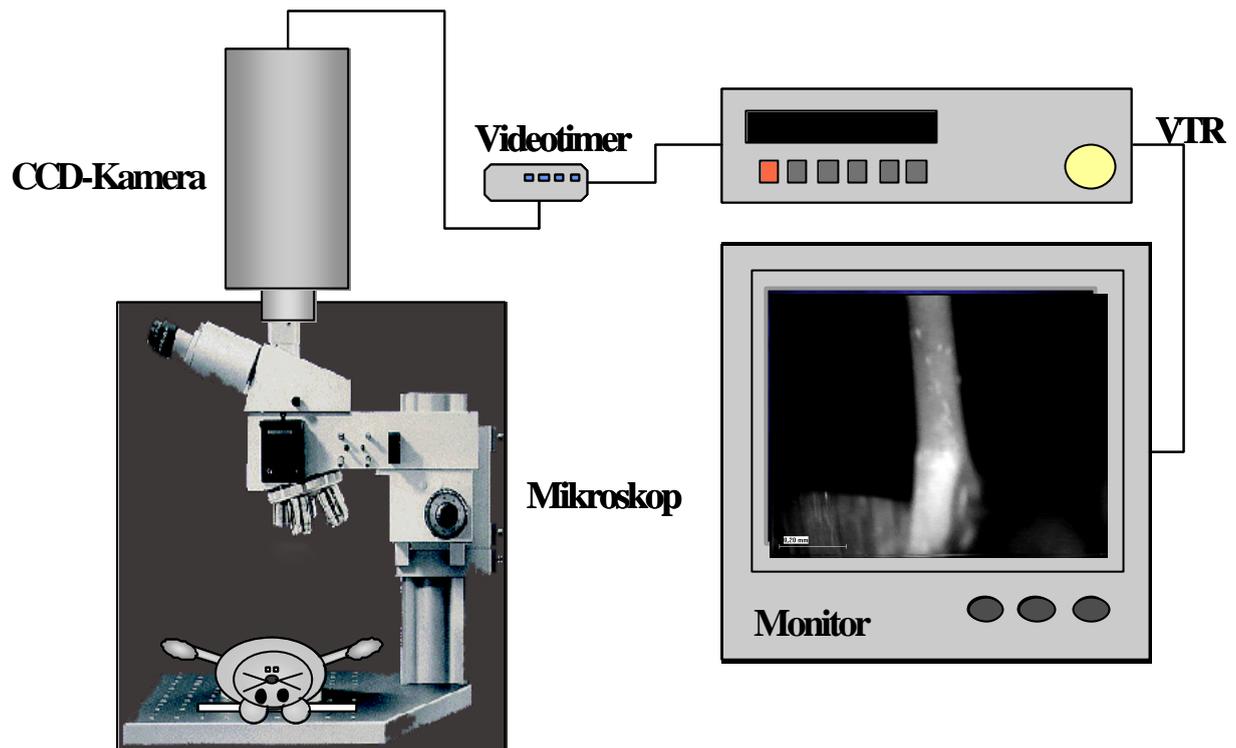


Abbildung 13

Schematischer Aufbau des IVM-Arbeitsplatzes:

Links: Die präparierte Maus liegt unter dem Fluoreszenzmikroskop, emittierte fluoreszierende Strahlen (siehe Abb. 11) werden von der CCD-Kamera aufgenommen und über einen Videotimer an den Videorekorder weitergeben.

Rechts: Auswerteeinheit, bestehend aus Videorekorder und Monitor.

2.2.8 Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Intravitalmikroskopie können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden. Im Vorfeld der Versuche muss geklärt sein, welche Zellen angefärbt und betrachtet werden sollen. In vorliegendem Versuchsvorhaben stehen sowohl Thrombozyten, als auch Leukozyten im Vordergrund des Interesses.

Um die Leukozyten *in vivo* anzufärben, werden 100 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 6G (Molecular Probes, USA) über einen Katheter in der V. jugularis dextra in einer Konzentration von 0,02% ins Gefäßsystem eingebracht. Dieser Farbstoff bindet direkt im Gefäßsystem an das Cytochrom C in Leukozyten⁴. Diese Art der Fluoreszenzmarkierung macht es möglich, die Leukozytenpopulation auch bei hoher Flussgeschwindigkeit im Zentralstrom des Blutflusses gut darzustellen⁴ und später in der Auswertung zu erfassen. Die Anregungswellenlänge für Rhodamin 6G liegt bei 530 nm, die Emissionswellenlänge bei 590 nm (siehe Abb. 14). Anders als bei Leukozyten erfolgt die Färbung der Thrombozyten *ex vivo*, da eine spezifische Markierung von Thrombozyten durch i.v.-Injektion eines Fluoreszenzfarbstoffes nicht möglich ist.

Die zu untersuchenden Thrombozyten werden daher *ex vivo* mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF (2,7-Dihchlorodihydrofluorescein-Diacetat, Fa. Molecular Probes, USA) markiert. Für diesen Farbstoff liegt die Anregung bei 513 nm und die Emission bei 532 nm (siehe Abb. 15). Aufgrund der verschiedenen Anregungswellenlänge können beide Zelltypen in einem Untersuchungsgang und somit in identischen Gefäßsegmenten betrachtet werden. Dies wird durch Wechseln der Filtersätze für den Farbstoff Rhodamin und DCF ermöglicht.

Im Mikroskop werden Filter verwendet, die den Fluoreszenzfarbstoffen entsprechen (Filter für Leukozytendetektion: Filterset 09, Fa. Zeiss, Göttingen, Thrombozyten: Filterset 15, Fa. Zeiss, Göttingen)¹¹⁸.

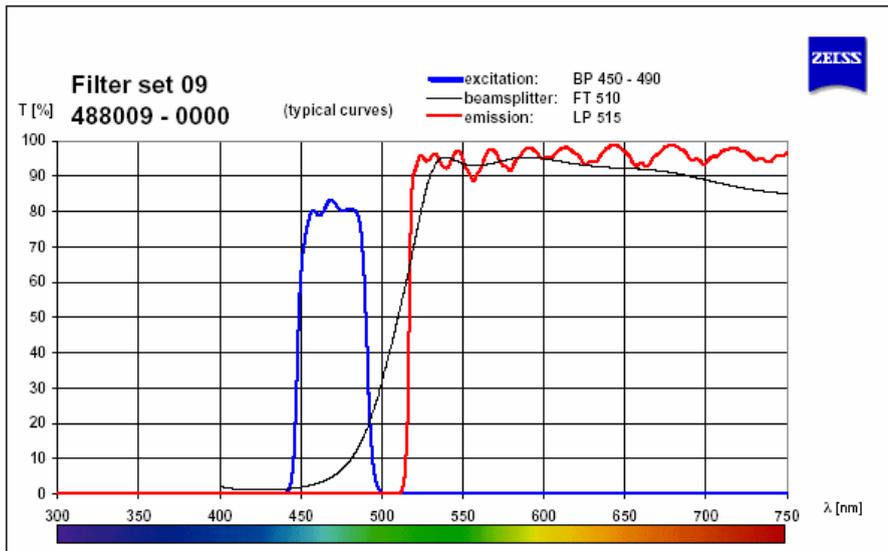


Abbildung 14

Fluoreszenzfilter für die Leukozyten-Detektion mit Rhodamin 6G¹⁵⁸

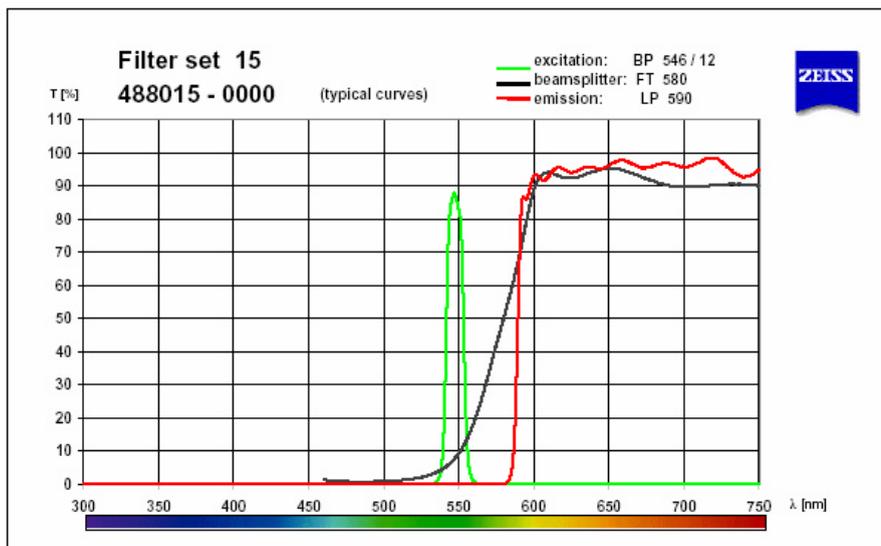


Abbildung 15

Fluoreszenzfilter für die Untersuchung der DCF-gelabelten Thrombozyten¹⁵⁸

2.2.9 Thrombozytenpräparation

Das Spendertier wird wie oben aufgeführt anästhesiert. Anschließend wird cardial punktiert und Blut gewonnen. Hierbei muss sehr vorsichtig vorgegangen werden, um eine Thrombozytenaktivierung zu vermeiden. Das gewonnene Blut wird durch Citrat (100µl Citrat/1ml Blut) ungerinnbar gemacht. Anschließend werden aus diesem Vollblut die Thrombozyten separiert.

Die aus dem Spendertier gewonnene Blutmenge (ca. 1,5 bis 2 ml/Tier) wird mit Tyrodes-Puffer auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt. Dies vereinfacht die spätere Handhabung und dient gleichzeitig als Waschschrift. Das Blut-Tyrodes-Gemisch wird bei 800 rpm für 20 Minuten zentrifugiert (Haereus, Megafuge, Hanau). Das hierbei entstehende sogenannte plättchenreiche Plasma (PRP) wird anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF (2,7-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat, Fa.Molecular Probes, USA) versetzt (20 µl/PRP einer Maus) und wiederum mit Tyrode pH 6,5 (Rezept Tyrode-Lösung siehe 3.7.1) aufgefüllt, diesmal auf ein Volumen von 5 ml. Das PRP wird nach 2 Minuten Inkubation mit dem Farbstoff im Dunkeln, bei 2400 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das hierbei entstehende Thrombozyten-Pellet wird in jeweils gleichen Anteilen von Tyrode pH 6,5 und pH 7,4 resuspendiert, um den Thrombozyten ein möglichst physiologisches Milieu zu bieten. Auch die Resuspension muss vorsichtig vorgenommen werden, um jegliche Voraktivierung zu vermeiden. Eine relevante Thrombozytenaktivierung im Rahmen der Thrombozytenseparation nach diesem Protokoll konnte in früheren Untersuchungen bereits ausgeschlossen werden⁴⁹.

Dem Spendertier werden nach der Blutentnahme beide Carotiden, die Aorta, das Herz, die Lunge, die Leber, die Milz, beide Nieren, sowie das Gehirn entnommen und für die spätere histologische Weiterverarbeitung bei -80°C gefrierkonserviert.

2.2.10 Bestimmung der Thrombozytenzahl

Die Thrombozytenzahl wird mit Tyrodes auf eine Konzentration von 200.000/µl eingestellt. Von dieser Thrombozytensuspension erhält jedes Empfängertier 250 µl. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Operationsbedingungen für alle Mäuse gleich sind.

Das Auszählen der Blutplättchen wird an einem Zellzählgerät (Sysmex Microcellcounter F-800, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) vorgenommen.

2.2.11 Präparation des Empfängertieres

Am eigentlichen Versuchstier beginnt die Einleitung der Narkose, wie unter 3.1.4 beschrieben, mit Isofluran. Unter dieser Inhalationsnarkose erfolgt die intraperitoneale Injektion der Langzeitanästhesie mit Medetomidin-Midazolam-Fentanyl (Dosierungen siehe 3.1.4). Sobald die Maus eine ausreichende Narkosetiefe (Stadium III₂) erreicht hat, wird sie auf einer Wärmematte in Rückenlage fixiert. Die Körpertemperatur wird durch die Heizmatte konstant bei 39°C gehalten und durch rektale Messung kontrolliert. Während der ganzen Operationsdauer verabreicht man über eine Kopfmaske Sauerstoff und kann hierüber bei Bedarf auch Isofluran beimischen. Ob das Tier ausreichend anästhesiert ist, wird durch Reizung von Zwischenzehen- und Schmerzreflex überprüft. Ist das Anästhesiestadium III₂ (chirug. Toleranz) erreicht, beginnt man mit dem Hautschnitt. Die folgenden Arbeitsschritte führt man unter einem Präpariermikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss, Göttingen) durch. Der Schnitt wird ventral in der Halsregion vom Sternum bis fast zum Kinnwinkel (Ramus mandibulae) geführt.

Anschließend trennt man die nun freiliegenden Speicheldrüsen (Glandula mandibularis) stumpf voneinander. Die rechte Speicheldrüse wird herauspräpariert, um freien Zugriff auf die V. jugularis dextra zu schaffen. Diese ligiert man kurz vor dem Verschwinden hinter dem Unterkieferknochen (Os mandibulare) mit einem Faden (Prolene[®], Fa. Ethicon, Norderstedt). Daraufhin verschließt man die Jugularvene vor dem Brusteingang mit einem Gefäßclip (Miniclip, Ysargil, Fa. Medicon). In die nun gestaute Vene wird ein Katheter gelegt (SIMS Portex, Hythe, England)¹⁰ und anschließend mit einer Ligatur fixiert.

Dieser Zugang dient der Applikation der fluoreszenzgefärbten Thrombozyten, sowie des Farbstoffes Rhodamin für die *In-vivo*-Färbung der Leukozyten. Außerdem wird über diesen Katheter während der gesamten Operationsdauer physiologische Kochsalzlösung (10 ml/kg/h, Isotonische Kochsalzlösung, Delta Pharma GmbH, Pfullingen) über einen Perfusor (Perfusor[®]fm, Fa. Braun, Melsungen) verabreicht¹⁰. Anschließend legt man die rechte A. carotis communis frei. Unter diese wird zur besseren Kontrastgebung ein kleines Stück schwarzer Folie geschoben. Daraufhin legt man das Tier auf der Wärmematte unter das Fluoreszenzmikroskop. Nun verabreicht man über den Katheter ca. 100 µl einer 0,2%igen Rhodamin-Lösung^{10,31,65,134,147}, um die Leukozyten *in vivo* anzufärben. Anschließend spült man den Zugang mit physiologischer Kochsalzlösung um daraufhin die DCF-markierten Thrombozyten zu injizieren.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zunächst wird die A. carotis bei 2,5-facher Vergrößerung zur Übersicht dargestellt und via charge coupled device (CCD)-Kamera (FK 90-IQ-S, Fa. Pieper, Düsseldorf) in eine Video-Monitor-Einheit (Videogerät: Panasonic AG-7355, Fa. Videocation, München, Monitor: Sony PVM-20M7MDE, Fa. Videocation, München)¹⁴⁸ eingespeist. Anschließend erfolgt eine kurze (15 sec.) Sequenz bei 10-facher Vergrößerung um später bei der Auswertung hieran den Durchmesser des Gefäßes zu erfassen. Daraufhin beginnt die eigentliche Intravitalmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung.

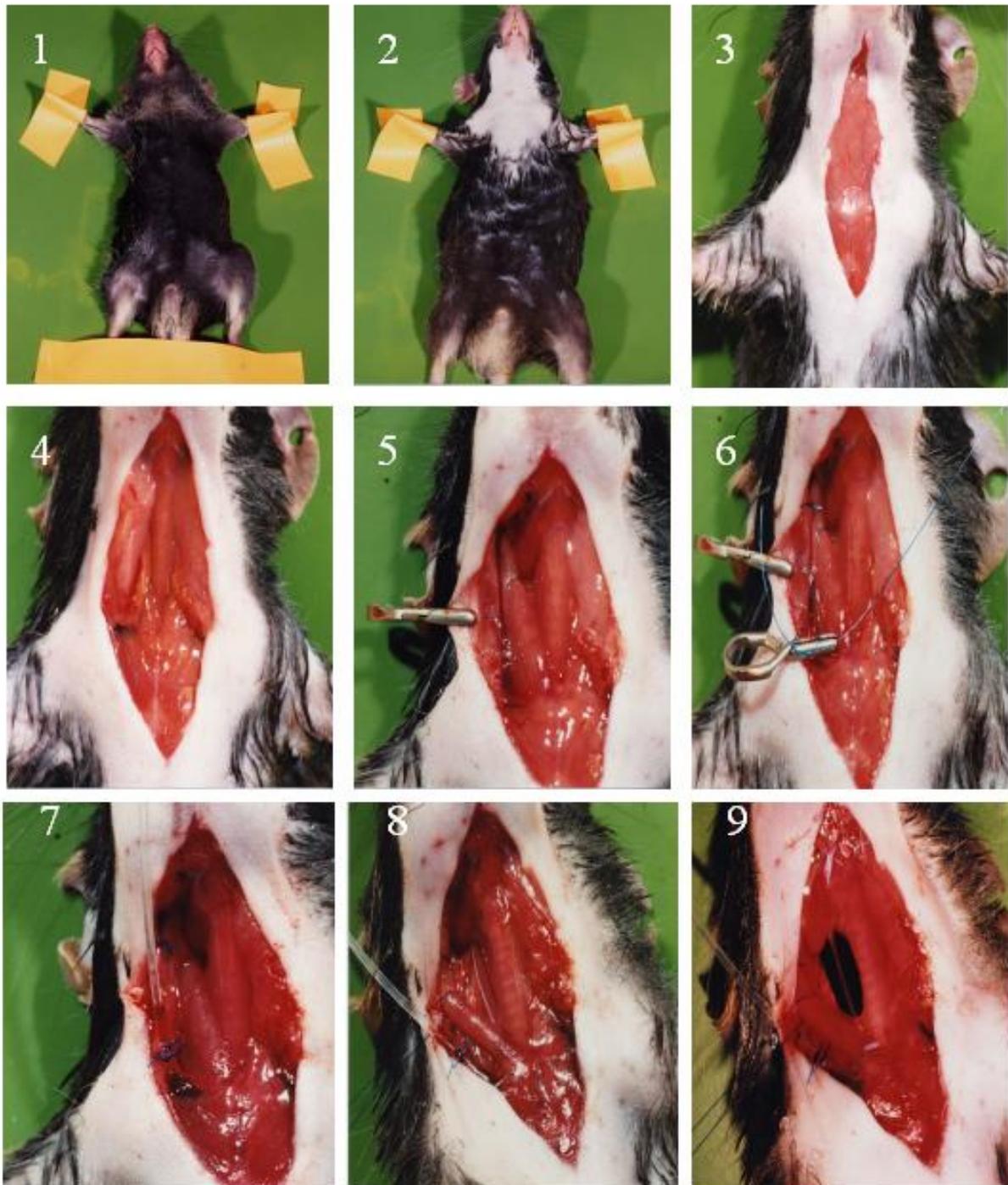


Abbildung 16

Darstellung der einzelnen Präparationsschritte für die Intravitalmikroskopie.

1: Auf Wärmematte fixierte Maus, 2: Tier vorbereitet zum Hautschnitt (enthaart und desinfiziert), 3: Inzision der Haut, 4: Stumpfe Trennung der Gll. mandibulares, 5: Freilegen der V. jugularis, 6: Stauung der V. jugularis vor Einbringen des Katheters, 7: Fixation des Katheters in der Halsvene, 8: Weitere Präparation bis zum Freilegen der A. carotis, 9: Vorbereitung der A. carotis zur Intravitalmikroskopie.

2.2.12 Mikroskopierschema

Erst bei 20-facher Vergrößerung können die einzelnen Blutzellen im Fluss in der A. carotis dargestellt werden. Hierbei wird folgendes Schema angewendet:

Zunächst werden vier Ausschnitte, von proximal nach distal fortschreitend, an der A. carotis communis untersucht. Dabei werden jeweils 30 Sekunden im Fluoreszenzfilter der Leukozytendetektion und 30 Sekunden im Thrombozytenfilter auf das Videoband aufgenommen. Somit liegt das erste Messfenster herznahe, die folgenden Ausschnitte werden dann Stück für Stück weiter distal Richtung Bifurkation gelegt. An der Bifurkation der Carotis werden dann zwei weitere Fenster untersucht, auch hier jeweils 30 Sekunden im Leukozyten- und im Thrombozytenfilter.

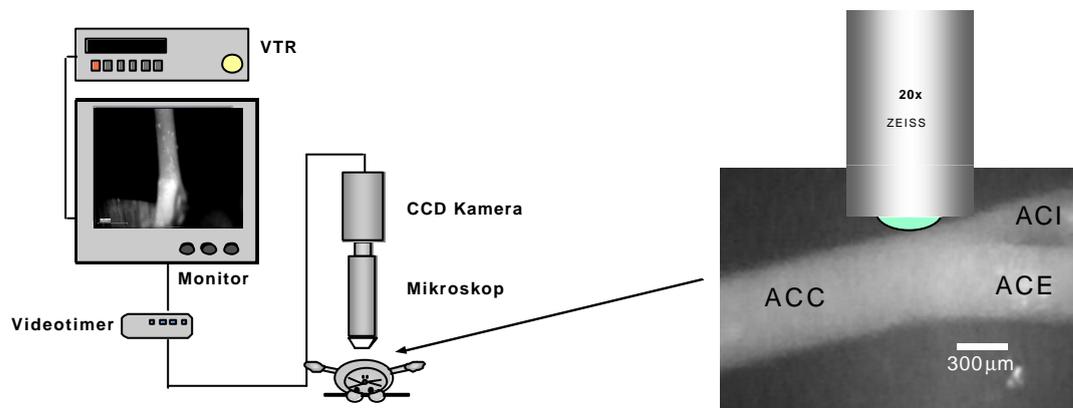


Abbildung 17

Mikroskopierschema:

Links: Der schematische Aufbau des IVM-Arbeitsplatzes

Rechts: Vergrößerter Ausschnitt des Untersuchungsfeldes (ACC: A. carotis communis, ACE: A. carotis externa, ACI: A. carotis interna).

Alle Sequenzen werden über die CCD-Kamera und die Videoeinheit aufgenommen und später ausgewertet. Am Ende der Intravitalmikroskopie wird das Tier durch Entbluten geopfert und alle Organe und Gefäße werden, wie oben beschrieben, entnommen und bei -80°C für die spätere histologische bzw. molekularbiologische Aufarbeitung asserviert.

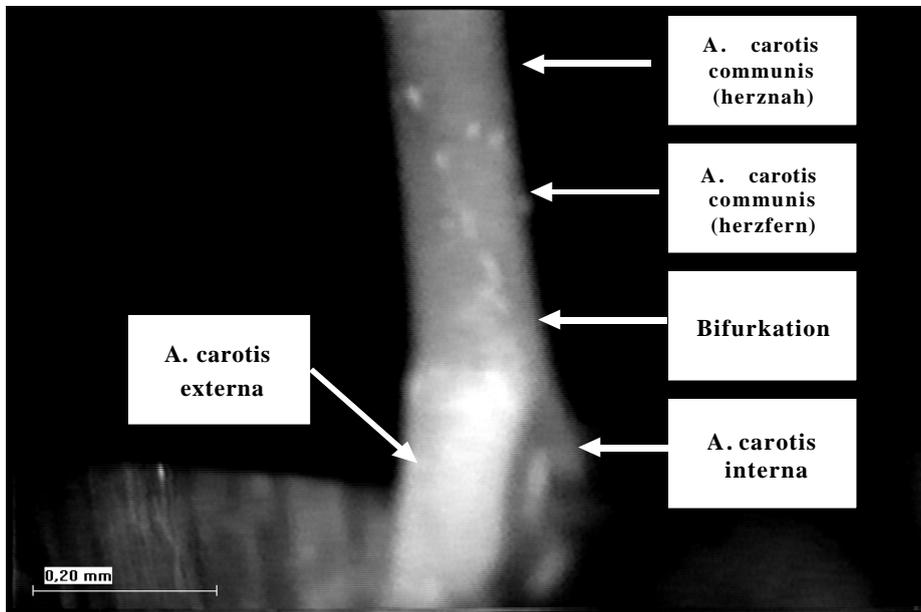


Abbildung 18

Detailaufnahme (Livebild) der rechten A. carotis von proximal (herznah) nach distal (Bifurkation).

2.2.13 Dokumentation

Alle wichtigen Parameter zum einzelnen Versuch werden bei den Video-Aufzeichnungen mit einem Mikrophon dokumentiert. Hierbei werden Fütterungswoche, Tiernummer, Vergrößerung, Lokalisation des Messfensters und der jeweilige Fluoreszenzfilter (für Thrombozyten bzw. Leukozyten) angegeben.

Insgesamt setzt sich die Aufzeichnung aus folgenden Komponenten zusammen:

- 15 Sekunden Übersicht bei 2,5-facher Vergrößerung, um evtl. Veränderungen am Gefäß festzustellen
- 15 Sekunden Übersicht bei 10-facher Vergrößerung, um den Gefäßdurchmesser für die spätere Auswertung messen zu können
- 30 Sekunden Thrombozyten bzw. Leukozyten bei jedem Messfenster mit 20-facher Vergrößerung, vier Fenster an der A. carotis communis, zwei an der Bifurkation.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.2.13.1 Protokoll für die Auswertung der IVM

2.2.13.1.1 Datenblatt für Einzeltierauswertung

<u>A. Carotis comm.</u>							
Gruppennummer:							
Tiernummer:							
Datum:							
Genotyp:							
Diameter A. carotis comm. (10x):							
ROI	DIA (mm)	LENGTH (mm)	Area (mm)	trans.-adh. Pl.	trans.-adh. Pl.		
				abs.	(1/mm ²)	MW	SEM
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
ROI	DIA (mm)	LENGTH (mm)	Area (mm)	roll. Pl.	roll. Pl.		
				abs.	(1/mm ²)	MW	SEM
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
ROI	DIA (mm)	LENGTH (mm)	Area (mm)	adh. Pl.	adh. Pl.		
				abs	(1/mm ²)	MW	SEM
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

ROI: "region of interest", Auswerteregion, DIA: „diameter“ , Breite der Auswerteregion,
 Area: Fläche des Auswertefensters, Pl: Plättchen, trans.-adh.: transient-adhärenente
 Thrombozyten, roll: rollende Thrombozyten, adh: adhärenente Thrombozyten

MW: Mittelwert

SEM: „standard error mean“, Standardfehler

2.2.13.1.2 Datenblatt für Zusammenfassung einer OP-Gruppe

<u>A. Carotis communis</u>									
Gruppennummer:									
Genotyp:									
Tier	Trans. Adh. Tz			Rollende Tz			Adh. Tz		
	1/sec/mm	MW	SEM	1/sec/mm	MW	SEM	1/mm ²	MW	SEM
Nr. 1									
Nr. 2									
Nr. 3									
Nr. 4									
Nr. 5									
Nr. 6									
Nr. 7									
Nr. 8									
Nr. 9									
Nr. 10									

MW: Mittelwert

SEM: „standard error mean“, Standardfehler

2.2.14 OP-Protokoll

Über jede OP-Gruppe (beinhaltet jeweils ein Spender- und ein Empfängertier) wird Protokoll geführt.

Auf diesem Datenblatt werden Gruppennummer, Datum, Tiernummer und -geschlecht, Gewicht und Genotyp notiert. Außerdem hält man hier auch die Präparationszeit, die Dauer der Aufzeichnungsphase und die Zeit von Thrombozytengewinnung bis zu deren Injektion fest.

Des Weiteren wird die gewonnene Blutmenge der Spendertiere und die daraus resultierende Thrombozytenzahl, sowie die genaue Anzahl der Videominuten mit Start- und Endzeitpunkt

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

und Bandnummer notiert. Außerdem dokumentiert man eventuelle Besonderheiten bei der Präparation, Mikroskopie oder Thrombozytenseparation.

<u>IVM A.carotis</u>		
Gruppennummer/Fütterungswoche:		
Tiernummer:		
Datum:		
Empfänger-Nummer:		
Gewicht (Empfänger):	Tierart:	
Geschlecht:		
Spender-Nummer:		
Gewicht (Spender):	Tierart:	
Geschlecht:		
Dauer der Präparation:		
Dauer der IVM:		
Dauer der Pl.-Isolierung (BE bis Inj.):		
Videotape-Nummer:		
Plättchencount:		
Gewonnene Blutmenge Spender:		
Duplex:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Histologie:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Anmerkungen:		

Abbildung 19

Schematische Darstellung eines OP-Protokolls

BE: Blutentnahme, IVM: Intravitalmikroskopie, Pl.: Plättchen, Inj.: Injektion

2.2.15 Auswertung der Videoaufzeichnungen

Die Auswertung der Videoaufnahmen erfolgt zeitlich unabhängig von der Intravitalmikroskopie. Hierbei werden die aufgezeichneten Sequenzen im Bild-zu-Bild-Verfahren ausgewertet. Das heißt, es werden alle Bilder nacheinander beurteilt und dort die transient-adhärenenten, rollenden und fest adhärierenden Zellen einzeln ausgezählt. Als „transient-adhärenent“ wird eine Zelle bezeichnet, die langsamer als der Hauptstrom fließt und über mehr als fünf Einzelbilder an der gleichen Stelle haftet. Wenn Zellen länger als zehn

Sekunden am gleichen Punkt auf dem Endothel verbleiben, werden sie als „adhärent“ bezeichnet.

Zur Auszählung wird auf dem Bildschirm ein ausgemessenes Fenster aufgeklebt. Dieses hat bei 20-facher Vergrößerung eine definierte Seitenlänge von $150 \times 100 \mu\text{m}$. Daraus ergibt sich folgende Formel für die Zellen/Fläche, die Rundung des Gefäßes miteinbezogen.

Gefäßdurchmesser in Mikrometer \times Kreiszahl $p \times 2x \sin^{-1}(\text{Breite des Messfensters in } \mu\text{m} / \text{Gefäßdurchmesser}) \times \text{Länge des Messfensters in } \mu\text{m}$

Die ausgezählten Zellen werden anschließend in eine Tabelle (Microsoft Office 2000, Excel) eingetragen und zusammengefasst.

2.2.16 Histologie

2.2.16.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung (Sudan III-Färbung)

Zur Darstellung der Progression der Atherosklerose werden von jeder Gruppe fünf makroskopische Präparate angefertigt. Dazu wählt man die Sudan III-Färbung (Sudan III C.I. 26100, Fa. Merck, Darmstadt), weil hier alle Fetteinlagerungen, somit auch die in atherosklerotischen Plaques, deutlich rot angefärbt werden. Hierzu fixiert man die Carotiden nach Entnahme in 4%igem Formalin (Rezept siehe 3.7.2). Nach maximal 12 Stunden Fixation in 4%igem Paraformaldehyd werden die Carotiden von jeglichem aufgelagerten Fett- und Bindegewebe befreit und der Länge nach aufgeschnitten. Anschließend verbringt man die so präparierten Carotiden in 70%igen Alkohol für fünf Minuten und legt danach die Gefäße in die Sudan III-Färbelösung ein. Dort verbleiben sie für 15 bis 20 Minuten. Nach dem Färbeschritt folgt nochmals eine Spülung in Aqua dest.. Dann werden die Gefäße auf Objektträgern (Micro Slides, Fa. Brand, Wertheim) ausgebreitet, mit einem Tropfen Eindeckmedium (Aquatex, Fa. Merck, Darmstadt) versehen und mit Deckgläsern (Deckglas $24 \times 50 \text{mm}$, Fa. Roth, Karlsruhe) abgedeckt.

Die so hergestellten Präparate werden mit einem Slide-Scanner digitalisiert und die Plaque-Fläche in μm^2 im Auswertesystem (Cap Image, Version 7.4, Dr. Zeintl, Heidelberg)^{10,147} quantifiziert.

2.2.16.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H & E)

Von den Tieren aller Gruppen werden sowohl von den Carotiden, als auch von den Aorten histologische Serienschnitte angefertigt und der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Protokoll siehe Romeis¹²³) unterzogen. Die Schnitte der Carotiden beurteilt man anschließend histomorphologisch (siehe unten). Die Objektträger werden mikroskopiert (Mikroskop: Leica DMRB, Fa. Leica, Bensheim) und die Schnitte mit einer Digitalkamera (Axiovision, Fa. Zeiss, Göttingen) dokumentiert und in Abbildungen nach Fütterungswochen sortiert zusammengestellt.

2.2.17 Immunhistologie auf „vascular cellular adhesion molecule-1“ (VCAM-1)

VCAM-1 ist ein Indikator für das chemotaktische Potential des Endothels und Subendothels. In der Immunhistologie untersucht man die Schnitte von Aorten aller Fütterungswochengruppen auf VCAM-1. Von den entnommenen Carotiden werden Gefrierschnitte mit einer Dicke von fünf Mikrometern angefertigt und auf Objektträger verbracht. Anschließend verbringt man diese Objektträger für zehn Minuten zur Antigen-Demaskierung bei 4°C in Aceton. Daraufhin folgt eine dreimalige kurze Spülung in „phosphate buffered saline“ (PBS). Dann werden die Schnitte für 20 Minuten in eine Lösung aus 0,3% Wasserstoffperoxid und Methanol gelegt, anschließend, wie oben aufgeführt, in PBS gespült. Ab diesem Arbeitsschritt erfolgt die weitere Färbung maschinell (Färbeautomat TechMate, Fa. Dako, Programm PolyA25M, Vectastain Elite ABC-Kit, Fa. Linaris). Die Verdünnung des Antikörpers gegen VCAM-1 von 1:500 ergab bei Vorversuchen mit manueller Färbetechnik die besten Resultate und wurde deswegen auch zur maschinellen Färbung eingesetzt.

Die Beurteilung der Expression dieses Adhäsionsmoleküls wird in einem subjektiven Verfahren durchgeführt.

(Je nach Stärke der Anfärbung werden die einzelnen Schnitte mit + für wenig, bis +++ für maximale Expression gewertet. Wobei die Klassifizierung

„+“ für eine Antikörper-positive Anfärbung von nur einzelnen Zellen steht,

„++“ für mehrere Einzelzellen und kleine Zellgruppen und

„+++“ für ganze Zellverbände.)

2.3 Molekulare Mechanismen der Thrombozytenadhäsion

Um die Bedeutung der Thrombozyten für die Atheroprogression zu klären, müssen zunächst die molekularen Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Atherosklerose verstanden werden.

Da viele verschiedene Membranrezeptoren für den Kontakt von Plättchen mit der Gefäßwand verantwortlich sind, stellt sich die Frage, welche dieser Adhäsionsmoleküle die wichtigste Rolle spielen. Hierbei ist anzunehmen, dass die wichtigsten Rezeptoren auch in der größten Anzahl auf der Thrombozytenmembran vorhanden sind. Tabelle 1 im Kapitel 2.2.4. zeigt die Glykoproteine IIb-IIIa und Ib α (im GPIb-V-IX-Komplex) als die am häufigsten vorkommenden adhäsionsvermittelnden Moleküle.

2.3.1 Glykoprotein Iba

Es ist bekannt, dass adhärenente Thrombozyten die Expression von inflammatorischen Genen *in vitro* induzieren^{62,82} und somit eventuell *in vivo* zur Entwicklung der Atherosklerose beitragen können. Deswegen stellt sich die Frage, ob eine Hemmung der Plättchenadhäsion die Atheroprogression verhindern kann.

Um diese Hypothese bestätigen zu können, werden die Thrombozyten ApoE-defizienter Mäuse vor Injektion in die Empfängermaus mit einem Antikörper gegen das Glykoprotein Ib α , welches über den vWF für den ersten Kontakt des Plättchens mit dem Endothel verantwortlich ist⁷, behandelt.

2.3.2 Glykoprotein IIb-IIIa

Die gleiche Vorgehensweise wendet man für den GPIIb-IIIa-Rezeptor an. Der Ligand für GPIIb-IIIa auf dem Endothel ist Fibrinogen^{11,151}. Auch hier wird durch Zugabe des Antikörpers gegen GPIIb-IIIa eine Adhäsionshemmung angestrebt.

2.3.3 Hemmung der Thrombozytenadhäsion in der Intravitalmikroskopie

Zur Hemmung der Thrombozytenadhäsion *in vivo* werden sechs Wochen Cholesterin-gefütterten ApoE-Knock-out-Mäusen antikörper-vorbehandelte Thrombozyten aus gleichaltrigen Spendern injiziert (Präparation, Menge und Färbung wie unter 3.2.9 beschrieben). Dazu werden die Spender-Thrombozyten für 10 Minuten mit 25 µg des Fab-Fragmentes von anti-GPIb α (mAB, p0p/B, zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Nieswandt)^{7, 104} oder anti-GPIIb-IIIa (JON/A-F(ab)₂, Arbeitsgruppe Nieswandt) inkubiert und anschließend dem Empfänger verabreicht. Der Antikörper p0p/B blockiert die Bindung von vWF an GPIb α und verhindert somit die Thrombozytenadhäsion an das Endothel⁷.

Die gleiche Vorgehensweise wendet man bei dem Antikörper gegen GPIIb-IIIa (JON/A-F(ab)₂) an. Auch hier werden die Thrombozyten 10 Minuten vor Injektion in die Empfängermaus mit dem Antikörper inkubiert und so die Bindung an Fibrinogen verhindert.

Als Bezugsgruppe dienen sechs Wochen gefütterte ApoE-defiziente Mäuse ohne Antikörpervorbehandlung der zu injizierenden Thrombozyten, welche ebenfalls aus sechs Wochen cholesterin-gefütterten ApoE-Mäusen stammen.

2.4 Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atherogenese

2.4.1 Chronische Blockade des GPIIb

In einer weiteren Versuchsreihe werden ApoE-defiziente Mäuse über 12 Wochen mit dem Antikörper gegen GPIb α (p0p/B, Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Nieswandt, Witten/Herdecke) behandelt. Hierfür verabreicht man den Tieren eine Anfangsdosis von 100 µg systemisch durch eine intrakardiale Punktion. Daraufhin werden die Mäuse alle drei Tage mit jeweils 50 µg Antikörper durch intraperitoneale Injektion weiterbehandelt. Für den Langzeitversuch verwendet man den vollständigen Antikörper (IgG), da dieser eine erheblich längere Halbwertszeit *in vivo* besitzt, als das im Akut-Versuch verwendete Fab-Fragment. Als Kontrollgruppe dienen zum einen unbehandelte Geschwistertiere (n=10) und zum anderen mit einem irrelevanten IgG („purified rat-IgG₁“, Fa. BD Biosciences, Heidelberg) behandelte Tiere (n = 4).

Nach Ablauf des Behandlungszeitraumes unterzieht man alle Mäuse einer Duplex-Sonographie. Anschließend werden die Mäuse euthanasiert, die Organe entnommen und

gefrierkonserviert. Auch hier fertigt man histologische Schnitte der Gefäße an und wertet sie histomorphometrisch aus (Programm: Cap Image Version 7.4, Dr. Zeintl, Heidelberg). Jeweils eine A. carotis führt man der Sudan III-Färbung zu, um dort direkt eventuell entstandene Plaques sichtbar zu machen. Auch diese Präparate werden histomorphometrisch bewertet (Programm: Cap Image Version 7.4, Dr. Zeintl, Heidelberg). Auch die Aorten dieser Antikörper-behandelten Mäuse kommen zur histologischen Aufbereitung und anschließenden immunhistochemischen Untersuchung.

2.4.2 Histomorphometrie

Um die Plaquegröße in atherosklerotisch veränderten Gefäßen festzustellen und somit einen Anhaltspunkt für das Ausmaß der Arteriosklerose zu erhalten, werden die entnommenen Gefäße histologisch aufgearbeitet und anschließend histomorphometrisch ausgewertet^{80,95,111}. Für die Histomorphometrie benötigt man 40 Serienschritte der A. carotis, beginnend in der Mitte der Carotis communis bis zur Bifurkation, mit einer Dicke von 5 µm und färbt sie nach van Giesson¹²³. Für die Untersuchung der Aorta wählt man das Gebiet des Aortenbogens. Die Schnitte werden an einem Mikroskop (Leica-DMRB, Fa. Leica, Bensheim) bei 10-facher Vergrößerung mit einer digitalen Kamera (Axiovision, Fa. Zeiss, Göttingen) abfotografiert. Daraufhin untersucht man diese Bilder im Auswerteprogramm (Cap Image, Version 7.4, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg)¹⁴⁸ histomorphometrisch. Die Plaque-Fläche im Gefäß berechnet sich aus der Differenz zwischen der „intimal area“ (Fläche, die von der Intima umgeben ist) und der „luminal area“ (noch freies Lumen) geteilt durch/normalisiert auf die „vessel area“ (von der Adventitia umgebene Fläche), um eventuelle Schwankungen in der Gefäßgröße auszugleichen (siehe Abb. 20).

(„Intimal area“ – „luminal area“)/ „vessel area“

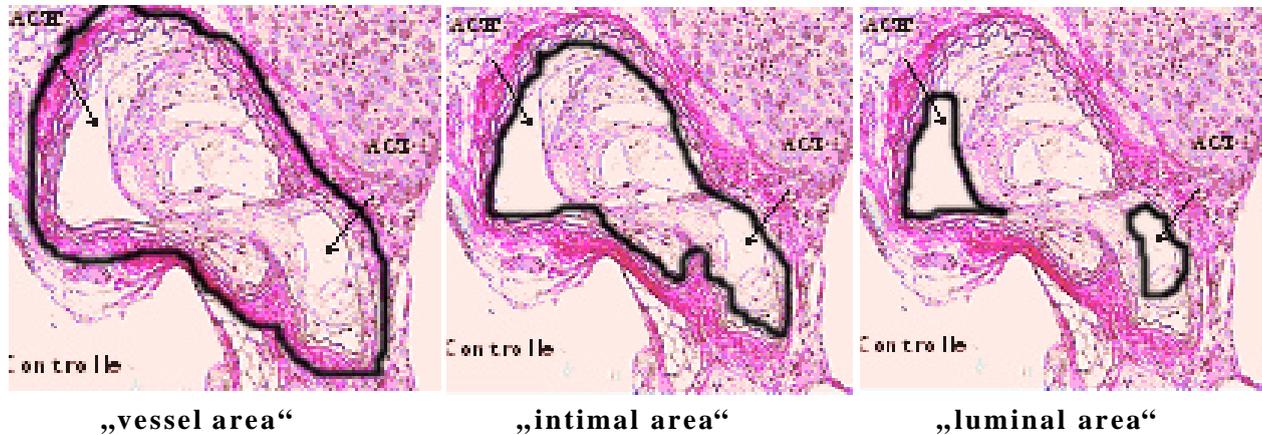


Abbildung 20

Schematische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung in der A. carotis
Im linken Bild wird die durch die Adventitia umgebene sogenannte „vessel area“
ausgemessen. Im mittleren Bild ist die durch die Intima begrenzte „intimal area“ dargestellt.
Das rechte Bild zeigt die vom Blut passierbare Fläche, die „luminal area“.
ACE: A. carotis externa, ACI: A. carotis interna

2.5 Statistische Berechnungen und Dokumentation

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass Wildtypen keinerlei atherosklerotische Veränderungen im Zeitrahmen der Untersuchungen aufweisen. Deswegen werden alle ApoE-Versuche zur Charakterisierung der Atherosklerose mit zwölf Wochen cholesterinarm gefütterten Wildtypen verglichen.

Bei den Versuchen zur Adhäsionshemmung durch Antikörper-Behandlung werden ausschließlich sechs Wochen cholesterinreich gefütterte ApoE-Knock-out-Mäuse verwendet, da diese die höchste transiente Adhäsion von Thrombozyten noch ohne atherosklerotische Läsionen zeigen. Hierbei werden die mit anti-GPIIb/IIIa oder IgG behandelten Tiere mit unbehandelten Sechs-Wochen-Tieren verglichen.

Im Versuchsansatz der chronischen Blockade der Adhäsionsrezeptoren durch Antikörper werden nur 12 Wochen cholesterinreich gefütterte ApoE-Knock-out-Mäuse verwendet.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Hierbei werden ebenfalls die mit anti-GPIb α oder IgG behandelten Tiere mit unbehandelten 12-Wochen-Tieren verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wird in allen Versuchen ein „post hoc“-Verfahren angewendet. Die Auswahl trifft hierbei auf den „least significance difference“-Test (LSD-Test). Die Abweichungen verstehen sich als Standardfehler SEM („standard error mean“). Alle angegebenen Zahlen sind Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler.

Als Signifikanzniveau wird die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

Die statistische Berechnung erfolgt mit dem Statistikprogramm SPSS.

2.6 Ergebnisse

2.6.1 Morphologische Charakterisierung der Atherosklerose in ihrem Verlauf unter Verwendung der Histologie

2.6.1.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Um atherosklerotische Veränderungen in der Gefäßwand darzustellen, werden histologische Schnitte von Aorten und Carotiden angefertigt und der Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Hierbei können erste Veränderungen der Gefäßauskleidung ab der 8. bis 10. Woche beobachtet werden. Diese zeigen sich vor allem an Gefäßabgängen, z.B. an der Abzweigung der A. renalis der Bauchaorta und an der Bifurkation der A. carotis communis. Massive atherosklerotische Läsionen werden erst bei 12- und 18-Wochen cholesterin-gefütterten Tieren gefunden (siehe Abb. 21).

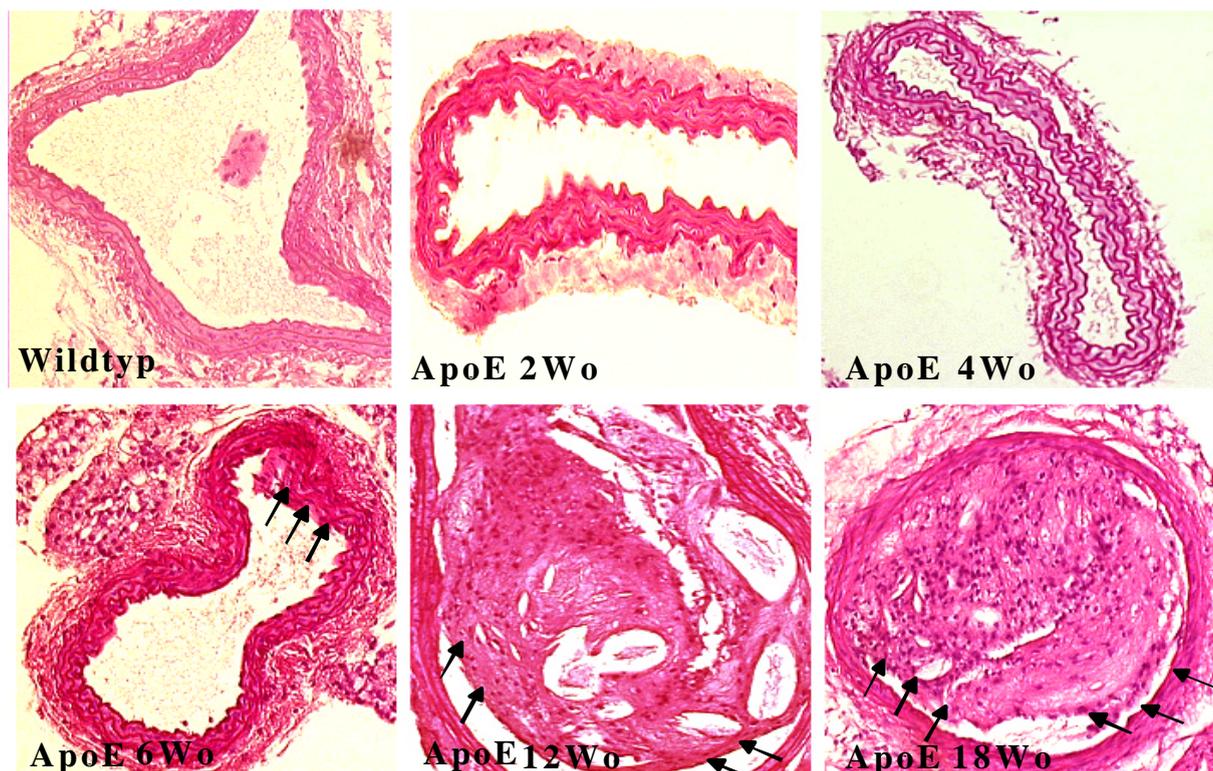


Abbildung 21

Hämatoxylin-Eosin Färbung

Histologische Schnitte der A. carotis communis von Wildtyp und ApoE-defizienten Mäusen in verschiedenen Stadien der Atherosklerose, gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin. Die Pfeile zeigen auf die atherosklerotischen Plaques, bei ApoE-6Wo noch klein und randständig, bei ApoE 12- und 18-Wochen cholesterinreicher Fütterung ist die Plaqueausdehnung erheblich größer.

2.6.1.2 Nachweis der Fetteinlagerung in atherosklerotische Gefäße

Um Fetteinlagerungen in der Gefäßwand nachzuweisen, wird die Sudan III-Färbung angewendet. Hierbei färben sich jegliche Fetteinlagerungen rot an. Bei Wildtyp-Mäusen sind altersunabhängig, wie in Vorversuchen gezeigt (siehe Abb. 22) keinerlei Veränderungen zu sehen. In der ApoE-Knock-out-Maus sind ab der vierten Woche cholesterinreicher Fütterung zunächst vereinzelte, ab sechs Wochen dann deutlich zunehmend regionale Rotfärbungen (vor allem an der Carotis-Bifurkation) zu finden. Bei 12- und 18-Wochen-Tieren ist eine massive Anfärbung der Bifurkation und A. carotis externa zu sehen, welche mit den Ergebnissen der Hämatoxylin-Eosin-Färbung übereinstimmt.



Abbildung 22

Wildtyp-Mäuse vergleichend nach verschieden langer cholesterinarmen Fütterung. In keinem der drei Gefäße sind atherosklerotische Läsionen (deutl. regionale Rotfärbung) zu erkennen.

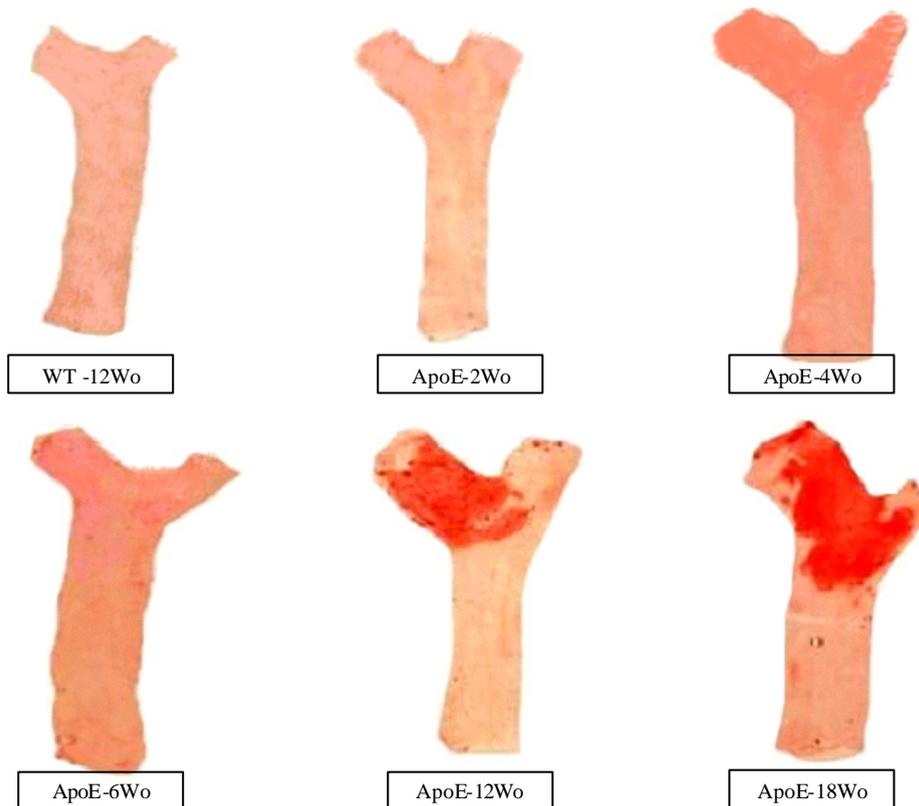


Abbildung 23

Sudan III-Färbung der A. carotis communis.

Abgebildet ist die komplette A. carotis communis, an der Bifurkation geht nach links die A. carotis externa, nach rechts die A. carotis interna ab. Rot angefärbt sind Bereiche mit starker Fetteinlagerung (atherosklerotische Plaques).

2.6.1.3 Nachweis der Entzündungsreaktion

Für den Nachweis inflammatorischer Proteine greift man auf die Methode der Immunhistologie zurück. In diesem Falle wird mit Antikörpern auf VCAM-1 gefärbt. VCAM-1-positive Zellen färben sich braun an (siehe Abb. 24). Dabei kann festgestellt werden, dass inflammatorische Ereignisse erst ab einem Zeitpunkt von 8-10 Fütterungswochen auftreten. In früheren Stadien sind keine oder nur vereinzelt positiv angefärbte Zellen zu sehen. In den späten Stadien der Atherosklerose (12-18 Wochen) zeigen sich nicht mehr einzelne Zellen, sondern ganze Zellverbände oder gar Geweberegionen positiv (siehe Abb. 24).

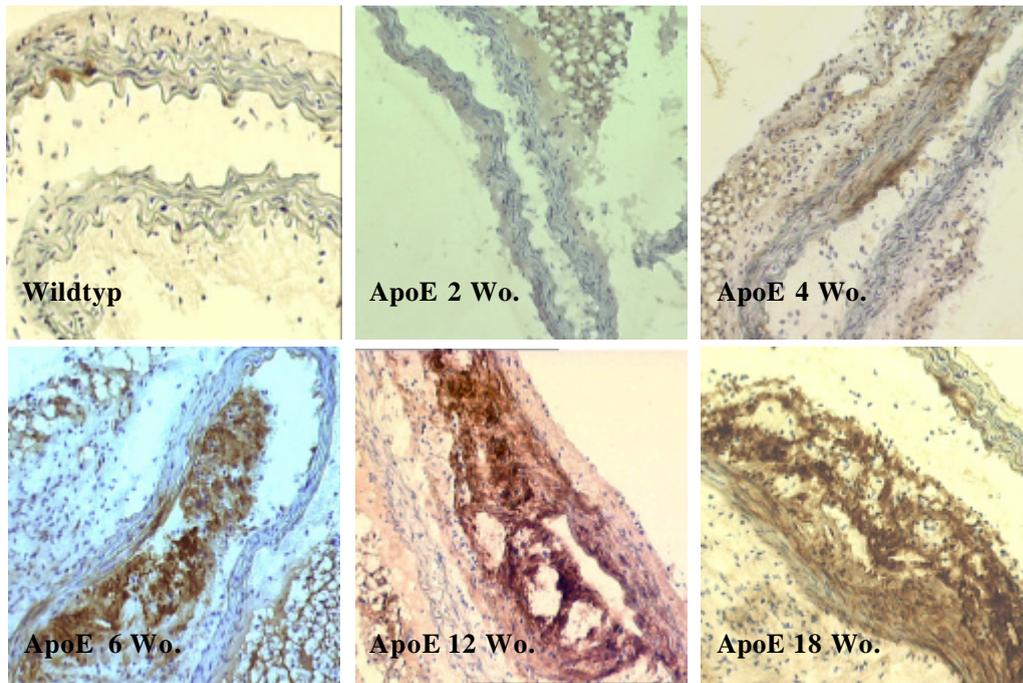


Abbildung 24

Immunhistologie: Immunhistologische Färbung auf VCAM-1 an der A. carotis communis der Maus in verschiedenen Stadien der Atherosklerose. VCAM-1-positive Zellen stellen sich braun dar.

2.6.1.4 Charakterisierung der Gefäßfunktion mittels Doppler-Sonographie

Der Ultraschall-Untersuchung an der A. carotis communis unterzieht man jeweils alle Spender- und Empfängertiere (insgesamt pro Gruppe $n = 20$). Gemessen wird der „Resistance Index“ (RI), ein Parameter für die Gefäßelastizität. Dieser liegt bei den untersuchten Wildtypen bei einem Wert von $0,72 (\pm 0,004)$. Bereits nach zweiwöchiger Cholesterinfütterung steigt der RI auf $0,77 (\pm 0,010)$, nach vier bzw. sechs Wochen auf $0,79 (\pm 0,008)$ bzw. $0,015$, nach acht Wochen auf $0,81 (\pm 0,004)$. Mit zunehmender Atherosklerose nach 12 Wochen Fütterung liegt dieser Wert bereits bei $0,83 (\pm 0,006)$ und steigt dann bei den 18-Wochen-Tieren nochmals auf $0,84 (\pm 0,003)$ an. Dies zeigt, dass die A. carotis communis im Verlauf der Atherogenese durch die atherosklerotischen Veränderungen an Elastizität verliert.

ERGEBNISSE

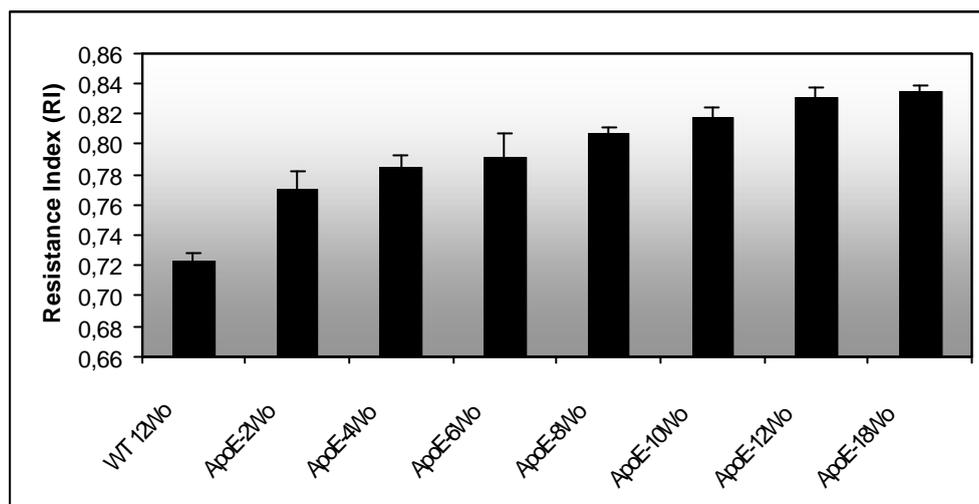


Abbildung 25

Gefäßwiderstandsindex („Resistance Index“ (RI) der A. carotis communis
Darstellung des RI im Verlauf der Atherogenese, als Ausgangswert dient die Gruppe der ungenüßerten Wildtypen (Einzelwerte siehe Tab. 8).

Tabelle 8

Durch Duplex-Sonographie ermittelte „Resistance Index“ (RI) von Wildtyp-Mäusen versus verschieden lang cholesterinreich gefütterten ApoE-Knock-out-Mäusen.

Tier	WT 12Wo	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-8Wo	ApoE-10Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
1	0,71	0,77	0,78	0,84	0,83	0,83	0,86	0,82
2	0,71	0,75	0,82	0,82	0,82	0,85	0,82	0,84
3	0,72	0,78	0,73	0,80	0,81	0,85	0,84	0,83
4	0,74	0,80	0,77	0,72	0,80	0,83	0,81	0,84
5	0,74	0,69	0,75	0,86	0,80	0,81	0,83	0,83
6	0,73	0,75	0,79	0,80	0,81	0,81	0,86	0,82
7	0,74	0,75	0,80	0,77	0,80	0,79	0,84	0,83
8	0,72	0,78	0,78	0,77	0,80	0,81	0,85	0,85
9	0,73	0,72	0,78	0,75	0,79	0,80	0,83	0,84
10	0,71	0,81	0,77	0,72	0,80	0,83	0,81	0,84
11	0,72	0,77	0,79	0,79	0,81	0,81	0,82	0,83
12	0,72	0,78	0,80	0,80	0,82	0,81	0,83	0,83
13	0,71	0,78	0,79	0,79	0,80	0,81	0,83	0,84
14	0,73	0,79	0,79	0,79	0,80	0,83	0,83	0,84
15	0,73	0,78	0,79	0,80	0,81	0,82	0,83	0,84
16	0,71	0,78	0,80	0,81	0,81	0,82	0,82	0,84
17	0,73	0,78	0,80	0,80	0,81	0,81	0,83	0,84
18	0,73	0,78	0,78	0,79	0,81	0,81	0,82	0,84
19	0,72	0,78	0,79	0,81	0,81	0,79	0,83	0,83
20	0,72	0,78	0,80	0,80	0,81	0,84	0,83	0,83
MW	0,72	0,77	0,79	0,79	0,81	0,82	0,83	0,84
± SEM	0,004	0,011	0,008	0,015	0,004	0,006	0,006	0,003

In der Tabelle aufgeführt sind die Einzeldaten der jeweils 20 Tiere pro Gruppe.

MW = Mittelwert

± SEM = Standardfehler

2.6.1.5 Charakterisierung der Zelladhäsion an die Gefäßwand *in vivo*

In der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie kann das Verhalten von Leukozyten und Thrombozyten im Verlauf der Atheroprogression dargestellt werden. Gemessen werden zwei verschiedene Parameter, die transiente und die feste Adhäsion dieser beiden Zelltypen.

2.6.1.5.1 Thrombozytenadhäsion

Bei Beobachtung der transienten Adhäsion der Plättchen an das Endothel der A. carotis zeigen Wildtyp-Mäuse (n = 14) einen Wert von 127 ± 22 Tz/mm². Dies gilt als Ausgangswert, mit dem man alle Wochengruppen der ApoE-defizienten Tiere vergleicht. Bereits nach zwei Wochen cholesterinreicher Diät steigt die Zahl der transient-adhärenenten Thrombozyten um das 3,2-fache (407 ± 189 Tz/mm²), nach vier Wochen um das 7,3-fache (923 ± 311 Tz/mm²) an. Im Gegensatz zum ersten Nachweis histologischer Veränderungen ab der 8. bis 10. Woche ist schon ab der sechsten Fütterungswoche (1498 ± 422 Tz/mm²) die Zunahme der transient-adhärenenten Thrombozyten signifikant. In der 12. Woche liegt die Zahl der adhärenierenden Thrombozyten mit 3035 ± 548 Tz/mm² bereits beim 24-fachen des Ausgangswertes. Nach 18 Wochen Cholesterindiät ist ein Wert von 4412 ± 536 Tz/mm² (34,8-facher Ausgangswert) erreicht (siehe Abb. 26).

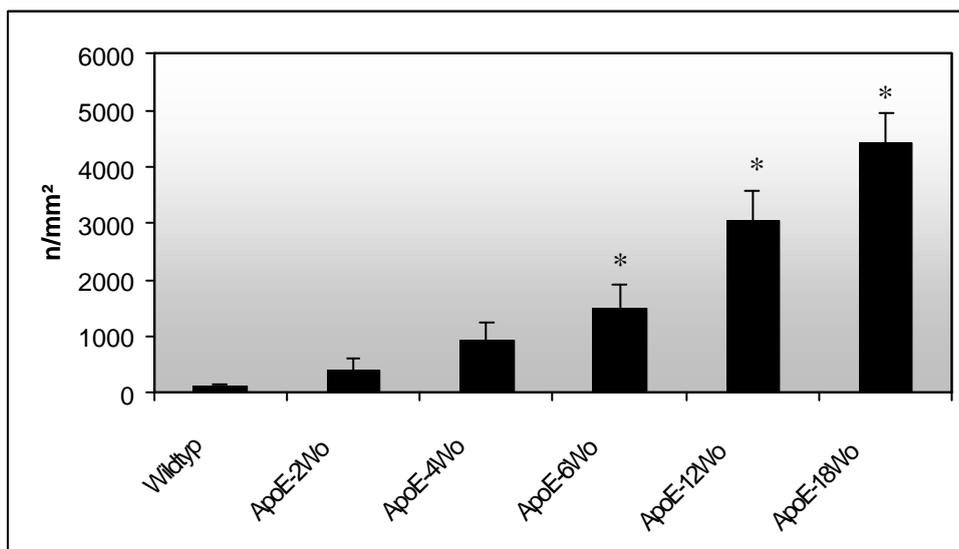


Abbildung 26

Darstellung der transient-adhärenenten Thrombozyten am Endothel der A. carotis communis. n/mm² = Anzahl transient adhärenierender Thrombozyten pro definierter Fläche

* = signifikant, p < 0,05

ERGEBNISSE

Tabelle 9

Transient adhärenente Thrombozyten in der A. carotis communis bei Wildtypen im Vergleich zu den verschieden lang cholesterinreich gefütterten ApoE-Knock-out-Mäusen.

Einzelwerte:

Tier	WT 12Wo	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
1	254,000	589,749	2104,350	1549,528	383,054	2472,437
2	242,836	1665,164	1154,756	4266,983	1967,503	6127,160
3	92,509	138,996	3184,327	226,350	3517,129	1567,038
4	0,000	111,011	736,522	937,467	2438,560	4398,809
5	0,000	194,089	243,243	1030,762	5365,529	7138,727
6	208,938	312,742	468,327	1560,073	3043,637	3534,540
7	156,109	172,934	434,363	1182,361	5065,067	5049,671
8	138,996	69,382	225,869	1236,219	1505,793	4044,994
9	156,302		398,177		4030,891	3935,045
10	140,182		277,527			5853,920
11	174,666					
12	115,636					
13	0,000					
14	92,509					
Gruppe	WT 12Wo	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
MW	126,620	406,758	922,746	1498,718	3035,240	4412,234
± SEM	22,416	188,925	310,614	422,398	548,273	535,937

MW = Mittelwert

± SEM = Standardfehler

Auch bei der permanenten Adhäsion der Thrombozyten wird der Wildtyp mit 9 ± 4 Tz/mm² als Ausgangspunkt gewählt. Wie schon bei der transienten Adhäsion steigt auch hier die Anzahl der festadhärierenden Thrombozyten schon nach zwei Wochen leicht an (13 ± 6 Tz/mm², 1,4-fache Steigerung), nach weiteren zwei Wochen auf 46 ± 27 Tz/mm² (5-facher Anstieg). Ein signifikanter Anstieg wird hier ebenfalls nach sechs Wochen beobachtet 213 ± 59 Tz/mm², 23,4-fache Zunahme). Auch bei 12 und 18 Wochen Cholesterinfütterung zeigt sich eine signifikante Steigerung mit 50,2- (458 ± 148 Tz/mm²) bzw. 99,5-facher (908 ± 318 Tz/mm²) Zunahme der festen Adhäsion gegenüber dem Wildtyp.

ERGEBNISSE

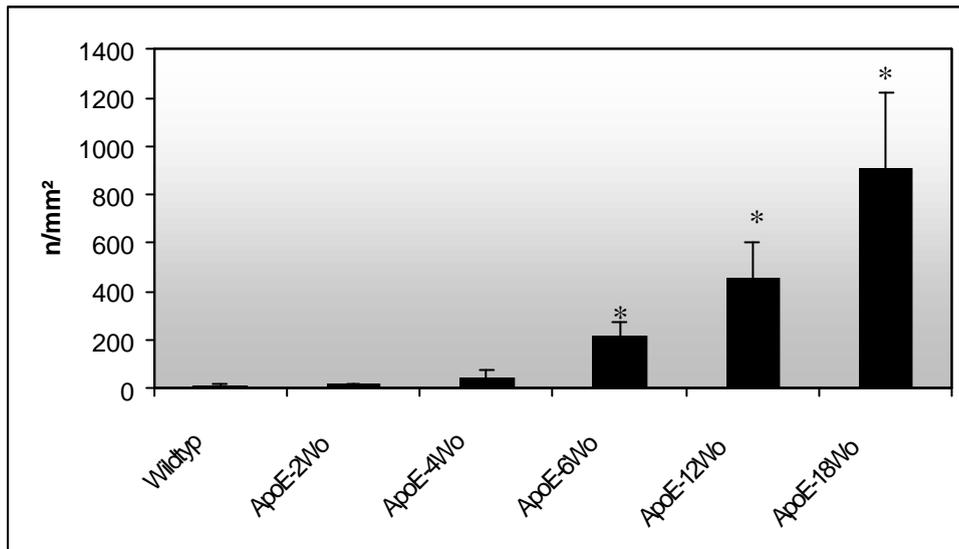


Abbildung 27

Darstellung der permanent adhärenenten Thrombozyten am Endothel der A. carotis communis.
 n/mm² = Anzahl permanent adhärrierender Thrombozyten pro definierter Fläche
 * = signifikant, p < 0,05

Tabelle 10

Permanent adhärrierende Thrombozyten in der A. carotis communis bei Wildtypen im Vergleich zu den verschieden lang cholesterinreich gefütterten ApoE-Knock-out-Mäusen.

Einzelwerte:

Tier	WT 12Wo	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
1	0,000	52,036	280,580	0,000	800,930	3168,898
2	0,000	23,127	0,000	450,982	228,350	139,679
3	0,000	13,900	0,000	104,469	34,823	0,000
4	46,332	0,000	52,609	69,442	174,421	1928,815
5	0,000	13,863	0,000	445,735	601,309	963,438
6	23,215	0,000	34,691	167,151	1369,637	452,700
7	0,000	0,000	17,375	278,203	634,859	996,099
8	0,000	0,000	34,749	191,527	138,996	156,244
9	0,000		34,624		138,996	92,589
10	35,171		0,000			1185,722
11	0,000					
12	0,000					
13	0,000					
14	23,127					
Gruppe	WT 12Wo	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
MW	9,132	12,866	45,463	213,439	458,036	908,418
± SEM	4,252	6,414	26,820	59,066	145,118	317,871

MW = Mittelwert

± SEM = Standardfehler

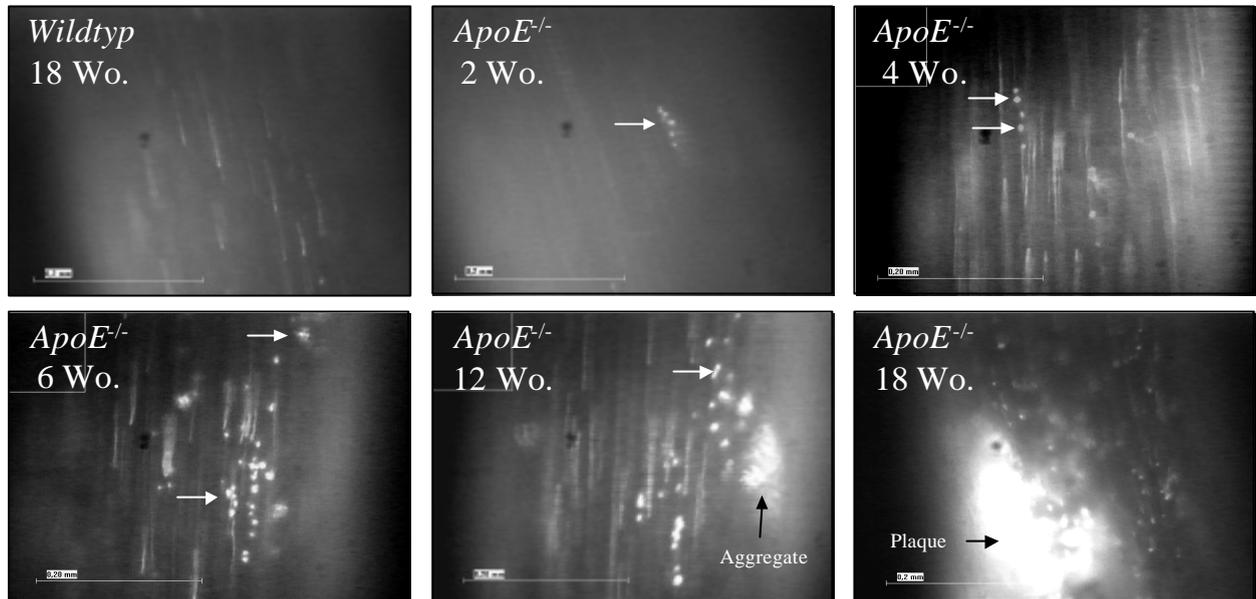


Abbildung 28

Momentaufnahmen aus Videosequenzen der IVM.

Intravitalmikroskopische Bilder von verschiedenen Atherosklerosestadien (2, 4, 6, 12, 18 Wochen) versus Wildtyp. Hier dargestellt ist die Thrombozytenadhäsion im entsprechenden Fluoreszenzfilter. Weiße Pfeile zeigen adhärenente Thrombozyten, schwarze Pfeile zeigen Thrombozyten-Aggregate und Plaques.

2.6.1.5.2 Leukozytenadhäsion

Die transiente Adhäsion der Leukozyten im Wildtyp liegt bei 152 ± 34 Lz/mm². Bei den Zwei-Wochen-Tieren steigt dieser Wert auf 245 ± 44 Lz/mm² (1,6-fache Zunahme), bei Vier-Wochen-Tieren auf 356 ± 100 Lz/mm² (2,3 fach). Die Sechs-Wochen-Tiere zeigen mit 465 ± 66 Lz/mm² eine 3-fache, die 12-Wochen-Tiere eine 4,9-fache (751 ± 174 Lz/mm²) Steigerung. 18 Wochen cholesteringefütterte Tiere erreichen 1083 ± 140 Lz/mm² (7,1-fach).

ERGEBNISSE

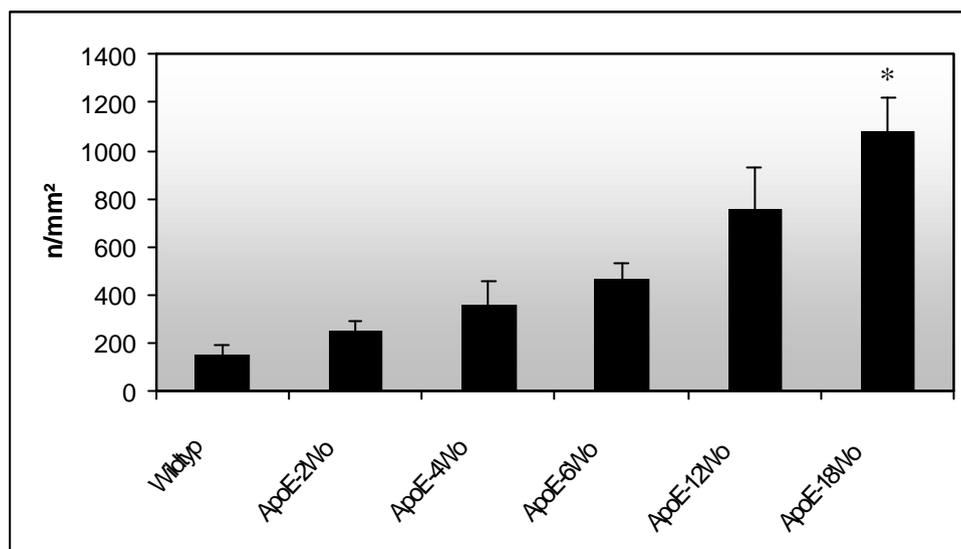


Abbildung 29

Darstellung der transient-adhärenenten Leukozyten am Endothel der A. carotis communis im Verlauf der Atherogenese.

n/mm² = Anzahl transient adhärerender Leukozyten pro definierter Fläche

* = signifikant, p < 0,05

Tabelle 11

Transient adhärierende Leukozyten in der A. carotis communis bei Wildtypen im Vergleich zu den verschieden lang cholesterinreich gefütterten ApoE-Knock-out-Mäusen.

Einzelwerte:

Tier	WT 12Wo	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
1	416,291	468,327	105,217	381,600	661,638	800,930
2	138,764	300,655	419,911	870,576	225,491	978,657
3	185,018	138,996	1189,749	243,761	1741,153	1149,161
4	69,498	138,764	69,382	555,536	210,776	513,426
5	69,382	221,813	260,618	431,089	208,146	1915,268
6	301,800	208,494	346,909	367,089	847,376	748,696
7	52,036	369,450	364,865	417,304	1048,897	991,488
8	92,664	111,011	374,491	452,700	602,317	1354,118
9	278,812		138,496		1216,217	729,141
10	69,839		291,404			1649,319
11	334,301					
12	52,036					
13	0,000					
14	69,382					
Gruppe	WT 12Wo	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
MW	152,130	244,689	356,104	464,957	751,335	860,544
± SEM	34,505	44,482	100,297	65,704	174,310	135,799

MW = Mittelwert

± SEM = Standardfehler

ERGEBNISSE

Die permanente Adhäsion der Leukozyten liegt (im Gegensatz zu den Thrombozyten) bei Wildtypen und Zwei-Wochen-Tieren annähernd auf gleichem Niveau (Wildtyp 9 ± 5 Lz/mm², Zwei-Wochen-Tiere 8 ± 5 Lz/mm²). Erst nach vierwöchiger Fütterung der ApoE-Mäuse ist ein erster Anstieg (9,2-fach) auf 83 ± 54 Lz/mm² zu sehen. Eine deutliche Zunahme der permanent adhärierenden Leukozyten ist erst ab sechs Wochen (291 ± 199 Lz/mm² (32,3-fach)) festzustellen. Einen leichten Rückgang weisen die 12-Wochen-Tiere mit 284 ± 58 Lz/mm² (31,5-fach) auf. Die 18-Wochen Tiere zeigen dann aber einen signifikanten Anstieg (115-fach mit 1034 ± 374 Lz/mm²).

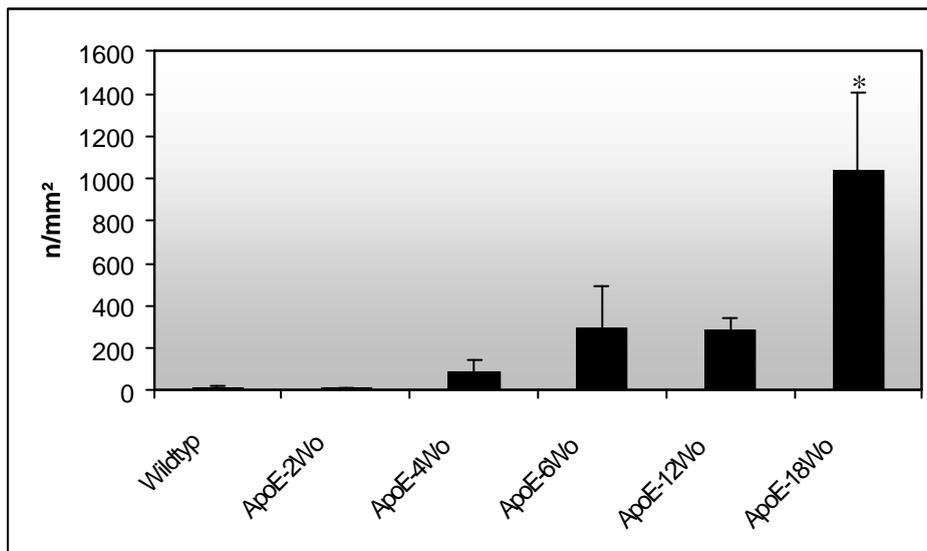


Abbildung 30

Darstellung permanent adhärenter Leukozyten am Endothel der A. carotis communis.
n/mm² = Anzahl permanent adhärrender Leukozyten pro definierter Fläche
* = signifikant, $p < 0,05$

Tabelle 12

Permanent adhärierende Leukozyten in der A. carotis communis bei Wildtypen im Vergleich zu den verschieden lang cholesterinreich gefütterten ApoE-Knock-out-Mäusen.

Einzelwerte:

Tier	WT 12Wo	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
1	69,382	35,691	35,072	0,000	139,292	4004,652
2	34,691	0,000	104,978	0,000	104,073	594,389
3	0,000	17,375	69,965	1654,095	243,761	191,527
4	0,000	0,000	555,055	34,721	244,068	1873,310
5	23,127	0,000	15,375	376,089	682,255	696,461
6	0,000	0,000	0,000	69,646	293,988	713,873
7	0,000	0,000	34,749	86,938	400,237	461,157
8	0,000	13,876	17,375	104,469	277,993	138,884
9	0,000		0,000		173,745	225,686
10	0,000		0,000			1440,250
11	0,000					
12	0,000					
13	0,000					
14	0,000					
Gruppe	WT 12Wo	ApoE-2Wo	ApoE-4Wo	ApoE-6Wo	ApoE-12Wo	ApoE-18Wo
MW	9,086	8,844	130,074	355,759	282,690	1345,702
± SEM	5,445	6,073	86,401	266,092	103,713	579,244

MW = Mittelwert

± SEM = Standardfehler

2.6.2 Charakterisierung der für die Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand verantwortlichen Rezeptoren

Um die genauen Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion im Rahmen dieser Arbeit zu klären, gilt es, die wichtigsten Rezeptoren der Adhäsion zu ermitteln. Aufschluss darüber gibt der Grad der Expression verschiedener Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Adhäsionsmoleküle, die in sehr grosser Zahl auf der Membran zu finden sind, nehmen mit grosser Wahrscheinlichkeit auch den wichtigsten Stellenwert im Adhäsionsverhalten ein. Die beiden meistexprimierten Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche sind GPIb α und GPIIb-IIIa. Deswegen werden die Untersuchungen genau auf diese beiden Adhäsionsmoleküle fokussiert, wobei besonders die Effekte nach gezielter Blockade dieser Rezeptoren durch monoklonale Antikörper interessieren.

2.6.2.1 Die Blockade des GPIIb/IIIa mittels anti-GPIIb/IIIa

2.6.2.1.1 Intravitalmikroskopie

Bei diesem Versuch soll die Funktion der jeweiligen Rezeptoren (GPIIb/IIIa und GPIIb/IIIa) durch deren gezielte Blockade untersucht werden. Dazu werden die Thrombozyten von sechs Wochen cholesterinreich gefütterten Tieren vor Injektion in eine gleich lang cholesterin-gefütterte Empfängermaus, für zehn Minuten mit einem monoklonalen Antikörper gegen GPIIb/IIIa bzw. GPIIb/IIIa vorinkubiert (n = 5). In der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wird dann das Verhalten dieser vorbehandelten Plättchen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe (ebenfalls sechs Wochen gefüttert, Thrombozyten ohne Inkubation mit Antikörpern) untersucht.

2.6.2.1.2 Transient-adhärenente Thrombozyten bei Adhäsionshemmung

Für die Untersuchung der Funktionsweise der verschiedenen Membranglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche verwendet man sechs Wochen gefütterte ApoE-defiziente Mäuse. In einer Gruppe werden die zu injizierenden Plättchen mit einem Antikörper gegen GPIIb/IIIa und in einer zweiten Gruppe mit anti-GPIIb/IIIa für zehn Minuten inkubiert. Als Kontrolle dienen Plättchen ohne Antikörper-Zugabe. Bei den transient-adhärenenten Thrombozyten zeigt sich durch die Hemmung des GPIIb/IIIa eine Abnahme der Adhäsion um 31,1 % von 1499 ± 422 Tz/mm² auf 1034 ± 237 Tz/mm². Bei Zugabe von anti-GPIIb/IIIa liegt jedoch die Reduktion bei 79,5 % (307 ± 64 Tz/mm²).

ERGEBNISSE

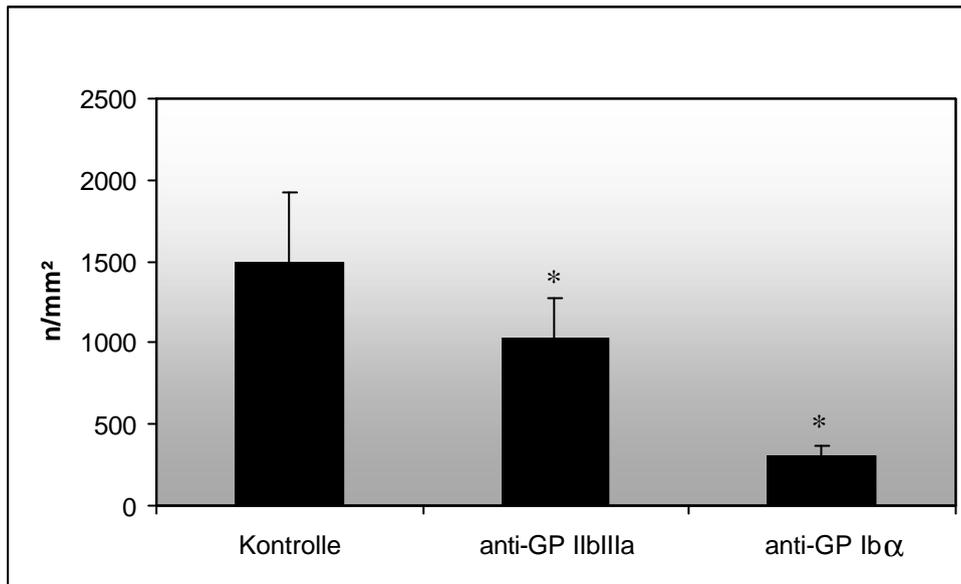


Abbildung 31

Darstellung der transient-adhärenenten Thrombozyten nach Rezeptorblockade durch spezifische monoklonale Antikörper gegen GPIIb-IIIa und GPIb α . Als Vergleich dienen gleich lang cholesterin-gefütterte, unbehandelte ApoE-defiziente Mäuse.

n/mm² = Anzahl transient adhärrender Thrombozyten pro definierter Fläche

* = signifikant, $p < 0,05$

Tabelle 13

Transient adhärrende Thrombozyten nach Rezeptorblockade durch spezifische monoklonale Antikörper gegen GPIIb-IIIa und GPIb α . Als Ausgangsgruppe dienen sechs Wochen cholesterin-gefütterte ApoE-Mäuse ohne Antikörperbehandlung.

Einzelwerte:

Tier	ApoE-6Wo	anti-GPIIb-IIIa	anti-GPIba
1	1549,528	1092,764	449,628
2	4266,983	1587,146	190,006
3	226,350	1023,382	208,494
4	937,467	432,335	381,600
5	1030,762		
6	1560,073		
7	1182,361		
8	1236,219		
Gruppe	ApoE-6Wo	anti-GPIIb-IIIa	anti-GPIba
MW	1498,718	1033,907	307,432
\pm SEM	422,398	236,562	64,095

MW = Mittelwert

\pm SEM = Standardfehler



Abbildung 32

Intravitalmikroskopische Momentaufnahmen von Versuchen, bei denen sechs Wochen gefütterte ApoE-Knock-out-Mäuse mit Antikörpern gegen GPIb α und gegen GPIIb-IIIa behandelt werden. Als Kontrolle (linkes Bild) dienen unbehandelte gleichaltrige ApoE-Mäuse. Im ersten Bild (ApoE-6Wo ohne AK-Behandlung, zur Kontrolle) zu sehen sind mehrere adhärenente Thrombozyten (weiße Pünktchen), im Gegenteil zu den beiden folgenden Bildern, auf denen kaum oder keine adhärenente Thrombozyten zu sehen sind.

2.6.2.1.3 Permanente Thrombozytenadhäsion bei Adhäsionshemmung

Auch bei der permanenten Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel kann durch die Antikörperzugabe eine beachtliche Reaktion erzeugt werden. Nach Inkubation mit anti-GPIIb-IIIa kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Adhäsion um 96,5 % von 213 ± 59 Tz/mm² bei der Kontrollgruppe ohne Antikörperzugabe auf 9 Tz/mm² (± 9). Bei Zugabe von GPIb α ist diese Reduktion sogar noch ausgeprägter, am Endothel bleiben keinerlei Plättchen haften.

ERGEBNISSE

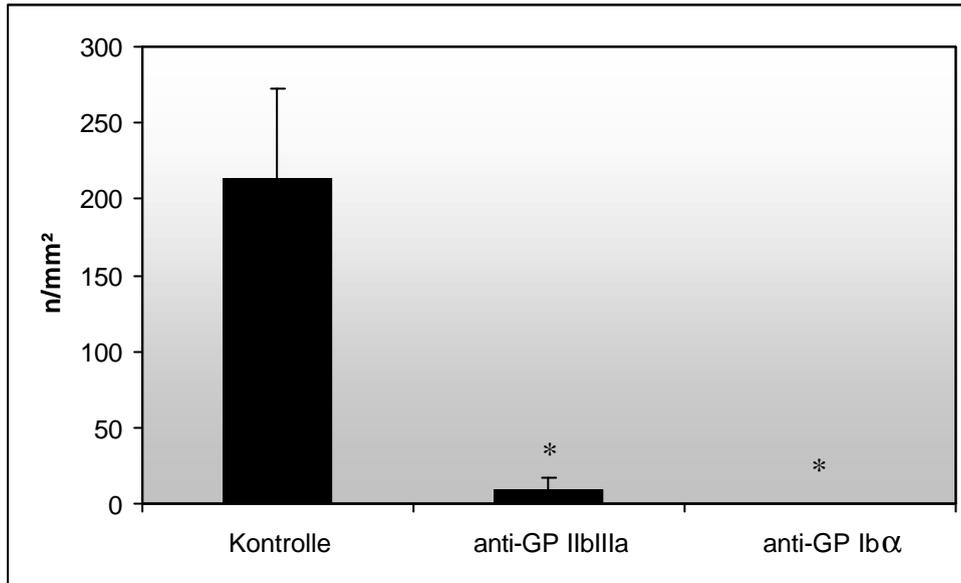


Abbildung 33

Permanente Adhäsion von Thrombozyten bei Rezeptorblockade durch Antikörper. Darstellung der festen Adhäsion Antikörper-vorbehandelter Thrombozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

n/mm² = Anzahl permanent adhätierender Thrombozyten pro definierter Fläche

* = signifikant, p < 0,05

Tabelle 14

Permanent adhätierende Thrombozyten nach Rezeptorblockade durch spezifische monoklonale Antikörper gegen GPIIb-IIIa und GPIbα. Als Ausgangsgruppe dienen sechs Wochen cholesterin-gefütterte ApoE-Mäuse ohne Antikörperbehandlung.

Einzelwerte:

Tier	ApoE-6Wo	anti-GPIIb-IIIa	anti-GPIba
1	0,000	0,000	0,000
2	450,982	0,000	0,000
3	104,469	0,000	0,000
4	69,442	34,587	0,000
5	445,735		
6	167,151		
7	278,203		
8	191,527		
Gruppe	ApoE-6Wo	anti-GPIIb-IIIa	anti-GPIba
MW	213,439	8,647	0,000
± SEM	59,066	8,647	0,000

MW = Mittelwert

± SEM = Standardfehler

2.6.3 Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheropression

2.6.3.1 Allgemeines zum Versuchsaufbau

Um die Rolle des Thrombozyten in der Atherogenese darzustellen, behandelt man ApoE-defiziente Mäuse ($n = 5$) über 12 Wochen mit einem monoklonalen Antikörper gegen GPIIb/IIIa. Als Vergleich dient eine Gruppe von vier Tieren, die mit einem Kontrollantikörper (IgG) behandelt werden ($n = 4$). Alle Tiere werden einer duplex-sonographischen Untersuchung unterzogen und nach der Intravitalmikroskopie getötet, um die Gefäße der histologischen Aufarbeitung zuzuführen. Die Plaquegröße in den Carotiden der einzelnen Tiere wird durch Histomorphometrie festgestellt und berechnet.

2.6.3.2 Charakterisierung der Gefäßfunktion mit der Duplex-Sonographie

Bei der chronischen Blockade des GPIIb/IIIa ist eine signifikante Abnahme des „Resistance Index“ (RI) der A. carotis communis zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle ($0,830 \pm 0,005$) und den mit IgG ($0,830 \pm 0,004$) behandelten Tieren erreicht der Index hier nur einen Wert von $0,800 \pm 0,004$.

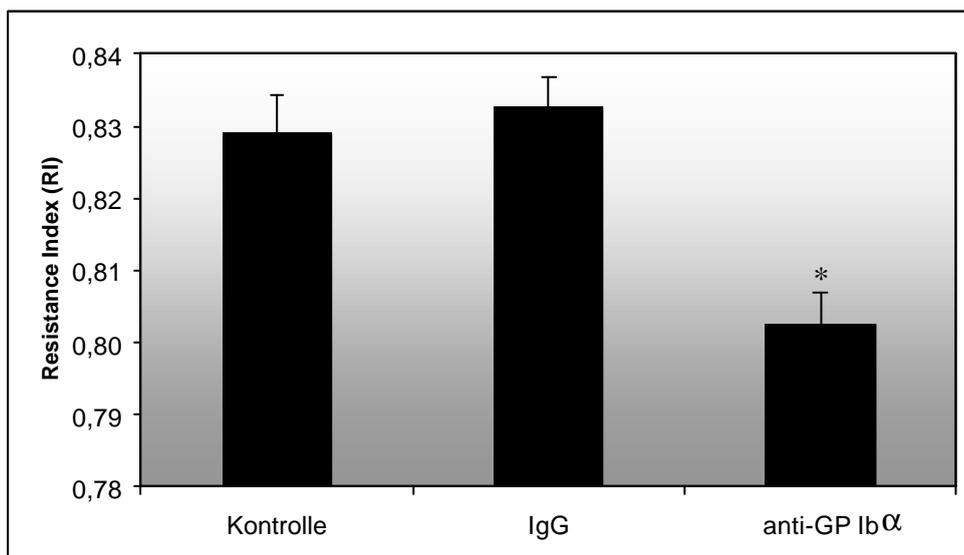


Abbildung 34

Darstellung des „Resistance Index“ nach Antikörper-Behandlung (Kontroll-IgG oder anti-GPIIb/IIIa).

* = signifikant, $p < 0,05$

Tabelle 15

Einzelwerte des RI bei unbehandelten 12 Wochen cholesterin- gefütterten Tieren im Vergleich zu Tieren, die mit Kontroll- AK (IgG) oder anti-GP Ib α behandelt wurden.

Einzelwerte:

Tier	ApoE-12Wo	IgG	anti-GPIba
1	0,82	0,83	0,81
2	0,83	0,83	0,80
3	0,82	0,84	0,80
4	0,83	0,83	0,80
5	0,83		
6	0,84		
7	0,83		
8	0,83		
9	0,83		
10	0,82		
11	0,83		
12	0,83		
13	0,83		
14	0,84		
15	0,83		
16	0,83		
17	0,82		
18	0,83		
19	0,83		
20	0,83		
Gruppe	ApoE-12Wo	IgG	anti-GPIb
MW	0,83	0,83	0,80
± SEM	0,005	0,004	0,004

MW = Mittelwert

± SEM = Standardfehler

2.6.3.3 Morphologische Charakterisierung der Atheroprogression nach chronischer Blockade des GPIba

Für den Nachweis von Fetteinlagerungen in der Gefäßwand wird auch hier, wie oben beschrieben, die Sudan III-Färbung angewendet. Die mit IgG behandelten Tiere zeigen ausgeprägte Rotfärbung an der Bifurkation, wie auch die regulär für 12 Wochen cholesterin- gefütterten unbehandelten Tiere. Bei der Langzeitbehandlung mit GPIb α zeigt sich jedoch eine massive Reduktion der Rotfärbung.

ERGEBNISSE



Abbildung 35

Sudan III-Färbung der Antikörper-behandelten ApoE^{-/-} Mäuse (anti-GPIIb α (Mitte) und Kontroll-IgG (rechts)) im Vergleich zum unbehandelten gleichaltrigen Tier (links).

2.6.3.4 Histomorphometrie

Für die histomorphometrische Beurteilung werden die Aorten und Carotiden geschnitten und mit van Giesson gefärbt. Sowohl bei den unbehandelten, als auch bei den mit Kontroll-IgG behandelten Tieren zeigt sich eine deutliche Plaquebildung (siehe Abb. 36), die unter Zuhilfenahme des Auswerteprogramms ermittelt wird. Im Gegensatz dazu weisen die mit GPIIb/IIIa behandelten Mäuse in der Aorta abdominalis eine um 60% und in der A. carotis communis eine um 81 % verminderte Plaquefläche auf.



Abbildung 36

Histomorphometrie:

Links: 12 Wochen cholesterin-gefütterte Maus, Mitte: Kontroll-IgG behandelte Maus, Rechts: mit anti-GPIIb/IIIa behandelte Maus. Van Giesson Färbung. Unbehandelte und IgG-Kontrollbehandelte Mäuse weisen deutlich atherosklerotische Plaques auf. Im Gegensatz dazu ist in der Antikörper-behandelten Maus keine Plaquebildung zu sehen.

ACE = A. carotis externa, ACI = A. carotis interna

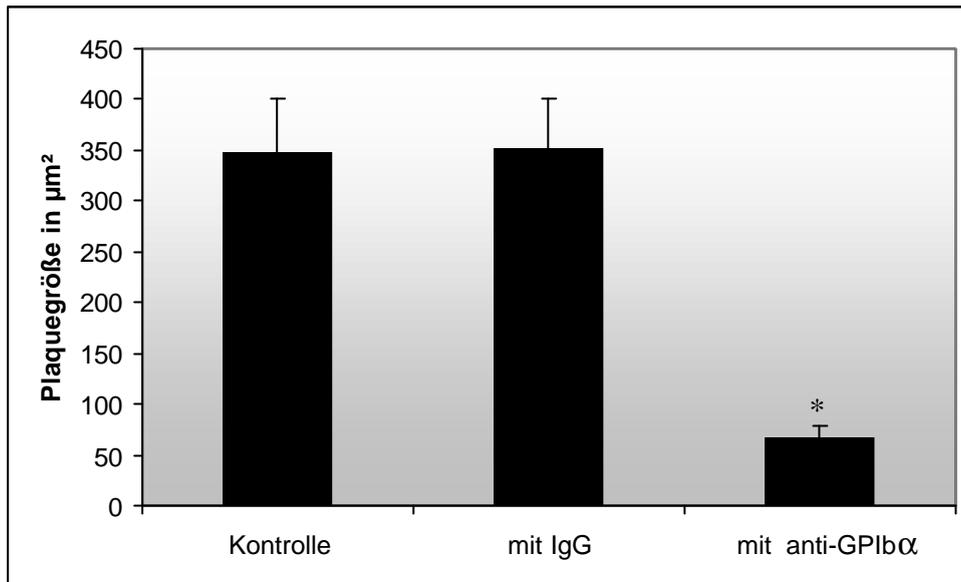


Abbildung 37

Bestimmung der Plaquesgröße. Kontroll- und IgG-kontrollbehandelte Tiere weisen annähernd gleiche Plaquesgröße auf. Die mit anti-GPIIb/IIIa behandelten Tiere sind nahezu plaquefrei.

2.7 Verwendete Reagenzien

2.7.1 Tyrode-Puffer

- 0,4g Bovines Serumalbumin (A-8022, SIGMA Chemical, Steinheim)
- 0,4g D(+)-Glucose (G-8270, SIGMA Chemical, Steinheim)
- in 40 ml Tyrodes 10x auflösen
- mit Aqua dest. auf 400 ml auffüllen
- pH-Wert auf 7,4 bzw. 6,5 einstellen

2.7.2 Paraformaldehyd 4%

- 40 g Paraformaldehyd ad 900 ml Aqua dest.
- dazu 320 μl NaOH (10N)
- bei 65°C im Wasserbad rühren
- nach 30 min. wird die Lösung klar
- dann Zugabe von 100 ml PBS
- pH-Wert auf 7,4 einstellen

3 DISKUSSION

3.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Definition der Atherosklerose wurde 1958 von der WHO („world health organisation“) wie folgt festgelegt:

„Die Atherosklerose ist eine variable Kombination von Veränderungen der Intima (mittel-) großer Arterien. Dabei kommt es zur lokalen Ansammlung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blutprodukten, Bindegewebe und Calciumkomplexen, die mit Veränderungen der Media assoziiert sind.“

Die Diagnostik und Verlaufskontrolle atherosklerotischer Prozesse steht in engem Zusammenhang mit der klinischen Manifestation. Die typischen Symptome treten allerdings erst im Spätstadium der Atherosklerose auf und haben dann häufig fatale Folgen. Deswegen ist es ein Ziel der Forschung, eine zuverlässige Methode zu entwickeln, die Aussagen über frühe Stadien der Atherosklerose zulässt. Angiographie, Ultraschall, Computertomographie und Magnetresonanztomographie sind hier oft zu wenig spezifisch und sensitiv.

Im Tiermodell gibt es die Möglichkeit, atherosklerotische Veränderungen über den Zeitverlauf histologisch darzustellen. Die Histologie ist zwar sehr gut geeignet, Ausmaße der Atherosklerose nachzuweisen, sie bringt jedoch den entscheidenden Nachteil mit sich, keine funktionelle Aussage über den genauen Pathomechanismus der Krankheit treffen zu können. Somit steht man vor dem Problem, jeweils nur die Folgen bzw. das Ausmaß einer Krankheit ermitteln zu können, aber keine dieser Methoden zeigt die dynamischen Auswirkungen im lebenden Organismus auf.

Um die Atherosklerose jedoch in ihrer tatsächlichen Entwicklung des Krankheitsbildes zu untersuchen, bedarf es eines Modells, welches erlaubt, die Vorgänge im einzelnen während der Atherogenese zu verfolgen und zu beurteilen.

Mit der Methode der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, die Zellen in ihrem physiologischen Milieu zu beobachten und zu beurteilen.

Mit der vorliegenden Arbeit soll die Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung der Atherosklerose geklärt werden. Bei diesen Versuchen sollte zunächst die Dynamik der Zell-Zell-Interaktion (Thrombozyten-Endothelzelle/Leukozyten-Endothelzelle) im Verlauf der Atherogenese geklärt werden. Dabei war es wichtig, zu welchem Zeitpunkt welche Zellpopulationen an der Entwicklung der Gefäßverkalkung beteiligt sind. Bisher war es jedoch nur über histologische Schnitte möglich, beteiligte Zellen nachzuweisen.

3.2 Diskussion der angewandten Methoden

3.2.1 Das Mausmodell

Bei der Versuchsplanung stellte sich unweigerlich die Frage, an welchem Tiermodell die Untersuchungen vorgenommen werden sollten. Hierbei fiel die Wahl aus zwei Gründen auf die Maus. Zum einen ist bei dieser Tierart die Herstellung bestimmter Knock-out-Stämme sehr gut erforscht und entwickelt^{109,149}. Somit kann ein krankheitsspezifisches Modell, hier die ApoE-defiziente Maus, welche dem Menschen sehr ähnliche atherosklerotische Läsionen entwickelt, gewählt werden^{13,67,100,139,159}. Zum anderen ist die Intravitalmikroskopie an der Arteria carotis technisch durch die Schichtdicke des zu durchdringenden Materials limitiert. Bei der Maus ist jedoch die Gefäßwand dünn genug, um den Blutfluss und das Verhalten einzelner Zellen im Gefäß beurteilen zu können⁸⁶. Bei der Ratte wäre das aufgrund der Wanddicke der Carotis bereits nicht mehr praktikabel. Ein zusätzlicher vorteilhafter Aspekt ist die einfache Handhabung, Nachzucht und Verfügbarkeit der Maus. Des Weiteren sind für die Maus verschiedenste Reagenzien, wie z.B. Antikörper kommerziell erhältlich, was eine weitere biochemische Aufarbeitung ermöglicht.

3.2.2 Duplex-Sonographie

Eine Untersuchung mit der Duplex-Sonographie liefert in der Diagnostik der Herz-Kreislauf-Krankheiten sehr wichtige Parameter. Hier ist die gezielte Beurteilung des Zustandes der Gefäße möglich. Diese Untersuchungsmethode bietet die Möglichkeit, die Elastizität der Gefäße zu bestimmen und erlaubt daneben noch Strömungsveränderungen (z.B. Strömungsbeschleunigung an Stenosen) festzustellen^{19,23,52,57,63,93,116,121,138,155}. Bei Untersuchungen am Menschen zur Beurteilung der Atheroprogression wird üblicherweise die Intimadicke verschiedener Gefäße (Coronararterien, Carotis) bestimmt^{33,75,121,141}, dies ist im Mausmodell größenbedingt nicht möglich. Daher beschränkt sich die Duplex-Sonographie an der Maus aufgrund der Größenverhältnisse und Grenzen der Auflösbarkeit durch Gerät und Schallkopf auf die Beurteilung der Gefäßelastizität. Diese verringert sich im Verlauf der Atherosklerose¹²¹ mit zunehmender Versteifung der Gefäßwand und somit steigt der hier gemessene Gefäßwiderstandsindex („Resistance Index“) an. Die Zunahme des Gefäßwiderstandes im Verlauf der Cholesterin-Fütterungswochen und somit der Atheroprogression ist begründet auf einer Abnahme der Gefäßelastizität¹²¹, bedingt durch die

Entstehung atherosklerotischer Veränderungen¹⁴¹. Durch die zunehmende Rigidität der Gefäßwand kommt es zum Verlust der sogenannten Windkesselfunktion der Aorta⁹⁹ und somit zum Anstieg des Gefäßwiderstandes. In den vorliegenden Untersuchungen fand sich eine konstante Zunahme des „Resistance Index“. Dieser korrelierte mit der histologisch manifestierten Progression der atherosklerotischen Läsionen. Allerdings konnte in Vorversuchen (mit bis zu 24 Wochen cholesterin-gefütterten Tieren) gezeigt werden, dass ab einem gewissen Zeitpunkt (18 Wochen) kein weiterer Anstieg des RI festzustellen ist. Dies ist wahrscheinlich auf Umbauvorgänge in den elastischen Regionen der Gefäßwand zurückzuführen, die nur in einem gewissen Zeitraum ablaufen und danach eine stationäre Phase erreichen.

3.2.3 Charakterisierung der Zell-Zell-Interaktion mittels Intravitalmikroskopie

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie als darstellendes Medium gewählt. Die Intravitalmikroskopie ist bisher an verschiedenen Organsystemen zu Untersuchungen des Blutflusses angewendet worden^{4,6,31,54,74,94,118,134,147,148}. Bislang wendete man dieses Verfahren vor allem in der quantitativen Analyse der Mikrozirkulation an^{53,86,89}. Der Vorteil dieser Methode liegt in der direkten Visualisierung physiologischer und pathologischer Vorgänge der Hämodynamik im lebenden Tier. *Ex-vivo*-Versuche können diese Prozesse nicht in notwendigem Maße nachahmen.

An der ApoE-defizienten Maus wurden bislang nur an der Aorta³¹, nicht aber an der Arteria carotis intravitalmikroskopische Untersuchungen vorgenommen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Methode der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie an der A. carotis communis und deren Aufzweigung zu entwickeln und zu etablieren.

Für die Zielsetzung dieser Arbeit in Bezug auf die Atheroskleroseforschung wählte man ein möglichst aussagekräftiges und klinisch relevantes Untersuchungsgebiet. Einer der wichtigsten Manifestationsorte der Atherosklerose ist neben den Coronargefäßen und dem Aortenbogen die Carotis, vor allem an ihrer Aufzweigung (Carotisbifurkation)^{13,51,139}.

Die *In-vivo*-Untersuchung der Coronararterien und des Aortenbogens ist ein schwer zugängliches und nur mit erheblichem chirurgischen Aufwand durchzuführendes Unterfangen, welches zudem einen schwerwiegenden Eingriff in die Physiologie des Blutflusses darstellt. Die Exploration der Arteria carotis hingegen stellt durch den

unkomplizierten chirurgischen Zugang und eine schonend durchführbare Präparation einen weitaus geringeren und praktikableren Eingriff in den Organismus dar.

3.2.4 Morphologische Charakterisierung und Quantifizierung der Atherosklerose

Zur Beurteilung der Atherosklerose und deren Progression wurden verschiedene histologische Färbungen eingesetzt. So wählte man die klassische Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H & E), um Veränderungen am Endothel in der Atherogenese darzustellen. Mit Hilfe dieser Methode waren die Entwicklung von Plaques und die frühe Gefäßwandverfettung („fatty streaks“) gut darzustellen. Weiterhin fiel eine Intimaverdickung auf, die jedoch bereits in vielen anderen Arbeiten untersucht und aus diesem Grunde hier nicht weiter verfolgt wurde³³.

Für die pathologisch-anatomische Untersuchung fiel die Wahl auf die Sudan III-Färbung. Bei vergleichender Testfärbung von Sudan III und Ölrot O, einer in der Literatur^{135,139,143} oft beschriebenen Färbemethode für Fetteinlagerungen, stellte sich erstere als die aussagekräftigere heraus. Das Ausgangsmaterial muss für solche Fettfärbungen allerdings sehr sorgfältig von außen am Gefäß anhaftendem Fett- und Bindegewebe befreit werden, um keine falsch-positiven Resultate zu erhalten.

Um den Zeitpunkt der Aktivierung des Endothels darzustellen, wurde der immunhistologische Nachweis von VCAM-1 gewählt. Dieses Adhäsionsmolekül wird bei Endothelaktivierung vermehrt exprimiert und spielt eine wichtige Rolle für die Chemotaxis und Endothel-Migration der Monozyten^{26,101}. Hier konnte gezeigt werden, dass erst in späteren Stadien der Atherosklerose eine deutliche Aktivierung des Endothels zu finden war.

Für die Histomorphologie wurde die van Giesson-Färbung gewählt, weil diese Methode die unterschiedlichen Gefäßstrukturen (Intima, Media, Adventitia) am differenziertesten darstellen kann und sich somit besser zur Auswertung eignet, als die HE-Färbung. Das Ausmessen der Serienschnitte der Gefäße durch Histomorphometrie ist eine häufig angewandte Methode^{80,95,111}, die sich sehr gut dazu eignet, die Ausdehnung von Läsionen oder Plaques darzustellen.

Durch diese Art der Messung werden die Ergebnisse der makroskopischen Sudan III-Untersuchung validiert.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Die Atherosklerose in ihrem Verlauf

Der allgemein akzeptierte Weg der Atherogenese, mit der typischen Einwanderung von Monozyten/Makrophagen, deren Aufnahme von Lipoproteinen und Differenzierung zu Schaumzellen und späterer Plaque-Bildung, stellt noch immer die bedeutende Rolle der Leukozyten an der Atheroskleroseentstehung in den Vordergrund^{15-17,96,119,124,130}. Die vermehrte Leukozytenadhäsion an das Endothel als Zeichen der Inflammation war allerdings in der vorliegenden Arbeit erst im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose festzustellen. Die entscheidende Rolle der Plättchen in der Komplikation der Atherosklerose (bei Plaqueruptur) mit Thrombusbildung und Gefäßverschluss ist inzwischen weithin bekannt^{122,124,127}. In der eigenen Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits im Initialstadium der Atherosklerose eine vermehrte Plättchenadhäsion stattfindet, welche bei Wildtypen nicht anzutreffen war. Dies kann folgendermaßen erklärt werden:

Thrombozyten exprimieren inflammatorische Mediatoren, Chemokine und Wachstumsfaktoren, wie z.B. den platelet-derived-growth factor (PDGF) und sind in der Lage, vasoaktive und proaggregatorische Substanzen, wie Thromboxan A_2 freizusetzen¹¹⁹. Bisher ist man davon ausgegangen, dass Blutplättchen nur mit subendothelialer Matrix, z.B. nach Endothelzelldenudation, interagieren. In der Arbeitsgruppe von Wagner^{35,36} und in Vorarbeiten von Massberg^{87,88} konnte gezeigt werden, dass eine Thrombozytenadhäsion auch an unverändertem Endothel auftreten kann. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigen die Daten, dass Thrombozyten an intaktes Endothel adhären, also noch bevor histologisch nachweisbare Veränderungen in der Gefäßwand nachweisbar sind. Wie bereits *in vitro* festgestellt wurde, fördert eine Stimulation des Endothels durch Thrombozyten die Sekretion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen und steigert somit die Adhäsion von Leukozyten^{42,44,62}, was bis heute als erster Schritt in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen angenommen wird und treibt somit das Fortschreiten der Atherosklerose voran. Das Auftreten vermehrter Leukozytenadhäsion (ab der 12. Woche) korrelierte mit dem Erscheinen histologisch und immunhistologisch nachweisbarer Veränderungen in der Gefäßwand (ebenfalls in der 12. Woche). So konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Plättchenadhäsion der gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion vorausgeht und somit der Thrombozyt in der frühen Atherogenese eine wichtige Rolle spielen muss.

3.3.2 Molekulare Mechanismen der Adhäsion

Im nächsten Schritt befasste sich die eigene Arbeit mit den zugrunde liegenden Mechanismen der Thrombozytenadhäsion in der frühen Phase der Atherosklerose, also noch vor Entstehen der Gefäßwandveränderungen.

Bei *in vitro*-Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl GPIIb/IIIa, als auch GPIIb-IIIa in der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion von großer Wichtigkeit sind^{1,7,11,34,117,127,151,152,156}. Deshalb scheinen diese beiden Rezeptoren dazu prädestiniert, die Adhäsion durch antikörper-vermittelte Blockade zu verringern oder gar aufzuheben¹⁵¹⁻¹⁵³.

Nach den Resultaten der Versuche mit Gruppen unterschiedlich lang andauernder cholesterinreicher Fütterung stellte sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt der Atherogenese man mit gezielter Adhäsionshemmung eingreifen sollte. Da der erste signifikante Anstieg der Thrombozytenadhäsion nach sechs Wochen Fütterung auftrat, wurde dieser Zeitraum gewählt, um die Rezeptorblockade zu untersuchen. Denn wenn die Antikörperbehandlung der Thrombozyten eine Hemmung oder Minderung der Plättchenadhäsion verursacht, dann wäre diese zum Zeitpunkt der höchsten transient-adhärenenten Adhäsion (hier im Falle der sechs Wochen cholesterin-gefütterten Tiere), vor Entstehung von atherosklerotischen Läsionen, am besten sichtbar zu machen. Durch die Blockade von GPIIb/IIIa und GPIIb-IIIa auf der Plättchenmembran konnte sowohl die transiente, als auch die permanente Adhäsion signifikant verringert werden. Hierbei war auffällig, dass anti-GPIIb/IIIa einen ausgeprägten hemmenden Einfluss auf die transiente (Reduktion um 85%) und permanente Adhäsion (Reduktion um 99%), anti-GPIIb-IIIa hingegen nur zum Teil Einfluss auf die transiente Adhäsion hatte, jedoch eine deutliche Wirkung, mit 95% Reduktion, auf die permanente Adhäsion zeigte. Dies lässt vermuten, dass die beiden Rezeptoren im Mechanismus der Thrombozytenadhäsion an Endothel verschiedene Aufgaben zu erfüllen haben. Das Glykoprotein Ib/IX ist hauptsächlich verantwortlich für den ersten Kontakt mit dem Endothel, während GPIIb-IIIa wohl hauptverantwortlich für die nachfolgend permanente Adhäsion des Thrombozyten an das Endothel ist^{1,129}. Dieses Phänomen konnte in dieser Arbeit erstmals direkt *in vivo* gezeigt werden.

3.3.3 Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogession

Aufgrund dieser beeindruckenden Ergebnisse stellte sich die Frage, ob eine längerfristige Hemmung der Thrombozytenadhäsion das Fortschreiten der Atherosklerose beeinflussen könnte.

Dazu wurde, auf obigen Ergebnissen basierend, der Adhäsionsmechanismus des Glykoprotein Ib α mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper chronisch inhibiert. Der Antikörper gegen GPIb α blockiert die Interaktion zwischen dem von Willebrand Faktor und dem Glykoprotein Ib α und unterbindet so die Adhäsion des Plättchens an das Endothel^{2,7,9,91,153}.

Für diese Versuchsreihe wurden die Tiere bereits zwei Wochen nach Beginn der Fütterung mit Antikörpern behandelt. Nach 12 Wochen Antikörpergabe wurden die Tiere geopfert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil hier in unbehandelten, cholesterinreich gefütterten Mäusen bereits deutliche atherosklerotische Veränderungen nachweisbar sind und somit ein Unterschied bei der Hemmung der Atheroprogession erkennbar sein müsste. Der bis zu dieser Versuchsreihe übliche Endpunkt der Versuche mit 18 Wochen Fütterung wurde deshalb nicht angestrebt, weil eine zu lange Behandlung mit dem Antikörper und somit eine zunehmende Gefahr an drohenden Komplikationen (wie z.B. die Bildung von Auto-Antikörpern, oder eventuelle Infektionen durch die peritoneale Injektion der Antikörper) ausgeschlossen werden sollte.

Die Hemmung der GPIb α -vermittelten Thrombozytenadhäsion über einen Zeitraum von 12 Wochen führte zu einem verringerten Anstieg des „Resistance Index“ und zum anderen zu einer substantiellen Reduktion in der Entwicklung atherosklerotischer Plaques im ganzen Tier, so z.B. um 60% in der Aorta abdominalis und um 81% in der A. carotis im Vergleich zu gleichaltrigen unbehandelten Tieren. Um einen eventuellen Einfluss von Fremdprotein (Antikörperapplikation) auf die Atherosklerose auszuschließen, wurden in einer Vergleichsgruppe Mäuse mit einem für die Adhäsion irrelevanten Immunglobulin behandelt. Diese Tiere zeigten keinerlei Abweichung in ihrem Krankheitsverlauf und in der Ausprägung ihrer atherosklerotischen Veränderungen im Vergleich zu gänzlich unbehandelten 14-Wochen-Tieren.

Die signifikante Reduktion des „Resistance Index“ in der Duplex-Sonographie, die nahezu fehlenden atherosklerotischen Veränderungen in der pathologisch-anatomischen Untersuchung mit der Sudan III-Färbung, sowie in der Histomorphometrie nach Hemmung der Thrombozytenadhäsion bekräftigten nochmals die Hypothese, dass der Thrombozyt an der frühen Atherogenese beteiligt sein muss.

3.4 Ausblick

Die Grundlage dieser Arbeit, die Validierung der Atheroprogression in der ApoE-defizienten Maus *in vivo* durch die Intravitalmikroskopie, die Duplex-Sonographie und später der Histologie und der pathologisch-anatomischen Untersuchung zeigt, dass der Thrombozyt nicht nur im späten Stadium der Atherosklerose bei Plaqueruptur und anschließendem Gefäßverschluss und dessen Folgeerscheinungen eine Rolle spielt, sondern schon viel früher, also im Initialstadium der Atherogenese wesentlich, wenn nicht sogar ausschließlich beteiligt sein muss.

Dies könnte das Blutplättchen zu einem interessanten Kandidaten für die präventive Medikation in Hinblick auf die Eindämmung der Atheroprogression, bzw. sogar zur Atherosklerosevermeidung machen.

Mit Sicherheit gibt es jedoch noch weitere Adhäsionsmechanismen, neben den GPIIb-IIIa- und dem GPIb α -vermittelten, die bei der Thrombozytenadhäsion in der Atherogenese beteiligt sind. Es ist aber nun mit Etablierung dieses aussagekräftigen Modells ein Leichtes, auch andere Wege der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion auszutesten. Durch die Breite der eingesetzten Untersuchungsmethoden (Duplex-Sonographie, Intravitalmikroskopie, Histologie, Histomorphometrie, Immunhistologie, pathologisch-anatomische Untersuchung) ist gesichert, dass hier nicht nur Einzeleffekte gemessen werden, sondern ein gesamter Organismus *in vivo* beurteilt werden kann.

Ein interessanter Ausblick ist auch, dass das entnommene Gewebe später molekularbiologisch aufgearbeitet werden kann. So ist es z.B. ein nächstes Ziel dieses Projektes, sich der Veränderung der Genexpression in atherosklerotisch veränderten Gefäßgebieten zu widmen, um so noch genaueren Aufschluss über beteiligte Mechanismen zu bekommen.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Thrombozyten spielen eine wesentliche Rolle bei thrombembolischen Komplikationen der fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsion. Ob sie jedoch ausschlaggebend für den Beginn des arteriosklerotischen Prozesses sind, ist bisher unklar.

Die Thrombozytenadhäsion am Endothel reguliert die Sekretion von intrazellulär gelagerten proinflammatorischen und proliferativen Mediatoren. *In vitro* rufen Plättchen eine Expression von inflammatorischen Genen, Adhäsionsrezeptoren und Chemokinen in Endothelzellen hervor, was auf eine proatherogenetische Funktion/Rolle schließen lassen könnte.

Diese Studie zeigt, dass Thrombozyten am Endothel der A. carotis in der Apo E^{-/-} Maus bereits vor der Entwicklung atherosklerotischer Plaques/Läsionen adhären. Schon nach sechs Wochen cholesterinreicher Fütterung war die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel signifikant erhöht, wohingegen die Leukozytenadhäsion erst sehr viel später zunahm. Diese Tatsache macht den Thrombozyt zu einem wichtigen Faktor in der Entstehung der Atherosklerose.

Um dies zu belegen wurden Versuche mit Antikörpern durchgeführt, die die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel durch Blockade von Glykoprotein Ib α , bzw. GPIIb-IIIa, verhindern.

Die Glykoproteine Ib α und GPIIb-IIIa sind die wichtigsten Adhäsionsrezeptoren bei der Thrombozyten-Endothel-Interaktion und spielen somit eventuell eine große Rolle bei der Entstehung der „Thrombozyten-vermittelten“ Atherosklerose.

Es konnte nachgewiesen werden, dass beide Antikörper im Akutversuch großen Einfluss auf die Adhäsivität der Thrombozyten aufweisen. Wobei anti-GPIb α die Thrombozytenadhäsion um 85% (transiente Adhäsion) bzw. sogar um 99% (permanente Adhäsion) verringern konnte und anti-GPIIb-IIIa mit 95%iger Reduktion vor allem bei permanenter Adhäsion Wirkung zeigte.

Eine Langzeitbehandlung mit dem Antikörper GPIb α konnte sogar das Fortschreiten der Atherosklerose wesentlich beeinflussen. In den mit anti-GPIb α behandelten Tieren konnte eine signifikante Reduktion der Plaquebildung um 81% erreicht werden.

Diese Ergebnisse zeigen die Wichtigkeit des Thrombozyten in der Entstehung der Atherosklerose und machen ihn somit zu einem wichtigen Ansatzpunkt für eine neue anti-atherosklerotische Therapie

5 SUMMARY

The role of thrombocyte- and leukocyte-endothelial cell-interaction in atherogenesis - an *in vivo*-study in the ApoE-knock-out-mouse -

Platelets play a crucial role in thromboembolic complications of advanced atherosclerotic lesions but their involvement in the initiation of the atherosclerotic process is unclear. Platelet adhesion regulates secretion of intracellularly stored proinflammatory and proliferative mediators. *In vitro*, platelets promote the expression of inflammatory genes in endothelial cells, including adhesion receptors and chemokines suggesting a proatherogenic role of platelets. Here, we show *in vivo* that platelets adhere to the vascular endothelium of the carotid artery in ApoE-deficient mice prior to the development of manifest atherosclerotic lesions.

Glycoprotein (GP-)Ib α and GPIIb-IIIa are the predominant adhesion receptors mediating platelet adhesion to the endothelium of the carotid artery and may play a crucial role in the genesis of platelet-mediated atherosclerosis.

In this experiment we could demonstrate the crucial role of these two receptors for platelet adhesion. While anti-GPIb α reduced transient adhesion for 85% and permanent adhesion for 99%, anti-GPIIb-IIIa shows a 95%-reduction of permanent adherent platelets.

Long-term antibody-treatment (anti-GPIb α) shows by a substantial reduction of plaque area from 60% in the aorta and 81% in the carotid artery a crucial influence of atheroprotection. Together, prolonged inhibition of platelet adhesion (with anti-GPIb α) in ApoE-deficient mice profoundly inhibited atherosclerotic lesion formation.

These findings establish platelets as major players in initiation of the atherogenic process and may have important implications for the development of novel anti-atherosclerotic therapies.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDRE,P., B.ARBEILLE, V.DROUET, P.HAINAUD, C.BAL DIT SOLLIER, J.P.CAEN & L.O.DROUET. 1996. Optimal antagonism of GPIIb/IIIa favors platelet adhesion by inhibiting thrombus growth. An ex vivo capillary perfusion chamber study in the guinea pig. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 56-63.
Ref ID: 1802
2. ANDRE,P., C.V.DENIS, J.WARE, S.SAFFARIPOUR, R.O.HYNES, Z.M.RUGGERI & D.D.WAGNER. 2000. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 96: 3322-3328.
Ref ID: 2615
3. ARISTIZABAL,O., D.A.CHRISTOPHER, F.S.FOSTER & D.H.TURNBULL. 1998. 40-MHZ echocardiography scanner for cardiovascular assessment of mouse embryos. *Ultrasound Med. Biol.* 24: 1407-1417.
Ref ID: 3179
4. BAATZ,H., M.STEINBAUER, A.G.HARRIS & F.KROMBACH. 1995. Kinetics of intravital white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc* 15: 85-91.
Ref ID: 553
5. BECKER,K.D., K.R.GOTTSHALL & K.R.CHIEN. 1996. Strategies for studying cardiovascular phenotypes in genetically manipulated mice. *Hypertension* 27: 495-501.
Ref ID: 3168
6. BECKER,M.D., S.CRESPO, T.M.MARTIN, S.R.PLANCK, M.NARAMURA & J.T.ROSENBAUM. 2001. Intraocular in vivo imaging of activated T-lymphocytes expressing green-fluorescent protein after stimulation with endotoxin. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 239: 609-612.
Ref ID: 3180
7. BERGMEIER,W., K.RACKEBRANDT, W.SCHRODER, H.ZIRNGIBL & B.NIESWANDT. 2000. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies. *Blood* 95: 886-893.
Ref ID: 2765
8. BERMAN,M.E., Y.XIE & W.A.MULLER. 1996. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J. Immunol.* 156: 1515-1524.
Ref ID: 1519
9. BEUMER,S., H.F.HEIJNEN, M.J.IJSSELDIJK, E.ORLANDO, P.G.DE GROOT & J.J.SIXMA. 1995. Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood* 86: 3452-3460.
Ref ID: 2994

LITERATURVERZEICHNIS

10. BIBERTHALER,P., B.LUCHTING, S.MASSBERG, D.TEUPSER, S.LANGER, R.LEIDERER, F.KROMBACH & K.MESSMER. 2001. Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res. Exp. Med. (Berl)* 200: 93-105.
Ref ID: 2533
11. BOMBELI,T., B.R.SCHWARTZ & J.M.HARLAN. 1998. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J. Exp. Med.* 187: 329-339.
Ref ID: 1952
12. BRASS,L.F., D.R.MANNING, K.CICHOWSKI & C.S.ABRAMS. 1997. Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb. Haemost.* 78: 581-589.
Ref ID: 1742
13. BRESLOW,J.L. 1996. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272: 685-688.
Ref ID: 2259
14. CAPRON,L. 1988. New concepts of atherogenesis. *Presse Med.* 17: 980-984.
Ref ID: 3234
15. CAPRON,L. 1989. Inflammation and atherosclerosis. *J. Mal Vasc.* 14 Suppl A:3-12.: 3-12.
Ref ID: 3235
16. CAPRON,L. 1991. Leukocytes and arteriosclerosis. *Arch. Mal Coeur Vaiss.* 84: 1845-1850.
Ref ID: 3232
17. CAPRON,L. 2000. Is atherosclerosis an infectious disease. *Rev. Med. Interne* 21: 499-501.
Ref ID: 3236
18. CELLETTI,F.L., J.M.WAUGH, P.G.AMABILE, A.BRENDOLAN, P.R.HILFIKER & M.D.DAKE. 2001. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* 7: 425-429.
Ref ID: 2640
19. CHAVES,A.A., D.M.WEINSTEIN & J.A.BAUER. 2001. Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen. *Life Sci.* 69: 213-222.
Ref ID: 3181
20. CHERESH,D.A. 1987. Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84: 6471-6475.
Ref ID: 3212

LITERATURVERZEICHNIS

21. CHERESH,D.A., S.A.BERLINER, V.VICENTE & Z.M.RUGGERI. 1989. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 58: 945-953.
Ref ID: 3211
22. CLEMETSON,K.J. & J.M.CLEMETSON. 2001. Platelet collagen receptors. *Thromb. Haemost.* 86: 189-197.
Ref ID: 3045
23. COATNEY,R.W. 2001. Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research. *ILAR. J.* 42: 233-247.
Ref ID: 3182
24. CONFORTI,G., C.DOMINGUEZ-JIMENEZ, A.ZANETTI, M.A.GIMBRONE, Jr., O.CREMONA, P.C.MARCHISIO & E.DEJANA. 1992. Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane. *Blood* 80: 437-446.
Ref ID: 3213
25. DAVIES,M.J. 1996. The contribution of thrombosis to the clinical expression of coronary atherosclerosis. *Thromb. Res.* 82: 1-32.
Ref ID: 3214
26. DAVIES,M.J., J.L.GORDON, A.J.GEARING, R.PIGOTT, N.WOOLF, D.KATZ & A.KYRIAKOPOULOS. 1993. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J. Pathol.* 171: 223-229.
Ref ID: 3170
27. DAVIES,M.J., J.L.GORDON, A.J.GEARING, R.PIGOTT, N.WOOLF, D.KATZ & A.KYRIAKOPOULOS. 1993. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J. Pathol.* 171: 223-229.
Ref ID: 3170
28. DEJANA,E. 1993. Endothelial cell adhesive receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21 Suppl 1:S18-21.: S18-S21.
Ref ID: 3171
29. DEJANA,E., F.BERTOCCHI, M.C.BORTOLAMI, A.REGONESI, A.TONTA, F.BREVIARIO & R.GIAVAZZI. 1988. Interleukin 1 promotes tumor cell adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest* 82: 1466-1470.
Ref ID: 3216
30. ENDENBURG,S.C., R.R.HANTGAN, L.LINDEBOOM-BLOKZIJL, H.LANKHOF, W.G.JEROME, J.C.LEWIS, J.J.SIXMA & P.G.DE GROOT. 1995. On the role of von Willebrand factor in promoting platelet adhesion to fibrin in flowing blood. *Blood* 86: 4158-4165.
Ref ID: 2993

LITERATURVERZEICHNIS

31. ERIKSSON,E.E., J.WERR, Y.GUO, P.THOREN & L.LINDBOM. 2000. Direct observations in vivo on the role of endothelial selectins and alpha(4) integrin in cytokine-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse aorta. *Circ. Res.* 86: 526-533.
Ref ID: 2504
32. FELDING-HABERMANN,B. & D.A.CHERESH. 1993. Vitronectin and its receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 864-868.
Ref ID: 2794
33. FRAUCHIGER,B., H.P.SCHMID, C.ROEDEL, P.MOOSMANN & D.STAUB. 2001. Comparison of carotid arterial resistive indices with intima-media thickness as sonographic markers of atherosclerosis. *Stroke* 32: 836-841.
Ref ID: 3269
34. FREDRICKSON,B.J., J.F.DONG, L.V.MCINTIRE & J.A.LOPEZ. 1998. Shear-dependent rolling on von Willebrand factor of mammalian cells expressing the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* 92: 3684-3693.
Ref ID: 3303
35. FRENETTE,P.S., R.C.JOHNSON, R.O.HYNES & D.D.WAGNER. 1995. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7450-7454.
Ref ID: 1548
36. FRENETTE,P.S., T.N.MAYADAS, H.RAYBURN, R.O.HYNES & D.D.WAGNER. 1996. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 84: 563-574.
Ref ID: 1713
37. FRENETTE,P.S., C.MOYNA, D.W.HARTWELL, J.B.LOWE, R.O.HYNES & D.D.WAGNER. 1998. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 91: 1318-1324.
Ref ID: 1954
38. FUSTER,V., L.BADIMON, J.J.BADIMON & J.H.CHESEBRO. 1992. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N. Engl. J. Med.* 326: 242-250.
Ref ID: 3217
39. FUSTER,V., L.BADIMON, J.J.BADIMON & J.H.CHESEBRO. 1992. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N. Engl. J. Med.* 326: 310-318.
Ref ID: 3218
40. FUSTER,V., J.T.FALLON, J.J.BADIMON & Y.NEMERSON. 1997. The unstable atherosclerotic plaque: clinical significance and therapeutic intervention. *Thromb. Haemost.* 78: 247-255.
Ref ID: 3169
41. GALLAGHER,K. & B.SUMPIO. 1997. *The Basic Science of Vascular disease.* Futura Publishing Company. Armonk, New York.
Ref ID: 3205

LITERATURVERZEICHNIS

42. GAWAZ,M., K.BRAND, T.DICKFELD, G.POGATSA-MURRAY, S.PAGE, C.BOGNER, W.KOCH, A.SCHOMIG & F.NEUMANN. 2000. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148: 75-85.
Ref ID: 2297
43. GAWAZ,M., T.DICKFELD, C.BOGNER, S.FATEH-MOGHADAM & F.J.NEUMANN. 1997. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 23: 379-385.
Ref ID: 2492
44. GAWAZ,M., F.J.NEUMANN, T.DICKFELD, W.KOCH, K.L.LAUGWITZ, H.ADELSBERGER, K.LANGENBRINK, S.PAGE, D.NEUMEIER, A.SCHOMIG & K.BRAND. 1998. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98: 1164-1171.
Ref ID: 2262
45. GAWAZ,M., F.J.NEUMANN, T.DICKFELD, A.REININGER, H.ADELSBERGER, A.GEBHARDT & A.SCHOMIG. 1997. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 96: 1809-1818.
Ref ID: 1956
46. GAWAZ,M., F.J.NEUMANN, I.OTT, A.SCHIESSLER & A.SCHOMIG. 1996. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 93: 229-237.
Ref ID: 2596
47. GAWAZ,M.P. 2001. *Blood Platelets: physiology, pathophysiology membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic diseases.* Thieme Verlag. Stuttgart, New York. S.30-42.
Ref ID: 3208
48. GAWAZ,M.P. 2001. *Blood Platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic diseases.* Thieme Verlag. Stuttgart, New York. S.97-108
Ref ID: 3206
49. GAWAZ,M.P. 2002. *Blood Platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic diseases.* Thieme Verlag. Stuttgart, New York. S.2-21
Ref ID: 3207
50. GIMBRONE,M.A., Jr. 1986. *Vascular Endothelium in Hemostasis and Thrombosis.* Churchill Livingstone. Edinburgh.
Ref ID: 3209
51. GIMBRONE,M.A., Jr. 1999. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 155: 1-5.
Ref ID: 3302

LITERATURVERZEICHNIS

52. GOERTZ,D.E., D.A.CHRISTOPHER, J.L.YU, R.S.KERBEL, P.N.BURNS & F.S.FOSTER. 2000. High-frequency color flow imaging of the microcirculation. *Ultrasound Med. Biol.* 26: 63-71.
Ref ID: 3183
53. GONZALEZ,A.P., S.SEPULVEDA, S.MASSBERG, R.BAUMEISTER & M.D.MENGER. 1994. In vivo fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats. *Transplantation* 58: 403-408.
Ref ID: 692
54. GRAYSON,M.H., D.D.CHAPLIN, I.E.KARL & R.S.HOTCHKISS. 2001. Confocal fluorescent intravital microscopy of the murine spleen. *J. Immunol. Methods* 256: 55-63.
Ref ID: 3184
55. HACKENG,C.M., M.HUIGSLOOT, M.W.PLADET, H.K.NIEUWENHUIS, H.J.VAN RIJN & J.W.AKKERMAN. 1999. Low-density lipoprotein enhances platelet secretion via integrin-alphaIIb beta3-mediated signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 239-247.
Ref ID: 3226
56. HANTGAN,R.R., G.HINDRIKS, R.G.TAYLOR, J.J.SIXMA & P.G.DE GROOT. 1990. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* 76: 345-353.
Ref ID: 2209
57. HARTLEY,C.J., G.E.TAFFET, L.H.MICHAEL, T.T.PHAM & M.L.ENTMAN. 1997. Noninvasive determination of pulse-wave velocity in mice. *Am. J. Physiol* 273: H494-H500.
Ref ID: 3185
58. HAWIGER,J. 1995. Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction. *Thromb. Haemost.* 74: 369-372.
Ref ID: 1639
59. HAWRYLOWICZ,C.M., G.L.HOWELLS & M.FELDMANN. 1991. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J. Exp. Med.* 174: 785-790.
Ref ID: 3219
60. HELLER,R. & E.M.BEVERS. 1997. Platelet and their factors. Springer Verlag. Berlin.
Ref ID: 3210
61. HENKE,J., U.ROBERTS, K.OTTO, C.LENDL, U.MATIS, T.BRILL & W.ERHARDT. 1996. Clinical investigations of an i.m. combination anesthesia with fentanyl/climazolam/xylazine and postoperative i.v. antagonism with naloxone/sarmazenil/yohimbine in guinea pigs. *Tierarztl. Prax.* 24: 85-87.
Ref ID: 3309

LITERATURVERZEICHNIS

62. HENN,V., J.R.SLUPSKY, M.GRAFE, I.ANAGNOSTOPOULOS, R.FORSTER, G.MÜLLER-BERGHAUS & R.A.KROCZEK. 1998. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391: 591-594.
Ref ID: 1991
63. HOEKS,A.P., P.J.BRANDS, J.M.WILLIGERS & R.S.RENEMAN. 1999. Non-invasive measurement of mechanical properties of arteries in health and disease. *Proc. Inst. Mech. Eng [H.]* 213: 195-202.
Ref ID: 3186
64. HOLT,J.C. & S.NIEWIAROWSKI. 1985. Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin. Hematol.* 22: 151-163.
Ref ID: 2432
65. HORIE,Y., R.WOLF, J.RUSSELL, T.P.SHANLEY & D.N.GRANGER. 1997. Role of Kupffer cells in gut ischemia/reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction in mice. *Hepatology* 26: 1499-1505.
Ref ID: 1936
66. HOSHIGA,M., C.E.ALPERS, L.L.SMITH, C.M.GIACHELLI & S.M.SCHWARTZ. 1995. Alpha-v beta-3 integrin expression in normal and atherosclerotic artery. *Circ. Res.* 77: 1129-1135.
Ref ID: 2450
67. ISHIBASHI,S., J.HERZ, N.MAEDA, J.L.GOLDSTEIN & M.S.BROWN. 1994. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 4431-4435.
Ref ID: 2275
68. ISHIGAMI,M., D.K.SWERTFEGER, M.S.HUI, N.A.GRANHOLM & D.Y.HUI. 2000. Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1020-1026.
Ref ID: 3187
69. JEROME,S.N., M.DORÉ, J.C.PAULSON, C.W.SMITH & R.J.KORTHUIS. 1994. P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: role in the genesis of postischemic no-reflow. *Am. J. Physiol.* 266: H1316-H1321.
Ref ID: 1116
70. KAPLANSKI,G., R.PORAT, K.AIURA, J.K.ERBAN, J.A.GELFAND & C.A.DINARELLO. 1993. Activated platelets induce endothelial secretion of interleukin- 8 in vitro via an interleukin-1-mediated event. *Blood* 81: 2492-2495.
Ref ID: 2034
71. KELLY,K.J., W.W.WILLIAMS, Jr., R.B.COLVIN, S.M.MEEHAN, T.A.SPRINGER, J.C.GUTIERREZ RAMOS & J.V.BONVENTRE. 1996. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J. Clin. Invest.* 97: 1056-1063.
Ref ID: 1884

LITERATURVERZEICHNIS

72. KNOUFF,C., M.E.HINSDALE, H.MEZDOUR, M.K.ALTEBURG, M.WATANABE, S.H.QUARFORDT, P.M.SULLIVAN & N.MAEDA. 1999. Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J. Clin. Invest* 103: 1579-1586.
Ref ID: 3279
73. KNOWLES,J.W. & N.MAEDA. 2000. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2336-2345.
Ref ID: 3188
74. KOSEKI,S., S.MIURA, H.FUJIMORI, R.HOKARI, S.KOMOTO, Y.HARA, T.OGINO, H.NAGATA, M.GOTO, S.HACHIMURA, S.KAMINOGAWA & H.ISHII. 2001. In situ demonstration of intraepithelial lymphocyte adhesion to villus microvessels of the small intestine. *Int. Immunol.* 13: 1165-1174.
Ref ID: 3189
75. LABROPOULOS,N., M.M.ASHRAF, S.S.KANG, D.S.OH, J.BUCKMAN & W.H.BAKER. 2000. Viscoelastic properties of normal and atherosclerotic carotid arteries. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 19: 221-225.
Ref ID: 3272
76. LAFRENIE,R.M., T.J.PODOR, M.R.BUCHANAN & F.W.ORR. 1992. Up-regulated biosynthesis and expression of endothelial cell vitronectin receptor enhances cancer cell adhesion. *Cancer Res.* 52: 2202-2208.
Ref ID: 3225
77. LAWRENCE,M.B. & T.A.SPRINGER. 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65: 859-873.
Ref ID: 2568
78. LI,H., M.I.CYBULSKY, M.A.GIMBRONE, Jr. & P.LIBBY. 1993. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am. J. Pathol.* 143: 1551-1559.
Ref ID: 3190
79. LI,J.M., R.S.PODOLSKY, M.J.ROHRER, B.S.CUTLER, M.T.MASSIE, M.R.BARNARD & A.D.MICHELSON. 1996. Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa. *J. Surg. Res.* 61: 543-548.
Ref ID: 1638
80. LI,L., E.MESSAS, E.L.BATISTA, Jr., R.A.LEVINE & S.AMAR. 2002. Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation* 105: 861-867.
Ref ID: 3300
81. LIBBY,P., P.M.RIDKER & A.MASERI. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143.
Ref ID: 3263

LITERATURVERZEICHNIS

82. LINDEMANN,S., N.D.TOLLEY, D.A.DIXON, T.M.MCINTYRE, S.M.PRESCOTT, G.A.ZIMMERMAN & A.S.WEYRICH. 2001. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J. Cell Biol.* 154: 485-490.
Ref ID: 2643
83. LUSIS,A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241.
Ref ID: 2641
84. LUTGENS,E., L.GORELIK, M.J.DAEMEN, E.D.DE MUINCK, I.S.GREWAL, V.E.KOTELIANSKY & R.A.FLAVELL. 1999. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat. Med.* 5: 1313-1316.
Ref ID: 2487
85. MAHLEY,R.W. 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-630.
Ref ID: 3296
86. MASSBERG,S., S.EISENMENGER, G.ENDERS, F.KROMBACH & K.MESSMER. 1998. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res. Exp. Med. (Berlin)* 198: 23-35.
Ref ID: 1990
87. MASSBERG,S., G.ENDERS, R.LEIDERER, S.EISENMENGER, D.VESTWEBER, F.KROMBACH & K.MESSMER. 1998. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 92: 507-515.
Ref ID: 1989
88. MASSBERG,S., G.ENDERS, F.C.MATOS, L.I.TOMIC, R.LEIDERER, S.EISENMENGER, K.MESSMER & F.KROMBACH. 1999. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 94: 3829-3838.
Ref ID: 2290
89. MASSBERG,S., A.P.GONZALEZ, R.LEIDERER, M.D.MENGER & K.MESSMER. 1998. In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. *Br. J. Surg.* 85: 127-133.
Ref ID: 1122
90. MASSBERG,S., A.P.GONZALEZ, M.D.MENGER & K.MESSMER. 1994. Analysis of microvascular perfusion of small intestine after heterotopic transplantation in the rat. *Br. J. Surg.* 81: 122.
Ref ID: 1124
91. MATSUNO,H., O.KOZAWA, M.NIWA & T.UEMATSU. 1997. Inhibition of von Willebrand factor binding to platelet GP Ib by a fractionated aurintricarboxylic acid prevents restenosis after vascular injury in hamster carotid artery. *Circulation* 96: 1299-1304.
Ref ID: 2819

LITERATURVERZEICHNIS

92. MAY,A.E., F.J.NEUMANN & K.T.PREISSNER. 1999. The relevance of blood cell-vessel wall adhesive interactions for vascular thrombotic disease. *Thromb. Haemost.* 82: 962-970.
Ref ID: 3172
93. MENETON,P., M.BLOCH-FAURE, A.A.HAGEGE, H.RUETTEN, W.HUANG, S.BERGAYA, D.CEILER, D.GEHRING, I.MARTINS, G.SALMON, C.M.BOULANGER, J.NUSSBERGER, B.CROZATIER, J.M.GASC, D.HEUDES, P.BRUNEVAL, T.DOETSCHMAN, J.MENARD & F.ALHENC-GELAS. 2001. Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98: 2634-2639.
Ref ID: 3191
94. MENGER,M.D., S.RICHTER, J.I.YAMAUCHI & B.VOLLMAR. 1999. Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states. *Ann. Acad. Med. Singapore* 28: 542-556.
Ref ID: 3192
95. MOGHADASIAN,M.H., B.M.MCMANUS, P.H.PRITCHARD & J.J.FROHLICH. 1997. "Tall oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 119-126.
Ref ID: 3301
96. MONTRUCCHIO,G., G.EMANUELLI, A.VENCO & G.CAMUSSI. 1995. Functional changes of the endothelium and atherosclerotic process. *Ann. Ital. Med. Int.* 10: 31-40.
Ref ID: 3244
97. MUNRO,J.M. & R.S.COTRAN. 1988. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 58: 249-261.
Ref ID: 3245
98. MURPHY,J.F., J.C.BORDET, B.WYLER, M.C.RISSOAN, P.CHOMARAT, T.DEFRANCE, P.MIOSSEC & J.L.MCGREGOR. 1994. The vitronectin receptor (alpha v beta 3) is implicated, in cooperation with P-selectin and platelet-activating factor, in the adhesion of monocytes to activated endothelial cells. *Biochem. J.* 304: 537-542.
Ref ID: 3221
99. NAGAI,Y., J.HELWEGEN, J.L.FLEG, M.K.KEMPER, C.J.EARLEY, T.M.RYWIK, P.WIJN & E.J.METTER. 1999. Decay Index: a new carotid Doppler waveform measure associated with the Windkessel function of elastic arteries. *Ultrasound Med. Biol.* 25: 1371-1376.
Ref ID: 3275
100. NAKASHIMA,Y., A.S.PLUMP, E.W.RAINES, J.L.BRESLOW & R.ROSS. 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb.* 14: 133-140.
Ref ID: 3193

LITERATURVERZEICHNIS

101. NAKASHIMA,Y., E.W.RAINES, A.S.PLUMP, J.L.BRESLOW & R.ROSS. 1998.
Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 842-851.
Ref ID: 2317
102. NAKASHIMA,Y., E.W.RAINES, A.S.PLUMP, J.L.BRESLOW & R.ROSS. 1998.
Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 842-851.
Ref ID: 2317
103. NEMERSON,Y. 1992. The tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin. Hematol.* 29: 170-176.
Ref ID: 3173
104. NIESWANDT,B., W.BERGMEIER, K.RACKEBRANDT, J.E.GESSNER & H.ZIRNGIBL. 2000. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood* 96: 2520-2527.
Ref ID: 2418
105. NIEUWENHUIS,H.K., K.S.SAKARIASSEN, W.P.HOUDIJK, P.F.NIEVELSTEIN & J.J.SIXMA. 1986. Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. *Blood* 68: 692-695.
Ref ID: 3023
106. NOLTE,D., R.HECHT, P.SCHMID, A.BOTZLAR, M.D.MENGER, C.NEUMUELLER, F.SINOWATZ, D.VESTWEBER & K.MESSMER. 1994. Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. *Am. J. Physiol.* 267: H1320-8.
Ref ID: 1757
107. NURDEN,A.T. & J.P.CAEN. 1975. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature* 255: 720-722.
Ref ID: 3174
108. NURDEN,A.T., D.DIDRY, N.KIEFFER & R.P.MCEVER. 1985. Residual amounts of glycoproteins IIb and IIIa may be present in the platelets of most patients with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood* 65: 1021-1024.
Ref ID: 2754
109. OGURA,A., K.INOUE, K.TAKANO, T.WAKAYAMA & R.YANAGIMACHI. 2000. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. *Mol. Reprod. Dev.* 57: 55-59.
Ref ID: 3266
110. PAIGEN,B., A.MORROW, C.BRANDON, D.MITCHELL & P.HOLMES. 1985. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 57: 65-73.
Ref ID: 3195

LITERATURVERZEICHNIS

111. PAIGEN,B., A.MORROW, P.A.HOLMES, D.MITCHELL & R.A.WILLIAMS. 1987. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68: 231-240.
Ref ID: 3299
112. PAIGEN,B., A.S.PLUMP & E.M.RUBIN. 1994. The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia. *Curr. Opin. Lipidol.* 5: 258-264.
Ref ID: 3194
113. PALABRICA,T., R.LOBB, B.C.FURIE, M.ARONOVITZ, C.BENJAMIN, Y.M.HSU, S.A.SAJER & B.FURIE. 1992. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 359: 848-851.
Ref ID: 1683
114. PIEDRAHITA,J.A., S.H.ZHANG, J.R.HAGAMAN, P.M.OLIVER & N.MAEDA. 1992. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89: 4471-4475.
Ref ID: 3196
115. POBER,J.S. & R.S.COTRAN. 1990. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev.* 70: 427-451.
Ref ID: 2559
116. POLLICK,C., S.L.HALE & R.A.KLONER. 1995. Echocardiographic and cardiac Doppler assessment of mice. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 8: 602-610.
Ref ID: 3197
117. RADOMSKI,A., M.W.STEWART, P.JURASZ & M.W.RADOMSKI. 2001. Pharmacological characteristics of solid-phase von Willebrand factor in human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 134: 1013-1020.
Ref ID: 3175
118. READ,T.A., M.FARHADI, R.BJERKVIG, B.R.OLSEN, A.M.ROKSTAD, P.C.HUSZTHY & P.VAJKOCZY. 2001. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells. *Cancer Res.* 61: 6830-6837.
Ref ID: 3198
119. REINER,Z. & E.TEDESCHI-REINER. 2001. New information on the pathophysiology of atherosclerosis. *Lijec. Vjesn.* 123: 26-31.
Ref ID: 3250
120. RESNICK,N. & M.A.GIMBRONE, Jr. 1995. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* 9: 874-882.
Ref ID: 3223
121. RIEGER,H., W.SCHOPP, A.L.STRAUSS, A.SCHEFFLER, G.DRIESSEN & B.KLEUREN. 1998. *Klinische Angiologie*. Springer Verlag, Berlin.
Ref ID: 3307

LITERATURVERZEICHNIS

122. ROBBIE,L. & P.LIBBY. 2001. Inflammation and atherothrombosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 947:167-79; discussion 179-80.: 167-179.
Ref ID: 3258
123. ROMEIS B. 1989. *Mikroskopische Technik.* Urban und Schwarzenberg. München.
Ref ID: 3308
124. ROSS,R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.
Ref ID: 2197
125. ROSS,R. 1999. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126.
Ref ID: 2316
126. ROSS,R. 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138: S419-S420.
Ref ID: 2315
127. RUGGERI,Z.M. 1997. von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 99: 559-564.
Ref ID: 2228
128. RUGGERI,Z.M. 1999. Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* 82: 576-584.
Ref ID: 3176
129. SAVAGE,B., E.SALDIVAR & Z.M.RUGGERI. 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84: 289-297.
Ref ID: 1610
130. SCHNEIDER,J. 1993. Morphological basis of atherosclerosis. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* 82: 1335-1338.
Ref ID: 3248
131. SEDLMAYR,P., A.BLASCHITZ, M.WILDERS-TRUSCHNIG, A.TIRAN & G.DOHR. 1995. Platelets contain interleukin-1 alpha and beta which are detectable on the cell surface after activation. *Scand J Immunol* 42: 209-214.
Ref ID: 2332
132. SIESS,W. 1989. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol. Rev.* 69: 58-178.
Ref ID: 2147
133. SMITH,J.D. & J.L.BRESLOW. 1997. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J. Intern. Med.* 242: 99-109.
Ref ID: 3199
134. SORIANO,A., A.SALAS, A.SALAS, M.SANS, M.GIRONELLA, M.ELENA, D.C.ANDERSON, J.M.PIQUE & J.PANES. 2000. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab Invest* 80: 1541-1551.
Ref ID: 3200

LITERATURVERZEICHNIS

135. STAPRANS,I., X.M.PAN, J.H.RAPP, C.GRUNFELD & K.R.FEINGOLD. 2000. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor- and apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 708-714.
Ref ID: 3285
136. STEIN,O. & Y.STEIN. 1999. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 144: 285-301.
Ref ID: 3286
137. SULLIVAN,P.M., H.MEZDOUR, Y.ARATANI, C.KNOUFF, J.NAJIB, R.L.REDDICK, S.H.QUARFORDT & N.MAEDA. 1997. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 272: 17972-17980.
Ref ID: 3298
138. TANAKA,N., N.DALTON, L.MAO, H.A.ROCKMAN, K.L.PETERSON, K.R.GOTTSHALL, J.J.HUNTER, K.R.CHIEN & J.ROSS, Jr. 1996. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation* 94: 1109-1117.
Ref ID: 2795
139. TANGIRALA,R.K., E.M.RUBIN & W.PALINSKI. 1995. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid Res.* 36: 2320-2328.
Ref ID: 2270
140. THOMPSON,J.S. 1969. Atheromata in an inbred strain of mice. *J. Atheroscler. Res.* 10: 113-122.
Ref ID: 3201
141. TOMOCHIKA,Y., N.TANAKA, S.ONO, K.MURATA, A.MURO, T.YAMAMURA, T.TONE, M.IWATATE, K.UEDA, K.MORIKUNI & M.MATSUZAKI. 1999. Assessment by transesophageal echography of atherosclerosis of the descending thoracic aorta in patients with hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* 83: 703-709.
Ref ID: 3278
142. VALENTE,A.J., M.M.ROZEK, E.A.SPRAGUE & C.J.SCHWARTZ. 1992. Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A special role for monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* 86: III20-III25.
Ref ID: 3224
143. VAN DE POLL,S.W., T.J.ROMER, O.L.VOLGER, D.J.DELSING, T.C.BAKKER SCHUT, H.M.PRINCEN, L.M.HAVEKES, J.W.JUKEMA, L.A.VAN DER & G.J.PUPPELS. 2001. Raman spectroscopic evaluation of the effects of diet and lipid-lowering therapy on atherosclerotic plaque development in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1630-1635.
Ref ID: 3287

LITERATURVERZEICHNIS

144. VAN ZANTEN,G.H., S.DE GRAAF, P.J.SLOOTWEG, H.F.HEIJNEN, T.M.CONNOLLY, P.G.DE GROOT & J.J.SIXMA. 1994. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J. Clin. Invest* 93: 615-632.
Ref ID: 2448
145. VLOT,A.J., S.J.KOPPELMAN, B.N.BOUMA & J.J.SIXMA. 1998. Factor VIII and von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* 79: 456-465.
Ref ID: 3177
146. VOLLMAR,B., J.GLASZ, M.D.MENGER & K.MESSMER. 1995. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 117: 195-200.
Ref ID: 1046
147. VOLLMAR,B., M.W.LASCHKE, R.ROHAN, J.KOENIG & M.D.MENGER. 2001. In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am. J. Pathol.* 159: 1661-1670.
Ref ID: 3202
148. VOLLMAR,B., M.MORGENTHALER, M.AMON & M.D.MENGER. 2000. Skin microvascular adaptations during maturation and aging of hairless mice. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279: H1591-H1599.
Ref ID: 3203
149. WAKAYAMA,T., V.TABAR, I.RODRIGUEZ, A.C.PERRY, L.STUDER & P.MOMBAERTS. 2001. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292: 740-743.
Ref ID: 3265
150. WERTHEIMER,S.J., C.L.MYERS, R.W.WALLACE & T.P.PARKS. 1992. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* 267: 12030-12035.
Ref ID: 2567
151. WU,D., M.MEIRING, H.F.KOTZE, H.DECKMYN & N.CAUWENBERGHS. 2002. Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 323-328.
Ref ID: 3305
152. WU,D., K.VANHOORELBEKE, N.CAUWENBERGHS, M.MEIRING, H.DEPRAETERE, H.F.KOTZE & H.DECKMYN. 2002. Inhibition of the von Willebrand (VWF)-collagen interaction by an antihuman VWF monoclonal antibody results in abolition of in vivo arterial platelet thrombus formation in baboons. *Blood* 99: 3623-3628.
Ref ID: 3306

LITERATURVERZEICHNIS

153. WU, Y.P., T.VINK, M.SCHIPHORST, G.H.VAN ZANTEN, M.J.IJSSELDIJK, P.G.DE GROOT & J.J.SIXMA. 2000. Platelet thrombus formation on collagen at high shear rates is mediated by von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction and inhibited by von Willebrand factor-glycoprotein IIb/IIIa interaction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1661-1667.
Ref ID: 2972
154. WWW.AKH-WIEN.AT. 2002. the platelet page Homepage der AKH-Wien.
Ref ID: 3313
155. YANG, X.P., Y.H.LIU, E.G.SHESELY, M.BULAGANNAWAR, F.LIU & O.A.CARRETERO. 1999. Endothelial nitric oxide gene knockout mice: cardiac phenotypes and the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Hypertension* 34: 24-30.
Ref ID: 3204
156. YAP, C.L., S.C.HUGHAN, S.L.CRANMER, W.S.NESBITT, M.M.ROONEY, S.GIULIANO, S.KULKARNI, S.M.DOPHEIDE, Y.YUAN, H.H.SALEM & S.P.JACKSON. 2000. Synergistic adhesive interactions and signaling mechanisms operating between platelet glycoprotein Ib/IX and integrin alpha IIb beta 3. Studies in human platelets and transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 275: 41377-41388.
Ref ID: 3178
157. ZEISS. 1998. Bedienungsanleitung für das Mikroskop Axiotech vario 100.
Ref ID: 3315
158. ZEISS. 2002. Mikroskopieren von Anfang an. Informationsbroschüre.
Ref ID: 3314
159. ZHANG, S.H., R.L.REDDICK, J.A.PIEDRAHITA & N.MAEDA. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-471.
Ref ID: 2482

TABELLENVERZEICHNIS

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	12
Tabelle 2	15
Tabelle 3	26
Tabelle 4	26
Tabelle 5	27
Tabelle 6	27
Tabelle 7	28
Tabelle 8	56
Tabelle 9	58
Tabelle 10	59
Tabelle 11	61
Tabelle 12	63
Tabelle 13	65
Tabelle 14	67
Tabelle 15	69

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	3
Abbildung 2	4
Abbildung 3	4
Abbildung 4	5
Abbildung 5	9
Abbildung 6	11
Abbildung 7	17
Abbildung 8	18
Abbildung 9	18
Abbildung 10	30
Abbildung 11	31
Abbildung 12	32
Abbildung 13	33
Abbildung 14	35
Abbildung 15	35
Abbildung 16	39
Abbildung 17	40
Abbildung 18	41
Abbildung 19	44
Abbildung 20	50
Abbildung 21	52
Abbildung 22	53
Abbildung 23	54
Abbildung 24	55
Abbildung 25	56
Abbildung 26	57
Abbildung 27	59
Abbildung 28	60
Abbildung 29	61
Abbildung 30	62
Abbildung 31	65
Abbildung 32	66

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 33	67
Abbildung 34	68
Abbildung 35	70
Abbildung 36	71
Abbildung 37	72

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.: Arteria (lat.)

Abb. : Abbildung

Abk. : Abkürzung

ACC : A. carotis communis

ACE : A. carotis externa

ACI : A. carotis interna

ADP : Adenosindiphosphat

AK : Antikörper

AMP : Adenosinmonophosphat

ApoE : Apolipoprotein E

ATP : Adenosintriphosphat

°C : Grad Celsius

CCD : charged-coupled-device

DCF : Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat

Duplex : Duplex-Sonographie

Empf. : Empfänger

Fa. : Firma

FGF : fibroblast growth factor

GP : Glykoprotein

h : Stunde

HE : Hämatoxylin/Eosin

ICAM : intercellular adhesion molecule

IP₃ : Inositol-1,4,5-Triphosphat

IVM : Intravitalmikroskopie

kg : Kilogramm

LDL : low density lipoprotein

Lz : Leukozyten

µg : Mikrogramm

µl : Mikroliter

µm : Mikrometer

ml : Milliliter

Min. : Minuten

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MW : Mittelwert
n : Anzahl
nm : Nanometer
NO : Stickstoffmonoxyd
OP : Operation
PBS : phosphat buffered saline
PDGF : platelet derived growth factor
PECAM : platelet-endothelial cell adhesion molecule
PRP : platelet rich plasma
RI : „Resistance Index“
rpm : rounds per minute
SEM : standard error mean
sin : Sinus
Tab. : Tabelle
TGF- β : transforming growth factor- β
TxA₂ : Thromboxan A₂
Tz : Thrombozyten
VCAM : vascular cellular adhesion molecule
V. : Vena (lat.)
V_{dia} : Enddiastolische Flussgeschwindigkeit
VLDL : very low density lipoprotein
V_{sys} : Systolische Flußgeschwindigkeit
VWF : von Willebrand Faktor
WT : Wildtyp
z.B. : zum Beispiel

10 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf möchte ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität ganz herzlich danken.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe im Institut für Experimentelle Kardiologie des Deutschen Herzzentrums in München. In dieser engagierten Arbeitsgruppe unterstützte er mich während der gesamten Zeit durch Anregungen und konstruktive Kritik und hatte jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme.

Danken möchte ich auch Dr. med. Steffen Massberg. Durch sein Engagement war es möglich, die Intravitalmikroskopie im Institut für Experimentelle Kardiologie aufzubauen und zu etablieren. Unter seiner Anleitung erlernte ich die Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie.

Ganz herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Wolf Erhardt für die Durchsicht des Manuskripts und seine unermüdliche Energie, die Doktoranden zu unterstützen.

Ein großes Dankeschön auch an die netten und vor allem zuverlässigen und verantwortungsvollen Tierpfleger, insbesondere Rosi Bergmeier und Isabella Kratzer, für die hervorragende Betreuung meiner Mäuse.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Elke Müller für Hilfe bei der Erstellung der histologischen Präparate für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung und die Immunhistologie, sowie Frau Dr. med. Iris Müller für die Anfertigung der Schnitte zur histomorphometrischen Auswertung.

Auch Herrn PD Dr. rer. nat. Bernhard Nieswandt möchte ich danken. Er stellte freundlicherweise unserer Arbeitsgruppe die verwendeten Maus-Antikörper (JON/A gegen GPIIb-IIIa und p0p/B gegen GPIIb α) zur Verfügung.

DANKSAGUNG

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützen und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

11 LEBENS LAUF

Name:	Sabine Grüner
Geburtsdatum/-ort:	04.06.1975 in Garmisch-Partenkirchen
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Eltern:	Hermann Grüner, Studiendirektor Hannelore Grüner, Studienrätin
Geschwister:	Brigitte Grüner Michael Grüner
Schulbildung:	
September 1981-Juli 1985	Volksschule Partenkirchen
September 1985-Juli 1994	Werdenfels-Gymnasium Garmisch-Partenkirchen
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Hochschulbildung:	
November 1994-Februar 2000	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München (LMU) 7. Semester an der Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT)
seit März 2000	Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians- Universität München (LMU)
1.8.2001-1.8.2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Gawaz im Dt. Herzzentrum München
seit 1.8.2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Nieswandt im Rudolf-Virchow-Zentrum für Exp. Biomedizin (DFG-Forschungszentrum) Würzburg