

Aus der I. Medizinischen Klinik  
(Prof. Dr. med. A. Schömig)  
der Technischen Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. med. S. Massberg

Vorgelegt über den  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
am Institut für Tierpathologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Rekrutierung von Thrombozyten, Leukozyten und  
Endothelzellen an die verletzte Endothelwand**  
-  
**Die Rolle des Lipidmediators Sphingosin-1-Phosphat**

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

Eingereicht von  
**Verena Barocke**  
Tierärztin aus Grub am Forst

München, 2008

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

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Schmahl  
Korreferent/en: Univ.- Prof. Dr. Kaspers

Tag der Promotion:  
18. Juli 2008

*Für meine Eltern*

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
2.1	MORPHOLOGIE UND FUNKTION VON ARTERIEN .....	3
2.2	ATHEROSKLEROSE.....	4
2.3	PHYSIOLOGIE DER HÄMOSTASE.....	6
2.3.1	<i>Primäre Hämostase</i> .....	7
2.3.2	<i>Sekundäre Hämostase</i> .....	11
2.3.3	<i>Fibrinolyse</i> .....	13
2.4	PATHOLOGIE DER HÄMOSTASE.....	14
2.5	REPARATUR DER GESCHÄDIGTEN GEFÄßWAND, NEOINTIMAFORMATION .....	14
2.6	MORPHOLOGIE UND FUNKTION VON LEUKOZYTEN .....	15
2.6.1	<i>Granulozyten</i> .....	16
2.6.2	<i>Lymphozyten</i> .....	19
2.6.3	<i>Monozyten</i> .....	21
2.7	MORPHOLOGIE UND FUNKTION VON EMBRYONALEN ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN..	22
2.8	DIE ROLLE VON SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT BEI DER REGULATION VON INFLAMMATORISCHEN UND PROLIFERATIVEN PROZESSEN UND IN DER ATHEROGENESE.....	25
2.8.1	<i>S1P-Rezeptoren</i> .....	27
2.8.2	<i>Sphingosinkinasen</i> .....	28
2.8.3	<i>S1P und Leukozyten</i> .....	28
2.8.4	<i>S1P und Endothelzellen</i> .....	28
2.8.5	<i>S1P und Neointimaformation</i> .....	30
2.8.6	<i>Fingolimod (FTY 720)</i> .....	31
2.8.7	<i>Therapeutische Ansätze für S1P</i> .....	33
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
4.1	SUBSTANZEN .....	35
4.1.1	<i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i> .....	35
4.1.2	<i>Fingolimod (FTY 720)</i> .....	35
4.1.3	<i>SEW 2871</i> .....	35
4.1.4	<i>Fluoreszenzfarbstoffe</i> .....	36
4.1.5	<i>Puffer</i> .....	39
4.2	TIERMODELL .....	39
4.2.1	<i>Verwendete Versuchstiere</i> .....	39
4.2.2	<i>Prämedikation</i> .....	43
4.2.3	<i>Wahl und Durchführung der Narkose</i> .....	43
4.2.4	<i>Operationstechniken</i> .....	45
4.2.5	<i>Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie</i> .....	48
4.2.6	<i>Färbeprotokolle ex vivo</i> .....	51

4.2.7	<i>Färbeprotokolle in vivo</i> .....	53
4.2.8	<i>Organentnahme (Carotiden, Aortenbogen)</i> .....	53
4.2.9	<i>Dokumentation</i> .....	54
4.3	AUSWERTUNG .....	55
4.3.1	<i>Auswertung der Videoaufnahmen</i> .....	55
4.3.2	<i>Histologie und Histomorphometrie</i> .....	59
4.4	VERSUCHSPROTOKOLLE UND EXPERIMENTELLE GRUPPEN .....	64
4.4.1	<i>Rolle der durch Sphk1 vermittelten S1P-Synthese für die Atherosklerose</i> .....	64
4.4.2	<i>Rolle von Sphingosin-1-Phosphat in der arteriellen Thrombose</i> .....	66
4.4.3	<i>Rolle von Sphingosin-1-Phosphat für die Rekrutierung von embryonalen endothelialen Progenitorzellen (eEPCs) in der arteriellen Thrombose</i> .....	68
4.4.4	<i>Rolle von Sphingosin-1-Phosphat in der Neointimaformation</i> .....	69
4.5	AUSWERTUNG UND STATISTIK .....	71
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>72</b>
5.1	EINFLUSS VON SPHK1 UND S1P-REZEPTOREN AUF DIE ATHEROSKLEROSE .....	72
5.2	ROLLE VON SPHK1 UND S1P-REZEPTOREN IN DER ARTERIELLEN THROMBOSE.....	77
5.3	ROLLE VON SPHK1 UND S1P-REZEPTOREN FÜR DIE REKRUTIERUNG VON eEPCs IN DER ARTERIELLEN THROMBOSE .....	80
5.4	ROLLE VON SPHK1 UND S1P-REZEPTOREN IN DER REGULATION VON ZELL-ZELL-INTERAKTIONEN UND IN DER NEOINTIMAFORMATION NACH GEFÄßVERLETZUNG .....	81
5.5	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....	83
5.5.1	<i>Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren in der Atherosklerose</i> .....	83
5.5.2	<i>Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren in der arteriellen Thrombose</i> .....	83
5.5.3	<i>Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren für die Rekrutierung von eEPCs in der arteriellen Thrombose</i> .....	84
5.5.4	<i>Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren in der Neointimaformation</i> .....	84
5.5.5	<i>Schlussfolgerung</i> .....	84
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>85</b>
6.1	WAHL DER MÄUSELINIEN .....	85
6.2	TIERMODELL DER ARTERIELLEN THROMBOSE .....	86
6.3	TIERMODELL DER NEOINTIMAFORMATION .....	87
6.4	DIE ROLLE DER SPHK1 FÜR DIE REGULATION VON INFLAMMATORISCHEN UND PROLIFERATIVEN PROZESSEN NACH ARTERIELLER GEFÄßWANDVERLETZUNG UND IN DER ATHEROGENESE.....	87
6.5	DIE ROLLE DER SPHK1 UND DER S1P-REZEPTOREN FÜR DIE REGULATION DER ATHEROGENESE .....	88
6.6	DIE ROLLE DER SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT UND S1P-REZEPTOREN FÜR DIE REGULATION DER THROMBOZYTENADHÄSION UND -AGGREGATION NACH ARTERIELLER GEFÄßWANDVERLETZUNG .....	89
6.7	DIE ROLLE VON SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT UND S1P-REZEPTOREN FÜR DIE REGULATION DER REKRUTIERUNG VON eEPCs NACH ARTERIELLER GEFÄßWANDVERLETZUNG.....	90

6.8	DIE ROLLE DER SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT UND S1P-REZEPTOREN FÜR DIE REGULATION DER NEOINTIMAFORMATION NACH ARTERIELLER GEFÄßWANDVERLETZUNG .....	91
6.9	SCHLUSSFOLGERUNG .....	92
6.10	AUSBLICK.....	92
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>BILDERVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>12</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>108</b>

# 1 Einleitung

In der heutigen Zeit, steht kaum eine Krankheit so im Blickfeld der medizinischen und biochemischen Forschung wie die Atherosklerose<sup>12</sup>. Die Folgen dieser Erkrankung, wie etwa arterielle Thrombose, Ischämie, Herzinfarkt und Schlaganfall, sind in den Industrienationen für etwa die Hälfte aller Todesursachen der über 60-jährigen verantwortlich. Trotz präventiver Maßnahmen zur Senkung des hohen Blutfettspiegels durch medikamentöse Behandlung, scheinen sie das Problem nicht zu lösen<sup>13</sup>. Das Tückische an dieser allgemeinen Erkrankung des Arteriensystems ist, dass sie sich langsam entwickelt und über Jahre und Jahrzehnte symptomlos verläuft, bevor sie sich klinisch manifestiert und entdeckt wird<sup>12</sup>. Kennzeichen der Erkrankung ist eine chronisch fortschreitende Degeneration der Arterien mit progressiven Veränderungen der Gefäßwand. Durch Bindegewebswucherung, intra- und extrazelluläre Einlagerungen von Cholesterin, Fettsäuren und Kalk sowie Akkumulation von Kollagen und Proteoglykanen kommt es zu einer Verhärtung und Verdickung der Gefäße, die mit Verengungen und einer abnehmenden Elastizität einhergeht<sup>12</sup>. Die hohe Zahl der Betroffenen zeigt, wie wichtig die Erforschung der Atherosklerose und deren Folgeerkrankungen ist.

Es ist bis jetzt nicht möglich die Atherosklerose vollständig zu heilen. Die teilweise sehr schweren Gefäßwandveränderungen lassen sich bislang mit Hilfe von Medikamenten nicht rückgängig machen. Daher versucht man meist, die zugrunde liegenden Erkrankungen, wie beispielsweise zu hoher Blutdruck, Störungen des Fettstoffwechsels oder Diabetes, zu therapieren. Dafür gibt es verschiedene und neuartige Arzneimittel, wie etwa blutdruck- und blutfettsenkende Mittel, die eine individuelle Therapie ermöglichen. Indem es gelingt, die Auslöser für die Atherosklerose zu bekämpfen, steigt für die Patienten die Chance, den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen und ein Fortschreiten der Gefäßwandschäden zu verlangsamen.

Eine weitaus invasivere, und doch häufig notwendige Therapiemöglichkeit der Atherosklerose, ist der interventionelle Eingriff. Hier wendet man u.a. im Falle der koronaren Herzkrankheit, die so genannte perkutane transluminale Angioplastie (PTA) an. Davon werden derzeit weltweit mehr als 500000 Eingriffe pro Jahr durchgeführt. Im Bereich der Herzkranzgefäße werden hierbei die verengten Stellen mit Spezialkathetern und Ballons geweitet (sog. Perkutane transluminale coronare Angioplastie, PTCA). In einigen Fällen ist die Implantation kleiner Gefäßstützen (Stents) notwendig, um die Blutbahn dauerhaft offen zu halten. Eine weitere Therapieoption, ist die operative Umleitung der Blutbahn mit einem körpereigenen Gefäßstück oder einer künstlichen Gefäßprothese, einem so genannten Bypass. Dieser leitet das Blut am verengten Gefäßabschnitt vorbei, und gewährleistet so, die Versorgung der angeschlossenen Gewebe und Organe.

Ein großes Problem bei der PTCA ist die so genannte Restenose. Darunter versteht man die erneute Verengung einer Arterie durch neointimale Proliferation, die bei einigen Patienten nach einer Behandlung (z.B. Angioplastie oder Stenting) auftreten kann.

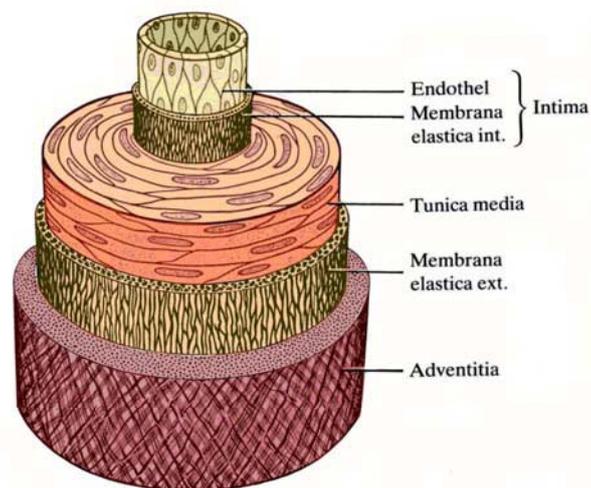
Die Restenose im Stent ist nach wie vor eine der Hauptkomplikationen nach koronaren Interventionen. Nach Implantation eines nicht mit Medikamenten beschichteten Edelstahlstents (sog. bare metal stent) kommt es in bis zu 35 Prozent der Fälle zu einer Wiederverengung des Gefäßes. Bei der erneuten Dilatation einer Restenose beträgt die Re-Restenoserate 40 bis 50 Prozent.

Durch verschiedenartige medikamentöse Beschichtung der Stents hat man versucht, die neointimale Proliferation zu verhindern. Bahnbrechende Verbesserungen brachten medikamentöse Stentbeschichtungen mit Rapamycin und Paclitaxel<sup>14, 15</sup>. Sie führen zu einer erheblichen Reduktion der Restenoserate können allerdings aufgrund des extrem hohen Preises nicht routinemäßig eingesetzt werden. Einige Studien haben gezeigt, dass endotheliale Progenitorzellen (EPCs, siehe 2.7) einen signifikanten Beitrag zur Reendothelialisierung im verletzten Gefäß leisten, und so die neointimale Hyperplasie hemmen. In neueren Studien wurde kürzlich ein mit anti-CD34-Antikörper beschichteter Stahlstent, der die Rekrutierung von EPCs forciert, klinisch als sehr viel versprechend getestet<sup>10, 16</sup>. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist allerdings nach wie vor dringend notwendig.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Morphologie und Funktion von Arterien

Je nach Beanspruchung durch den im Gefäß herrschenden Druck, und nach funktionellen Besonderheiten in den verschiedenen Organen, ist der Wandaufbau von Blutgefäßen unterschiedlich gestaltet <sup>7</sup>. Allen Gefäßen ist jedoch gemein, dass sie grundsätzlich aus drei Schichten aufgebaut sind, die ihnen erlauben, sich an ihre Aufgaben anzupassen (siehe Bild 1) <sup>6,7</sup>.



*Bild 1 Allgemeiner Aufbau eines Gefäßes modifiziert nach <sup>6</sup>;  
Die äußerste Schicht heißt Adventitia; die Membrana elastica externa trennt die Adventitia von der nächsten Wandschicht, der Tunica media; eine weitere elastische Schicht, die Membrana elastica interna bildet die Grenze zur innersten Gefäßschicht, der Tunica intima*

Die innerste Schicht, die so genannte Tunica intima, ist die glattwandige Innenauskleidung der Gefäße <sup>7</sup>. Sie unterteilt sich in das Endothel, die Basalmembran und eine dünne Lage von subendotheliales Bindegewebe <sup>6</sup>. Dabei hat das Endothel die Funktion einer regulierbaren Barriere zwischen Intravasalraum und Gefäßwand bzw. interstitiellem Raum <sup>1</sup>. Endothelzellen sind in der Lage antithrombotische und vasodilatative Substanzen, wie zum Beispiel Prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) und Stickstoffmonoxid (NO), freizusetzen <sup>17</sup>. Durch die Beeinflussung des Oberflächenbesatzes von Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen ist das Endothel außerdem an vielen physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen beteiligt <sup>1</sup>.

Die Membrana elastica interna ist eine elastische Membran welche die Tunica intima von der nach außen hin folgenden Schicht, der Tunica media trennt<sup>18</sup>. Diese besteht hauptsächlich aus glatten Muskelzellen, die sich zirkulär oder leicht spiralig verlaufend anordnen<sup>6</sup>. Durch aktive Spannungsentwicklung wirkt die Media der Dehnung des Gefäßes durch den Blutdruck entgegen und kann die Lumenweite aktiv verändern<sup>1,7</sup>. Aus diesem Grund spielt sie im Hochdrucksystem des Kreislaufs, also vor allem bei Arterien, eine wichtige Rolle<sup>7</sup>.

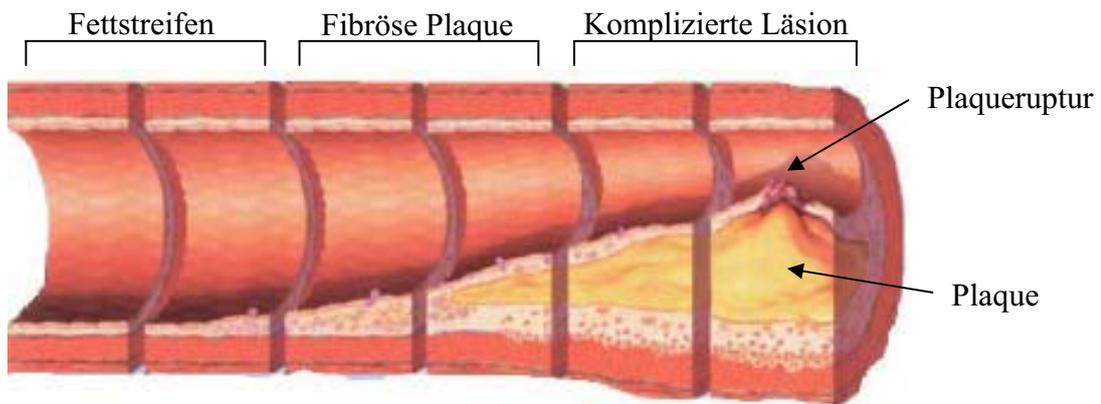
In Abhängigkeit von der Größe der Arterie befindet sich an der Grenze zur nächsten Gewebsschicht eine unterschiedlich stark ausgeprägte Lage elastischer Fasern. Diese Schicht bezeichnet man als Membrana elastica externa<sup>7</sup>. Die Tunica adventitia schließt sich außen an die Tunica media an. Zum Großteil setzt sie sich aus kollagenen Faserbündeln in Scherengitteranordnung und elastischen Fasern zusammen<sup>7,6</sup>. Sie stabilisiert die Gefäßwand als Ganzes, dient dem Einbau in das umgebende Gewebe und schützt vor äußeren Einwirkungen, wie zum Beispiel Längsdehnungen<sup>6,7</sup>.

Die arterielle Gefäßwand stellt eine hoch plastische dreidimensionale Struktur dar. Sie hat einzigartige adaptive Fähigkeiten um Veränderungen von Blutdruck, Blutfluss und Scherkräften abfangen zu können. Dieses funktionelle Verhalten beruht auf der besonderen Verteilung von Zellen und extrazellulären Komponenten auf die drei Schichten Intima, Media und Adventitia. Pathologische Stimuli können entweder alle Gefäßschichten gleichzeitig oder einzelne Lagen betreffen. Die Folgen einer Verletzung können initial auf einen spezifischen Bereich der Gefäßwand begrenzt sein, und sich später abhängig von Zeit, Schweregrad der Läsion, Empfindlichkeit und funktionellem Zusammenhang der einzelnen Gewebeschichten, in der Gefäßwand ausbreiten. Als Reparaturprogramm kommt es zu Neovaskularisation, Infiltration von Entzündungszellen, lokaler Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose und zur Ablagerung von extrazellulärer Matrix. Im positiven Fall führen diese Prozesse trotz strukturellen Umbaus zur Wiederherstellung des Gefäßes mit akzeptabler Funktion<sup>19</sup>.

## **2.2 Atherosklerose**

Atherosklerose ist definiert als eine variable Kombination von Intimaveränderungen mit fokaler Akkumulation von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutprodukten, fibrinösem Gewebe und Kalziumablagerungen, unter Einbeziehung der Media, in großen und mittleren, elastischen und muskulären Arterien. Sie ist eine der häufigsten Todesursachen beim Menschen und die Ursache für Erkrankungen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und Gangrän<sup>20-22</sup>.

In Verlauf der Erkrankung entstehen die für die Atherosklerose charakteristischen Plaques oder Atherome. Sie werden nach der WHO (World Health Organisation) in drei Stadien eingeteilt. Die frühe Läsion wird als Fettstreifen, die fortgeschrittene als fibröse Plaque bezeichnet. Das letzte Stadium ist die komplizierte Läsion mit klinisch manifesten Folgekrankheiten (siehe Bild 2)<sup>23</sup>.



*Bild 2 Von links nach rechts zunehmende entzündliche und fibroplastische Veränderungen der arteriellen Gefäßwand bis hin zur Bildung von Plaque und Entstehung einer Plaqueruptur (modifiziert nach Stary H.C. et al)*

Die atherosklerotischen Veränderungen sind charakterisiert durch die Ansammlung von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten in der Tunica Intima der großen Arterien<sup>24</sup>. Die Plaques können das Lumen der betroffenen Gefäße stark einengen und dadurch zu einer Beeinträchtigung des Blutflusses, und der Sauerstoffversorgung betroffener Regionen führen<sup>20</sup>. Die durch Ruptur oder Erosion der fortgeschrittenen Läsion freigelegte subendotheliale Matrix induziert die Adhäsion von Plättchen, führt zur Aktivierung von Thrombozyten und zur fortschreitenden Thrombusformation an der Oberfläche der verletzten atherosklerotischen Plaque<sup>21</sup>. Dadurch kann es zum vollständigen Verschluss des Gefäßes, mit ischämischen Episoden wie beispielsweise dem Coronarsyndrom, oder dem cerebralen Infarkt kommen<sup>24</sup>.

Verantwortlich für die systemische Erkrankung der arteriellen Blutgefäße ist ein aktiviertes Endothel, zum Beispiel durch erhöhte Cholesterinwerte im Blut, welches zu starken entzündlichen und fibroproliferativen Veränderungen in der Gefäßwand führt<sup>20</sup>. Es wurde gezeigt, dass Thrombozyten und die Adhäsion von Thrombozyten ans Endothel, nicht nur im Endstadium, sondern auch in der frühen Initialphase der Atherogenese, eine wichtige multifaktorielle Rolle spielen<sup>21,24</sup>.

Thrombozyten binden über Gp1b $\alpha$  an von-Willebrand-Faktor und P-Selektin der aktivierten Endothelzellen. Dadurch wird GpIIb-IIIa auf der Oberfläche der Blutplättchen aktiviert (siehe 2.3.1). Es kommt zur Aggregation von Thrombozyten und zu einem Anstieg der cytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den Thrombozyten. Die Plättchen sezernieren daraufhin Granula, und setzen Entzündungsmediatoren in das umliegende Gewebe frei<sup>24</sup>. Besonders die beiden Cytokine CD40L und IL-1 $\beta$  führen zu einer gesteigerten Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) auf den Endothelzellen und zu einer vermehrten Freisetzung der Chemokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) und RANTES (regulated-on-activation, normal T-cell-expressed and -secreted chemokine) aus aktivierten Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen oder aktivierten Endothelzellen. MCP-1 und

RANTES initiieren die Rekrutierung, VCAM-1 und ICAM-1 die Adhäsion und Transmigration von Monozyten und Leukozyten durch die Endothelschicht der Gefäßwand in die Intima<sup>24,25</sup>. Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen, nehmen oxidiertes LDL (low density lipoprotein) auf und verwandeln sich in Schaumzellen<sup>26</sup>. Gleichzeitig kommt es zur Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen. Diese bilden vermehrt Bindegewebe innerhalb der Tunica Intima und führen so zu fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen in der Gefäßwand<sup>20</sup>. Im Inneren einer Plaque bilden Schaumzellen und extrazelluläre Lipidtropfen die so genannte Kernregion. Sie ist umgeben von einer faserigen Kappe aus einer Lage glatter Muskelzellen und einer kollagenreichen Matrix (siehe Bild 3). In den Schulterregionen, in denen reichlich T-Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen vorhanden sind, findet das Wachstum der Plaque statt<sup>26</sup>.

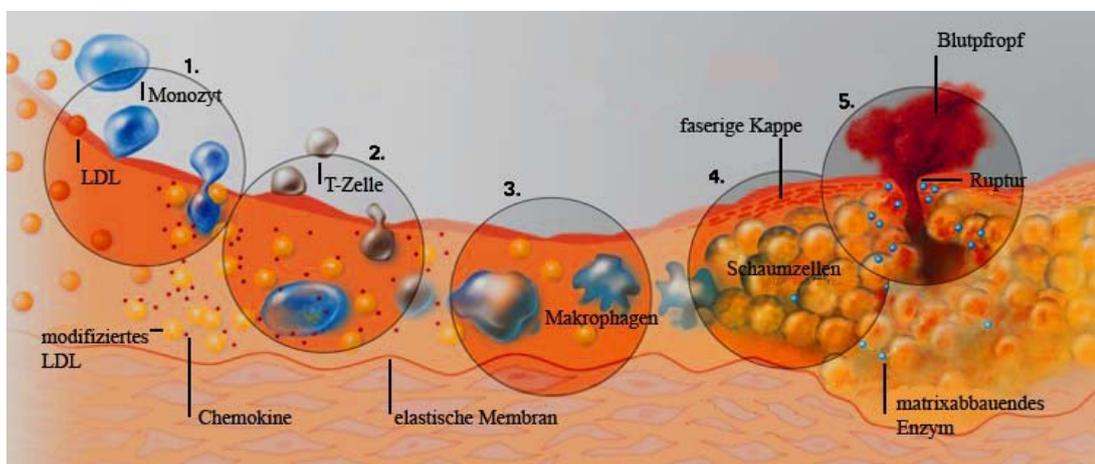


Bild 3 Verschiedene Stadien bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques; links: Initialphase mit Adhäsion und Transmigration von Monozyten und T-Zellen; rechts: Kernregion mit Schaumzellen, Kappe und Plaqueruptur (modifiziert nach<sup>8</sup>)

## 2.3 Physiologie der Hämostase

Als Hämostase bezeichnet man die Bildung eines Gefäßwandthrombus, welcher zur Blutstillung führt<sup>17</sup>. Dieser Prozess ist äußerst wichtig, um durch den Verschluss von kleineren Gefäßwanddefekten, übermäßigen posttraumatischen Blutverlust zu verhindern. Andererseits kann eine unkontrollierte Thrombusbildung zu Gefäßverschluss und Ischämie, und damit beispielsweise zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führen. Daher müssen die adhäsiven Eigenschaften der Thrombozyten im Körper streng reguliert werden<sup>9</sup>.

Das vaskuläre Endothel stellt eine Barriere zwischen zirkulierenden Blutzellen, und der subendothelialen Matrix dar. Diskontinuität dieser Barriere durch Verletzung oder Plaqueruptur, legt verschiedene Komponenten der subendothelialen Matrix, einschließlich Kollagen, Fibronectin oder von Willebrandt-Faktor frei. Thrombozyten adhäreren in kurzer Zeit an die Gefäßwandläsion, und führen so zur Thrombusbildung<sup>27</sup>.

Nach dem zeitlichen Ablauf wird die Hämostase in drei Stadien unterteilt<sup>17</sup>. Die primäre Hämostase zeichnet sich durch die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und durch die Bildung eines plättchenreichen primären hämostatischen Thrombus im Bereich der Läsion aus. Dieser stillt vorerst die Blutung, ist aber fragil und löst sich leicht. Während der sekundären Hämostase kommt es zur Aktivierung des Gerinnungssystems. Aus Prothrombin entsteht Thrombin, welches durch Degradation von Fibrinogen zur Bildung von Fibrin führt. Der Thrombus verfestigt sich zum sekundären hämostatischen Thrombus. Dieser dichtet die Läsion stabil ab und leitet den Heilungsprozess ein. Während des dritten Stadiums, der Fibrinolyse, wird ein Teil des Thrombus wieder abgebaut. Gefäßwand, Thrombozyten und plasmatische Gerinnungsfaktoren müssen sowohl pro- als auch antithrombotisch gut zusammenarbeiten, um ein Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Bei Ungleichgewicht kann es zur thrombotischen (Thromboseneigung) oder hämorrhagischen (Blutungsneigung) Diathese kommen<sup>17</sup>.

### **2.3.1 Primäre Hämostase**

Thrombozyten sind ein wichtiger Bestandteil der primären Hämostase. Sie zirkulieren im Blut und Überwachen die Integrität der Gefäßwände<sup>22</sup>. Ist diese nicht mehr gegeben, haften sie am Gewebe, aggregieren und bilden einen hämostatischen Pfropf<sup>17</sup>. Gemeinsam mit dem Gerinnungssystem erlauben die Plättchen so die Wiederherstellung eines normalen Blutflusses. Dabei erfolgt keine Unterscheidung zwischen einer traumatischen Wunde oder einer Läsion, die bei Erkrankung des Gefäßes auftritt, wie zum Beispiel bei Ruptur eines atherosklerotischen Plaques<sup>22</sup>.

#### Morphologie und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von zahlreichen krankhaften Zuständen, wie beispielsweise Ischämie und Reperfusion oder kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose<sup>21</sup>. Da sie nach vaskulärer Verletzung schnell am verletzten (subendothelialen) Gewebe adhäreren und homotypische Interaktionen eingehen, sind sie bedeutsam für die Hämostase und die Atherothrombose<sup>22</sup>.

Thrombozyten entstehen im Knochenmark durch Abschnürung aus ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten<sup>7, 9</sup>. Obwohl sie kernlos sind, besitzen sie zahlreiche zelluläre Eigenschaften, die sie mit Leukozyten teilen<sup>28</sup>. Sie sind farblos und spindelförmig und haben ein Zytoskelett, welches eine Fortbewegung ermöglicht<sup>7,28</sup>.

Physiologischer Weise befinden sich im peripheren Blut 150 000 bis 300 000 Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut, mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 7 Tagen. Davon ist etwa ein Drittel in der Milz gespeichert<sup>17</sup>. Gealterte Blutplättchen werden im retikuloendothelialen System von Milz und der Leber durch Makrophagen abgebaut<sup>7, 9, 17</sup>.

Betrachtet man Thrombozyten unter dem Mikroskop erkennt man eine zentrale Zone mit basophilen Körnchen, das so genannte Granulomer<sup>7</sup>. Hier befinden sich unterschiedliche Granula. Der schmale periphere Zytoplasmasaum wird als Hyalomer bezeichnet (siehe Bild 4)<sup>29</sup>.

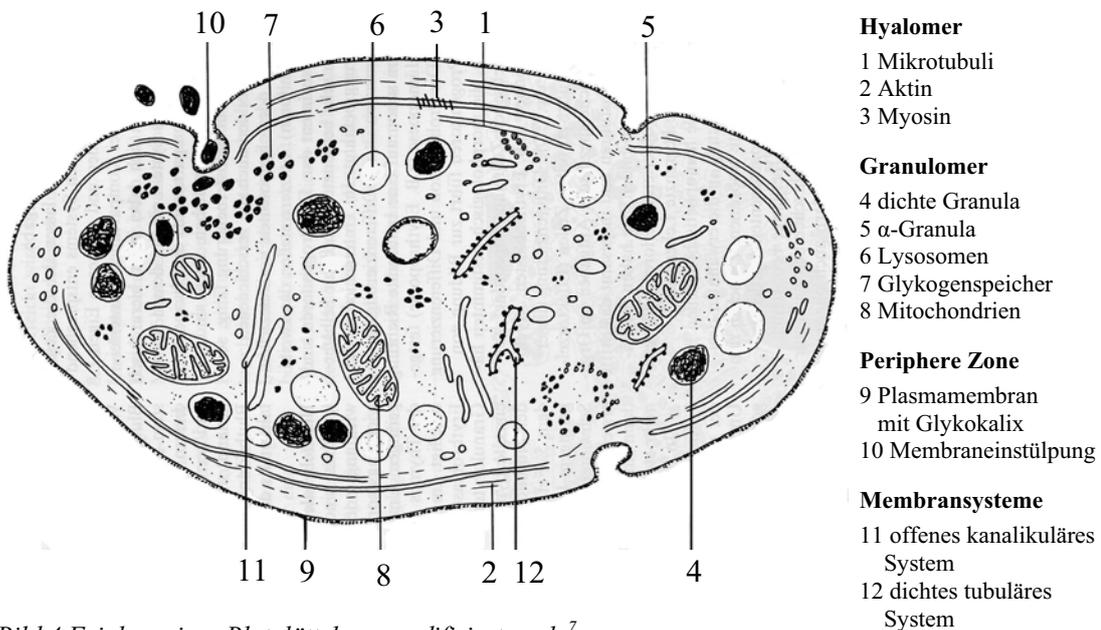


Bild 4 Feinbau eines Blutplättchens modifiziert nach<sup>7</sup>

Elektronenmikroskopisch lässt sich erkennen, dass im Randbereich unter der Plasmamembran ein Ring von 10 bis 15 Mikrotubuli und kontraktilen Filamenten, wie etwa Aktin und Myosin, verläuft. Dadurch wird der Zelle eine gewisse Stabilität verliehen. Die Plasmamembran weist eine gut ausgebildete Glykokalix auf. Sie senkt sich als Invaginationen in das Innere des Blutplättchens und vergrößert dadurch die Oberfläche der Zelle. Im Bereich des Granulomers befinden sich Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen und verschiedene Granula<sup>7</sup>. Die  $\alpha$ -Granula enthalten unter anderem von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibronektin, Thrombospondin und Platelet Derived Growth Faktor (PDGF). In den kleineren sehr dichten Granula befindet sich neben Serotonin und ADP auch Kalzium und Phosphat<sup>29</sup>. Außerdem findet man im Inneren der Thrombozyten Glykogen, und bei jungen Zellen eine kleinere Zahl von Ribosomen<sup>7</sup>. Eine weitere morphologische Struktur ist das Membransystem im Thrombozyten. Es besteht aus dem offenen kanalikulären, und dem dichten tubulären System. Ersteres ist charakterisiert durch gewundene Kanäle die mit der Plasmamembran verbunden, und durch Porenöffnungen vom Extrazellulärraum aus

zugänglich sind. Das dichte tubuläre System ist einer der Hauptspeicherorte für Kalzium und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Plättchenmetabolismus. Überschreitet die zytoplasmatische freie Kalziumkonzentration eine bestimmte Schwelle, kommt es zur Aktivierung des Thrombozyten mit Bildung von Pseudopodien und Degranulierung<sup>17</sup>.

Die meisten Blutplättchen erfahren bei ihrer Wanderung durch die Zirkulation keine feste Adhäsion. Erst wenn die Endothelschicht der Gefäßwand durch Verletzung oder pathologische Veränderungen zerstört wird, tritt das adhäsive Potential der Thrombozyten zu Tage<sup>9</sup>. Der Kontakt mit der subendothelialen extrazellulären Matrix führt zur Aktivierung der Zelle.

Im nichtaktivierten Zustand weisen Plättchen eine diskoide Form mit einer durchschnittlichen Oberfläche von  $8\mu\text{m}^2$  auf. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Degranulation und Formveränderung mit Bildung von Pseudopodien, welche Ausstülpungen der Plasmamembran darstellen. Man bezeichnet diese Zellen als Echinosphärozyten. Dabei vergrößert sich die Zelloberfläche auf bis zu  $13\mu\text{m}^2$  (siehe Bild 5)<sup>17</sup>.



*Bild 5 Ruhende und aktivierte Blutplättchen; links: ruhende diskoide Form; rechts: aktivierte Form mit Pseudopodien (Echinosphärozyten), Elektronenmikroskopie modifiziert nach<sup>2</sup>*

Werden Thrombozyten aktiviert, produzieren sie Sauerstoffradikale und setzen zahlreiche verschiedene proinflammatorische und vasokonstriktive Mediatoren wie etwa Thromboxan A, Leukotrien, Serotonin, Platelet factor 4, PDGF, Interleukin  $1\beta$ , ADP/ATP oder RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) frei. Auf der Oberfläche der Blutplättchen befinden sich verschiedene Adhäsionsmoleküle, darunter P-Selektin, PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) und einige Integrine (z.B. GpVI, GpIIb/IIIa, GpIb $\alpha$ ), die eine Schlüsselrolle bei der Plättchenadhäsion an die subendotheliale Matrix spielen<sup>28</sup>.

## Integrine

Integrine sind weit verbreitete heterodimere, transmembrane Glykoproteinrezeptoren, die zur Regulierung der Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix, oder zwischen zwei Zellen dienen, und bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen mitwirken. Sie bestehen aus einer größeren  $\alpha$ - und einer kleineren  $\beta$ -Untereinheit, die nicht-kovalent gebunden sind. Auf ruhenden Thrombozyten befinden sie sich in einem Stadium niedriger Affinität. Durch Aktivierung verwandeln sie sich in einen hochaffinen Zustand und können so an ihre entsprechenden Liganden binden<sup>9</sup>. Plättchen exprimieren zwei verschiedene  $\beta_3$ -Integrine,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Fibrinogenrezeptor) und  $\alpha_V\beta_3$  (Vitronectinrezeptor), und drei  $\beta_1$ -Integrine  $\alpha_2\beta_1$  (Kollagenrezeptor),  $\alpha_5\beta_1$  (Fibronectinrezeptor) und  $\alpha_6\beta_1$  (Lamininrezeptor)<sup>9,21</sup>. Von besonderer Bedeutung für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation sind davon der Fibrinogenrezeptor  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und der Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$ .

## Primäre Hämostase

Unter normalen Umständen kommt es zu einer Thrombozytenaktivierung, und in der Folge zu einer Hämostase nur dann, wenn die subendotheliale extrazelluläre Matrix im Gefäß freiliegt<sup>9,22</sup>. Es sei jedoch erwähnt, dass unter bestimmten pathologischen Bedingungen, Thrombozyten über P-Selektin und dessen Ligand P-Selektin Glykoprotein Ligand 1(PSGL-1), oder über das Glykoprotein GpIb und dessen auf der Oberfläche von dysfunktionellem Endothel befindlichem Ligand von-Willebrand-Faktor, auch an der intakten Gefäßwand adhärent werden können, was beispielsweise bei der Entstehung der Atherosklerose eine große Rolle spielt<sup>9, 21, 28</sup>.

Durch die Freilegung der subendothelialen extrazellulären Matrix kommt es zum Kontakt von Thrombozyten mit verschiedenen adhäsiven Makromolekülen wie zum Beispiel Laminin, Fibronectin, Kollagen und von-Willebrand-Faktor<sup>9</sup>. In Gefäßen mit hohen Scherkräften, wie sie in kleinen Arterien und Arteriolen vorliegen, wird der initiale Kontakt zwischen Blutplättchen und subendothelialer Matrix über die Interaktion von Plättchenrezeptor GpIb, und an Kollagen gebundenem vWF vermittelt<sup>9, 24</sup>. Diese Bindung ist nur kurzweilig und nicht in der Lage eine stabile Adhäsion herzustellen, aber sie hält den engen Kontakt zwischen Zelle und Oberfläche aufrecht und führt zum sogenannten „Rollen“ der Thrombozyten an der Gefäßwand<sup>9</sup>. Dies erlaubt nun den Kontakt zwischen Kollagen und dem Plättchen-Kollagenrezeptor GpVI<sup>9, 21</sup>. Als Folge kommt es zur Aktivierung von ruhenden Integrinen auf dem Thrombozyten in einen hoch-affinen Zustand, und zur Freisetzung von ADP und Thromboxan A<sup>9</sup>. In der extrazellulären Matrix freigelegter Tissue Faktor (Thromboplastin) aktiviert das extrinsische Gerinnungssystem und führt zur Bildung von Thrombin. Gemeinsam mit dem freigesetzten ADP und Thromboxan induzieren diese Mediatoren, über die Stimulation von G-Protein-abhängigen Rezeptoren, die vollständige Aktivierung der Blutplättchen (siehe Bild 6).

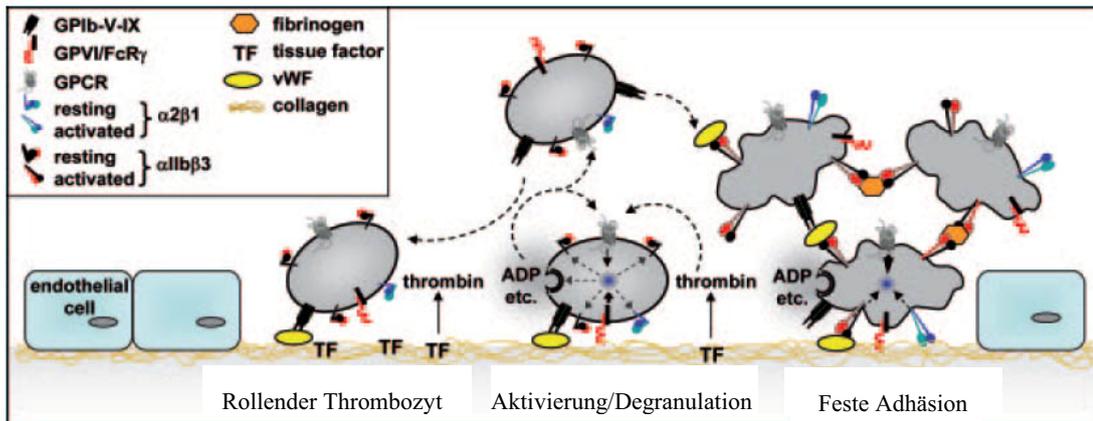


Bild 6 Mechanismen der Plättchenadhäsion und -aggregation modifiziert nach<sup>9</sup>  
 Die Interaktion zwischen GpIb und vWF vermittelt das „Rollen“ der Thrombozyten und erlaubt das Zusammenspiel von GpVI mit Kollagen. Das triggert die Umwandlung der Integrine in einen aktiven hoch-affinen Zustand und die Freisetzung von ADP und anderen Mediatoren. Gleichzeitig führt freigelegter Tissue Faktor (TF) zur Bildung von Thrombin was die Aktivierung der Blutplättchen zusätzlich vorantreibt.

Für die feste Plättchenadhäsion wird das Zusammenspiel verschiedener Integrine auf der Zelloberfläche des Thrombozyten verantwortlich gemacht<sup>21</sup>. Dabei gilt der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Fibrinogen-Rezeptor Glycoprotein GpIIb/IIIa, als wichtigster Mediator für die primäre feste Adhäsion an die subendotheliale Matrix, ebenso wie an das dysfunktionale Endothel<sup>21, 24</sup>. Durch die Freisetzung von Stoffen, bewirkt das aktivierte Blutplättchen außerdem die Rekrutierung von weiteren Thrombozyten, und fördert dadurch die Aggregation der Zellen. Die Gesamtheit der Thrombozyten lagert sich zusammen und bildet innerhalb von kurzer Zeit den so genannten weißen Thrombozytenthrampus<sup>1</sup>. Bei Verlust oder Inhibition des GpIIb/IIIa-Rezeptors ist kein anderes Integrin in der Lage, die feste Adhäsion oder die Aggregation der Blutplättchen zu triggern<sup>21</sup>.

Mit der Aggregation der Blutplättchen ist die primäre Hämostase abgeschlossen. Die Dauer dieses Vorgangs beträgt unter normalen Umständen 2 bis 4 Minuten und wird als Blutungszeit bezeichnet<sup>1</sup>.

### 2.3.2 Sekundäre Hämostase

Der entstandene plättchenreiche, primäre hämostatische Thrombus verschließt zunächst den Gefäßwanddefekt, ist aber nicht stabil und kann leicht im Blutfluss abgeschwemmt werden. Um dieser Gefahr vorzubeugen aktiviert der Körper das Gerinnungssystem. Es bildet sich ein Maschenwerk aus Fibrinfäden aus, in das auch Erythrozyten eingelagert werden. Der entstehende Blutpfropf wird daher auch als roter Thrombus bezeichnet<sup>1</sup>.

Die sekundäre Hämostase verläuft in drei Phasen. Zu Beginn wird in der Aktivierungsphase aus Prothrombin Thrombin. In der Koagulationsphase entstehen durch Abspaltung von Fibrinopeptiden lösliche Fibrinmonomere aus Fibrinogen. Schließlich kommt es in der Retraktionsphase durch Kontraktion der Thrombozyten zu einer Volumenminderung und Verfestigung des Blutgerinnsels (siehe Bild 7) <sup>1</sup>.

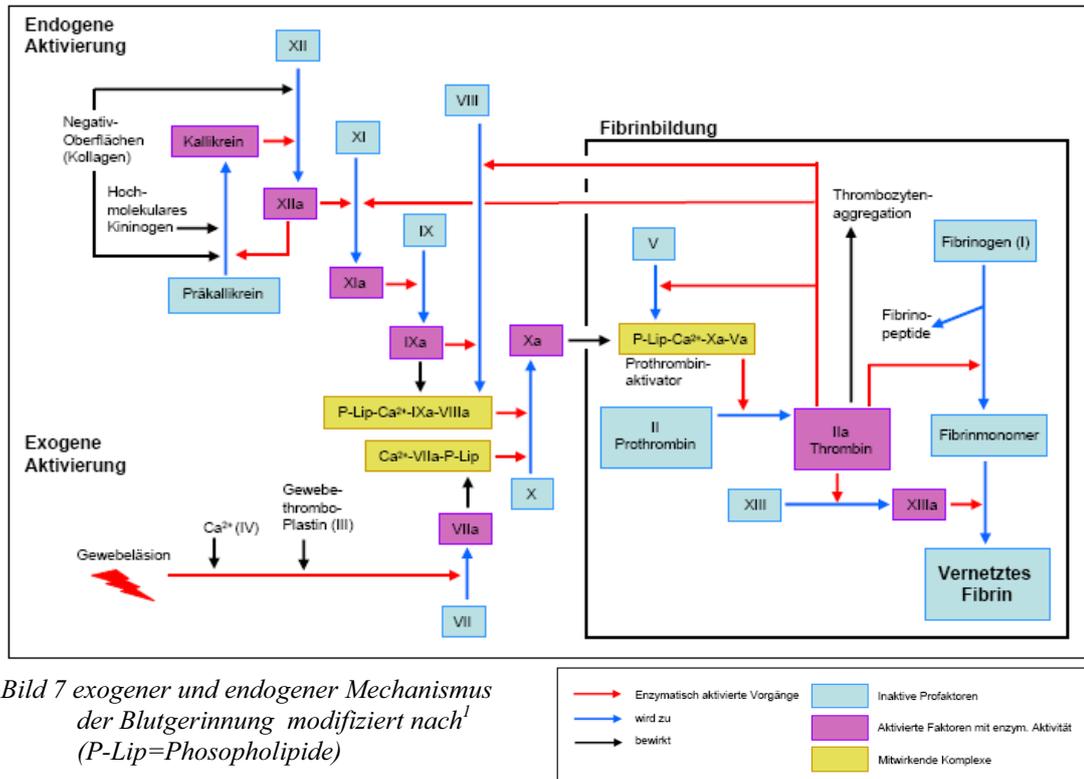


Bild 7 exogener und endogener Mechanismus der Blutgerinnung modifiziert nach<sup>1</sup> (P-Lip=Phospholipide)

Beim exogenen Mechanismus der Blutgerinnung, auch extrinsisches Gerinnungssystem genannt, verursacht eine Gewebsverletzung den Kontakt des Blutes mit Bestandteilen der zertrümmerten Zellen, in denen sich Tissue Faktor (Gewebethromboplastin) befindet. Dieser Lipid-Proteinkomplex aktiviert den Faktor VII, der mit Ca<sup>2+</sup> und Phospholipiden einen Komplex bildet, welcher den Faktor X aktiviert <sup>1</sup>.

Der endogene Mechanismus, das so genannte intrinsische Gerinnungssystem, beginnt im Bereich eines Endotheldefektes <sup>30</sup>. Er wird eingeleitet durch die Kontaktaktivierung des Faktor XII an negativ geladenen Oberflächen wie zum Beispiel subendotheliales Kollagen, Sulfatidgruppen oder Zelloberflächen von aktivierten Thrombozyten <sup>22,30</sup>. XIIa aktiviert Präkallikrein zu Kallikrein, das ebenso wie hochmolekulares Kininogen, die Faktor XII-Aktivierung verstärkt <sup>30</sup>. In der Folge werden die Faktoren XI und IX aktiviert <sup>1</sup>. Faktor IXa aktiviert wiederum Faktor VII zu Faktor VIIa, und beide aktivierten Faktoren bilden zusammen mit Phospholipiden und Ca<sup>2+</sup> einen Enzymkomplex der den Faktor X aktiviert <sup>30</sup>.

Aus Faktor Xa entsteht nun zusammen mit Faktor Va, Phospholipiden und  $\text{Ca}^{2+}$  ein weiterer Enzymkomplex, der als Prothrombinaktivator bezeichnet wird. Er leitet durch Umwandlung von Prothombin (Faktor II) in Thrombin (Faktor IIa) die Fibrinbildung ein. Thrombin aktiviert Faktor XIII und führt zur Spaltung von Fibrinogen in Fibrinopeptide und Fibrinmonomere <sup>1</sup>. Faktor XIIIa ist eine Transamidase und verknüpft schließlich die Seitenketten der Fibrinmonomere zu einem fest vernetzten unlöslichen Fibrin <sup>30</sup>.

### 2.3.3 Fibrinolyse

Um eine überschießende Gerinnung mit Bildung von Thromben und Entstehung von Embolien zu vermeiden, können einerseits freie Fibringerinnsel mittels Fibrinolyse wieder aufgelöst werden, andererseits wird ein Ausufern der Hämostase durch zum Teil rückgekoppelte Hemmfaktoren von vornherein verhindert <sup>30</sup>.

Für die Fibrinolyse sorgt das Plasmin, eine Serinprotease, die Fibrinogen, Fibrin und die Faktoren V und VIII spalten kann <sup>1</sup>. Es entsteht aus Plasminogen, das durch im Blut vorkommendes Kallikrein, im Gewebe befindliches tPA (Gewebsplasminogenaktivator) oder durch im Urin vorhandene Urokinase aktiviert werden kann <sup>30</sup>. Streptokinase und Staphylokinase sind bakterielle Aktivatoren des Plasminogens, die normalerweise nicht im Körper vorkommen, therapeutisch aber zur Thrombolyse eingesetzt werden <sup>1</sup>. Einer überschießenden Fibrinolyse wirkt physiologischerweise  $\alpha_2$ -Antiplasmin entgegen (siehe Bild 8) <sup>30</sup>.

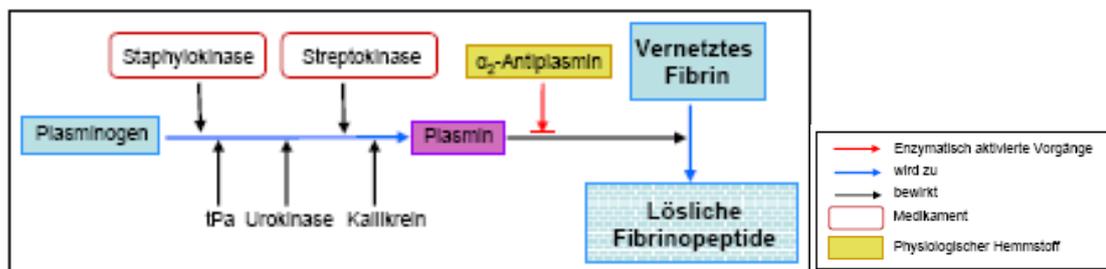


Bild 8 schematische Darstellung der Fibrinolyse modifiziert nach <sup>1</sup>  
(tPA=Gewebsplasminogenaktivator)

Weiteren Schutz vor Thrombose bietet zudem das im Blutplasma vorkommende Antithrombin III. Es bindet an Thrombin und die Faktoren IXa, Xa, XIa und XIIa und hemmt damit deren Proteaseaktivität. Wesentlich verstärkt wird diese Hemmung durch natürliches oder injiziertes Heparin, sowie durch heparinähnliche Glucosaminoglykane des Endothels. Zu guter letzt, wirken außerdem die bei der Fibrinbildung entstehenden Fibrinopeptide antithrombotisch, indem sie die Fibrinpolymerisierung negativ beeinträchtigen <sup>30</sup>. Für die Gerinnungshemmung *in vitro* werden außer Heparin, vor allem Komplexbildner für  $\text{Ca}^{2+}$  wie beispielsweise Citrat, Oxalat oder EDTA verwendet, die die Konzentration freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vermindern <sup>1</sup>.

## **2.4 Pathologie der Hämostase**

Unter Thrombose versteht man die Bildung eines Blutpfropfes durch lokales intravitalen und intravasales Erstarren des Blutes. Damit unterscheidet sich die Thrombose von der physiologischen intravitalen aber extravasalen Blutgerinnung. Man unterteilt pathogenetisch in Abscheidungs- oder Agglutinationsthrombose durch Läsionen der Gefäßintima, Gerinnungs-, Koagulations-, Pulsions- und Stagnationsthrombose durch Störungen der Hämodynamik im Sinne verminderter Strömungsgeschwindigkeit und Wirbelungen, und Thrombose durch erhöhte Gerinnungsneigung. Als Folge der Thrombose kommt es zu Zirkulationsstörungen in den betroffenen Organen<sup>31</sup>. Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass es sich bei der Hämostase und der Thrombose wahrscheinlich um zwei vom Entstehungsmechanismus her teilweise unterschiedliche Prozesse handelt<sup>22</sup>.

Von einer arteriellen Thrombose spricht man, wenn sich ein Blutgerinnsel in einer Arterie bildet. Der Thrombus kann in betroffenen Organen zu Durchblutungsstörungen und Sauerstoffmangel führen. Besonders prädestiniert sind unter anderem die Herzkranzgefäße (Herzinfarkt), die das Gehirn versorgenden Arterien (Schlaganfall) sowie die Beinschlagadern (arterieller Verschluss)<sup>12</sup>.

## **2.5 Reparatur der geschädigten Gefäßwand, Neointimaformation**

Perkutane transluminale Koronarangioplastik (PTCA) ist eine weithin anerkannte, effektive Therapie bei der symptomatischen Koronararterienkrankung. Allerdings reduzieren sich der Langzeiteffekt und die Kosteneffizienz dieser Methode signifikant, durch überschießende Wundheilung und daraus resultierender Restenose, bei bis zu 35 Prozent der Patienten. Es ist bekannt, dass die Zerstörung von Endothelzellen ein wichtiger Trigger für die Restenosierung nach Angioplastik oder Stentimplantation ist<sup>10</sup>. Verschiedene Strategien, einschließlich pharmakologischer Wirkstoffe, neuer mechanischer Methoden und Gentherapie wurden bereits getestet und etabliert um die postangioplastische Restenose zu verhindern. Trotzdem bleibt das Problem nicht vollständig gelöst<sup>32</sup>. Insbesondere die gestörte Reendothelisierung nach Implantation von mit antiproliferativen Medikamenten beschichteten Stents, stellt ein großes klinisches Problem dar.

Die Restenose stellt eine spezielle Art von exuberanter Wundheilung dar. Die Bildung von neuem intraluminales Gewebe, und die anschließende allumfassende Gefäßkonstriktion sind denen der Narbenbildung und -kontraktur während des Heilungsprozesses einer Wunde ähnlich. Bei histologischer Untersuchung zeigt sich, dass humane Koronararterien auf die durch die Angioplastie hervorgerufene Gefäßwandstreckung und Endothelverletzung, mit Vernarbung in Form einer proliferativen Neointima reagieren.

Bei der Bildung von Neointima kommt es zu einer exzessiven Proliferation von glatten Muskelzellen (SMCs) in der Intima. Diese neointimale Hyperplasie wird als unspezifische Gewebsreaktion angesehen, die im Extremfall so stark ausgeprägt sein kann, dass sie das Gefäßlumen bis hin zur Stenose stark einschränkt <sup>32</sup>.

Nach der Verletzung des Endothels eines Gefäßes kommt es zunächst zur Bildung eines Thrombus und zu Thrombusorganisation <sup>32</sup>. Der Thrombus beinhaltet chemotaktische und mitogene Faktoren, und funktioniert als eine Matrix für die Migration und Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) <sup>33</sup>. Erst einige Tage nach der Thrombosierung beginnt der eigentliche Prozess der Neointimaformation. Dieser dauert Wochen bis Monate und führt schließlich zum Ausgleich des Verhältnisses zwischen Gefäßwand und Lumen <sup>32</sup>. Durch die Vorgänge an der verletzten Gefäßwand verliert die Tunica media ihren kontraktilen Charakter <sup>33</sup>. Dies initiiert die Wanderung von glatten Muskelzellen aus Adventitia, Media und Intima in den adluminalen Bereich <sup>32, 33</sup>. Hier replizieren sich aus dem Blut stammende VSMCs und SMCs aus Adventitia, Media und Intima, und synthetisieren Elemente der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Kollagen und Proteoglykane <sup>32</sup>. Es kommt zur Akkumulation von glatten Muskelzellen, aber auch von Progenitorzellen und Myofibroblasten (differenzierte Fibroblasten) aus der Adventitia. Innerhalb einer Woche bildet sich eine neointimale Zellschicht <sup>33</sup>. Dabei ist die Ausprägung der Neointima abhängig von der Stärke der Gefäßverletzung. Vor allem die Zerstörung der Membrana elastica interna führt zu einer Zunahme der neointimalen Hyperplasie <sup>34</sup>. Als Anpassung an die neuen Konditionen, kommt es zur Neugestaltung und Remodellierung der Gefäßarchitektur, mit mehr oder weniger stark bleibender Einengung des Gefäßlumens (positive oder negative Remodellierung). Die Mechanismen dieses Prozesses sind sehr komplex, es gibt aber Hinweise darauf, dass TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) und die Integrine  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_8\beta_1$  eine regulierende Rolle spielen <sup>33</sup>.

## 2.6 Morphologie und Funktion von Leukozyten

Neben den Thrombozyten sind auch die Leukozyten als wesentlicher zellulärer Bestandteil des Blutes bei der Entstehung von Thrombosen und in der Atherogenese von besonderer Bedeutung. Als Leukozyten bezeichnet man die weißen Blut- und Lymphzellen, die den roten Blutzellen gegenübergestellt werden <sup>31</sup>. Sie sind kernhaltige Zellen. Ihre Zahl ist viel geringer als die der Erythrozyten, und liegt beim Menschen normalerweise bei 5000 bis 9000 pro  $\mu\text{l}$  Blut. Nur ein kleiner Teil der Zellen zirkuliert im Blutkreislauf, die meisten Leukozyten befinden sich in den lymphatischen Organen und im Bindegewebe. Mittels gerichteter Migration durch die Gefäßwand können sie die Blutbahn verlassen und ins Gewebe eindringen, bzw. dieses wieder in Richtung Blut verlassen <sup>7</sup>.

Die weißen Blutkörperchen lassen sich vereinfacht in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten unterteilen. Das Verhältnis der drei Zellarten beträgt beim Erwachsenen ca. 60:30:10 (siehe Tabelle 1) <sup>7, 23</sup>.

*Tabelle 1 Zusammensetzung des humanen Blutes modifiziert nach <sup>6</sup>*

<b>Blutzellen human</b>	Erythrozyten		4,6 Mio./ $\mu$ l bei der Frau 5,2 Mio./ $\mu$ l beim Mann		O <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> -Transport
	Leukozyten 7000/ $\mu$ l	Granulozyten	neutrophile	55-68%	Phagozytose (Mikrophagen)
			eosinophile	1-4%	Elimination von Antigen-Antikörperkomplexen
			basophile	0,3-1%	Gerinnungshemmung
			stabkernige	2-3%	Jugendliche Granulozyten
Agranulozyten	Lymphozyten	20-35%	immunologische Abwehr		
	Monozyten	2-6%	Phagozytose (Makrophagen)		
Thrombozyten		150000-300000/ $\mu$ l		Blutgerinnung	

Das Verhältnis der verschiedenen Zellarten der Leukozyten bei der Maus ist in Tabelle 2 dargestellt.

*Tabelle 2 Zusammensetzung des murinen Blutes modifiziert nach <sup>35</sup>*

<b>Blutzellen murin</b>	Erythrozyten		7-11 Mio./ $\mu$ l		O <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> -Transport
	Leukozyten 7000/ $\mu$ l	Granulozyten	neutrophile	5-20%	Phagozytose (Mikrophagen)
			eosinophile	50-100/ $\mu$ l	Elimination von Antigen-Antikörperkomplexen
		Agranulozyten	Lymphozyten	60-90%	immunologische Abwehr
			Monozyten	50-100/ $\mu$ l	Phagozytose (Makrophagen)
Thrombozyten		1-2 Mio./ $\mu$ l		Blutgerinnung	

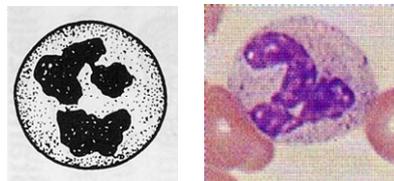
### 2.6.1 Granulozyten

Die Granulozyten sind originäre Blutzellen die auch als Mikrophagen bezeichnet werden. Sie sind amöboid beweglich und können daher jederzeit aus dem Gefäß auswandern, um am Ort der Schädigung spezielle Abwehrvorgänge in Gang zu setzen. Bei der akuten Entzündung spielen diese Zellen die Hauptrolle <sup>6</sup>. Charakteristisch für sie ist ein gelappter Kern und im Zytoplasma lokalisierte Granula. An gefärbten Blutaussstrichen können drei Arten von Granulozyten unterschieden werden,

neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Die Bildung dieser Zellen erfolgt im Knochenmark <sup>7</sup>.

### Neutrophile Granulozyten

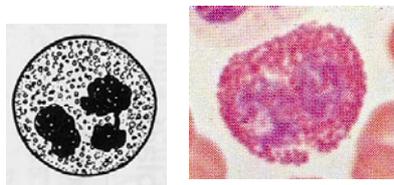
Beim Menschen machen die neutrophilen Granulozyten einen Anteil von 60% der Leukozytenpopulation aus <sup>6</sup>. Im Gegensatz dazu sind bei der Maus nur 5 bis 20% der Leukozyten neutrophile Granulozyten (siehe Tabelle 2) <sup>35</sup>. Es handelt sich um große Zellen (Durchmesser 9-12µm), die große gestaltliche Wandlungsmöglichkeiten haben, so dass sie trotz ihrer Größe noch durch 3µm große Poren der Gefäßwand hindurchtreten können (Diapedese). In der Randzone des Zytoplasmas der Granulozyten befinden sich zahlreiche Aktinfilamente, die bei der Zytoplasmabewegung und bei der Ausbildung der Mikrovilli und Pseudopodien eine Rolle spielen. Normalerweise bewegen sich die weißen Blutkörperchen im langsamen, erythrozytenfreien Randstrom des Blutes und verlassen erst auf taktische Reize hin die Blutbahn. Ihr Zellkern ist stabförmig, gelappt oder segmentiert, wobei die Segmentation des Kernes mit dem Alter der Zelle zunimmt. Das leicht azidophile Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten zeigt lichtmikroskopisch eine feine, kaum sichtbare, staubartige Granulation (siehe Bild 9). Dabei handelt es sich um primäre Lysosomen. Der größte Teil der übrigen Granula enthält alkalische Phosphatasen und basische Proteine, die eine antibakterielle Aktivität aufweisen. Durch Bakterien oder Zelltrümmer werden die neutrophilen Granulozyten angelockt (Leukotaxis), verlassen die Blutbahn, nehmen mit den Fremdelementen Kontakt auf und phagozytieren sie. Mit Hilfe der Lysosomen werden diese abgebaut, wobei die Zelle meist apoptotisch zugrunde geht <sup>6</sup>. Ferner können die Zellen bei Kontakt mit phagozytosefähigem Material auch ihre Granula nach außen abgeben und dieses dadurch extrazellulär verdauen. Die Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten beträgt circa 8 Tage, ihre Verweildauer im Blut etwa 7 bis 9 Stunden. Ein großer Anteil der Zellen verlässt den Körper unter physiologischen Bedingungen über Mundhöhle, Magen-Darm-Trakt, Harnwege und seröse Häute. Sie tragen ständig dazu bei, den Organismus vor eindringenden Keimen zu schützen <sup>7</sup>.



*Bild 9 neutrophiler Granulozyt mit segmentiertem Kern und staubartiger Granulation schematisch (links) und mikroskopisch (rechts)*

## Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten (Durchmesser 11-16 $\mu$ m) sind durch das Vorkommen zahlreicher, relativ großer Granula charakterisiert, die sich mit sauren Farbstoffen intensiv anfärben. Der hufeisen- oder hantelförmige Kern wird durch die eosinophilen Granula oft weitgehend bedeckt (siehe Bild 10). Elektronenmikroskopisch lässt sich an den Granula eine homogene Matrix (Externum) von einer kristalloiden Innenstruktur (Internum) unterscheiden. Das Internum enthält eine Esterase und das argininreiche basische Hauptprotein. Im Externum finden sich Peroxidase, Katalase, die so genannten kationischen Eosinophilenproteine und Enzyme des Fettabbaus. Im normalen Blut sind circa ein bis vier Prozent der weißen Blutkörperchen eosinophile Granulozyten. Im Unterschied zu den neutrophilen Granulozyten spielen sie bei der Phagozytose von Bakterien keine wesentliche Rolle. Sie nehmen bevorzugt Antigen-Antikörper-Komplexe auf. Bei allergischen Erkrankungen ist die Zahl eosinophiler Granulozyten im Blut deutlich erhöht. Sie wirken außerdem dämpfend auf entzündliche Reaktionen ein, indem sie die stark entzündlich wirkenden Produkte der Mastzellen, das Histamin und das Leukotrien C<sub>4</sub>, enzymatisch inaktivieren. Ferner hemmen sie mit Prostaglandin E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> die Freisetzung von Mastzellgranula beziehungsweise phagozytieren bereits ausgeschleuste Granula. Auch bei Anwesenheit von Parasiten im Körper kommt es zur Vermehrung der eosinophilen Granulozyten. Man nimmt an, dass das basische Hauptprotein gegenüber Parasiten, vor allem gegen Würmer, wirksam ist. Die eosinophilen Granulozyten haben eine Lebensdauer von 8 bis 12 Tagen. Ihre intravasale Verweildauer liegt bei 4 bis 12 Stunden<sup>7</sup>.

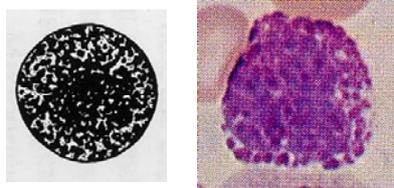


*Bild 10 Eosinophiler Granulozyt mit hantelförmigem Kern und eosinophilen Granula schematisch (links) und mikroskopisch (rechts)*

## Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten sind mit 0,3 bis 1 Prozent die seltenste Form der Granulozyten beim Menschen. Ihre Größe beträgt etwa 10 $\mu$ m. Sie enthalten in großer Zahl basophile, blauschwarze Granula, die oft den gelappten Zellkern weitgehend überdecken können (siehe Bild 11). In den Granula sind Heparin, Histamin und zinkhaltige Proteine enthalten. Man nennt diese Zellen daher auch Blutmastzellen. Die basophilen Granulozyten besitzen membranständige Rezeptoren für Immunglobulin E (IgE).

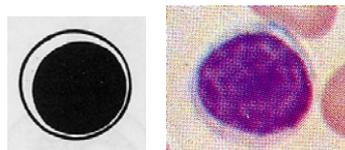
Kommen diese Rezeptoren mit IgE in Kontakt, zum Beispiel bei allergischen Erkrankungen, führt dies zur massiven Freisetzung der Granula. Durch die Wirkung des freiwerdenden Histamins, kommt es zur Quaddelbildung und zum Juckreiz. Die Zellen phagozytieren kaum. Ihre Verweildauer im Blut ist kurz und beträgt weniger als 6 Stunden. Im Gewebe halten sie sich circa 24 Stunden auf. Die biologische Bedeutung der basophilen Granulozyten ist noch nicht völlig geklärt. Sie dürfte aber jenen der Gewebsmastzellen ähnlich sein <sup>7</sup>.



*Bild 11 Basophiler Granulozyt mit gelappten Zellkern und basophilen Granula schematisch (links) und mikroskopisch (rechts)*

## 2.6.2 Lymphozyten

Lymphozyten sind relativ kleine Zellen (Durchmesser 6-8 $\mu$ m), die einen rundlichen heterochromatischen Kern besitzen, der die Zelle weitgehend ausfüllt. Der schmale Zytoplasmasaum ist oft lichtmikroskopisch kaum zu erkennen (siehe Bild 12). Die Lymphozyten sind aber morphologisch und funktionell keine einheitliche Zellpopulation. Es gibt kleine, große und mittelgroße Zellen, je nachdem in welchem Stadium der Immunreaktion sie sich befinden. Nur ein kleiner Teil der Lymphozytenpopulation zirkuliert im Blut. Die meisten Zellen befinden sich in den lymphatischen Organen, im Knochenmark oder als freie Zellen im lockeren Bindegewebe. Von dort aus treten sie regelmäßig ins Gefäßsystem über, um im Körper mögliche Antigene aufzuspüren. Obwohl Lymphozyten nicht amöboid beweglich sind, besitzen sie doch eine so große Migrationsfähigkeit dass sie die Wanderung durch den Blutkreislauf durchführen können <sup>6</sup>. Im Blut des Menschen sind etwa 20 bis 35 Prozent der weißen Blutzellen Lymphozyten. Sie phagozytieren nicht und besitzen kaum Lysosomen <sup>7</sup>. Vielmehr spielen sie sowohl bei der Antikörperproduktion als auch bei der Gedächtnisfunktion des Immunsystems eine entscheidende Rolle <sup>1</sup>.



*Bild 12 Lymphozyt mit rundlichem Kern und kaum sichtbarem Zytoplasma schematisch (links) und mikroskopisch (rechts)*

Lymphozyten sind keine „Endzellen“, sie können nach Stimulation weiter transformiert werden <sup>7</sup>. Aus lymphatischen Vorläuferzellen, die noch keine Antigenrezeptoren besitzen, wird bei der Prägung im Thymus (T-Lymphozyten) und im Knochenmark (B-Lymphozyten) ein Repertoire von einer Milliarde verschiedenen, jeweils gegen ein bestimmtes Antigen gerichteten T- beziehungsweise B-Zellen gebildet. Solche noch „naiven“ Lymphozyten kreisen durch den Organismus. Entdeckt eine Zelle dabei „ihr“ Antigen, was meist in lymphatischem Gewebe geschieht, vermehrt sie sich, und es entstehen zahlreiche, monospezifische Tochterzellen <sup>30</sup>. So werden B-Zellen zu Plasmazellen, die für die spezifische humorale Immunabwehr von Bedeutung sind. T-Zellen werden zu verschiedenen T-Effektorzellen, die sich nach ihrer Funktion in T-Killerzellen (zytotoxische T-Zellen), T-Gedächtniszellen und T-Helferzellen unterscheiden lassen, und für die spezifische zelluläre Immunantwort verantwortlich sind. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal dieser verschiedenen Zellen ist die Ausstattung mit Oberflächenrezeptoren. Bei den B-Zellen sind diese Oberflächenrezeptoren membranständige Immunglobuline (IgM-Monomer, IgD). Bei den T-Zellen sind es die T-Zell-Rezeptoren, welche als zwei zellspezifische Typen von Heterodimeren ( $\alpha$  und  $\beta$ ) vorkommen. Die Rezeptoren besitzen zwar eine ähnliche Grundstruktur, jedoch weisen die antigenerkennenden Abschnitte durch genetische Rekombination eine große Vielfalt auf. So gibt es potenziell eine Billion verschiedene Immunglobuline und eine Billiarde verschiedene  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptoren. Dabei existieren sowohl auf den B-Zellen als auch auf den T-Zellen weitere Rezeptoren, die bei Adhäsion und Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen. Auf T-Zellen sind das zum Beispiel CD4- und CD8-Rezeptoren. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind ihrer Funktion nach T-Helferzellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wirken als T-Killerzellen. Beide Rezeptoren verstärken die spezifische Wechselwirkung zwischen T-Zellen und ihren jeweiligen Zielzellen, wobei CD8 als Corezeptor mit dem HLA-I-Proteinkomplex (human leucocyte antigen) und CD4 mit HLA-II-Proteinen in Wechselwirkung tritt <sup>1</sup>.

### T-Lymphozyten

Die „naiven“ CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wandeln sich nach HLA-II-assoziiierter Präsentation des Antigens durch antigenpräsentierende Zellen (z.B. dendritische Zellen), in unreife T-Effektorzellen um. Aus diesen entstehen durch weitere Differenzierung T-Helferzellen und zwar entweder inflammatorische T<sub>H1</sub>-Zellen, die Makrophagen mittels IFN $\gamma$  aktivieren, oder T<sub>H2</sub>-Helferzellen, die für die B-Zell-Aktivierung nötig sind. T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen hemmen sich gegenseitig, so dass, ist die Weiche einmal gestellt, nur einer der beiden Typen vorherrscht <sup>30</sup>.

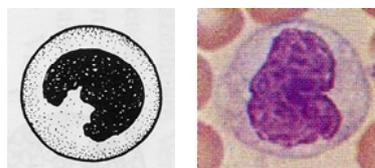
Zytotoxische T-Zellen (T-Killerzellen) entstehen aus „naiven“ CD8-T-Zellen nach HLA-I-assoziiierter Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen. Die T-Killerzellen erkennen dann mit ihrem CD8-assoziierten T-Zell-Rezeptor das HLA-I-gebundene zugehörige Antigen auf infizierten Körperzellen, auf Tumorzellen und auf Zellen transplantiert Organe wieder und treiben diese Zellen in den programmierten Zelltod (Apoptose) oder die Nekrose <sup>30</sup>.

## B-Lymphozyten

Die spezifische humorale Immunantwort nimmt ihren Ausgang von den B-Lymphozyten. Auf deren Oberfläche sind IgD und IgM-Monomere verankert, von denen mehrere an das zugehörige Antigen binden. Die dadurch ausgelöste Antikörpervernetzung löst in der B-Zelle die Internalisierung und Aufarbeitung des Antigen-Antikörper-Komplexes aus. Zur anschließenden Aktivierung der B-Zelle ist aber noch ein zweites Signal notwendig. Das kann vom Antigen selbst, oder von T<sub>H2</sub>-Zellen stammen, denen die B-Zellen das HLA-II-assoziierte Antigen präsentieren. Erkennt der CD4-assoziierte T-Zell-Rezeptor der T<sub>H2</sub>-Zelle das Antigen, so exprimiert die T-Zelle auf der Oberfläche den CD40-Liganden und sezerniert außerdem IL-4. CD40-Ligand und IL-4 lösen die klonale Selektion der B-Zelle, die Sekretion von IgM sowie die Differenzierung zur Plasmazelle aus. Dabei kann, durch unterschiedliches DNA-Spleissen, von der Expression des IgM auf die von IgA, IgG oder IgE umgeschaltet werden. Hierbei bleiben aber all diese Ig-Typen, die von einem B-Zell-Klon stammen, für das gleiche Antigen monospezifisch. Die Plasmazellen produzieren nur jeweils einen Ig-Typ<sup>30</sup>.

### **2.6.3 Monozyten**

Der Organismus verfügt außer den Granulozyten noch über ein anders Phagozytosesystem, das ubiquitär ist und sich von den Monozyten des Blutes ableitet. Während die neutrophilen Granulozyten nach der Phagozytose meist absterben, bleiben die Monozyten am Leben. Ihre Phagozytosekapazität ist um ein Vielfaches größer als die der anderen Zellen. Die Monozyten sind die größten Zellen des Blutes (Durchmesser 12-20µm) und machen beim Menschen circa 2 bis 6 Prozent aller Leukozyten aus<sup>6</sup>. Bei der Maus findet man etwa 50 bis 100 Monozyten pro µl Vollblut (siehe Tabelle 2)<sup>35</sup>. Es sind mononukleäre Zellen mit einem heterochromatinarmen Kern und einem leicht basophilen Zytoplasma, das feinste, lichtmikroskopisch kaum erkennbare, azurophile Granula enthält.



*Bild 13 Monozyt mit heterochromatinarmen Kern und basophilen Zytoplasma schematisch (links) und mikroskopisch (rechts)*

Aufgrund ihres Lysosomenreichtums können Monozyten auch größere Gewebs- oder Zelltrümmer intrazellulär verarbeiten und beseitigen. Sie sind amöboid beweglich. An der Zelloberfläche entwickeln sich lange, tentakelartige Zytoplasmafortsätze, die durch ihre starke Haftfähigkeit mit Gewebstrümmern oder Oberflächen aller Art Kontakt aufnehmen können. Bei den in Monozyten gefundenen Enzymen handelt es sich im

Wesentlichen um Peptidasen, Peroxydasen und Phosphatasen, die innerhalb der Lysosomen meist in inaktiver Form vorliegen. Die Monozyten entstehen im Knochenmark<sup>6</sup>. Sie zirkulieren nur ein bis zwei Tage im Blut und wandern rasch ins Gewebe ein. Dort differenzieren sie zu Makrophagen, werden ortsständig und können mehrere Monate aktiv bleiben<sup>7</sup>. Je nach lokalen Erfordernissen differenzieren sie sich in verschiedenen Organen noch weiter aus<sup>6</sup>. So finden sich beispielsweise Kupffer-Sternzellen in der Leber, Alveolarmakrophagen in der Lunge, Uferzellen in den Lymphknoten, Langerhans-Zellen in der Haut und viele weitere Makrophagen auf Darmserosa, in den Milzsinus, den Gelenkspalten, im Gehirn und am Endothel. Mann nennt sie zusammen auch mononukleäres phagozytotisches System (MPS) oder retikuloendotheliales System (RES). Makrophagen erkennen relativ unspezifisch Kohlenhydratkomponenten auf der Oberfläche von Bakterien und phagozytieren diese<sup>30</sup>.

## **2.7 Morphologie und Funktion von embryonalen endothelialen Progenitorzellen**

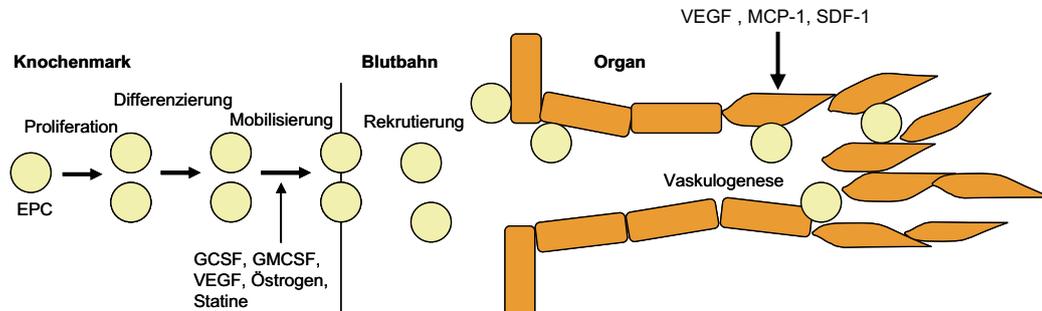
Neben Leukozyten und Thrombozyten sind im Blut zusätzlich so genannte endotheliale Progenitorzellen an der „Reparatur“ geschädigter bzw. verletzter Gefäße beteiligt.

Generell wird die Bezeichnung endotheliale Progenitorzelle (EPC) verwendet, um eine besondere Art von Zelltyp zu beschreiben, der das Potential hat, sich in eine mature funktionelle Endothelzelle zu differenzieren, die dann das Lumen von Blutgefäßen oder Kapillaren auskleidet<sup>11</sup>.

Zirkulierende EPCs, die nach heutigem Wissen größtenteils aus dem Knochenmark in den Blutstrom einwandern, tragen zur Bildung von neuen Blutgefäßen bei, und begünstigen so die Gefäßneubildung und Reendothelialisierung in ischämischem Gewebe, nach Gefäßverletzung und beim Tumorwachstum<sup>10, 36, 37</sup>. Ihnen wird außerdem eine Schlüsselrolle bei der Erhaltung der Integrität der Gefäßwand zugesprochen. In neueren Studien wurde gezeigt, dass eine verminderte Anzahl von zirkulierenden EPCs, nicht nur die Angiogenese beeinträchtigt, sondern auch zur Entstehung von Atherosklerose beitragen kann. Interessanterweise haben Patienten mit erhöhtem Risiko für Coronararterienkrankungen eine geringere Anzahl zirkulierender EPCs mit reduzierter Aktivität<sup>27</sup>. Dennoch sind die zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen für die Rekrutierung und Differenzierung der EPCs noch nicht genauer bekannt, und bleiben nach wie vor ein zentrales Thema in der Stammzellbiologie<sup>37</sup>.

Bei der postnatalen Gefäßneubildung proliferieren und differenzieren EPCs im Knochenmark. Verstärkt durch Cytokine und Wachstumsfaktoren wie GCSF (granulocyte colony stimulating factor), GMCSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) und unterstützt durch Östrogene und Statine, werden die Zellen aus dem Knochenmark in den Blutstrom

mobilisiert, und gelangen so in periphere Blutbahnen und an den Ort der Vaskulogenese<sup>10</sup>. Hier werden die EPCs abgefangen und tragen zur Gefäßneubildung bei (siehe Bild 14)<sup>10</sup>.



*Bild 14 Kinetik der EPCs bei der postnatalen Gefäßneubildung. Zirkulierende EPCs werden aus dem Knochenmark mobilisiert und an den Ort der Gefäßneubildung rekrutiert. Die Mobilisierung wird verstärkt durch Cytokine und Wachstumsfaktoren wie GCSF (granulocyte colony stimulating factor), GMCSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), VEGF (vascular endothelial growth factor)<sup>10</sup>. VEGF, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) und SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) sind verantwortlich für die Rekrutierung der Progenitorzellen an den Ort des Geschehens<sup>11</sup>.*

Ischämie ist ein dominantes Signal, das über den Aktivator HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) die Cytokinkaskade aktiviert, und zur Mobilisierung der EPCs aus dem Knochenmark führt. Bislang sind die Mechanismen, die für die Rekrutierung von EPCs an die verletzte Gefäßwand beteiligt sind nicht im Detail geklärt. Zytokine wie VEGF (vascular endothelial growth factor), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) und SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) scheinen eine Rolle bei der Wanderung der Progenitorzellen an den Ort des Geschehens zu spielen. Über die genauen Prozesse, die Migration und Invasion der EPCs, und die Entstehung neuer Gefäße regulieren, ist jedoch nur wenig bekannt<sup>11</sup>. Man weiß allerdings, dass im Bereich von Gefäßverletzungen adhären Thrombozyten, potente Chemokine sezernieren und verschiedene Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren. Sie stellen daher potentielle Mediatoren für das Homing von Progenitorzellen dar. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass es über die Bindung von PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) mit P-Selektin zum Rollen von EPCs entlang der aktivierten Thrombozyten kommt. Durch VLA-4-Bindung an VCAM-1, wird die feste Adhäsion von EPCs an Thrombozyten getriggert (siehe Bild 15). Außerdem wurde nachgewiesen, dass es in Anwesenheit von aktivierten Blutplättchen zur Transformierung von embryonalen EPCs in reife endotheliale Zellen kommt. Thrombozyten können also eine wichtige Rolle bei der Regulation der Chemotaxis, der Adhäsion und der Differenzierung von EPCs bzw. embryonalen EPCs spielen<sup>27</sup>.

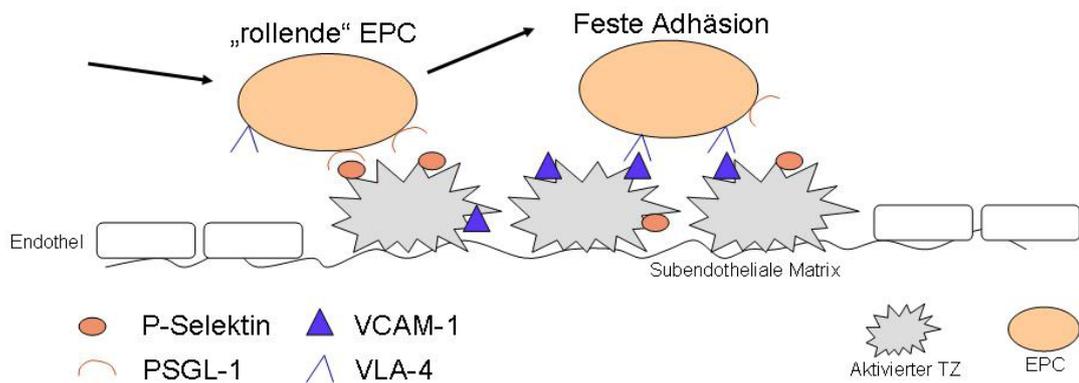


Bild 15 Homing der endothelialen Progenitorzellen (EPCs) an aktivierte Thrombozyten im Bereich der verletzten Gefäßwand; P-Selektin/PSGL-1-Bindung vermittelt das Rollen, VCAM-1/VLA-4-Bindung die feste Adhäsion der EPCs

Endotheliale Progenitorzellen stellen einen Subtyp der Stammzellen dar und besitzen daher einige Stammzeleigenschaften, wie etwa klonales Wachstum, Proliferation, Pluripotenz und Stressresistenz<sup>38</sup>. Auf Matrigel zeigen sie eine für EPCs typische Pflastersteinmorphologie und bilden röhrenartige Strukturen. Embryonale endotheliale Progenitorzelllinien (eEPCs) zeichnen sich durch ein nahezu unbegrenztes Wachstum aus, welches nur mit dem der embryonischen Stammzellen vergleichbar ist<sup>39</sup>. Diese Eigenschaft geht den adulten EPCs allerdings verloren. Adulte EPCs sind *in vitro* schwer zu isolieren und zu kultivieren und außerdem genetisch schlecht zu manipulieren. Daher werden in der Forschung in der Regel embryonale epitheliale Progenitorzelllinien als Modell genutzt. Embryonale EPCs exprimieren frühe endotheliale Marker, differenzieren zu maturaen Endothelzellen und bilden während der Embryogenese Blutgefäße<sup>37</sup>. EPCs lassen sich anhand einiger spezifischer endothelialer Oberflächenmarker gut identifizieren. Dazu gehören unter anderem CD34, AC133, KDR, Flk-1 (entspricht dem murinen VEGFR2) und CD31 (PECAM-1)<sup>10, 38</sup>. Während Vorläufer- und mature Zellen CD34-Marker besitzen, glaubt man, dass die Koexpression von CD133 und VEGFR-2 auf der Oberfläche der Zellen, eher auf immature EPCs hindeutet<sup>11</sup>. Viele dieser Oberflächenantigene befinden sich auch auf hämatopoetischen Stammzellen, so dass für eine eindeutige Zuordnung der Zellen weitere Unterscheidungen anhand morphologischer Charakteristika oder mittels RNA-Analysen notwendig sind. Im Knochenmark und im peripheren Blut besitzen etwa 0,1 bis 2 Prozent aller mononuklearen Zellen das CD34-Antigen. *In vitro* differenzieren sich diese Zellen in endotheliale Zelllinien, in Tiermodellen inkorporieren sie bei Ischämie-Experimenten in die Bereiche der Gefäßneubildung<sup>10</sup>.

In der vorliegenden Studie wurde in den Mausmodellen die murine embryonale endotheliale Progenitorzelllinie T17b verwendet. Für die Gewinnung dieser Zelllinie werden embryonale Zellen von 7,5 bis 8,5 Tage alten Mäuseembryonen isoliert, mittels spezifischer Marker für Zelltyp und Zellstadium, und anhand charakteristischer morphologischer Eigenschaften als embryonale EPCs identifiziert, und in

0,1-prozentigen gelatinebeschichteten Flaschen kultiviert<sup>39</sup>. Das Kulturmedium besteht aus DMEM (Gibco, Fa. Invitrogen, Karlsruhe) mit 20% hitze-inaktiviertem FCS (Fa. Invitrogen, Karlsruhe), 0,1 mmol/L  $\beta$ -Mercaptoethanol (Fa. Sigma-Aldrich, München), 1 mmol/L nicht essentiellen Aminosäuren und 2 mmol/L L-Glutamin (Gibco, Fa. Invitrogen, Karlsruhe)<sup>27</sup>.

Die T17b-Zellen zeichnen sich besonders durch robuste Wachstumseigenschaften in Kultur, einen stabilen morphologischen Phänotyp und die problemlose Isolierung und Erhaltung einer reinen Zelllinie aus. Außerdem differenzieren sie verlässlich zu ausgereiften Endothelzellen, was Voraussetzung für eine standardisierte Versuchsdurchführung ist<sup>27</sup>. In einem Fall konnte eine T17b-Zelllinie über drei Jahre vermehrt und kultiviert werden, ohne dass es zu Veränderungen des Phänotyps oder zu einem reduzierten Wachstum der Zellen kam<sup>39</sup>.

## **2.8 Die Rolle von Sphingosin-1-Phosphat bei der Regulation von inflammatorischen und proliferativen Prozessen und in der Atherogenese**

Neben Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und FGF können insbesondere auch Lipide an der Regulation reparativer Prozesse in der verletzten oder geschädigten Gefäßwand von Bedeutung sein.

Der Lipidmediator Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ein Produkt aus dem Sphingomyelin-Metabolismus, ist in der Natur weit verbreitet<sup>40</sup>. Als bioaktives Molekül reguliert S1P viele zelluläre Prozesse wie etwa Proliferation und Migration von Zellen<sup>41</sup>. Obwohl es ursprünglich als intrazellulärer sekundärer Botenstoff beschrieben wurde, zeigte sich mit der Entdeckung der G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren, die wichtige Rolle für S1P als extrazellulärer Lipidmediator in höheren Organismen<sup>40</sup>. Intrazellulär nimmt S1P Einfluss auf Mitose, Apoptose, Zellwachstum, Calciummobilisation und Motilität der Zelle, wohingegen es extrazellulär auf Angiogenese, Herzentwicklung, Immunsystem und Zellmigration einwirkt.

Sphingosin-1-Phosphat entsteht in Säugerzellen primär aus durch Abbau von Ceramiden gewonnenem Sphingosin. Dieses wird, stimuliert etwa durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, durch die Sphingosinkinase Typ 1 und Typ 2 (Sphk1, Sphk2) zu Sphingosin-1-Phosphat phosphoryliert. Der Abbau von S1P wird mittels der Enzyme S1P-Phosphatase und S1P-Lyase (SPL) reguliert, und erfolgt mit einer S1P-Halbwertszeit von 15 Minuten. Interessanterweise gibt es Hinweise, dass die Expression dieser beiden Enzyme in Endothelzellen durch laminare Strömung herunterreguliert, und so die Freisetzung von S1P stimuliert wird<sup>42</sup>. S1P-Lyase befindet sich im endoplasmatischen Retikulum und degradiert S1P irreversibel zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin<sup>43</sup>. Die S1P-Konzentration in der Zelle ist also abhängig, von der Aktivität der synthetisierenden Enzyme Sphingosinkinase 1 und 2, und der Tätigkeit der abbauenden Enzyme S1P-Lyase und -Phosphatase (siehe Bild 16)<sup>42</sup>.

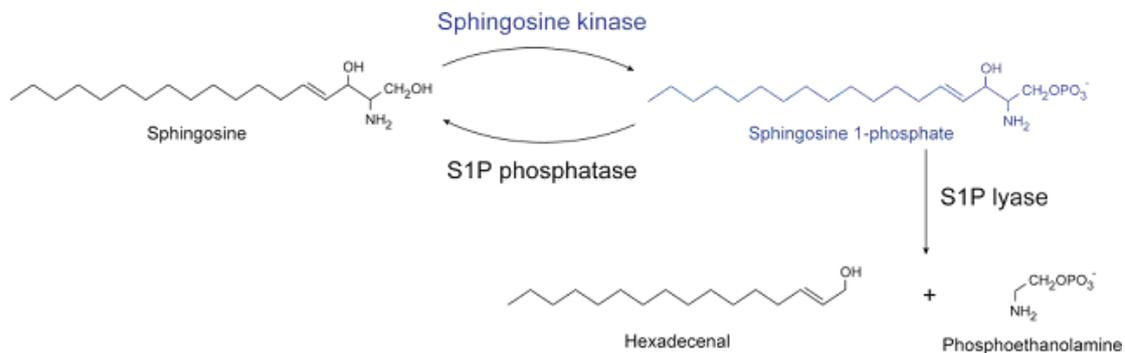


Bild 16 Synthese und Abbau von Sphingosin-1-Phosphat

Hämatopoetische Zellen wie Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten, aber auch vaskuläre Endothelzellen sezernieren S1P ins Blut, wo es Plasmakonzentrationen von 330-420 nmol/l erreicht, und zu circa 60% an Albumin und Lipoproteine gebunden ist. Besonders HDL (high-density-lipoprotein) scheint einer der natürlichen Transportmoleküle für S1P zu sein<sup>25, 42</sup>. Die Sezernierung von S1P aus Blutplättchen erfolgt über zwei Transportsysteme. Das häufigere ist ATP-abhängig und lässt sich durch Thrombin stimulieren, das andere ist ein ATP-unabhängiger S1P-Transporter. Bei Erythrozyten erfolgt die Freisetzung von S1P kontinuierlich<sup>41</sup>. Erstaunlicherweise kommt es weder bei Thrombozytopenie noch bei Leukopenie, zu einem Abfallen der S1P-Konzentration im Blut. Neben Leukozyten und Thrombozyten scheinen daher nach neuen Erkenntnissen, auch rote Blutzellen und eEPCs verantwortlich zu sein. Aufgrund der hohen Blutkonzentration werden die Rezeptoren der im Blut vorhandenen Zellen durch S1P wahrscheinlich permanent aktiviert. Im Gegensatz dazu findet man im Gewebe einen bedeutend niedrigeren S1P-Level von circa 0,5-75 pmol/mg. Diesen Konzentrationsunterschied zwischen Blut und Gewebe bezeichnet man als vaskulären S1P Gradienten<sup>42</sup>.

S1P und seine Rezeptoren nehmen Einfluss auf die Gefäßentstehung im Körper. Zum einen haben Untersuchungen gezeigt, dass S1P *in vitro* in Follikularflüssigkeit endotheliale Progenitorzellen stimulieren und die ovariale Angiogenese vorantreiben kann. Des Weiteren werden alle im Gefäßsystem für Interaktionen relevanten Zellen, wie vaskuläre glatte Muskelzellen, Endothelzellen, und Leukozyten einschließlich Makrophagen, durch den S1P-Signalweg beeinflusst<sup>25</sup>.

Bei Ratten und Mäusen hat man durch Untersuchungen herausgefunden, dass es nach systemischer oder lokaler Applikation von S1P, abhängig vom betroffenen Gefäßsystem, sowohl zu Vasokonstriktion als auch zu Vasodilatation kommen kann. Beispielsweise kontrahieren cerebrale und koronale Arterien, wohingegen Aorta, Arteria carotis und Femoralarterien kaum bis gar nicht auf die Stimulation durch S1P reagieren. Zusätzlich wurde in verschiedenen *in vivo* Versuchen dargestellt, dass systemisch appliziertes S1P für kurze Zeit zu einer Erniedrigung des Blutdrucks und zu

einer dosisabhängigen Reduktion des mesenterialen und renalen Blutflusses, und der myokardialen Perfusion führt. Man vermutet eine Beteiligung insbesondere der S1P<sub>2</sub>- oder S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren an diesen Phänomenen.

### 2.8.1 S1P-Rezeptoren

Sphingosin-1-Phosphat bindet an die fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub>. Diese Rezeptoren funktionieren über den klassischen G-Protein-Signalweg der in vielen verschiedenen Zellen vorgefunden wird. Die Bindung an G<sub>q</sub> führt zur Stimulierung der Phospholipase C und zur Calcium-Mobilisierung. G<sub>i</sub> (inhibitory G-Protein) bewirkt die Aktivierung von ERK (extracellular signal-related kinase) und PI3-Kinase (Phosphoinositol 3-Kinase) und die Hemmung von Adenylatcyclase (AC). Über G<sub>12/13</sub> kommt es zur Aktivierung von Rho und zur Neuordnung von Aktin (siehe Bild 17) <sup>25</sup>.

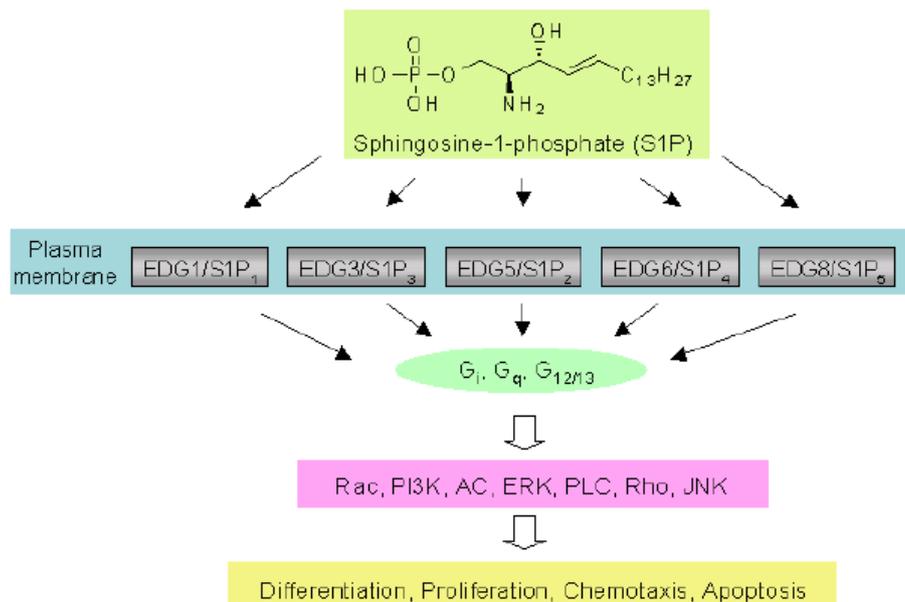


Bild 17 Signaltransduktion von Sphingosin-1-Phosphat über fünf G-Protein gekoppelte Rezeptoren in der Plasmamembran von Zellen; EDG=endothelial differentiation gene <sup>3</sup>

Beim Säugetier findet man die S1P-Rezeptoren in einer großen Auswahl von Gewebe und auf verschiedenen Zelltypen <sup>25, 40</sup>. Sie sind bei vielen wichtigen physiologischen Aktionen einschließlich Immunantwort, Angiogenese, Kontrolle des Gefäßtonus, Herzfunktion und Regulation der Gefäßpermeabilität von Bedeutung. Zusätzlich beteiligen sich die Rezeptoren an verschiedenen pathophysiologischen Prozessen. Unter anderem stellt S1P einen wichtigen Mediator bei einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen wie Autoimmunerkrankungen, Organtransplantationen, Tumorerkrankungen, Infertilität der Frau, myokardialen Infarkt, entzündlichen Gefäßkrankungen oder bei multipler Sklerose dar <sup>40</sup>.

Es hat sich herausgestellt, dass im kardiovaskulären System, vor allem die Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> eine funktionelle Rolle spielen. Mäuse mit ausgeknockten Rezeptoren S1P<sub>1</sub> sind nicht überlebensfähig und zeigen schwerwiegende Defekte im Gefäßsystem. Bei gleichzeitigem Fehlen aller drei Rezeptoren sind diese Defekte noch deutlicher und die Embryonen sterben früher ab. Dies zeigt, dass auch S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> entscheidend für die Gefäßfunktion und Hämodynamik des Blutes sind, wobei allerdings der alleinige Knockout von S1P<sub>2</sub> oder S1P<sub>3</sub> die Lebensfähigkeit der Embryonen nicht beeinträchtigt<sup>25</sup>.

### **2.8.2 Sphingosinkinasen**

Die Sphingosinkinasen (Sphk1, Sphk2) sind ubiquitäre Enzyme im Zytosol und im endoplasmatischen Retikulum der Zellen. Teilweise werden die Sphingosinkinasen auch in den extrazellulären Raum sezerniert, so dass auch hier eine kleine Menge an S1P gebildet werden kann<sup>41</sup>. Die Sphk1 findet man vorwiegend im Zytosol. Hier wirkt sie positiv auf das Überleben der Zelle. Im Gegensatz dazu befindet sich die Sphk2 im endoplasmatischen Retikulum und stimuliert die Apoptose der Zelle. Mäuse, die weder Sphingosinkinase 1 noch 2 exprimieren, sind nicht überlebensfähig. Sie entwickeln ähnlich ausgeprägte Gefäßmissbildungen wie S1P<sub>1</sub>-Rezeptorknockouts, und sterben im Embryonalstadium. Fehlt nur eine der beiden Sphingosinkinasen, kommt es phänotypisch zu keiner Veränderung im Gefäßsystem der Mäuse. Wahrscheinlich kann die zur normalen Gefäßentwicklung benötigte S1P-Konzentration durch nur eine intakte Sphingosinkinase noch ausreichend gebildet werden<sup>25</sup>. Dennoch belegen neueste Studien, dass bei Sphk1-defizienten Mäusen, die S1P-Konzentration im Plasma signifikant um etwa 65 Prozent erniedrigt ist. Es scheint, dass die Sphk1-Aktivität ein entscheidender Faktor für den S1P-Level im Blut darstellt<sup>42</sup>.

### **2.8.3 S1P und Leukozyten**

Sphingosin-1-Phosphat ist von funktioneller Bedeutung für die Auswanderung von Lymphozyten aus den lymphoiden Geweben und dem Thymus ins Blut. Hierbei folgen die Zellen dem vaskulären S1P Gradienten und wandern vom Ort der niedrigeren Konzentration im Gewebe, ins Blut mit deutlich höheren S1P-Konzentrationen ab<sup>42</sup>.

### **2.8.4 S1P und Endothelzellen**

Vaskuläre Endothelzellen sind wichtig für S1P-induzierte Aktivitäten. Sie exprimieren die Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> und triggern über die Aktivierung dieser Rezeptoren diverse Auswirkungen auf Proliferation, Migration, Morphogenese, Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytoskelettveränderungen und Lebensdauer der endothelialen Zelle. Je nach spezifischem Besatz der Endothelzelle mit den S1P-Rezeptoren, verläuft die Antwort der Zelle auf S1P-Einwirkung anders. Das Expressionsmuster der Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird dabei durch Faktoren wie Blutfluss, Zytokine und S1P-Plasmaspiegel stark beeinflusst. Das erklärt die

variierende S1P-Rezeptor-Expression der Endothelzellen von Arterien, Venen und Kapillaren sowie in Koronar-, Zerebral-, Renal- oder peripheren Arterien<sup>25</sup>.

Für die Bildung neuer Gefäße werden zu allererst vaskuläre Endothelzellen (ECs) benötigt. Nur durch ordnungsgemäße Proliferation, Migration und Morphogenese dieser Zellen können neue kapilläre Netzwerke entstehen. Die zelluläre Morphogenese der ECs in tubuläre, kapillar-ähnliche Strukturen wird durch S1P eingeleitet. Dabei kommt es zur Kontaktherstellung zwischen einzelnen Zellen und zur Aktivierung von Integrinen, so dass die Endothelzellen entlang einer komplexen extrazellulären Matrix wandern können<sup>25</sup>.

#### Regulation von endothelialer Permeabilität und Adhäsion

Einer der Haupteffekte von S1P am Endothel ist die Herabsetzung der Permeabilität und damit die Reduzierung der Diapedese von Zellen in tiefere Gefäßschichten. Bei verschiedenen humanen und bovinen Endothelzelltypen führt S1P zu einem erhöhten elektrischen Widerstand der Zellwand. Dieser Effekt wird über die Bindung von S1P an S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> mit nachfolgender Aktivierung von G<sub>i</sub>-Protein, Rho und Rac, vermittelt. Es kommt zu einer vermehrten Bildung von Aktin-Lamellipodien (Rac) und zum Umbau des Aktinzytoskelett (Rho). Das Ergebnis ist eine deutliche Stärkung der Barrierefunktion des Endothels. Lee *et al.* konnte zeigen, dass S1P zu einer Aktivierung von tight-junction assoziiertem Protein ZO-1 (zonula occludens-1) führt<sup>44</sup>. ZO-1 spielt eine kritische Rolle bei der Regulation von Chemotaxis und Integrität der endothelialen Barriere und wird nach Stimulation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors an die Lamellopodien und Kontaktflächen zu Nachbarzellen umgelagert. Sowohl die Barrierenintegrität als auch die Zellmotilität werden so bei S1P-behandelten Zellen über die Aktivierung von G<sub>i</sub>-Protein, PKB (Proteinkinase B) und Rac, signifikant gesteigert. ZO-1 ist für diese Prozesse offensichtlich unabkömmlich. Zusammengefasst nimmt S1P, abhängig von der Art des Gefäßsystems und der S1P-Rezeptor-Ausstattung, auf viele verschiedene mögliche Arten, antiinflammatorisch und antiarteriosklerotisch Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen<sup>25</sup>.

#### Regulation von endothelialer Zellmigration

In einigen Studien wurde nachgewiesen, dass S1P ein sehr starker chemotaktischer Lockstoff für Endothelzellen ist, stärker noch als VEGF (vascular endothelial growth factor) und FGF-2 (fibroblast growth factor-2). Die S1P-vermittelte Chemotaxis setzt die Aktivierung von Rho und Rac GTPase über die Bindung an S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren voraus. Über G<sub>i</sub>-Proteine kommt es gleichzeitig zur Aktivierung von Proteinkinase B welche für die chemotaktische Antwort der Endothelzellen unentbehrlich ist. Für die Chemotaxis ist eine gut abgestimmte Regulation der Zytoskelettremodellierung und der fokalen Kontaktausbildung entscheidend. In der Folge kommt es zur Ausbildung von stress fibers (Bündel von Mikrofilamenten) und so genannten membrane ruffings (Ausstülpung der Zelloberfläche durch neu gebildete Aktinfilamente)<sup>25</sup>.

Auf murinen vaskulären Endothelzellen fehlt im Gegensatz zu den humanen Zellen der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor. Stimulation dieser Zellen mit S1P und EGF (endothelial growth factor) über S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> führt hier ebenfalls zur Aktivierung von Rac, und zur Migration und Ausbildung von röhrenähnlichen Strukturen. Bei gleichzeitiger Zugabe eines S1P<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten bleiben die Effekte über die Rac-Aktivierung allerdings aus. Umgekehrt hat die Antagonisierung des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors eine Verstärkung der Effekte zur Folge. Dies deutet darauf hin, dass der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor hemmend auf die Rac-Aktivierung wirkt und infolge dessen, die Migration, die endotheliale Morphogenese und Angiogenese negativ reguliert<sup>25</sup>.

#### Regulation von endothelialer Apoptose

Endotheliale Dysfunktion, ein Schlüsselmechanismus bei der Entstehung von Atherosklerose, wird häufig mit endothelialer Zelloptose in Zusammenhang gebracht. Der Zelltod dysfunktioneller Endothelzellen tritt besonders bei Störung der physiologischen Scherkräfte und gestörtem Blutfluss, zum Beispiel im Bereich von Gefäßabzweigungen und -gabelungen, gehäuft auf. Der stärkste Hemmstoff der endothelialen Apoptose ist Stickstoffmonoxid (NO), der besonders bei Scherspannung kontinuierlich ins Blut sezerniert wird. Hierbei kommt es zur Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs und in dessen Folge zur Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthasen (eNOS) die vermehrt NO produziert. Assoziiert mit der PI3-Aktivierung läuft gleichzeitig die Hochregulierung von antiapoptotischem BCL-2 (B cell lymphoma gene 2) und die Herabregulierung des proapoptotischen Proteins Bisindolylmaeimide (BCL-2 interacting mediator of cell death) ab. Mehrere Studien belegen, dass Endothelzellen unter Anwesenheit von S1P, eine gesteigerte Resistenz gegen die durch TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose besitzen. Dabei ergab sich kein Unterschied zwischen exogen zugeführtem S1P und gesteigerter endogene Produktion von S1P. Die protektiven Effekte von S1P beruhen auf der Stimulation der NO-Produktion in endothelialen Zellen. Zusätzlich unterdrückt S1P die kompletten Apoptosemarker indem es die Aktivierung von Caspase-3, die Zytochrom c-Freisetzung und die DNA-Fragmentierung in den Zellen hemmt. Hierbei verhindert die Blockade des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors die protektiven Effekte des S1P, eine Antagonisierung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors führt dagegen nur teilweise zu einer Reduktion der antiapoptotischen Wirkung von S1P<sup>25</sup>.

#### **2.8.5 S1P und Neointimaformation**

Ein Hauptkriterium bei der Bildung von Neointima ist die exzessive Proliferation von glatten Muskelzellen (SMCs) in der Intima. In unterschiedlichen Zelllinien der vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC), findet man eine verschiedenartige Expression der Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub><sup>45</sup>. Bei diesen Zellen ist die Stimulierung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors über die Aktivierung des G<sub>i</sub>-Proteins entscheidend für die Migration und Proliferation der Zellen. Der weitere Signalweg führt über die Induktion der p70 S6 Kinase-Aktivität und die Expression von Zyklin D1. Über den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor kommt es so zu einer gesteigerten Migration der VSMCs<sup>25</sup>. Im Gegensatz zu

immaturen glatten Muskelzellen, exprimieren adulte SMCs, S1P<sub>1</sub> nur sehr schwach und haben daher eine verminderte Fähigkeit zu migrieren. Wird dagegen der auf den glatten Muskelzellen der Tunica media stark exprimierte S1P<sub>2</sub>-Rezeptor stimuliert, inhibiert dies die Migration und Proliferation der VSMCs<sup>45</sup>. Da auf adulten SMCs der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor überwiegend vorhanden ist, wirkt S1P in diesem Fall also der Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen entgegen. Nur durch die Hochregulierung der S1P<sub>1</sub>-Expression oder durch die Blockade des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors führt die S1P-Stimulierung zur gesteigerten Wanderung und Vermehrung der glatten Muskelzellen. Bei fehlendem S1P<sub>2</sub>-Rezeptor kommt es nach Verletzung des Endothels zu einer schnellen Entstehung von Neointima mit gesteigerter Replikationsrate und Beweglichkeit der glatten Muskelzellen<sup>45</sup>.

### **2.8.6 Fingolimod (FTY 720)**

Anfang der 90er Jahre entdeckte ein japanisches Forscherteam die immunsuppressive Wirkung des Myriocins, ein aus der traditionellen chinesischen Medizin bekannter Wirkstoff des Pilzes *Isaria sinclairii*<sup>12</sup>. Fingolimod ist ein Immunmodulator, der ursprünglich als eine synthetische Modifikation dieses natürlich vorkommenden Sphingoidbasenanalogs entwickelt wurde<sup>43</sup>. Zunächst wurde er zur Verhinderung der Abstoßungsreaktion von Nierentransplantaten eingesetzt<sup>46</sup>. Aufgrund mangelnden Erfolges wurde jedoch die Entwicklung von Fingolimod für die Transplantationsmedizin eingestellt<sup>12</sup>. Gegenwärtig wird Fingolimod bei Patienten mit multipler Sklerose eingesetzt. Hier zeigten sich erhebliche therapeutische Effekte in klinischen Studien bei Patienten mit rezidivierenden Schüben dieser Autoimmunerkrankung<sup>47</sup>. Ein Vorteil von Fingolimod gegenüber anderen Immunsuppressiva, ist die gute Verträglichkeit und die geringe Toxizität<sup>43</sup>.

Als strukturelles Homolog von S1P, wirkt Fingolimod, nach endogener Phosphorylierung in den Thrombozyten durch die Sphingosinkinase 2, als starker Agonist der Rezeptoren S1P<sub>1, 3-5</sub>. Dadurch hat es Einfluss auf viele physiologische Prozesse wie beispielsweise Immunität, Angiogenese, Zellmigration und Entzündung<sup>46</sup>. Außerdem bewirkt Fingolimod eine Hemmung der S1P-Lyase, welche dem Abbau von S1P dient<sup>43</sup>. Die Sezernierung von Fingolimod-P aus Thrombozyten kann durch die Aktivierung der Zellen mit Thrombin erhöht werden. Ebenso wie die Freisetzung von S1P aus Thrombozyten, erfolgt auch die Freisetzung von Fingolimod-P, sowohl durch stimulusabhängige als auch durch stimulusunabhängige Transportsysteme<sup>41</sup>.

#### Fingolimod und Leukozyten

Der Immunmodulator Fingolimod wird in Versuchsmodellen der Organtransplantation und der Autoimmunität eingesetzt. Im Gegensatz zu anderen Immunsuppressiva beeinträchtigt Fingolimod nicht die Aktivierung, Proliferation und Funktion der Leukozyten, sondern greift in die Verteilung der Zellen zwischen lymphoiden Organen und dem Blut ein<sup>25</sup>. Dabei hemmt es unter anderem die Auswanderung von naiven und aktivierten CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und B-Lymphozyten aus peripheren lymphoiden Organen

und dem Thymus<sup>43</sup>. Der immunsuppressive Effekt von Fingolimod wird auf die Herunterregulation des lymphozytären S1P<sub>1</sub>-Rezeptors zurückgeführt<sup>46</sup>. S1P<sub>1</sub>, der vorherrschende S1P-Rezeptor auf Lymphozyten, ist der wichtigste Regulator der Migration dieser Zellen. Ohne den S1P<sub>1</sub>-Signalweg können extravaskuläre Lymphozyten nicht aus dem Gewebe auswandern<sup>47</sup>. Die Bindung von Fingolimod-P an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor führt zu einer Internalisierung des Rezeptors. Dadurch werden die Zellen unempfindlich für Serum-S1P, und so dem verbindlichen Signal zur Auswanderung aus lymphoiden Organen entzogen. Lymphozyten sind nun nicht in der Lage über das Blut, in peripheres entzündliches Gewebe zu gelangen. Der Langzeiteffekt von Fingolimod ist also, im Gegensatz zur initialen agonistischen Wirkung, eher der eines funktionellen S1P-Antagonisten<sup>47</sup>.

#### Fingolimod und Endothelzellen

Es konnte gezeigt werden, dass Fingolimod-P S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren auf Endothelzellen aktiviert. Dadurch kommt es zu vielfältigen Effekten. Die Aktivierung der eNOS durch die Bindung von Fingolimod-P an S1P<sub>3</sub>, führt zur Vasorelaxation in Arterien. Im Ischämiemodell verbessert es außerdem die Wiederherstellung des Blutflusses, bei Koronarerkrankungen die Funktion der endothelialen Progenitorzellen<sup>25</sup>. Zusätzlich fördert Fingolimod-P die Migration von Endothelzellen und reduziert über die Stimulation des endothelialen S1P<sub>1</sub>-Rezeptors, die VEGF-induzierte Permeabilität der Endothelschicht *in vivo*. Die Passage der endothelialen Barriere für andere Zellen ist somit erschwert<sup>41</sup>. Über G<sub>i</sub>-gekoppelte S1P-Rezeptoren und deren Aktivierung von ERK (extracellular-signal regulated kinase) und PKB (Proteinkinase B), vermittelt Fingolimod-P den Einbau von Adhäsionsverbindungen (zonula adhaerens) und begünstigt die Überlebensfähigkeit der Zelle<sup>25</sup>.

#### Fingolimod und Atherosklerose

Kürzlich wurde in einem Mausmodell für Atherosklerose demonstriert, dass durch die Behandlung mit Fingolimod die atherosklerotischen Läsionen um mehr als 50 Prozent reduziert werden. Auch der Gehalt an Makrophagen in den Läsionen war deutlich geringer und die Freisetzung von MCP-1 gehemmt. In *in vitro* Versuchen wurden Hinweise gefunden, dass die antiatherosklerotischen Eigenschaften von Fingolimod über die Aktivierung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors getriggert wird. Weitere Experimente sind nötig um den genaueren Mechanismus nachzuweisen<sup>25</sup>.

### 2.8.7 Therapeutische Ansätze für S1P

Neben den nachgewiesenen positiven Effekten bei der Entstehung von Atherosklerose gibt es noch einige andere therapeutische Ansätze für Sphingosin-1-Phosphat.

Beispielsweise stellt S1P eine potentielle therapeutische Möglichkeit dar, Krebserkrankungen durch Hemmung der Tumorangiogenese zu beeinflussen<sup>25</sup>.

Durch Experimente mit dem selektiven S1P<sub>1</sub>-Agonisten SEW 2871 fand man zudem heraus, dass über S1P-Bindung an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor, die Nierenfunktion während eines akuten ischämischen Nierenversagens, um signifikante 40 Prozent verbessert werden kann. Die Behandlung mit SEW 2871 führte zu einer Umkehrung der Hochregulierung von TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), P-Selektion und ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) im Bereich der Ischämie in der Niere, und zu einer Reduktion der zirkulierenden Lymphozyten und infiltrierenden Neutrophilen im äußeren Nierenmark<sup>25</sup>.

In einem *in vivo* Mausmodell für Myokardinfarkt, konnte nachgewiesen werden, dass HDL-assoziiertes S1P über einen durch S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren vermittelten Signalweg, das Herz vor ischämisch bedingten Schäden schützen kann. So kommt es nach S1P<sub>3</sub>-Aktivierung über PI3-Kinase und PKB zur Anregung der eNOS (endotheliale NO-Synthase) und dadurch zur gesteigerten NO-Produktion. Auch hier kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenrekrutierung und -adhäsion im Infarktgebiet<sup>25</sup>.

Letztlich besteht zudem ein nützlicher therapeutischer Ansatz für Diabetes-induzierte Gefäßerkrankungen, da S1P über den Rezeptor S1P<sub>1</sub> auch die Monozyten-Endothelzellinteraktionen signifikant reduziert<sup>25</sup>.

Zusammenfassend könnten Thrombozyten (als Hauptquelle für S1P) im Rahmen der arteriellen Thrombose zentrale Bedeutung für die Regulation inflammatorischer Prozesse, aber insbesondere auch für die Rekrutierung von EPCs und damit für die Reendothelisierung nach Gefäßverletzung besitzen.

### 3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Obwohl Atherosklerose, arterielle Thrombose und Restenose aufgrund von Neointimaformation, nach wie vor zu den Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen zählen, sind die den Erkrankungen zugrunde liegenden Mechanismen und Signalwege immer noch nicht im Detail bekannt. Auch die Möglichkeiten der Prävention und Behandlung sind nach wie vor begrenzt und nicht zufrieden stellend. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, aufzuzeigen, inwiefern Sphingosin-1-Phosphat aus Thrombozyten, Einfluss auf entzündliche und proliferative Prozesse in der arteriellen Thrombose, der Atherosklerose und während der Neointimaformation nimmt. Um die beteiligten molekularen und zellulären Phänomene besser zu verstehen, wird in der Arbeit mit Sphingosinkinase 1-Knockout-Tieren gearbeitet und eine Doppelknockoutmaus aus ApoE<sup>-/-</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Tieren generiert. Außerdem kommen die S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod und SEW 2871 zum Einsatz. Die verschiedenen zellulären Interaktionen und parakrinen Signalwege während Atherosklerose, arterieller Thrombose und vaskulärem Remodelling im Rahmen der Neointimaprolieration, werden mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie an der Arteria carotis communis *in vivo* analysiert. Die Beteiligung von Thrombozyten, Leukozyten und EPCs wird analysiert. Außerdem erfolgen histologische und morphologische Untersuchungen von Carotiden und Aortenbogen der Maus.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen bearbeitet werden:

1. Welchen Einfluss hat S1P auf die inflammatorischen und proliferativen Prozesse der Gefäßwand im Rahmen der Atherosklerose?
2. Welche Rolle spielt S1P bei der Regulation von thrombotischen Ereignissen an der verletzten oder geschädigten Gefäßwand?
3. Welche Bedeutung besitzt S1P für die Reendothelialisierung und Gefäßwandreparatur, speziell für die Neointimaformation, nach Verletzung oder Schädigung des Endothels?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Substanzen

#### 4.1.1 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dimethylsulfoxid (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ist ein dipolares Lösungsmittel mit der Summenformel  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ . Es dient als Trägersubstanz für Arzneimittel und als Gefrierschutzmittel bei der Kryokonservierung von Zellen. Außerdem erhöht es die Löslichkeit schwer löslicher Substanzen<sup>48</sup>. Dimethylsulfoxid kann in Konzentrationen bis maximal 10 Prozent für Versuche eingesetzt werden<sup>48</sup>.

#### 4.1.2 Fingolimod (FTY 720)

FTY 720 (Fa. Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) ist ein strukturelles S1P-Analog mit der chemische Summenformel  $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{NO}_2$  (siehe Bild 18).



Bild 18 Chemische Formel von FTY 720

FTY 720 ist als kristallines Pulver erhältlich und wird zur Vorbereitung für die Versuche, unter Argon in einer Konzentration von 5mg/ml in DMSO gelöst und bei minus 20°C aufbewahrt. Zur intravenösen oder peroralen Anwendung am Tier wird die Lösung auf Raumtemperatur gebracht, mit Aqua ad injektabile um den Faktor 10 verdünnt, und möglichst zeitnah dem Versuchstier verabreicht.

#### 4.1.3 SEW 2871

SEW 2871 (Fa. Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) ist ein selektiver S1P<sub>1</sub>-Rezeptor Agonist beim Menschen und in der Maus, mit der Summenformel  $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{F}_6\text{N}_2\text{OS}$  (siehe Bild 19).

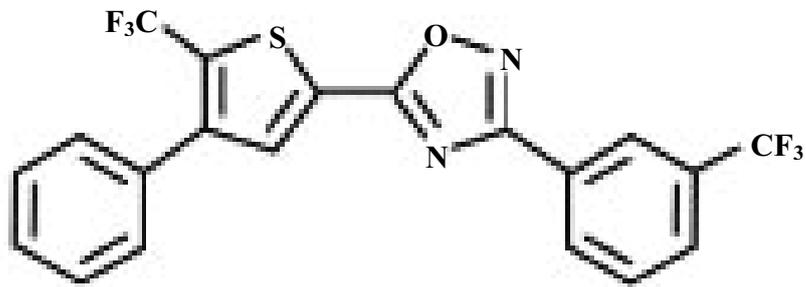


Bild 19 Chemische Strukturformel von SEW 2871

Es ist wie FTY 720, ein kristallines Pulver, das vor Einsatz im Tier unter Argon in DMSO gelöst und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  konserviert wird. Vor intravenöser oder peroraler Applikation wird es auf Raumtemperatur erhitzt und mittels Aqua ad injektabile 1:10 verdünnt. Erst dann kommt es zur Anwendung am Tier.

#### 4.1.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Um einzelne Zelltypen *in vivo* visualisieren zu können, bedient man sich unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe. Sie haben die besondere Eigenschaft, Licht nicht nur zu absorbieren, sondern einen Teil des absorbierten Lichts auch wieder als Fluoreszenz zu emittieren (siehe Bild 21 und Bild 20).

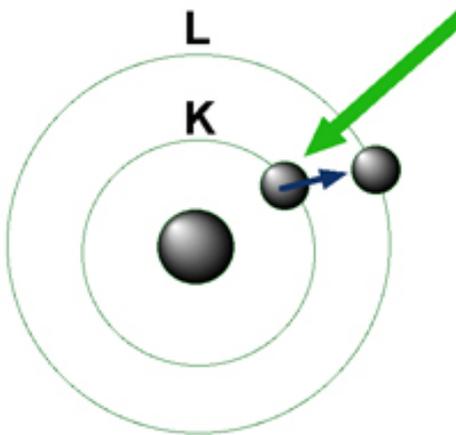


Bild 20 Anregung eines Atoms und Anhebung auf ein energiereicheres Niveau durch Absorption von Licht

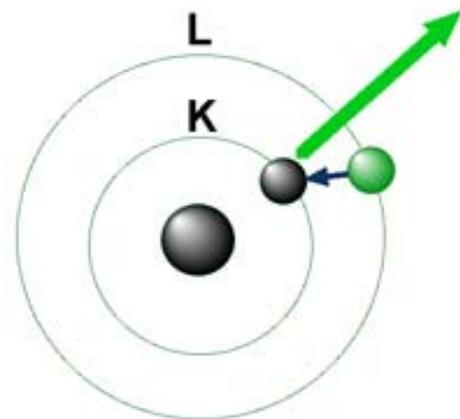


Bild 21 Beim Zurückfallen eines Atoms auf ein energieärmeres Niveau wird Emissionslicht ausgesendet

Als Fluoreszenz bezeichnet man Leuchterscheinungen, die auf der spontanen Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie beruhen <sup>12</sup>. Dabei kommt es während der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (=Anregungslicht) zur gleichzeitigen Emission von Licht mit größerer Wellenlänge (so genannte Stokes-Regel) <sup>12</sup>.

Durch die Anregung mit einer Lichtquelle wird der Fluoreszenzfarbstoff in ein energiereicheres elektronisches Niveau gehoben. Da er sich hier allerdings nicht halten kann, fällt er praktisch augenblicklich auf das ursprüngliche Energieniveau zurück. Dabei wird die Energie, die er kurz zuvor aufgenommen hat wieder frei. Ein Teil davon wird als Fluoreszenzlicht abgegeben. Weil die Energie aber nicht vollständig als Licht freigesetzt wird, ist das Emissionslicht etwas energieärmer als das Anregungslicht. Somit hat es auch eine größere Wellenlänge und dadurch eine andere Lichtfarbe als die energiereichere Lichtstrahlung der Lichtquelle <sup>12</sup>.

Fluoreszenzfarbstoffe werden abhängig von Filterausstattung und Fragestellung der Versuche ausgewählt. Dabei differenziert man zwischen *in* und *ex vivo* Färbung der Zellen. Man sollte beachten, dass die gefärbten Moleküle bei Belichtung leicht ausbleichen und daher die Belichtungszeiten möglichst kurz gehalten werden sollen.

#### 5(6)-CFDA

Das Xanthen-Derivat 5(6)-Carboxyfluorescein Diazetat (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) mit der Summenformel  $C_{29}H_{19}NO_{11}$  ist ein wichtiger Fluoreszenzmarker für die Darstellung verschiedener Zelltypen *in vivo* (siehe Bild 22). Er ist lipophil und somit membrangängig und kann passiv in die Zellen diffundieren. Das Reagenz selbst ist farblos und nicht fluoreszierend. In den Zellen wird CFDA durch intrazelluläre Esterasen zu Carboxyfluorescein deacetyliert und beginnt hellgrün zu fluoreszieren. Der Farbstoff muss also erst in der Zelle in den eigentlichen Fluorophor umgewandelt werden. Dadurch kommt es zu einer Langzeit-Markierung von Zellen. Die Fluoreszenzmarkierung mit CFDA bleibt dabei auch bei der Fixierung mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd stabil <sup>49</sup>.

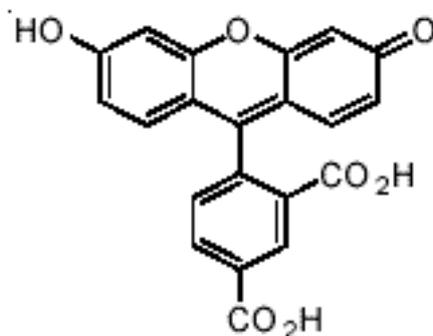


Bild 22 Chemische Struktur von 5-Carboxyfluorescein <sup>5</sup>

Das Absorptionsmaximum des Anregungsspektrums für den Farbstoff liegt bei einer Wellenlänge von 514nm, das Maximum der Emission dagegen bei einer Wellenlänge von 532nm (siehe Bild 23).

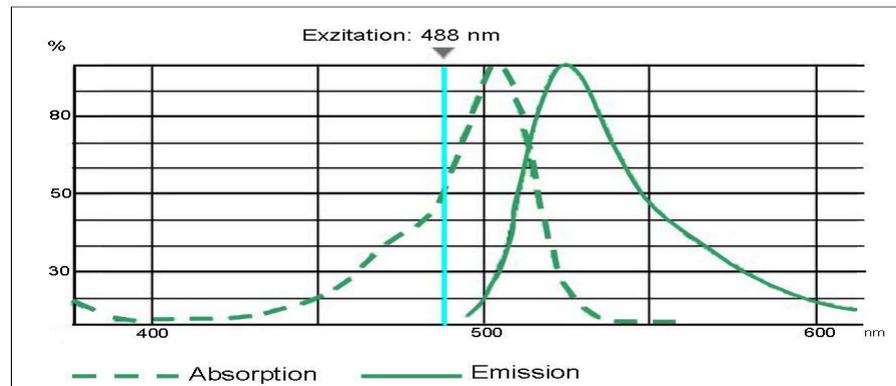


Bild 23 Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren von 5-Carboxyfluorescein modifiziert nach <sup>4</sup>

### Rhodamin 6G

Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) dient der *in vivo* Färbung von Leukozyten <sup>50</sup>. Er wird bei der Intravitalmikroskopie zur Darstellung der weißen Blutkörperchen im Gefäßsystem unter hohen Flussgeschwindigkeiten genutzt <sup>51</sup>. Nach intravenöser Applikation ist er in der Lage im Zellkern und den Mitochondrien von lebenden Zellen selektiv zu akkumulieren <sup>52</sup>. Es kommt zu einer Anfärbung praktisch aller Granulozyten und Monozyten über einen Zeitraum von etwa 60 Minuten <sup>51</sup>. Dazu werden 0,1ml des Farbstoffes in einer Konzentration von 0,02 g/dl verabreicht. Bei den intravitalmikroskopischen Aufnahmen, sollte man möglichst kurze Belichtungszeiten einhalten <sup>53</sup>.

Zur Anregung von Rhodamin 6G ist eine Wellenlänge von 528nm erforderlich. Die Emissionswellenlänge liegt bei 590nm.

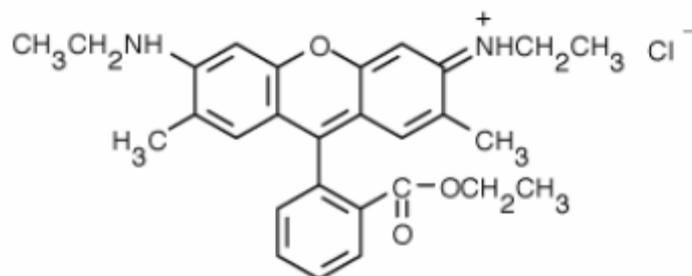


Bild 24 Struktur von Rhodamin 6G

#### **4.1.5 Puffer**

##### PBS-Puffer

Der Name dieser Pufferlösung stammt aus dem Englischen und ist die Abkürzung von *Phosphate Buffered Saline*. PBS-Puffer ist isotonisch, gut verträglich für Zellen und hat als salzhaltige Lösung die Eigenschaft eines Puffers. Daher wird er sehr vielfältig verwendet, unter anderem um Organe oder Zellen kurzzeitig zur weiteren Verarbeitung aufzubewahren.

##### Tyrodes-Puffer

Den Tyrodes-Puffer verwendet man bei der Isolierung von Thrombozyten oder allgemein beim Umgang mit Blutbestandteilen. Er ermöglicht das Arbeiten bei einem konstanten pH-Wert und wird für jede Anwendung frisch hergestellt. Dabei sollte er mindestens auf Raumtemperatur gehalten werden um die Blutzellen möglichst wenig in ihrer Funktion zu beeinflussen.

Für die Herstellung von 100ml Puffer wiegt man zunächst von den beiden Trockensubstanzen D(+)-Glucose (0,1%, SIGMA, Taufkirchen) und bovines Serumalbumin (0,1%, SIGMA, Taufkirchen) mittels geeichter Waage je 0,1mg in ein Becherglas ab. Nach Zugabe von 90ml Aqua bidest und 1ml HEPES (Fa. Invitrogen), werden noch 10ml einer vorbereiteten Tyrodes-10x-Lösung zugegeben. Zur Herstellung dieser Lösung werden auf 1000ml Aqua bidest, 80g NaCl (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt), 10,15g NaHCO<sub>3</sub> (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt) und 1,95g KCl (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt) gegeben. Da die Tyrodes-10x-Lösung über längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden kann, erleichtert sie so das Zubereiten des Tyrodes-Puffers. Die Flüssigkeiten werden nun durchmischt und mittels 2mM HCL und NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 geeicht. Dann werden ca. 50ml des Puffers in ein zweites Becherglas gegeben und dieser dann nochmals auf einen pH-Wert von 6,5 geeicht. Die beiden Puffer können nun sofort für die Thrombozytenpräparation verwendet werden.

## **4.2 Tiermodell**

Ziel der Arbeit ist es anhand zweier unterschiedliche Modelle Mechanismen bei der Entstehung der Atherosklerose und der arteriellen Thrombose mit darauf folgender Neointimaformation darzustellen und zu untersuchen. Die einzelnen Modelle werden später im Detail erklärt.

### **4.2.1 Verwendete Versuchstiere**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Maus als Versuchstier verwendet, da sie durch schnelle Generationszeiten, problemlose Aufzucht, leichtes Handling und kostengünstige Haltung besonders gut geeignet ist<sup>22</sup>. Außerdem prädestiniert die geringe Größe diese Tierart besonders für intravitalmikroskopische Untersuchungen.

Auch stehen für spezielle Fragestellungen diverse transgene Stämme zur Verfügung um verschiedene molekulare Mechanismen zu erforschen.

Für die einzelnen Versuche wurden folgende Mäusestämme verwendet:

- C57Bl6/J (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld)
- Sphk1<sup>-/-</sup> (generiert durch <sup>54</sup>)
- ApoE<sup>-/-</sup> (Jackson Laboratory)
- Sphk1<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup>

Da alle verwendeten Mäusestämme auf einem C57BL/6J-Hintergrund basieren, wurde dieser Stamm als Kontrollgruppe verwendet. Die angestrebten Untersuchungen und Ergebnisse werden mit den von diesen Tieren ermittelten Daten verglichen.

Das vorliegende Versuchsvorhaben ist von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierschG in der Fassung vom 25.05 1998) genehmigt.

#### Haltung und Fütterung

Die in den Versuchen verwendeten Tiere wurden im Klinikum rechts der Isar im Zentrum für präklinische Forschung unter so genannten SPF-Bedingungen (spezifisch pathogenfrei) gehalten und gezüchtet.

Nach Stämmen getrennt, befinden sich die Tiere je nach Gewicht, in Gruppen von zwei bis sechs Tieren, in durchsichtigen, leicht reinig- und sterilisierbaren Makrolonkäfigen vom Typ II (360cm<sup>2</sup>, Fa. Ehret GmbH, Emmendingen). Dadurch ist gewährleistet, dass jedem Tier über 20g Körpergewicht mindestens 100cm<sup>2</sup> Fläche zur Verfügung stehen <sup>55</sup>. Als Einstreu wird entkeimtes, entstaubtes Weichholzgranulat (Tiereinstreu „Faser“, Fa. Altromin, Lage) verwendet. Dieses zeichnet sich besonders durch gute Saugfähigkeit und weiche Beschaffenheit aus. Zweimal wöchentlich erfolgt der Wechsel der Einstreu, um gesundheitsschädlicher Feuchtigkeit und Ammoniakbelastung vorzubeugen. Um den Spiel- und Nestbautrieb zu befriedigen und so das Wohlbefinden der Tiere zu steigern, werden sterilisierter Zellstoff und Kriechröhren aus Pappe angeboten. Um für die Mäuse ein gesundes Mikroklima in den Käfigen zu erhalten, empfiehlt die Gesellschaft für Versuchstierkunde ein komplexes Belüftungssystem, um eine konstante Temperatur von 20 bis 24° Celsius und gleich bleibende Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70 Prozent aufrechterhalten zu können <sup>55</sup>. Eine Beleuchtungsanlage garantiert einen für die nachtaktiven, stressanfälligen Tiere wichtigen, geregelten zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus, mit 50-100 Lux im Käfig während der Tagesphase. Zur Deckung des Wasser- und Futterbedarfs stehen sterilisiertes Leitungswasser und pelletiertes Alleinfutter für Mäuse (Nr. 1324 Ratte-/Maushaltungs-Diät, 10mm, vierkant, Fa. Altromin, Lage) ad libitum zur Verfügung.

## Zucht

Die sexuelle Reife tritt bei Mäusen sehr früh auf. Ab einem Alter von etwa 6 Wochen sind sie geschlechtsreif, ab 8 Wochen werden sie zur Zucht eingesetzt. Die Weibchen sind polyöstrisch, neigen aber zum Anöstrus wenn sie in Gruppen ohne Männchen gehalten werden. Die Einführung eines Männchens in solch eine Gruppe führt zur Synchronisation ihres Zyklus (Whitten-Effekt). Wird ein Weibchen innerhalb von 24 Stunden mit einem weiteren Männchen verpaart, kommt es zur Resorption der befruchteten Eizelle und die Trächtigkeit unterbleibt (Bruce-Effekt). Diese beiden Effekte werden durch Pheromone im Urin des Männchens ausgelöst. Bis zu 24 Stunden nach einer Verpaarung kann ein Vaginalpfropf in der Vagina nachgewiesen werden. Dies ist ein einfacher, aber nicht immer sicherer Nachweis einer Verpaarung. Nach einer Tragzeit von 19 bis 21 Tagen werden die Jungen nackt und blind geboren. Frühestens drei Wochen nach der Geburt werden sie von der Mutter abgesetzt. Verschiedene Zuchtssysteme können genutzt werden. Eine Möglichkeit ist, dass das Männchen ständig bei dem oder den Weibchen bleibt. Dann kann es zu einer Postpartum-Verpaarung kommen, und das Muttertier hat drei Wochen nach der ersten Geburt ihren zweiten Wurf. Die zuerst geborenen Jungtiere müssen vor der zweiten Geburt von der Mutter getrennt werden. Die andere Variante ist, dass das Männchen für 3 bis 4 Tage zu dem oder den Weibchen gesetzt und dann wieder getrennt wird. Dabei unterscheidet man zwischen monogamer (ein Männchen und ein Weibchen) und polygamer (ein Männchen und mehrere Weibchen) Verpaarung<sup>56</sup>.

## Kontrollstämme

### C57Bl6/J:

Dieser Wildtypstamm ist ein weit verbreiteter Inzuchtstamm, der gerne für Experimente verwendet wird. Er zeichnet sich besonders aus durch eine rasche, problemlose Aufzucht, die mittels polygamer Verpaarung erzielt wird. Er wurde ursprünglich von Dr. C.C. Little generiert und dient unter anderem als Hintergrundstamm für die Erzeugung kongener, und zur Generierung transgener Mäuse. Die C57Bl6/J-Mäuse finden vielfältig Verwendung auf vielen Forschungsgebieten wie zum Beispiel der kardiovaskulären Biologie, der Reproduktions- und Neurobiologie oder der Diabetes- und genetischen Forschung.

Für die eigene Zucht wurden kommerziell erworbene Geschwisterzuchtpaare (Fa. Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld) als genetischer Ursprung verwendet.

## Gendefiziente und transgene Mauslinien

### Sphk1<sup>-/-</sup>:

Um die Rolle von thrombozytärem S1P und der Sphingosinkinase 1 bei der Atherosklerose, der Entstehung einer arteriellen Thrombose und bei der Neointimaformation nach Verletzung des Endothels beurteilen zu können, wurde mit Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen (generiert durch <sup>54</sup>) gearbeitet. Dieser Stamm ist charakterisiert durch das Fehlen der Sphingosinkinase 1 in allen Zellen. Neuere Studien zeigen, dass diese Tiere einen signifikant erniedrigten S1P-Plasmaspiegel besitzen <sup>42</sup>. Als Kontrollgruppe wurde der Sphk1<sup>-/-</sup>-Stamm mit C57Bl6/J-Tieren zurückgekreuzt und die Sphk1<sup>+/+</sup>-Tiere zur weiteren Zucht erneut verpaart.

### ApoE<sup>-/-</sup>:

Der ApoE<sup>-/-</sup>-Stamm (C57Bl6/J-ApoE<sup>tm1Unc</sup>, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) stellt ein gut charakterisiertes Modell für die manifeste Atherosklerose dar. Den Mäusen fehlt das Apolipoprotein E, ein Glycoprotein, welches die Bindung von VLDL und Chylomikronen an LDL-Rezeptoren vermittelt. Nur so können diese Stoffe von der Leber aufgenommen werden. Bei fehlendem ApoE kommt es zu einer fünfmal höheren Konzentration von cholesterolreichen Stoffen im Blut. Unterstützt durch eine cholesterinreichen Diät (Harlan Research diets), entwickeln ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse sehr schnell spontane atherosklerotische Läsionen. Mit Hilfe dieses Mäusestammes erhält man die Möglichkeit, die Dynamik von Zell-Gefäßwand-Interaktionen während der Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose direkt zu untersuchen <sup>24</sup>.

### ApoE<sup>-/-</sup> Sphk1<sup>-/-</sup> Doppelknockouts:

Zur Beurteilung der Rolle von S1P und der Sphingosinkinase 1 bei der Entstehung von Atherosklerose wurde ein Sphk1<sup>-/-</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>-Doppelknockout-Stamm generiert. Dazu wurde der oben beschriebene Sphk1<sup>-/-</sup> Stamm mit dem ApoE<sup>-/-</sup> Stamm gekreuzt. In der ersten Generation entstehen dabei doppelt heterozygote Tiere, die wiederum miteinander verpaart werden. Nun erhält man mit einer 25-prozentigen Wahrscheinlichkeit (nach Mendel) homozygote Doppelknockout-Mäuse, die mittels Genotypisierung selektiert und für die weitere Zucht verwendet werden. Die zu entstehenden homozygoten Sphk1<sup>+/+</sup> ApoE<sup>+/+</sup>-Tiere wurden als Kontrollgruppe weiter gezüchtet.

#### **4.2.2 Prämedikation**

In einigen Versuchsprotokollen ist eine Vorbehandlung der Mäuse mit verschiedenen S1P-Rezeptoragonisten vorgesehen. Dabei wird unterschieden zwischen einmaliger intraperitonealer Verabreichung, und einer peroralen Dauermedikation über mehrere Tage bis Wochen.

Zum intraperitonealen Applikation wird sechs Stunden präoperativ eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich) durchgeführt. Bei ausreichender Narkosetiefe wird der Wirkstoff mittels einer Kanüle durch vorsichtiges Einstechen paramedian, im rechten caudalen Quadranten des Abdomens, in die Bauchhöhle verabreicht. Nach Abfluten des Inhalationsgases wachen die Tiere rasch aus der Narkose auf.

Bei der Dauermedikation über mehrere Tage wird das Mittel alle drei Tage über eine Magensonde verabreicht. Dazu wird die Maus an Nacken und Schwanzansatz gut fixiert, die Sonde über das Maul vorsichtig in den Ösophagus vorgeschoben und der Wirkstoff verabreicht.

#### **4.2.3 Wahl und Durchführung der Narkose**

Für die Gewebeentnahme im Rahmen der Genotypisierung der Tiere, für die intraperitoneale Verabreichung von Medikamenten und im Rahmen der Blutentnahme durch Herzpunktion (Finalversuch) wird eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich) durchgeführt.

Bei den operativen Eingriffen im Rahmen der verschiedenen Versuchsmodelle, wird die Narkose zunächst durch Inhalationsanästhesie eingeleitet, und anschließend durch Injektionsnarkose fortgesetzt.

##### Inhalationsnarkose

Die Inhalationsanästhesie erfolgt mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich) und Sauerstoff über einen Verdampfer (Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen, eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen). Durch das schnelle An- und Abfluten des Narkosegases ist die Inhalationsanästhesie besonders für kurz dauernde Eingriffe gut geeignet. Die schwache analgetische Wirkung von Isofluran reicht um leichte Schmerzen auszuschalten, so dass auf ein zusätzliches Analgetikum verzichtet werden kann.

##### Injektionsnarkose

Zur Durchführung von Operationen wird die Narkose zunächst wie oben beschrieben mittels Inhalation eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches eingeleitet. Damit das chirurgische Toleranzstadium (Stadium III<sub>2</sub>) erreicht werden kann, wird dann am schlafenden Tier eine Injektionsnarkose durchgeführt.

Eine Narkose lässt sich beschreiben als ein medikamentös ausgelöster, dynamischer, reversibler Zustand eines Menschen oder Tieres, in dem operative Stimuli bei psychischer Dämpfung (Sedation) und Bewusstseinsverlust (Hypnose) ohne Schmerzempfindung (Analgesie) und ohne vegetative oder muskuläre Abwehrreaktionen (Muskelrelaxation) ertragen werden. Das Ziel einer Narkose besteht darin, durch Zufuhr von Substanzen mit möglichst geringer Toxizität, bestmögliche Operationsbedingungen und eine optimale Stabilisierung des Patienten zu erreichen. Dies kann nur durch eine Kombination mehrerer Narkotika mit einem Muskelrelaxans erfüllt werden. Man spricht von einer so genannten Kombinationsnarkose, bei der die Einzeldosierung der Wirkstoffe deutlich reduziert werden kann, und so unerwünschte Nebenwirkungen minimiert werden<sup>57</sup>.

Fentanyl ist ein stark wirkender Opiatagonist, mit guter analgetischer und leicht atemdepressiver Wirkung. Es ergänzt sich gut mit dem sedativ-hypnotisch-analgetischen  $\alpha$ 2-Adrenorezeptoragonist Medetomidin, welcher aufgrund seiner Nebenwirkungen (ausgeprägte Bradykardie und Begünstigung von Herzarrhythmien) nur in möglichst geringen Dosierungen eingesetzt werden soll. Zur Muskelrelaxation und Krampfhemmung dient das leider auch atemdepressiv wirkende Benzodiazepin Midazolam.

Die Kombination der genannten drei Wirkstoffe erfüllt die Voraussetzung für eine den Anforderungen entsprechende, komplikationsarme Narkose. Dazu wird nach kurzer Inhalationsanästhesie, eine Mischung von 5,0 mg/kg Midazolam (Midazolam-ratiopharm<sup>®</sup>, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), 0,5 mg/kg Medetomidin (Dormitor<sup>®</sup>, Pfizer GmbH, Karlsruhe) und 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Curamed<sup>®</sup>, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) intraperitoneal verabreicht, und so die Narkose vertieft und aufrechterhalten<sup>58</sup>.

Während der Narkose wird in regelmäßigen Abständen Puls- und Atemfrequenz, Atemtyp und Körpertemperatur überwacht. Zur Feststellung der Narkosetiefe überprüft man das Fehlen des Flexorreflexes. Weitere Narkosesicherheit ist gewährleistet, durch die permanente Zufuhr von Sauerstoff über eine Narkosemaske und die Verwendung einer Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner) zur Vermeidung von Hypothermien. Bei Bedarf kann dem Sauerstoff jederzeit Isofluran zugemischt werden.

In der Regel dauert ein operativer Eingriff in allen Versuchsgruppen circa 1,5 bis 2 Stunden. Danach wird das Tier in tiefer Narkose durch Blutentzug getötet.

Bei der Durchführung der chronischen Versuche zur Neointimaformation, bei denen die Tiere nach 7, 14, 21 oder 28 Tagen erneut untersucht werden, kann die oben genannte Tripelnarkose vollständig antagonisiert werden. Dazu wird nach erfolgtem operativen Eingriff und ordnungsgemäßem Wundverschluss, eine Mischung aus 1,2 mg/kg Naloxon (Narvanti<sup>®</sup>-Vet, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), 0,5 mg/kg Flumazenil (Anexate<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) und 2,5 mg/kg Atipamezol (Antisedan<sup>®</sup>, Pfizer GmbH, Karlsruhe) subkutan appliziert<sup>58</sup>. Der Opioidrezeptorantagonist Naloxon überwindet sehr schnell die Blut-Hirn-Schranke und

führt zu einem raschen Wirkungseintritt. Flumazenil bewirkt als hochspezifischer Antagonist für Benzodiazepine eine Verdrängung dieser von ihren Rezeptoren im ZNS. Atipamezol dagegen bindet spezifisch an zentrale und periphere  $\alpha_2$ -Rezeptoren und verhindert so die Bindung und Wirkung von Medetomidin. Auch die negativen Begleiterscheinungen der Tripelnarkose wie etwa Hypotonie, Bradykardie und AV-Block werden bei der Antagonisierung beseitigt. Durch einen atemstimulierenden Effekt wird die arterielle Sauerstoffsättigung gesteigert und die durch Medetomidin oft auftretende Hypothermie verschwindet. 7, 14, 21 oder 28 Tage nach diesem Eingriff erfolgt eine intravitalmikroskopische Untersuchung unter erneuter Inhalations- und Injektionsnarkose. Nach Beendigung des Eingriffs werden die Tiere in tiefer Narkose mittels Blutentzug getötet<sup>59, 60</sup>.

*Tabelle 3 Dosierung der vollständig antagonisierbaren Anästhesie (VAA) bei der Maus (Anästhesievorschlag modifiziert nach Henke Julia, Erhardt Wolf, TU München 2003)*

Injektionsnarkotikum	Dosierung	Antagonist	Dosierung
Medetomidin	0,5 mg/kg i.p.	Atipamezol	2,5 mg/kg s.c.
Midazolam	5 mg/kg i.p.	Flumazenil	0,5 mg/kg s.c.
Fentanyl	0,05 mg/kg i.p.	Naloxon	1,2 mg /kg s.c.

#### 4.2.4 Operationstechniken

Obwohl sich durch *in vitro* Versuchen viele molekulare und zelluläre Funktionen und Mechanismen gut darstellen lassen, kommt es nicht selten vor, dass *in vitro* gewonnene Ergebnisse nicht mit den tatsächlichen Begebenheiten *in vivo* übereinstimmen. Sowohl hämodynamische, als auch lokale zelluläre und molekulare Interaktionen während zahlreicher Prozesse im lebenden Organismus, lassen sich *in vitro* nicht immer ausreichend simulieren. Daher scheint es notwendig, entsprechende Versuchsergebnisse *in vivo* nachzuvollziehen. Dazu wurden zahlreiche Tiermodelle entwickelt<sup>22</sup>. Das ideale Tiermodell sollte bereits verfügbar, nicht zu teuer in der Anschaffung und Erhaltung und leicht zu handhaben sein. Weiterhin sollte es möglichst genau die pathophysiologischen Vorgänge im Menschen reproduzierbar imitieren<sup>34</sup>.

Zur Durchführung der operativen Eingriffe wird die oben (siehe 4.2.3) beschriebene Narkose angewendet. Um ein Austrocknen der Cornea zu verhindern werden die Augen mit Bepanthen-Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) geschützt. Nach dem Wiegen des Tieres, und der Überprüfung der Narkosetiefe mittels Zwischenzehenreflex, wird es in Rückenlage, mit der Nase in der Narkosemaske, auf einer Wärmematte positioniert. Zur Fixierung verwendet man

Klebeband (Transpore™, 3M Health Care, Neuss). Die Enthaarung der Operationsstelle mit Enthaarungscreme (Pilca® extra soft, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Brühl) ermöglicht eine gewissenhafte Desinfektion und Entfettung der Haut mit Alkohol (Cutasept®F, Fa. Bode Chemie, Hamburg). Die Manipulation der Maus und Präparation des OP-Bereichs erfolgt unter einem Stereomikroskop (Stemi-2000-C, Fa. Zeiss, Göttingen) unter Zuhilfenahme einer Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Fa. Zeiss, Göttingen) zur besseren Ausleuchtung des Operationsfeldes. Während des gesamten Eingriffs wird sehr behutsam vorgegangen, um eine Traumatisierung des Gewebes und Blutungen zu vermeiden. Besonders bei der Durchführung der chronischen Versuche, bei denen die Tiere nach der Untersuchung wieder aufwachen sollen, wird darauf geachtet, dass der Hautschnitt möglichst klein, und die Präparation so schonend wie möglich vorgenommen werden.

#### Venöser Zugang über die rechte Vena jugularis

Fluoreszenzfarbstoffe oder gefärbte Zellen werden dem Empfängertier über einen venösen Zugang appliziert. Dazu eignet sich bei der Maus die Vena jugularis. Zunächst, wird nach medianem Hautschnitt in der Halsregion vom Kinnwinkel (Ramus mandibularis) bis zum Sternum, die rechte Speicheldrüse (Glandula mandibularis) dargestellt und vorsichtig nach kranial vorgelagert. Die Vena jugularis kommt zum Vorschein. Möglichst nah am Kinnwinkel wird diese mit einem Faden (Prolene® Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) ligiert und der Faden mit einer Moskitoklemme fixiert. Durch Spannung des Fadens wird die Jugularvene gestreckt, dadurch der Blutfluss minimiert, und die weitere Manipulation erleichtert. Der Polyethylene-Katheter (Katheterschlauch Portex®, Polythene Tubing, 0,28mm ID, Smiths Medical, Keene, NH, USA) wird durch eine kleine Inzision der Vena jugularis eingeführt und mittels Ligatur befestigt. Anschließend wird die korrekte Lage des Katheters, durch die Spülung mit isotoner Natriumchloridlösung (Isotone Kochsalzlösung, Delta Pharm GmbH, Pfullingen) überprüft, und ein Herausrutschen des Katheters durch weitere Fixierung mittels Klebeband verhindert.

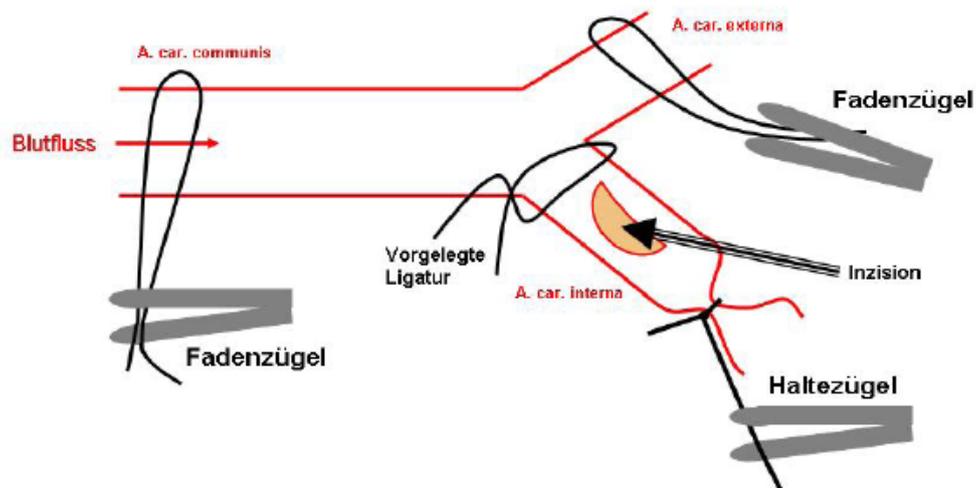
#### Darstellung der Arteria carotis communis dexter und sinistra

Zu Darstellung der rechten und linken Arteria carotis communis für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie, erfolgt zunächst, ähnlich wie oben beschrieben (siehe 0), ein medianer Hautschnitt in der Halsregion vom Kinnwinkel (Ramus mandibularis) bis zum Sternum, und die Vorlagerung der beiden Speicheldrüsen (Glandula mandibularis) nach kranial. Um die beiden Carotiden zu finden, präpariert man nun vorsichtig beidseits der Trachea in die Tiefe. Parallel zu den großen Arterien verläuft der Nervus vagus, der äußerst behutsam von den Gefäßen separiert wird. Nun kann ein schwarzes, flexibles Plastikstück unter die Carotiden gelegt werden. Die Arterien treten dadurch aus der Tiefe hervor und sind für die intravitalemikroskopischen Aufnahmen besser zugänglich. Gleichzeitig verbessert die Unterlage die Kontrastierung bei der mikroskopischen Aufnahme der Zell-Zell- und Zell-Gefäßwandinteraktionen.

## Denudation der Arteria carotis communis sinistra

Die endotheliale Denudation mittels Drahtmodell dient der Zerstörung der Endothelschicht im Gefäß. Es kommt zur Exposition von subendothelialer Matrix mit allen Folgen wie Thrombozytenadhäsion, -aggregation und Thrombusbildung bis hin zur Neointimaformation und Reendothelisierung. Die Denudation der Arteria carotis stellt ein Modell für arterielle Thrombose und Neointimaformation dar. In den verschiedenen experimentellen Gruppen wird die linke Arteria carotis communis denudiert. Die rechte Arterie bleibt unverletzt und dient als Kontrolle.

Um die Denudation durchführen zu können, wird die linke Arteria carotis communis, wie oben beschrieben, frei präpariert. Um das kaudale Ende und um die Arteria carotis externa wird jeweils ein Fadenzügel (Prolene<sup>®</sup> Polypropylen, 6-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) gelegt und an je einer Moskitoklemme befestigt. Bei Zug auf die Fadenzügel wird das Gefäß gespannt und eine temporäre Blutleere erzeugt. Die Arteria carotis interna wird möglichst weit kranial mit einem Faden (Prolene<sup>®</sup> Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) ligiert und dieser als Haltezügel genutzt. Ein weiterer Faden (Prolene<sup>®</sup> Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) wird möglichst nahe der Bifurkation um die Arteria carotis interna als Ligatur vorgelegt. Unter Blutleere wird ein Angioplastiedraht (Floppy<sup>®</sup> II Guide Wire 0,014'' (0,36mm), Guidant Corporation, Diegem, Belgien) über eine kleine Inzision der Arteria carotis interna circa 1 cm weit in das Lumen der Arteria carotis communis eingeführt. Je nach Versuchsgruppe wird durch ein-, zwei- oder dreimaliges vor- und zurückschieben des Drahtes eine unterschiedlich starke Verletzung der Gefäßwand erzielt. Nach Entfernung des Drahtes wird die vorgelegte Ligatur um die Arteria carotis interna verschlossen und der Zug auf die Moskitoklemmen gelöst. Der Blutstrom ist wiederhergestellt. Nun beginnt man mit den intravitalmikroskopischen Untersuchungen.



*Bild 25 Schematische Darstellung der Präparation der Arteria carotis zur Durchführung der endothelialen Denudation*

## Wundverschluss

Sollen die Tiere in den chronischen Versuchen nach der Untersuchung wieder aufwachen, erfolgt nach beendeter Untersuchung eine Hautnaht (Prolene<sup>®</sup> Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) und die postoperative Wundversorgung mit Betaisodona (Betaisodona<sup>®</sup> Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg). Die Wunde wird täglich kontrolliert und die Fäden nach 7 Tagen gezogen. Je nach Eingriff und Verfassung der Tiere erfolgt die analgetische Versorgung postoperativ durch die subkutane Injektion von 0,05-0,1ml/Maus (30g KM) Temgesic (Fa. Essex Pharma, München) über zwei bis drei Tage.

### 4.2.5 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie von Zellen im lebenden Organismus dient der Darstellung molekularer Mechanismen und Zell-Zell-Interaktionen an der verletzten Gefäßwand in Echtzeit. Damit die Zellen sichtbar werden, färbt man sie *in* oder *ex vivo* mit nicht-toxischen, gut verträglichen Fluoreszenzfarbstoffen und untersucht sie mittels Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop (Axiotech<sup>vario</sup> 100 HD, Fa. Zeiss, Göttingen oder Olympus BX51WI, Fa. Olympus, Hamburg). Eine Quecksilber-Kurzbogen-Höchstdrucklampe (Hg-Höchstdrucklampe, HBO 100W, Fa. Zeiss, Göttingen) die kurzwelliges Anregungslicht emittiert, dient als Lichtquelle, um die fluoreszenzmarkierten Zellen *in vivo* sichtbar zu machen. Die verwendeten Fluorophore in den gefärbten Zellen absorbieren das Anregungslicht, und strahlen es kurz darauf in einer 20 bis 50 nm größeren Wellenlänge als Emissionslicht wieder ab. Im Strahlengang des Mikroskops wird das Anregungslicht (kurzwellig) vom Emissionslicht (langwellig) getrennt.

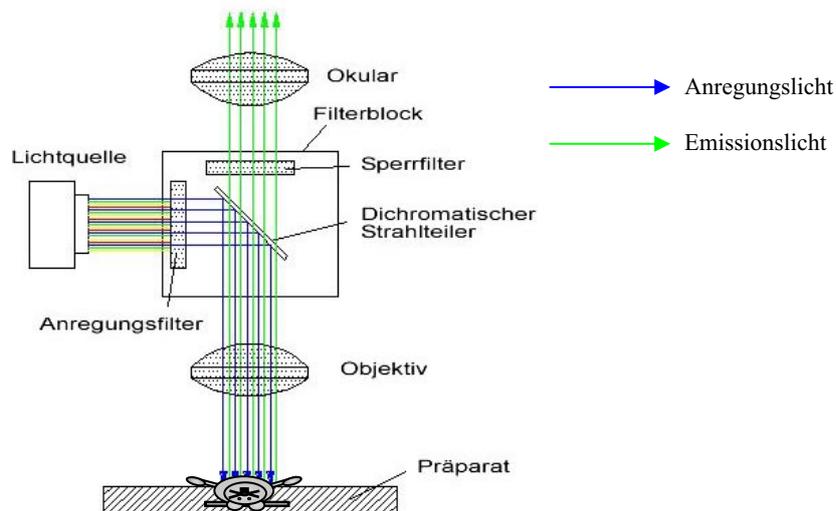
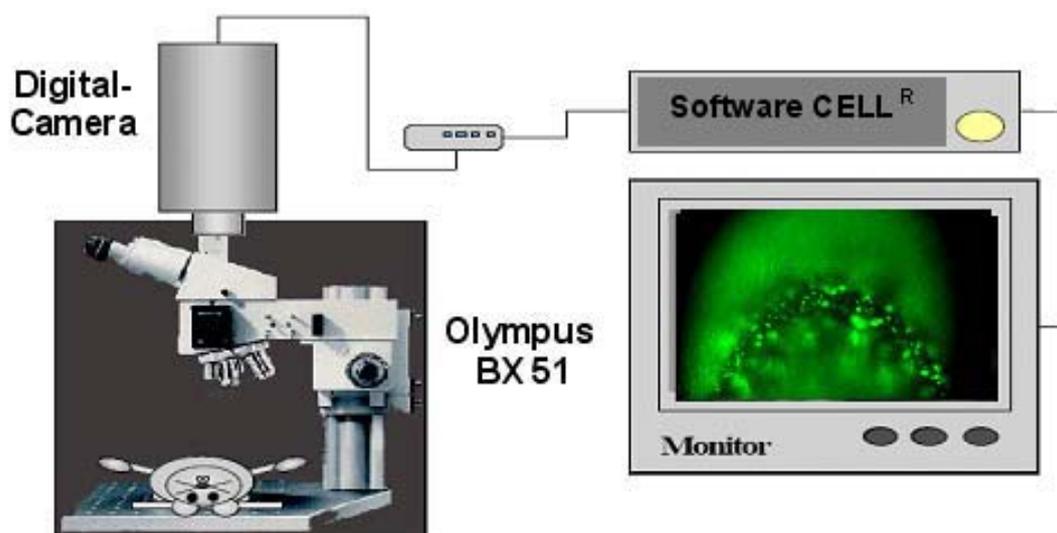


Bild 26 Prinzip des Strahlenganges bei der Auflichtmikroskopie. Das Licht wird durch den Anregungsfilter und den Strahlteiler auf das Objekt gelenkt. Die vom Objekt reflektierten Strahlen gelangen durch den Sperrfilter und können mit einer Kamera aufgenommen werden.

Im oben gezeigten Bild (Bild 26) ist die typische Strahlenführung in einem Auflichtmikroskop (Epifluoreszenzmikroskop) dargestellt. Die Lichtquelle emittiert kurzwelliges Licht, welches zusätzlich durch einen Anregungs- bzw. Exzitationsfilter geführt wird. Dieser hat die Eigenschaft, nur kurzwelliges Exzitationslicht (Anregungslicht) durchzulassen. Das Anregungslicht wird durch einen Strahlteiler (Farbteiler) auf das zu untersuchende Objekt und die gefärbten Zellen gelenkt. Es entsteht, aufgrund der Stokes-Verschiebung, das langwelligere Emissionslicht. Dieses von den Fluorophoren emittierte Licht, kann den Strahlteiler ungehindert passieren und trifft auf den Emissions- oder Sperrfilter. Hier werden die letzten Reste an störendem Anregungslicht zurückgehalten. Da das Strahlenspektrum der Lichtquelle mit den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen kompatibel sein muss, können im Mikroskop entsprechende Filterblöcke eingesetzt werden.

Arbeitseinheit für das Epifluoreszenzmikroskop Olympus BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg)

Es handelt sich hierbei um ein Epifluoreszenzmikroskop wie oben (siehe 4.2.5) beschrieben. Das Emissionslicht wird mittels der Realtime-Imaging-Station Cell<sup>R</sup> (Fa. Olympus, Hamburg) aufgezeichnet, auf den Computerbildschirm projiziert, und verarbeitet. Die wichtigsten Komponenten von Cell<sup>R</sup> sind ein „All-in-one“-Beleuchtungssystem MT20, eine besonders lichtempfindliche Digitalkamera und die hoch präzise arbeitende Hardwaresteuerung (siehe Bild 27).

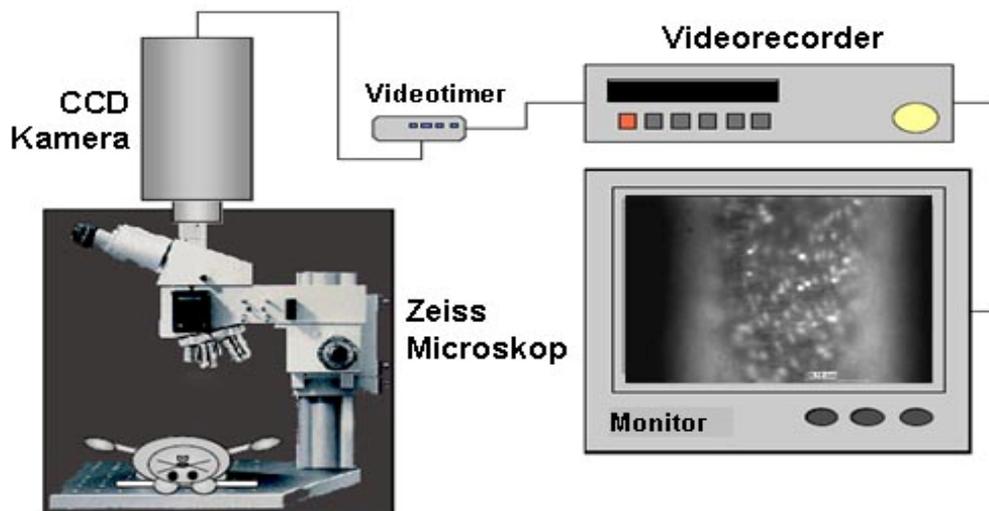


*Bild 27 Schematischer Aufbau der Arbeitseinheit zur intravitalem fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit dem Epifluoreszenzmikroskop Olympus BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg) und der Realtime-Image-Station Cell<sup>R</sup> (Fa. Olympus, Hamburg)*

Das zentrale Steuerungselement, der Realtime-Controller, kann unterschiedliche Hardwarekomponenten wie Lichtquelle, Kamera und Shutter mikrosekundengenau simultan regulieren und synchronisieren. Das grafische Bedienkonzept der Software, der Experiment-Manager, ermöglicht es, hoch komplexe Prozesse mit großer Leichtigkeit zu planen und mit besonderer Genauigkeit auszuführen <sup>61</sup>.

Arbeitseinheit für das Epifluoreszenzmikroskop Axiotech<sup>vario</sup> 100 HD (Fa. Zeiss, Göttingen)

Das Axiotech<sup>vario</sup> 100 HD ist ebenfalls ein Auflichtmikroskop. Vom Objekt emittierte Strahlen werden von einer CCD-Kamera (Charged Coupled Device Kamera) erfasst, auf einen Monitor projiziert, und mit einem Videorecorder in Echtzeit aufgezeichnet (siehe Bild 28).



*Bild 28 Schematischer Aufbau der Arbeitseinheit zur intravitalen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiotech<sup>vario</sup> 100 HD (Fa. Zeiss, Göttingen)*

### Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie

Mittels Videofluoreszenzmikroskopie können Zelladhäsion und -aggregation, vor und nach Gefäßverletzung in situ verfolgt werden.

In den durchgeführten Versuchen wird die Thrombozyten-, Leukozyten- und T17b-Zellrekrutierung im Rahmen der arteriellen Thrombose, der Atherosklerose und der Neointimaformation in der Arteria carotis communis der Maus untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Färbeverfahren der einzelnen Zellpopulationen greift man, entsprechend den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen, auf zwei verschiedene Intravitalmikroskope (Axiotech<sup>vario</sup> 100 HD, Fa. Zeiss, Göttingen; Olympus BX51WI, Fa. Olympus, Hamburg) mit kompatiblen Filtersätzen zurück. Mit dem Axiotech<sup>vario</sup> werden Übersichtsaufnahmen der Gefäße mit einer 100fachen (Objektiv 10x0,25; Carl

Zeiss MicroImaging, Inc.) Vergrößerung gemacht. Anschließend wird für die Untersuchung der zellulären Mechanismen, die 200fache (Wasserimmersionsobjektiv, W 20x0,5; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) Vergrößerung genutzt. Die Aufnahmen mit dem Olympus BX51WI erfolgen immer mit der 200fachen Vergrößerung (Wasserimmersionsobjektiv, XLUMPlanFI 20x/0,95W, Fa. Olympus, Hamburg).

#### **4.2.6 Färbeprotokolle *ex vivo***

##### Thrombozytenpräparation und Färbung mit 5(6)-CFDA

Für die Thrombozytenpräparation wird zunächst Vollblut einer syngenen Spendermaus mittels Herzpunktion gewonnen (Finalversuch). Dazu wird eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich) (Verdampfer Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickemeyer, Tuttlingen eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) und Sauerstoff durchgeführt. Die Maus befindet sich bei der Punktion in Rückenlage. Die Kanüle wird im dem Bereich, in dem der Herzspitzenstoß am besten fühlbar ist, senkrecht zur Körperoberfläche eingestochen. Dabei kann eine ausreichend große Menge an Blut von circa 1,5 bis 2,0 ml Blut pro Maus entnommen werden. Das gewonnene Blut wird mit 100µl/ml Citrat (aus S-Monovetten, Sarstedt AG&Co., Nümbrecht) ungerinnbar gemacht. Da die Herzpunktion mit dem Risiko sehr schmerzhafter Komplikationen wie Pneumothorax oder Herzbeutelamponade verbunden ist, empfiehlt Svendsen diese nur bei terminalen Experimenten einzusetzen<sup>55</sup>.

Bei der weiteren Verarbeitung des Blutes muss unbedingt darauf geachtet werden, sorgfältig und schonend mit dem Blut umzugehen, da die Gefahr besteht, die Thrombozyten zu aktivieren und damit die Versuchsergebnisse zu verfälschen. Wichtig dabei ist, dass man Flüssigkeiten langsam an der Oberfläche der verwendeten Gefäße abfließen lässt, vorsichtig miteinander vermengt, und darauf achtet, bei physiologischer Temperatur (37°C) zu arbeiten. Dazu werden frisch angesetzte Substanzen und beheizbare Zentrifugen verwendet. Durch frühere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das hier verwendete Protokoll der Thrombozytenseparation und 5(6)-CFDA -Färbung zu keiner relevanten Thrombozytenaktivierung führt<sup>17, 50, 62</sup>.

Nach der intrakardialen Blutgewinnung, wird das Vollblut in einem Röhrchen mit Tyrodes-Puffer pH 6,5 auf 2ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieses Gemisch wird für 20 Minuten bei 92g ohne Bremse zentrifugiert (Haereus, Megafuge, Hanau). Der dabei entstehende Überstand wird als plättchenreiches Plasma (PRP) bezeichnet. Er wird vorsichtig abpipettiert und mit Tyrodes-Puffer pH 6,5 auf 4ml Gesamtvolumen verdünnt. Nun werden 20µl des oben beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffes 5(6)-CFDA (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) zugegeben und das Gemisch für 2 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert. Die darauf folgende erneute Zentrifugation erfolgt für 10 Minuten bei 1277g mit Bremse. Danach befindet sich am Boden des Röhrchens ein Thrombozytenpellet, welches nach Abgießen des Überstandes, mit jeweils 250µl

Tyrodes-Puffer pH 6,5 und pH 7,4 vermischt wird. Da die gefärbten Thrombozyten ausbleichen können, müssen sie mittels braunen Eppendorf-Gefäßes vor Lichteinstrahlung geschützt werden.

Um die genaue Thrombozytenzahl der hergestellten Zellsuspension zu ermitteln wird ein Zellzählgerät verwendet (Sysmex Microcellcounter XE-2100, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt).

Damit schließlich jedes Versuchstier genau gleiche Flüssigkeitsmengen mit der gleichen Anzahl von Thrombozyten erhält, wird als letzter Schritt die Thrombozytenzahl mit Tyrodes-Puffer pH 6,5 auf eine Konzentration von  $150 \times 10^3$  Blutplättchen pro  $\mu\text{l}$  Flüssigkeit eingestellt. Die Empfängertiere erhalten alle genau  $250\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension über einen Venenkatheter. Dadurch erhält jedes der Tiere eine Gesamt-Thrombozytenzahl von  $37,5 \times 10^6$  Zellen in einem Gesamtvolumen von  $250\mu\text{l}$ .

Die mittlere Überlebenszeit der gefärbten Thrombozyten in der Maus beträgt circa 3 Tage. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Farbstoff 5(6)-CFDA in vivo nicht auf andere ungefärbte Zellen überträgt. Die Thrombozyten zeigen äquivalente Funktionen zu nativen Blutplättchen mit normaler Lebensdauer<sup>62</sup>.

#### T17b-Zell-Präparation und Färbung mit 5(6)-CFDA

In der vorliegenden Studie werden in den Versuchen murine embryonale endotheliale Progenitorzellen der Linie T17b verwendet. Die Zellen werden auf 0,1% gelatinebeschichteten Platten kultiviert<sup>39</sup>. Das Kulturmedium besteht aus DMEM mit 20% hitze-inaktiviertem FBS, 0,1 mmol/L  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mmol/L nicht essentiellen Aminosäuren, 100 U/mL Penicillin, 100  $\mu\text{g/mL}$  Streptomycin und 2 mmol/L L-Glutamin<sup>27</sup>.

Für die Versuche werden die T17b-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mittels Citrat Saline vom Medium gelöst. Die abgelösten Zellen werden in PBS aufgenommen und für drei Minuten bei 400rpm zentrifugiert (Haereus, Megafuge, Hanau). Der entstehende Überstand wird abgenommen und erneut für drei Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Dieses mal wird der Überstand verworfen, und das Pellet in DCF-PBS-Lösung (1:200) resuspendiert und für fünf Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich werden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen, abzentrifugiert (drei Minuten bei 1200rpm) und in PBS resuspendiert. Danach erfolgen die Feststellung der Zellzahl/ml mittels Neubauer-Zählkammer, und die Einstellung auf eine Endkonzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/  $500\mu\text{l}$  PBS. Diese Lösung wird dann zur intravitalmikroskopischen Untersuchung über den Venenkatheter sehr langsam intravenös appliziert.

#### 4.2.7 Färbeprotokolle *in vivo*

Um die Leukozytenrekrutierung und -interaktionen *in vivo* darstellen zu können verwendet man den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G. Er akkumuliert im Zellkern und den Mitochondrien von lebenden Zellen selektiv und färbt insbesondere Granulozyten und Monozyten über einen Zeitraum von circa 60 Minuten (siehe Bild 29)

51

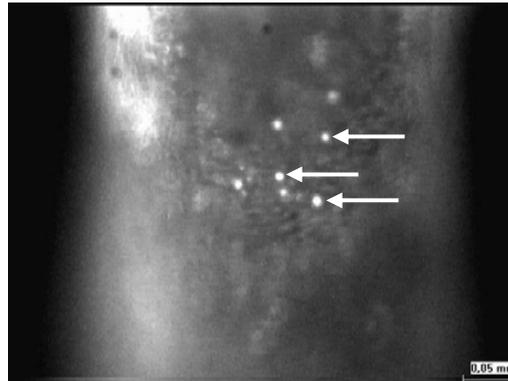


Bild 29 Beispiel einer intravitalmikroskopischen Aufnahme der Arteria carotis communis mit dem Auflichtmikroskop Axiotech<sup>vario</sup> (Fa. Zeiss, Göttingen); die Pfeile zeigen auf adhärenz-fähige, mit Rhodamin 6G angefarbte Leukozyten

Um den Farbstoff verabreichen zu können, wird zunächst ein intravenöser Venenkatheter in der Vena jugularis platziert (siehe 4.2.4). Unmittelbar vor Beginn der Aufzeichnung werden 0,1ml des Fluorophors in einer Konzentration von 0,02 g/dl über den Katheter verabreicht. Die Anfärbung der Zellen erfolgt innerhalb weniger Sekunden. Bei länger andauernden Aufnahmezeiträumen verblasst die Leuchtkraft der gefärbten Zellen mit der Zeit, und eine erneute Gabe des Farbstoffs wird nötig.

#### 4.2.8 Organentnahme (Carotiden, Aortenbogen)

Nachdem die intravitalmikroskopische Untersuchung beendet ist, wird das Tier durch Ausbluten in Narkose getötet. Da verbleibende Blutreste in den Gefäßen die Auswertung erschweren oder verfälschen können, wird das Gefäßsystem nun über den Venenkatheter vorsichtig mit PBS gespült. Die einzelnen Organe werden entsprechend der Fragestellung (Atheroprogression bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen oder Neointimaformation nach endothelialer Gefäßverletzung) auf unterschiedliche Art und Weise entnommen.

Zur Untersuchung der Plaquebildung bei der Atherogenese wird die linke Arteria carotis communis mitsamt der Bifurkation, und der Aortenbogen vorsichtig frei präpariert, entnommen und in eine verdünnte und gepufferte Formaldehyd-Lösung (Formaldehyd-Lösung 4,5%, Otto Fischer GmbH, Saarbrücken) eingelegt. Durch die Fixierung des Gewebes mit Formaldehyd sollen autolytische Vorgänge verhindert, und die

Zellstruktur in einem möglichst natürlichen Zustand erhalten werden. Darüber hinaus werden durch das Fixierungsmittel auch Bakterien und Mikroorganismen abgetötet, die zu Fäulnis und damit gleichfalls zu Gewebsabbau führen würden. Formaldehyd ist neben Glutaraldehyd das am häufigsten verwendete Fixierungsmittel und führt zu einer guten Übereinstimmung des Erscheinungsbildes der fixierten Zelle mit einer lebenden Zelle. Durch Eiweißfällung erhält das Gewebe eine festelastische Konsistenz, die für die weitere Verarbeitung von Vorteil ist <sup>7</sup>. Nach etwa 24 Stunden in Formaldehyd ist die Fixierung von Arteria carotis communis und Aortenbogen abgeschlossen und die weitere Vorbereitung für die Plaquebestimmung kann beginnen.

Für die Auswertung der Neointimaformation nach endothelialer Denudation werden rechte und linke Arteria carotis communis mitsamt der Bifurkation, nach vorsichtiger Spülung der Gefäße mit PBS, entnommen, für 24 Stunden in Formaldehyd-Lösung (Formaldehyd-Lösung 4,5%, Otto Fischer GmbH, Saarbrücken) fixiert und dann in 70%-igem Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt) für die spätere Einbettung in Paraffin (medite tissuwax<sup>®</sup>, Fa. Medite, Burgdorf) konserviert.

#### **4.2.9 Dokumentation**

Für die Nachvollziehbarkeit der Versuchsergebnisse ist eine lückenlose und korrekte Dokumentation aller Daten und Eingriffe unabdinglich. Angefangen bei Prämedikation, Anästhesie, Blutentnahme und Operationsverlauf werden auch das Verfahren der Intravitalmikroskopie und die Auswertungsmodalitäten festgehalten. Mittels schriftlicher Protokolle werden Projektbezeichnung, Versuchs- und Auswertedatum, verwendete Versuchstiere mit Art, Tierstamm, Geschlecht, spezifischer Tiernummer, Geburtsdatum und Gewicht, sowie Anästhesie- und Tötungsmethoden und auftretende Komplikationen vermerkt. Dadurch ist sichergestellt, dass die richtigen Spender- und Empfängertierkombinationen eingehalten und überprüft werden können. Auch verabreichte Medikamente, Farbstoffe oder Antikörper, ebenso wie verwendete Antikoagulantien werden dokumentiert. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf Versuchsergebnisse. Um eine korrekte Auswertung zu ermöglichen, erfolgt eine gewissenhafte Beschriftung der Videokassetten und Datenordner, und stets die Notiz der Vergrößerungsobjektive. Nur so können die Aufnahmen jederzeit einem Versuch zugeordnet werden.

## 4.3 Auswertung

### 4.3.1 Auswertung der Videoaufnahmen

Anhand der Videoaufnahmen sollen Zelladhäsion und -aggregation vor und nach Gefäßverletzung beurteilt und ausgewertet werden. Untersucht werden Thrombozyten-, Leukozyten- und T17b-Zell-Rekrutierung im Rahmen der arteriellen Thrombose, der Atherosklerose und der Neointimaformation in der Arteria carotis der Maus. Dabei werden aufgrund der unterschiedlichen Färbeverfahren der Zellpopulationen, zwei verschiedene Intravitalmikroskope (Axiotech<sup>vario</sup> 100 HD, Fa. Zeiss, Göttingen; Olympus BX51WI, Fa. Olympus, Hamburg), mit entsprechenden Filtersätzen verwendet.

Prinzipiell werden die intravitalmikroskopischen Aufnahmen immer an drei gleich bleibenden Lokalisationen der Arteria carotis gemacht. Die erste ist im Bereich der Aufzweigung in Carotis externa und interna (Bifurkation), zwei weitere Aufnahmen erfolgen im Bereich der Carotis communis (siehe Bild 30). Anschließend werden an allen drei Aufnahme Fenstern nach festem Zeitschema die zu untersuchenden Zellen ausgezählt.

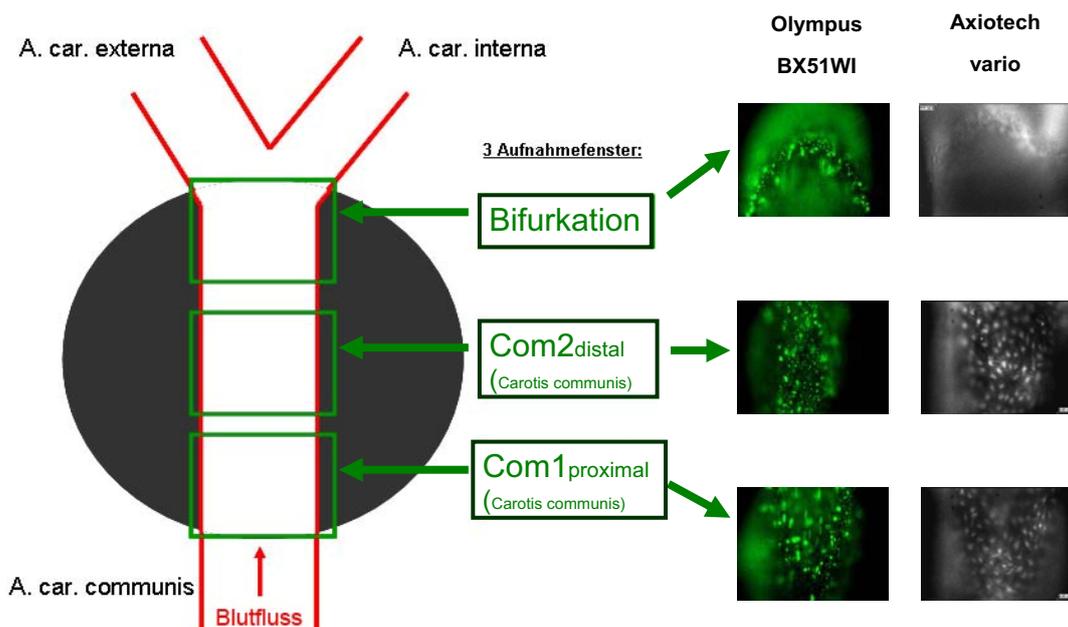


Bild 30 **Links:** Schematische Darstellung der Arteria carotis communis mit drei Aufnahme Fenstern Com1, Com2 und Bifurkation für die intravitalen Fluoreszenzmikroskopie;  
**Rechts:** intravitalmikroskopische Aufnahmen an den drei Aufnahme Fenstern der Arteria carotis communis mit den Fluoreszenzmikroskopen Olympus BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg) und Axiotech<sup>vario</sup> (Fa. Zeiss, Göttingen)

### Allgemeine Definition von adhärenenten, transient adhärenenten und rollenden Zellen

Bei der Zählung der Zellen unterscheidet man zwischen adhärenent, transient adhärenent und rollend. Zu den adhärenenten Zellen zählt man alle Zellen, die an der Gefäßwand länger als 10 Sekunden fest anhaften. Alle Zellen die kürzer als 10 Sekunden an einer Stelle festsitzen, zählt man zu den transient adhärenenten Zellen. Schließlich gibt es Zellen die sich sehr langsam an der Zellwand entlang bewegen und immer wieder kurz Kontakt zum Endothel haben. Es sieht so aus, als würden sie an der Gefäßwand entlang „rollen“<sup>21, 63</sup>.

### Evaluation der Zahl adhärenenter Leukozyten im Atherosklerosemodell

Für die Beurteilung der Leukozyteninteraktionen mit dem dysfunktionellen Endothel in der Atherogenese werden Aufnahmen mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiotech<sup>vario</sup> 100 HD (Fa. Zeiss, Göttingen) gemacht.

Dazu wird folgendes Aufnahmeschema gewählt:

*Tabelle 4 Aufnahmeschema der analogen Videodokumentation zu den Versuchen zur Atherosklerose*

<b>Vergrößerung</b>	<b>Aufnahmezeitpunkt</b>	<b>Aufnahmedauer</b>	<b>Aufnahmeort</b>	<b>Aufnahmeart</b>
100fach	Zu Beginn der Aufnahmen	30 Sekunden	gesamte Arteria carotis communis dexter und sinister incl. Bifurkation	Übersichtsaufnahme (Bestimmung des Gefäßdurchmessers)
200fach	Nach den 100-fach Aufnahmen	15 Sekunden	je zwei Fenster an zwei Lokalisationen der Arteria carotis communis dexter und sinister (Bifurkation, Communis)	Leukozyten-Interaktionen

Anhand der Aufnahmen der Carotiden bei 100facher Vergrößerung wird durch eine an den Bildschirm angepasste Maßstabschablone der Gefäßdurchmesser ermittelt. Anschließend wird die Anzahl von rollenden und fest adhärenenten Leukozyten am dysfunktionellen Endothel bei ApoE-defizienten Mäusen ermittelt. Dazu verwendet man ein Auswertungsfenster, welches bei 200facher Vergrößerung die Seitenlängen 150 x 100 µm aufweist, und fixiert dieses am Monitor. Es werden zwei Fenster im Bereich der Bifurkation ausgezählt und gemittelt und das Vorgehen im Bereich der Carotis communis wiederholt. Die so ermittelten Werte an Bifurkation und Arteria carotis communis können nun in den verschiedenen Versuchsgruppen verglichen werden.

## Thrombozytenzählung im Modell der arteriellen Thrombose

Für die Erfassung der Thrombozyteninteraktionen mit dem verletzten Endothel nach Drahtverletzung werden Aufnahmen mit dem Epifluoreszenzmikroskop Olympus BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg) gemacht.

Folgendes Aufnahmeschema wurde hierbei gewählt:

*Tabelle 5 Aufnahmeschema der digitalen Videodokumentation zu den Versuchen zur arteriellen Thrombose*

<b>Vergrößerung</b>	<b>Aufnahmezeitpunkt</b>	<b>Aufnahmedauer</b>	<b>Aufnahmeort</b>	<b>Aufnahmeart</b>
200fach	vor Drahtverletzung	15 Sekunden	drei Lokalisationen der Arteria carotis communis <b>sinister</b> (Bifurkation, Communis1, Communis2)	Thrombozyten-Interaktionen
200fach	5 Minuten nach Drahtverletzung, dann alle 15 Minuten nach Drahtverletzung bis Minute 60	15 Sekunden	drei Lokalisationen der Arteria carotis communis <b>sinister</b> (Bifurkation, Communis1, Communis2)	Thrombozyten-Interaktionen
200fach	vor Drahtverletzung der A. carotis sinister, dann alle 15 Minuten	15 Sekunden	eine Lokalisation der Arteria carotis communis <b>dexter</b> (Bifurkation)	Thrombozyten-Interaktionen

Nach Verletzung des Endothels mittels Denudation wird die Anzahl von adhärenenten Thrombozyten an der Gefäßwand ermittelt. Die Größe des Auswertungsfensters wird mit Hilfe der Experimentmanagersoftware der Realtime-Imaging-Station Cell<sup>R</sup> (Fa. Olympus, Hamburg) auf 100 x 150 µm eingestellt. Dann werden in jeder Filmsequenz der drei Lokalisationen (Bifurkation, Communis1, Communis2), zu allen Zeitpunkten, anhand jeweils sechs Auswertungsfenster die Thrombozyteninteraktionen ausgezählt, gemittelt und verglichen.

### Bestimmung der Aggregationsfläche der Thrombozyten im Modell der arteriellen Thrombose

Zusätzlich zur Ermittlung der Anzahl von adhärennten Thrombozyten, wird anhand der oben beschriebenen Aufnahmen, die Aggregationsfläche der Blutplättchen beurteilt. Auch hier bedient man sich des Bildanalyseprogramms Cap Image (Cap Image 7.1; Dr. H. Zeintl, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) <sup>28</sup>. Von jeder Filmsequenz, die an den drei Lokalisationen Bifurkation, Communis1 und Communis2 zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen wurden, werden jeweils drei repräsentative Standbildaufnahmen ausgewählt. Die Fläche der aggregierten Thrombozyten pro mm<sup>2</sup> Gefäßwandfläche in jedem Bild wird mit Hilfe von Cap Image ausgemessen und untereinander gemittelt. Die so erhaltenen Zahlen können dann miteinander verglichen werden.

### Rekrutierung von embryonalen endothelialen Progenitorzellen im Modell der arteriellen Thrombose

Zur Beurteilung der Rekrutierung von eEPCs (T17b) in die verletzte Gefäßwand nach Drahtverletzung werden ebenfalls Aufnahmen mit dem Epifluoreszenzmikroskop Olympus BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg) gemacht. Das Aufzeichnungsschema entspricht dem der Thrombozytenzählung (siehe Tabelle 6).

*Tabelle 6 Aufnahmeschema der digitalen Videodokumentation zu den Versuchen zur T17b-Zellrekrutierung*

<b>Vergrößerung</b>	<b>Aufnahmezeitpunkt</b>	<b>Aufnahmedauer</b>	<b>Aufnahmeort</b>	<b>Aufnahmeart</b>
200fach	vor Drahtverletzung	15 Sekunden	drei Lokalisationen der Arteria carotis communis <b>sinister</b> (Bifurkation, Communis1, Communis2)	T17b-Zell-Interaktionen
200fach	5 Minuten nach Drahtverletzung, dann alle 15 Minuten nach Drahtverletzung bis Minute 60	15 Sekunden	drei Lokalisationen der Arteria carotis communis <b>sinister</b> (Bifurkation, Communis1, Communis2)	T17b-Zell-Interaktionen
200fach	vor Drahtverletzung der A. carotis sinister, dann alle 15 Minuten	15 Sekunden	eine Lokalisation der Arteria carotis communis <b>dexter</b> (Bifurkation)	T17b-Zell-Interaktionen

Nach Verletzung des Endothels mittels Denudation wird die Anzahl von rekrutierten T17b-Zellen an die Gefäßwand ermittelt. Die Größe des Auswertungsfensters wird wie oben beschrieben mit Hilfe der Experimentmanagersoftware der Realtime-Imaging-Station Cell<sup>R</sup> (Fa. Olympus, Hamburg) auf 100 x 150 µm eingestellt. Dann werden wieder in jeder Filmsequenz der drei Lokalisationen (Bifurkation, Communis1, Communis2), zu allen Zeitpunkten, anhand jeweils sechs Auswertungsfenster, die T17b-Zell-interaktionen ausgezählt, gemittelt und verglichen.

### **4.3.2 Histologie und Histomorphometrie**

#### Sudanrotfärbung der Gefäße

Sudanrot (Sudan III, Fa. Merck, Darmstadt) ist ein rötlichbraunes Pulver, das wie alle Sudan-Farbstoffe in Fetten, Ölen, Wachsen, Harzen und Kohlenwasserstoffen löslich, in Wasser dagegen praktisch unlöslich ist. Mit der Sudanrot-Färbung werden fettreiche atherosklerotische Plaques in Gefäßen rot dargestellt.

Zur Herstellung einer Stammlösung wird 1g Sudan III (Fa. Merck, Darmstadt) in 200ml 100% Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt) gelöst und anschließend filtriert. Für die Gebrauchslösung verdünnt man die Stammlösung im Verhältnis 2:1 mit destilliertem Wasser. Die zu färbenden Organe werden aus der Formaldehyd-Lösung (Formaldehyd-Lösung 4,5%, Otto Fischer GmbH, Saarbrücken) für zwei Minuten in Aquadest und danach für drei Minuten in 75%-igen Ethanol gegeben. Nun folgt die Färbung der Fettzellen für 25 bis 30 Minuten in Sudan III-Stammlösung. Nach weiteren zwei Minuten in Aquadest können die Gefäße in die Formaldehyd-Lösung zurückgegeben und für die Auswertung weiter vorbereitet werden.

#### Vorbereitung der Gefäße zum Abfotografieren

Nach der Fixierung der Arteria carotis communis und des Aortenbogens für ungefähr 24 Stunden in Formaldehyd-Lösung (Formaldehyd-Lösung 4,5%, Otto Fischer GmbH, Saarbrücken) und nach Sudanrotfärbung der Gefäße, werden sie in einer Petrischale vorsichtig von umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit. Damit die Gefäße nicht austrocknen, werden sie mit PBS-Lösung feucht gehalten. Anschließend positioniert man sie unter einem Deckgläschen und fotografiert sie mit einer hochauflösenden Kamera (AxioCam MRc5, Fa. Zeiss, Göttingen) unter einem Inversionsmikroskop (Axiovert 100, Fa. Zeiss, Göttingen) ab. Dabei wird für die Aufnahme der Arteria carotis communis eine 40fache Vergrößerung (Achromplan 4x/0,10, Fa. Zeiss, Göttingen) (siehe Bild 31), und für die Aortenbögen eine 25fache Vergrößerung (Plan-Neofluar 2,5x/0,075, Fa. Zeiss, Göttingen) (siehe Bild 32) verwendet. Anhand der Vergrößerung kann später bei der Auswertung die genaue Fläche der Plaqueregionen berechnet werden.

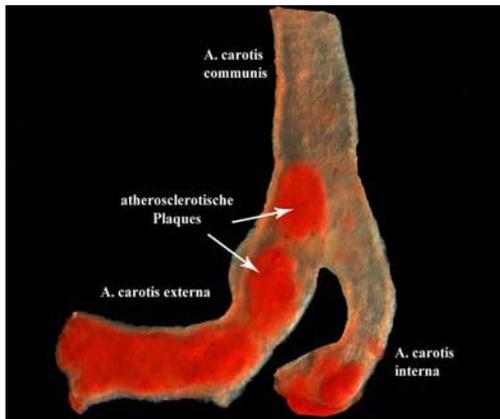


Bild 31 Arteria carotis dexter einer ApoE<sup>-/-</sup> Maus mit atherosclerotischen Plaques (dunkelrot) nach Sudan III-Färbung, 40fach

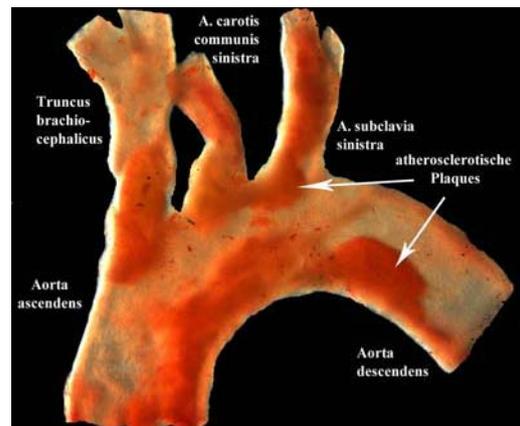


Bild 32 Aortenbogen einer ApoE<sup>-/-</sup> Maus mit atherosclerotischen Plaques (dunkelrot) nach Sudan III-Färbung, 25fach

### Auswertung der Plauegröße mit Cap Image

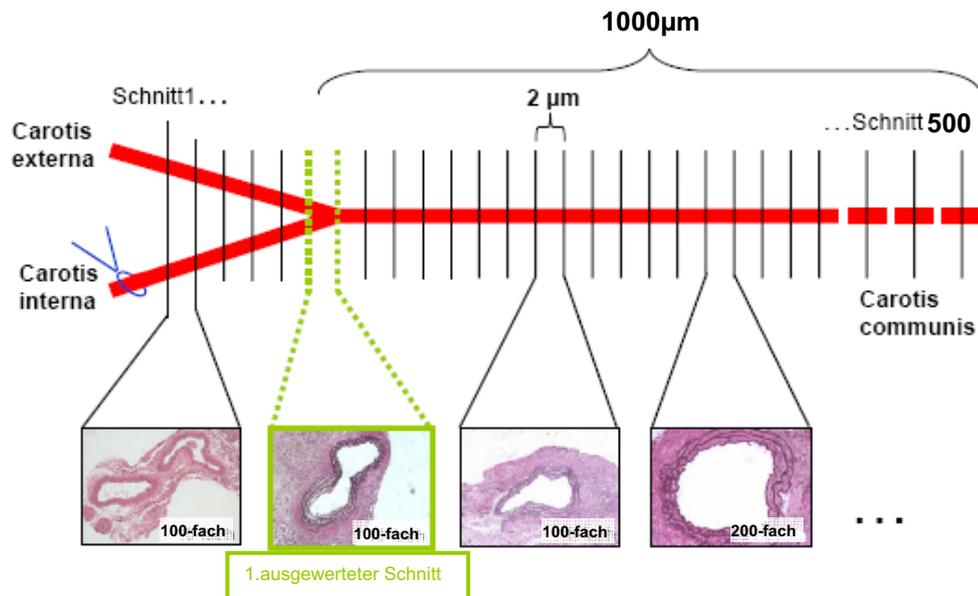
Cap Image (Cap Image 7.1; Dr. H. Zeintl, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ist ein Computer-Programm für die Bildanalyse in der Mikrozirkulationsforschung<sup>28</sup>. Neben vielen anderen Leistungen, ist diese Software in der Lage die geometrische Fläche von Rechtecken, beliebigen Polygonen und auch von beliebig geformten Flächen, die mit der Maus umrandet werden, zu berechnen<sup>64</sup>. Dabei wird der Maßstab des Programms anhand der verwendeten Vergrößerungen angepasst. Man erhält also mittels Umrandung der eindimensionalen Fläche die das Gefäß einnimmt, zunächst die Gesamtfläche des Gefäßes in mm<sup>2</sup>. Setzt man nun die Fläche der Plaques zur Gesamtfläche ins Verhältnis, lassen sich die Daten untereinander vergleichen und auswerten.

### Histologische Darstellung der Neointimaformation

Um die Neointimaformation in den Gefäßen nach endothelialer Denudation beurteilen zu können werden die Organe histologisch untersucht. Die in Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt) konservierten Arterien werden durch eine Alkoholreihe von zunehmender Konzentration geführt und dabei schrittweise entwässert. Durch Behandlung mit geeigneten Intermedien wie etwa Xylol, die sowohl mit Alkohol, als auch mit Paraffin (medite tissuewax<sup>®</sup>, Fa. Medite, Burgdorf) mischbar sind, wird der Alkohol aus dem Gewebe verdrängt, und Paraffin kann eindringen und die Arterien durchtränken. Das Paraffin wird dazu auf circa 60°C erwärmt und erstarrt anschließend beim Auskühlen zu einem Präparatblock, der dann geschnitten werden kann<sup>7</sup>. Dabei wird die Arteria carotis communis im Paraffinblock mit der Bifurkation nach unten eingebettet.

## Anfertigung von histologischen Schnitten

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wird ein Rotationsmikrotom (Microtom HM 335 E, MICROM GmbH, Walldorf) verwendet. Die Arterien in den Paraffinblöcken werden, beginnend bei der Bifurkation, über 1000µm seriell durchgeschnitten, wobei jeder Schnitt exakt 2µm dick ist. Insgesamt entstehen so 500 Schnitte. Diese werden zum Strecken und Glätten mit einem Pinsel in ein Warmwasserbad (Paraffin Streckbad TB 35, MEDITE Medizintechnik, Burgdorf) überführt. Dann nimmt man jeweils fünf Schnitte auf einen sauberen, fettfreien, beschrifteten Objektträgern (SuperFrost®Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig) auf, und bewahrt diese zum trocknen und anhaften der Schnitte, bis zum Färben, in einem 37°C warmen Brutschrank auf. Der erste Schnitt, bei dem, von der Bifurkation ausgehend, die Arteria carotis externa und interna das erste Mal ein gemeinsames Lumen bilden, stellt den Startpunkt für die Auswertung dar (siehe Bild 33).



*Bild 33 Schematische Darstellung der Anfertigung serieller histologischer Schnitte der Arteria carotis communis über 1000 µm, beginnend an der Bifurkation; grün: erster Schnitt bei dem Carotis externa und interna ein gemeinsames Lumen bilden; die Dicke der Schnitte beträgt 2µm. Beispielbilder mit 100- und 200facher Vergrößerung.*

## Färbetechnik

Nach dem Antrocknen der Schnitte auf den Objektträgern, muss für die lichtmikroskopische Untersuchung, zunächst das Paraffin entfernt und anschließend die Schnitte mittels erprobter Verfahren spezifisch gefärbt werden. Durch unterschiedliche Anfärbung entstehen im Gewebe Kontraste, durch die bestimmte Strukturen besonders hervorgehoben werden. Daneben ist es möglich, durch spezifische Farbstoffe und Techniken selektiv Zellen und Gewebsstrukturen anzufärben. Viele Standardmethoden der Histologie verwenden dazu eine Färbung mit je einem sauren und einem basischen

Farbstoff <sup>7</sup>. Sämtlichen Färbeschritte werden dabei von einem Färbeautomaten übernommen.

### Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)

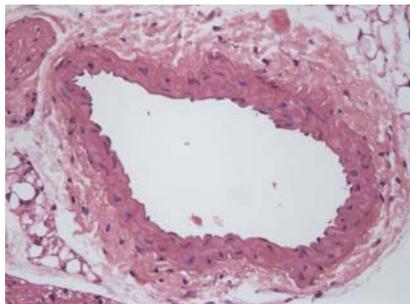
Die H.E.-Färbung ist eine der gebräuchlichsten Übersichtsfärbungen, die Zellkerne und zytoplasmatische Bestandteile darstellt. Durch den basischen Farbstoff Hämatoxylin werden Zellkern sowie saure Komponenten anderer Zellstrukturen und extrazellulärer Bestandteile blau bis violett. Der saure Farbstoff Eosin färbt zahlreiche zelluläre und extrazelluläre Strukturen in einem roten Farbton (siehe Tabelle 7 und Bild 34) <sup>7, 29</sup>.

### Van Gieson Färbung (v.G.)

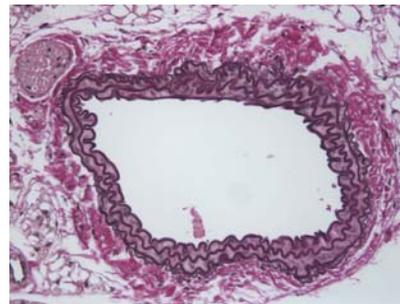
Die van Gieson-Färbung ist eine in der Histologie häufig verwendete Färbung zur Darstellung von Bindegewebe und Muskulatur. Die Zellkerne stellen sich hier durch Weigerts Eisenhämatoxylin schwarzbraun dar. Pikrinsäure-Säurefuchsin färbt das Zytoplasma gelbbraun, kollagenes Bindegewebe rot, elastische Fasern sowie Bindegewebe und Erythrozyten gelb (siehe Tabelle 7 und Bild 35).

*Tabelle 7 Resultate bei der H.E.- und Van G.-Färbung modifiziert nach<sup>7</sup>*

	Zellkerne	Zytoplasma	elast. Bindegew.	kollag. Bindegew.	hyaliner Knorpel	verkalkter Knochen	Muskelzellen
<b>H.E.</b>	blau	blaßrot	rosa	rot	blaßblau-violett	rot	dunkelrot
<b>v. G.</b>	braun-schwarz	gelb-braun	gelb	rot	gelb od. rot	gelb-rot	gelb



*Bild 34 Arteria carotis communis;  
H.E.-Färbung*

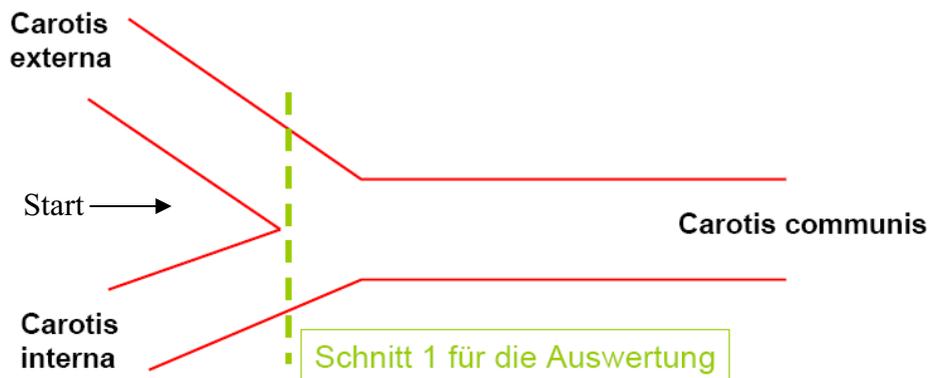


*Bild 35 Arteria carotis communis;  
v. G.-Färbung*

## Histomorphometrische Quantifizierung

Die Arteria carotis communis wird von der Bifurkation ausgehend, seriell über 1000  $\mu\text{m}$  durchgeschnitten. Seriell bedeutet hierbei, dass die Schnitte von 2  $\mu\text{m}$  Dicke, durchgehend angefertigt und auf Objektträger aufgenommen werden, ohne zwischendurch Gewebe zu verwerfen. Da bei der Denudation, die Verletzung des Endothels, fast über die gesamte Länge der Arterie erfolgt, kann man so die Morphologie des ganzen Gefäßes ausnahmslos beurteilen.

Um vergleichbare Daten zu erhalten muss für jedes einzelne Präparat, die gleiche Lokalisation untersucht und ausgewertet werden. Es werden jeweils 500 Schnitte von je 2  $\mu\text{m}$  analysiert. Begonnen wird mit dem ersten Schnitt, von der Bifurkation ausgehend, bei dem die Arteria carotis externa und interna ein gemeinsames Lumen haben (siehe Bild 36).

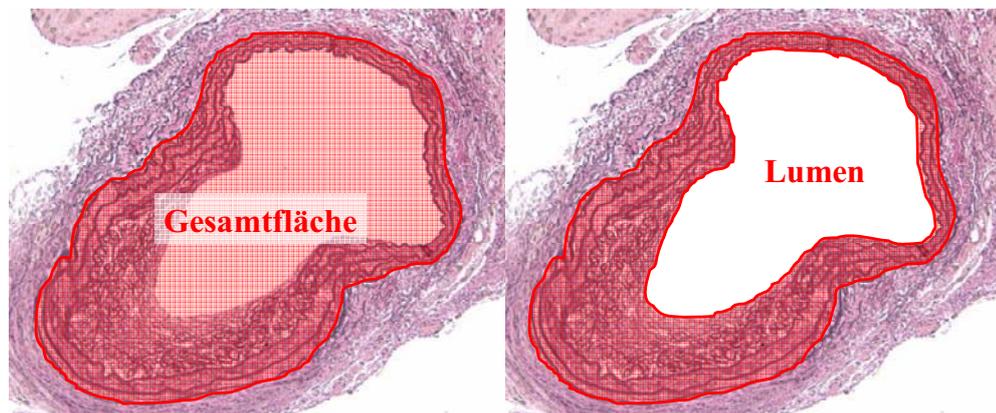


*Bild 36 Schematische Darstellung der Arteria carotis communis, grün: erster Schnitt, von der Bifurkation ausgehend, bei dem die Carotis externa und interna ein Lumen bilden*

Folgende Kriterien müssen außerdem bei jedem Schnitt erfüllt werden. Der maximale Durchmesser des Gefäßes darf 600  $\mu\text{m}$  nicht überschreiten (der physiologische Durchmesser der Arteria carotis communis der Maus liegt bei etwa 350-400 $\mu\text{m}$ ). Außerdem werden Gefäße mit komplett zerstörter Intima nicht in die Auswertung genommen.

Hat man die den Kriterien entsprechenden Gefäßschnitte ausgewählt, wird jeder fünfte Schnitt mittels einer hochauflösenden Kamera (Axiocam MRc5, Fa. Zeiss, Göttingen) unter einem Durchlichtmikroskop (Leica DMRB, Fa. Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit 200facher Vergrößerung (PL Fluotar 20x/0,50, Fa. Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) abfotografiert. Die Flächenberechnung der Neointima erfolgt mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Cap Image (Cap Image 7.1; Dr. H. Zeintl, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland)<sup>28</sup>.

Zunächst wird die Gesamtfläche ausgemessen (siehe Bild 37). Als äußere Grenze dient die in der van Gieson-Färbung in dunkelviolett gut sichtbare Membrana elastica interna. Von der Gesamtfläche wird die Fläche des Gefäßlumens abgezogen. Man erhält so die Fläche die von Intima und Neointima eingenommen wird, und kann diese mit anderen Bildern vergleichen.



*Bild 37 histologischer Schnitt der Arteria carotis communis; Schematische Darstellung der Berechnung der Neointimafläche; als äußere Begrenzung dient die Membrana elastica interna; von der Gesamtfläche wird die Fläche die das Gefäßlumen einnimmt, abgezogen, 100fach*

## 4.4 Versuchsprotokolle und experimentelle Gruppen

### 4.4.1 Rolle der durch Sphk1 vermittelten S1P-Synthese für die Atherosklerose

Um den Einfluss der Sphk1 vermittelten Sphingosin-1-Phosphat-Synthese und von S1P-Rezeptoren auf die Atherogenese zu analysieren, werden zwei unterschiedliche Versuchsmodelle verwendet.

#### Vergleich von Sphk1<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen

Zunächst wird die Rolle der Sphingosinkinase Typ 1 bei der Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen untersucht. Dazu werden ApoE-S1P-doppeldefiziente Mäuse mit ApoE<sup>-/-</sup> S1P<sup>+/+</sup> Tieren (als Kontrolle), bei unterschiedlich starker Ausprägung der Atherosklerose verglichen. In drei Versuchsgruppen wird jeder Mäusestamm über 7, 10 und 13 Wochen, mit cholesterinreicher Diät gefüttert. Dann werden Aortenbogen und die Carotiden entnommen, und die Plaquegröße mittels Sudan III-Färbung ermittelt (siehe Tabelle 8).

*Tabelle 8 Versuchsprotokoll zum Einfluss von S1P auf die Atherogenese; Vergleich von ApoE<sup>-/-</sup> Sphk1<sup>+/+</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup> ApoE<sup>+/+</sup> Mäusen*

<b>Stamm</b>	<b>Cholesterinfutter</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auswertung</b>
ApoE <sup>-/-</sup> Sphk1 <sup>+/+</sup>	7 Wochen	n=5	sex matched	10-12 Wochen	Plaquegröße
ApoE <sup>-/-</sup> Sphk1 <sup>+/+</sup>	10 Wochen	n=8	sex matched	13-15 Wochen	Plaquegröße
ApoE <sup>-/-</sup> Sphk1 <sup>+/+</sup>	13 Wochen	n=12	sex matched	16-18 Wochen	Plaquegröße
ApoE <sup>-/-</sup> Sphk1 <sup>-/-</sup>	7 Wochen	n=4	sex matched	10-12 Wochen	Plaquegröße
ApoE <sup>-/-</sup> Sphk1 <sup>-/-</sup>	10 Wochen	n=8	sex matched	13-15 Wochen	Plaquegröße
ApoE <sup>-/-</sup> Sphk1 <sup>-/-</sup>	13 Wochen	n=11	sex matched	16-18 Wochen	Plaquegröße

#### Behandlung von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit dem S1P-Agonisten Fingolimod und DMSO

Im zweiten Versuchsmodell werden ApoE-defiziente Mäuse über 11 Wochen mit DMSO oder dem S1P-Agonisten Fingolimod behandelt. Es soll untersucht werden, welche S1P-Rezeptoren bei der Atherogenese eine Rolle spielen. Da Fingolimod in DMSO gelöst ist, dient die Behandlung mit diesem Lösungsmittel als Kontrolle zur Fingolimodverabreichung. Die Applikation erfolgt alle drei Tage mittels Magensondenfütterung in einer Dosierung von 2,5mg/kg Fingolimod über 11 Wochen, wobei Fingolimod in einer Konzentration von 5mg/ml in 10% DMSO gelöst ist. Entsprechend erfolgt die Gabe von 10% DMSO. Nach 11 Wochen Medikation erfolgt eine intravitalmikroskopische Untersuchung der Leukozyten-Zellwand-Interaktionen. Man färbt die Leukozyten *in vivo* mittels Venenkatheter mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G, und verwendet das oben beschriebene Aufzeichnungsschema. Anschließend werden der Aortenbogen und die beiden Carotiden entnommen und mittels Sudan III-Färbung die Plaquegröße festgestellt (siehe Tabelle 9).

*Tabelle 9 Versuchsprotokoll zum Einfluss von SIP auf die Atherogenese; Vergleich von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit Fingolimod- bzw. DMSO-Behandlung*

<b>Stamm</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auswertung</b>
ApoE <sup>-/-</sup>	11 Wochen perorale Behandlung mit Fingolimod in 10% DMSO	IVM: n=4 Plaque: n=7	sex matched	14-16 Wochen	Leukozyten-Adhäsion, Plaquegröße
ApoE <sup>-/-</sup>	11 Wochen perorale Behandlung mit 10% DMSO	IVM: n=3 Plaque: n=7	sex matched	14-16 Wochen	Leukozyten-Adhäsion, Plaquegröße
ApoE <sup>-/-</sup>	unbehandelt	Plaque: n=2	sex matched	14-16 Wochen	Plaquegröße

#### **4.4.2 Rolle von Sphingosin-1-Phosphat in der arteriellen Thrombose**

Um die mögliche Rolle von SIP in der Entstehung der arteriellen Thrombose näher zu bestimmen, werden fünf Versuchsgruppen in zwei unterschiedlichen Modellen untersucht. Bei allen Tieren erfolgt die Verletzung des Endothels mittels Denudation. Die Aufnahmeschemata sind alle identisch und sind im Kapitel 4.3 genau beschrieben. Um die Interaktion der Thrombozyten mittels Videofluoreszenzmikroskopie beurteilen zu können werden zunächst Blutplättchen eines Spendertieres isoliert und ex vivo mit dem Fluorophor 5(6)-CFDA angefärbt. Dann erfolgt die Injektion der gefärbten Thrombozyten über einen Venenkatheter in das Empfängertier. Anschließend beginnen die intravitalmikroskopischen Aufnahmen.

##### Vergleich von Sphk1<sup>+/+</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen

Im ersten Versuchsmodell werden Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Mäuse miteinander verglichen, um eine mögliche Einwirkung der Sphingosinkinase Typ 1 auf die arterielle Thrombose zu analysieren. Anhand von intravitalmikroskopischen Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten, wird die Anzahl der adhärenenten Blutplättchen und das Ausmaß der Aggregation dieser Zellen, an der verletzten Gefäßwand dargestellt, ausgewertet und verglichen (siehe Tabelle 10).

*Tabelle 10 Versuchsprotokoll zum Einfluss von S1P auf die arterielle Thrombose; Vergleich von Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen*

<b>Stamm</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auswertung</b>
Sphk1 <sup>+/+</sup>	n=5	sex matched	6-8 Wochen	Thrombozyten-adhäsion und -aggregation
Sphk1 <sup>-/-</sup>	n=5	sex matched	8-11 Wochen	Thrombozyten-adhäsion und -aggregation

Behandlung von S1P<sup>+/+</sup> Mäusen mit den S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod und SEW 2871, und dem Lösungsmittel DMSO

Im zweiten Versuchsmodell geht es darum, den Einfluss einzelner S1P-Rezeptoren auf die Entstehung der arteriellen Thrombose darzustellen. Dazu werden den Tieren die S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod (2,5mg/kg) oder SEW 2871 (20mg/kg) intraperitoneal verabreicht. Da diese Wirkstoffe in DMSO gelöst sind, dient eine dritte mit DMSO (15µl, 1:10 mit Aqua ad injektibile verdünnt) behandelte Tiergruppe, als Kontrolle. In allen drei Versuchsgruppen bekommen sowohl Spender- als auch Empfängertiere 6 Stunden vor Versuchsbeginn eine intraperitoneale Injektion der entsprechenden Stoffe. Nach fünf Stunden erfolgt die Blutabnahme und Thrombozytenpräparation bei den Spendertieren. Die Vorbereitung und Färbung der Blutplättchen zur intravenösen Injektion in das Empfängertier, erfolgt nach bekanntem Protokoll (siehe 4.2.7). Abweichend davon werden die Thrombozyten vor intravenöser Injektion mit Fingolimod (180µg/ml), SEW 2871 (440µg/ml) oder DMSO (36µl/ml) zusätzlich vorinkubiert. So ist gewährleistet, dass das Empfängertier und die Thrombozyten des Spendertiers ausreichend mit den Wirkstoffen in Kontakt gekommen sind. Schließlich erfolgt 6 Stunden nach Medikation die intravitalmikroskopische Aufnahme der Thrombozyteninteraktion in der Arteria carotis der Empfängertiere. Man bewertet die Thrombozytenadhäsion und- aggregation an die verletzte Gefäßwand nach Denudation bei unterschiedlicher Behandlung mit S1P-Rezeptoragonisten (siehe Tabelle 11).

*Tabelle 11 Versuchsprotokoll zum Einfluss von S1P auf die arterielle Thrombose; Behandlung mit Fingolimod, SEW 2871 und DMSO*

<b>Stamm</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auswertung</b>
Sphk1 <sup>+/+</sup>	Fingolimod 6h prä OP	n=5	sex matched	7-10 Wochen	Thrombozyten-adhäsion und -aggregation
Sphk1 <sup>+/+</sup>	SEW 6h prä OP	n=5	sex matched	8-14 Wochen	Thrombozyten-adhäsion und -aggregation
Sphk1 <sup>+/+</sup>	DMSO 6h prä OP	n=5	sex matched	7-8 Wochen	Thrombozyten-adhäsion und -aggregation

#### 4.4.3 Rolle von Sphingosin-1-Phosphat für die Rekrutierung von eEPCs in der arteriellen Thrombose

Anhand der folgenden zwei Versuchsmodelle wird die Rolle von S1P für die Rekrutierung der endothelialen Progenitorzellen an die verletzte Gefäßwand nach Denudation eruiert. Die Präparation und Färbung der T17b-Zellen erfolgt nach bekanntem Protokoll (siehe 4.2.6). Bevor man mit den intravitalmikroskopischen Aufnahmen beginnt, werden die fluoreszenzmarkierten T17b-Zellen dem Empfängertier mittels Venenkatheter injiziert. Nach erfolgter Denudation wird die Anzahl der adhärenen Zellen mittels Auswertungsfenster bestimmt und miteinander verglichen.

##### Vergleich von Sphk1<sup>+/+</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen

Zunächst wird der Einfluss der durch Sphingosinkinase Typ 1 vermittelten S1P-Freisetzung aus den Thrombozyten im Bereich der defekten Gefäßwand auf die Interaktion zwischen T17b-Zellen und der denudierten Gefäßwand untersucht. Dazu vergleicht man Mäusestämme mit ausgeknockter Sphk1 mit dem dazugehörigen Kontrollstamm (siehe Tabelle 12).

*Tabelle 12 Versuchsprotokoll zum Einfluss von S1P auf die T17b-Zellrekrutierung; Vergleich von Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen*

<b>Stamm</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auswertung</b>
Sphk1 <sup>+/+</sup>	n=3	sex matched	7-13 Wochen	Rekrutierung T17b-Zellen
Sphk1 <sup>-/-</sup>	n=3	sex matched	6 Wochen	Rekrutierung T17b-Zellen

##### Behandlung von Sphk1<sup>+/+</sup> Mäusen mit den S1P-Agonisten Fingolimod und SEW 2871, und dem Lösungsmittel DMSO

Die verschiedenen S1P-Rezeptoren können unterschiedliche Wirkung auf die Rekrutierung von T17b-Zellen haben. Daher werden Sphk1<sup>+/+</sup> Mäuse mit den S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod und SEW 2871 und dem dazugehörigen Lösungsmittel DMSO behandelt und mittels Drahtverletzung eine arterielle Thrombose induziert. Die nach beschriebenen Protokoll präparierten und fluoreszenzgefärbten T17b-Zellen werden intravenös appliziert. Danach folgt die intravitalmikroskopische Aufzeichnung der Zellinteraktionen nach vorgegebenem Aufnahmeschema. Die Anzahl der adhärenen T17b-Zahlen wird ausgezählt und mit den anderen Versuchsgruppen verglichen (siehe Tabelle 13).

*Tabelle 13 Versuchsprotokoll zum Einfluss von SIP auf die T17b-Zellrekrutierung; Behandlung mit Fingolimod, SEW 2871 und DMSO*

<b>Stamm</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auswertung</b>
Sphk1 <sup>+/+</sup>	Fingolimod 6h prä OP	n=5	sex matched	7-10 Wochen	Rekrutierung T17b-Zellen
Sphk1 <sup>+/+</sup>	SEW 6h prä OP	n=5	sex matched	6-11 Wochen	Rekrutierung T17b-Zellen
Sphk1 <sup>+/+</sup>	DMSO 6h prä OP	n=5	sex matched	7-10 Wochen	Rekrutierung T17b-Zellen

#### **4.4.4 Rolle von Sphingosin-1-Phosphat in der Neointimaformation**

Um die Einwirkung von SIP auf die Bildung von Neointima beurteilen zu können werden Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gefäßverletzung untersucht. Die Neointimaformation wird mittels Drahtverletzung der Arteria carotis communis induziert. Dabei erfolgt die Verletzung des Endothels oberflächlich. Im Vergleich dazu wird in zusätzlichen Tiergruppen als Modell für eine starke Thrombose, ein tiefer Media-Schaden hervorgerufen. 7, 14, 21 bzw. 28 Tage später werden die Carotiden entnommen und die Fläche der gebildeten Neointima histomorphometrisch vermessen und verglichen(siehe Tabelle 14).

*Tabelle 14 Versuchsprotokoll zum Einfluss der Sphk1 bei der Neointimaformation nach Endothelverletzung*

<b>Stamm</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Untersuchungszeitpunkt</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auswertung</b>
Sphk1 <sup>+/+</sup>	keine	7 Tage nach Denudation, Endothelschaden	n=5	sex matched	8-10 Wochen	Neointimaformation
Sphk1 <sup>+/+</sup>	keine	7 Tage nach Denudation, tiefer Mediaschaden	n=7	sex matched	6-7 Wochen	Neointimaformation
Sphk1 <sup>+/+</sup>	keine	14 Tage nach Denudation, Endothelschaden	n=5	sex matched	7-9 Wochen	Neointimaformation
Sphk1 <sup>+/+</sup>	keine	21 Tage nach Denudation, Endothelschaden	n=5	sex matched	7-10 Wochen	Neointimaformation
Sphk1 <sup>+/+</sup>	keine	28 Tage nach Denudation, Endothelschaden	n=5	sex matched	7-10 Wochen	Neointimaformation
Sphk1 <sup>-/-</sup>	keine	7 Tage nach Denudation, Endothelschaden	n=5	sex matched	7-10 Wochen	Neointimaformation
Sphk1 <sup>-/-</sup>	keine	7 Tage nach Denudation, tiefer Mediaschaden	n=8	sex matched	7-8 Wochen	Neointimaformation
Sphk1 <sup>-/-</sup>	keine	14 Tage nach Denudation, Endothelschaden	n=5	sex matched	7-14 Wochen	Neointimaformation
Sphk1 <sup>-/-</sup>	keine	21 Tage nach Denudation, Endothelschaden	n=5	sex matched	7-14 Wochen	Neointimaformation
Sphk1 <sup>-/-</sup>	keine	28 Tage nach Denudation, Endothelschaden	n=5	sex matched	6-9 Wochen	Neointimaformation

In einer weiteren Versuchgruppe werden Sphk1<sup>+/+</sup> Mäuse über 7 Tage mit Fingolimod behandelt um die Rolle der S1P-Rezeptoren für die Neointimaformation zu beurteilen. Auch hier erfolgt eine tiefe Gefäßwandverletzung mit Media-Schaden mittels Denudation (siehe Tabelle 15).

*Tabelle 15 Versuchsprotokoll zum Einfluss der S1P-Rezeptoren bei der Neointimaformation nach Endothelverletzung*

<b>Stamm</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Untersuchungszeitpunkt</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Auswertung</b>
Sphk1 <sup>+/+</sup>	7 Tage Fingolimod	7 Tage nach Denudation, tiefer Media-Schaden	n=6	sex matched	9 Wochen	Neointimaformation

## 4.5 Auswertung und Statistik

Alle Daten wurden mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Corporation) ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit dazugehörigen Standardfehlern angegeben.

Um verlässliche Aussagen treffen zu können, werden in dieser Arbeit zur Auswertung der Daten einige Methoden der deskriptiven Statistik verwendet. Damit lässt sich eine bestimmte Menge von gesammelten Daten summarisch darstellen und auswerten. Als signifikant bezeichnet man in der Statistik Ergebnisse, bei denen der Unterschied zwischen den Ergebnissen nur mit einer definierten geringen Wahrscheinlichkeit durch Zufall zustande gekommen ist. Mittels eines Signifikanztest kann diese Signifikanz überprüft werden. Dazu wird anfangs eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  festgelegt. Ein Unterschied wird als signifikant bezeichnet wenn  $p < 0,05$ , also kleiner 5 Prozent ist. Wenn  $p < 0,001$  spricht man von hochsignifikanten Ergebnissen. Zur Auswertung und Berechnung der hier erhobenen Daten wurde mit Hilfe des Auswertungsprogramm SigmaStat<sup>®</sup> der Man Whitney Rank Sum Test durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

Durch die in diesem Tiermodell verwendeten intravitalmikroskopischen Untersuchungen ist es möglich, zelluläre und molekulare Mechanismen in der Atherosklerose, der arteriellen Thrombose und bei der Neointimaformation detailgetreu und in Echtzeit darzustellen.

Im Modell der spontanen Atherosklerose können zelluläre Prozesse und deren Regulation in der nicht verletzten aber dysfunktionellen Gefäßwand definiert werden.

Die verwendete Methode der Denudation, stellt eine gute Möglichkeit dar, die Zerstörung der intakten antiadhäsiven Endothelzellschicht, wie sie beispielsweise während koronarer Interventionen mittels Katheterisierung auftreten kann, zu simulieren. Es kommt zur Freilegung der subendothelialen kollagenen Matrix mit allen Folgen, von der Anlagerung der Thrombozyten, über die arterielle Thrombose bis hin zur Neointimaformation und schließlich zur Ausheilung des Defekts.

### 5.1 Einfluss von Sphk1 und S1P-Rezeptoren auf die Atherosklerose

Mit Hilfe der ApoE-defizienten Maus, können verschiedene Stadien der Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene untersucht werden. Durch das Einkreuzen einer Sphk1-Knockouts in den ApoE<sup>-/-</sup>-Hintergrund soll eruiert werden, welche Rolle der Sphingosinkinase Typ 1 bei der Atherogenese zukommt. Die Sphk1<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> Tiere werden entsprechend der mendelschen Verteilung geboren. Es wird keine erhöhte pränatale Mortalität durch Sphk1<sup>-/-</sup> im ApoE<sup>-/-</sup> Hintergrund beobachtet.

#### Vergleich von Sphk1<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen

Bei der Erforschung der Rolle von Sphingosinkinase Typ 1 bei der Entstehung der Atherosklerose, werden Versuchsgruppen über 7, 10 und 13 Wochen mit einer cholesterolreichen Diät gefüttert. Anschließend werden die Tiere geopfert, und mittels Sudan III-Färbung, die atherosklerotischen Plaques an Arteria carotis communis und Aortenbogen dargestellt und analysiert.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 38 und 39 dargestellt. Man erkennt, dass die Fläche der atherosklerotischen Plaques an der Arteria carotis communis und am Aortenbogen, mit zunehmendem Alter und steigender Fütterungsdauer, stetig zunimmt. Zum anderen zeigt sich, dass an beiden Lokalisationen (Aortenbogen und Arteria carotis communis) und zu allen Zeitpunkten, kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit ausgeknockter Sphingosinkinase Typ 1 und den entsprechenden

Kontrolltieren zu erkennen ist. Weiterhin ist zu beachten, dass die Plaquentwicklung am Aortenbogen deutlich stärker ausgeprägt ist als an der Arteria carotis communis (siehe Bild 38 und Bild 39).

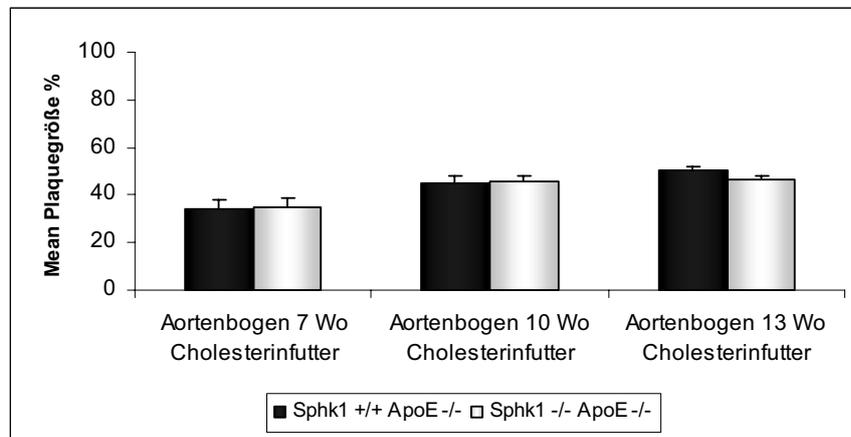


Bild 38 Vergleich  $Sphk1^{+/+}ApoE^{-/-}$  mit  $Sphk1^{-/-}ApoE^{-/-}$ ; mittlere Plaquergröße in Prozent der Gesamtfläche am Aortenbogen der Maus; Cholesterinreiche Diät über 7, 10 und 13 Wochen

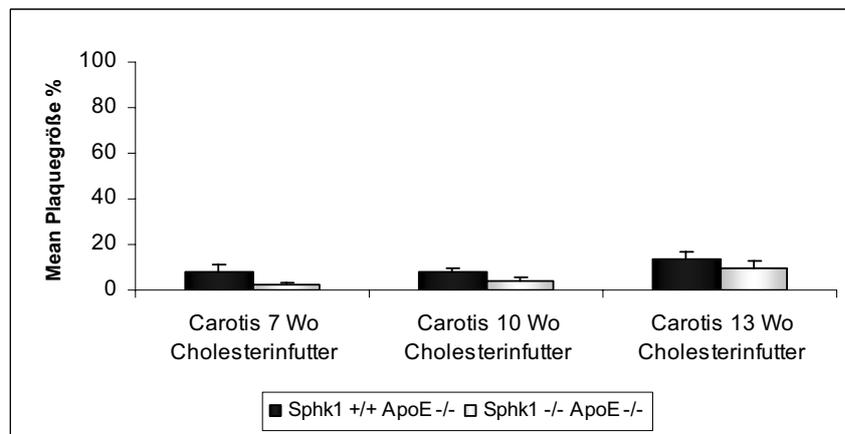
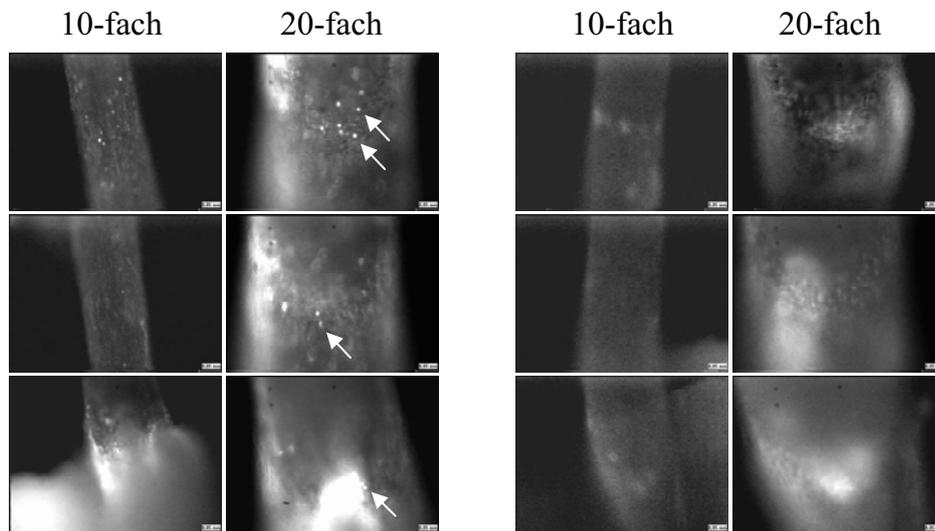


Bild 39 Vergleich  $Sphk1^{+/+}ApoE^{-/-}$  mit  $Sphk1^{-/-}ApoE^{-/-}$ ; mittlere Plaquergröße in Prozent der Gesamtfläche an der Arteria carotis communis der Maus; Cholesterinreiche Diät über 7, 10 und 13 Wochen

### Behandlung von $ApoE^{-/-}$ Mäusen mit dem S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod und DMSO

Um die Rolle von S1P-Rezeptoren für die Entstehung von atherosklerotischen Plaques an der Arteria carotis communis und am Aortenbogen der Maus zu ermitteln, werden  $ApoE$ -Knockoutmäuse über 11 Wochen mit dem S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod behandelt. Als Kontrolle dient eine Tiergruppe die über den gleichen Zeitraum DMSO appliziert bekommt. Zusätzlich erfolgt für alle Gruppen die Fütterung mit

Cholesterinfutter. Dann wird mittels intravitalmikroskopischer Aufnahmen, die Leukozytenrekretierung an das dysfunktionelle Endothel der Arteria carotis communis beurteilt. Dazu wird über einen Venenkatheter der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G verabreicht, welcher in den Zellkernen der Leukozyten akkumuliert und unter dem Epifluoreszenzmikroskop detektiert werden kann (siehe Bild 40).



**Bild 40 Links:** intravitalmikroskopische Aufnahmen der Arteria carotis communis einer *ApoE<sup>-/-</sup>* Maus nach Behandlung mit DMSO an drei Lokalisationen (von oben: *Communis1*, *Communis2*, *Bifurkation*)  
**Rechts:** intravitalmikroskopische Aufnahmen der Arteria carotis communis einer *ApoE<sup>-/-</sup>* Maus nach Behandlung mit Fingolimod an drei Lokalisationen (von oben: *Communis1*, *Communis2*, *Bifurkation*)  
 Pfeile: Leukozyten

Bei der Auszählung der Leukozyten unterscheidet man zwischen adhärenenten und rollenden Leukozyten. Es werden drei Lokalisationen ausgewertet. Zum einen untersucht man die Bifurkation der Arteria carotis. Die Ergebnisse zwei weiterer Auswertungsfenster an der Arteria carotis communis (*Communis 1* und *Communis 2*) werden gemittelt und sind in Bild 40 dargestellt.

Betrachtet man die Ergebnisse an der Aufzweigungsstelle der Arteria carotis communis in die Arteria carotis externa und interna, sieht man, dass die Anzahl rollender und adhärenenter Leukozyten nach Fingolimod-Applikation deutlich vermindert ist. Dabei ist die Reduktion statistisch signifikant (siehe Bild 41).

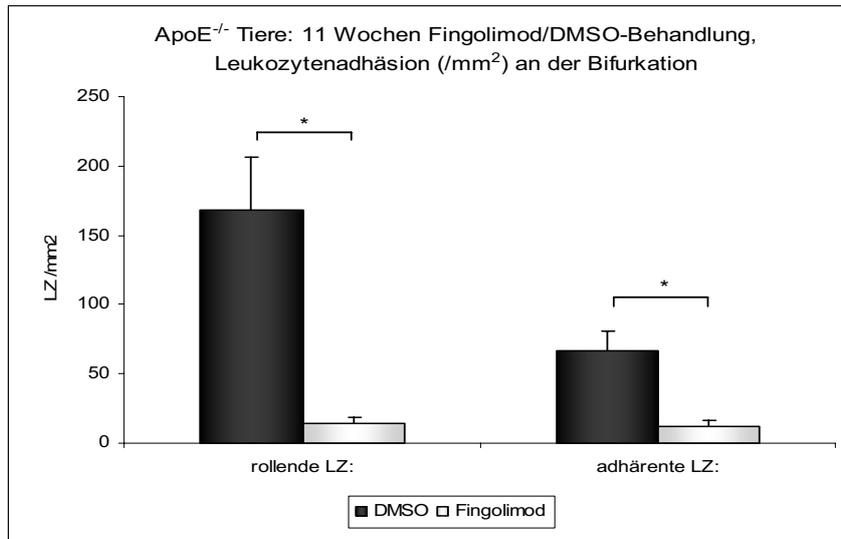


Bild 41 ApoE<sup>-/-</sup> Tiere; 11 Wochen Fingolimod- /DMSO-Behandlung;  
Leukozytenadhäsion pro mm<sup>2</sup> an der **Bifurkation** der Arteria carotis;  
links die rollenden und rechts die fest adhärenen Leukozyten

Auch im weiteren Verlauf der Arteria carotis communis sieht man deutlich herabgesetzte Zahlen an fest und transient adhärenen und rollenden Leukozyten bei den Mäusen mit Fingolimod-Behandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Bild 42).

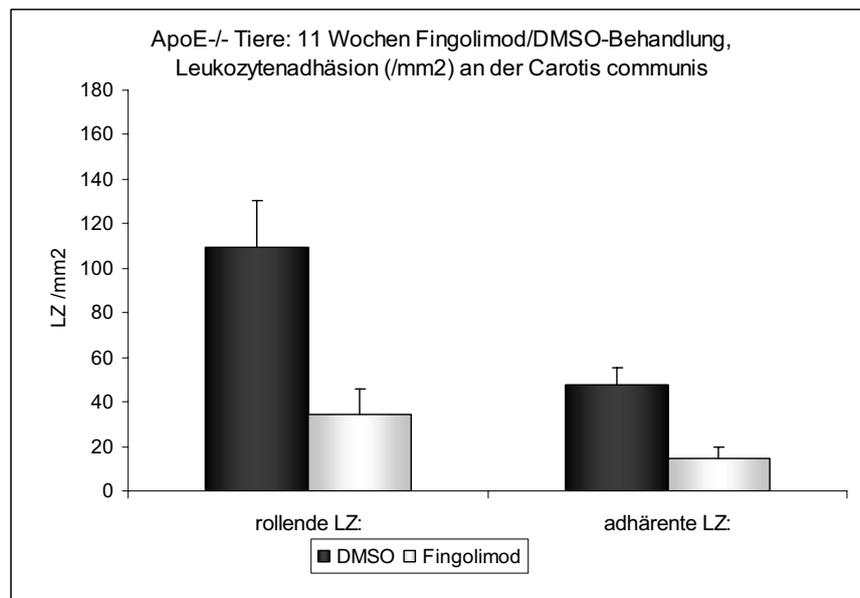
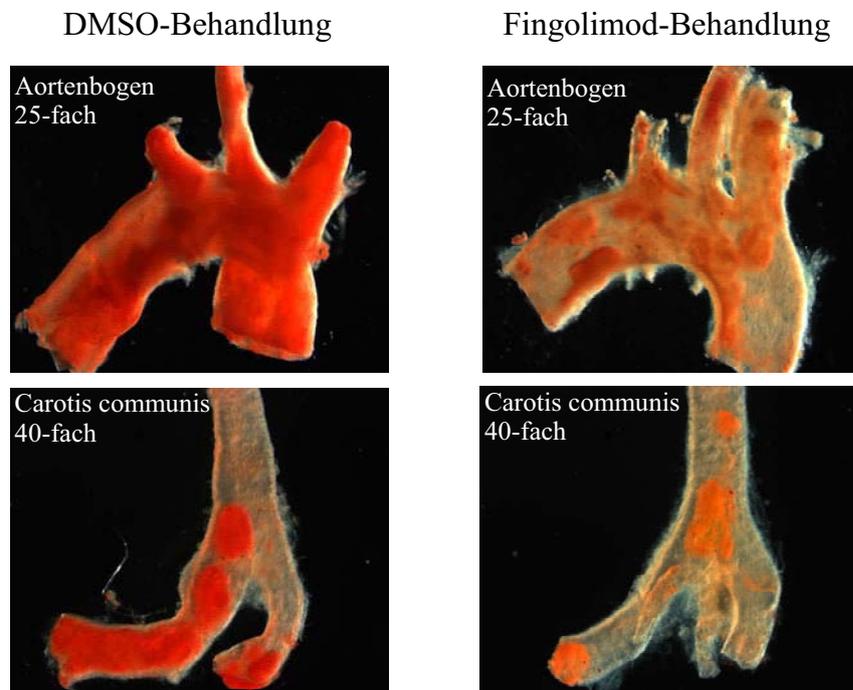


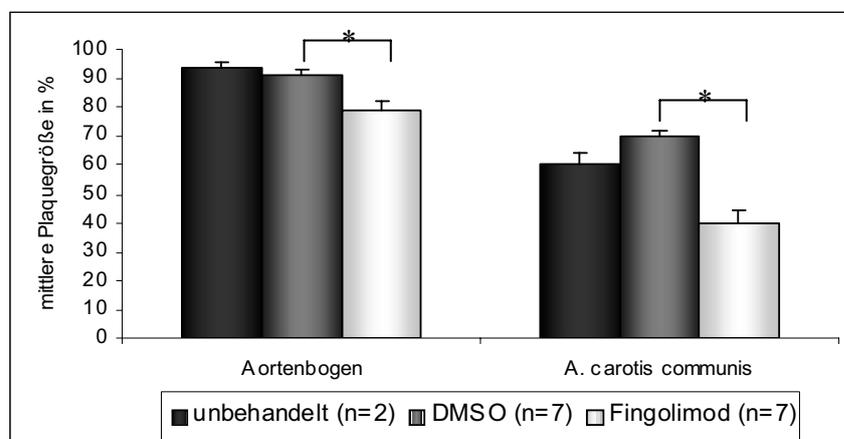
Bild 42 ApoE<sup>-/-</sup> Tiere; 11 Wochen Fingolimod- /DMSO-Behandlung und  
Cholesterinfutter; Leukozytenadhäsion pro mm<sup>2</sup> an der **Arteria carotis  
communis**; links die rollenden und rechts die fest adhärenen Leukozyten

Nach Beendigung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen, werden die Tiere getötet und der Aortenbogen sowie die beiden Carotiden zur Beurteilung der atherosklerotischen Veränderungen entnommen und mit Sudan III-Lösung angefärbt (siehe Bild 43).



**Bild 43 Links:** Aortenbogen und Arteria carotis communis einer mit DMSO behandelten ApoE<sup>-/-</sup> Maus, Sudan III-Färbung  
**Rechts:** Aortenbogen und Arteria carotis communis einer mit Fingolimod behandelten ApoE<sup>-/-</sup> Maus, Sudan III-Färbung

Bei der statistischen Auswertung der Daten zeigt sich eine signifikante Reduktion der Plaquesfläche bei Tieren, die über 11 Wochen mit dem S1P-Agonisten Fingolimod behandelt worden waren (siehe Bild 44).



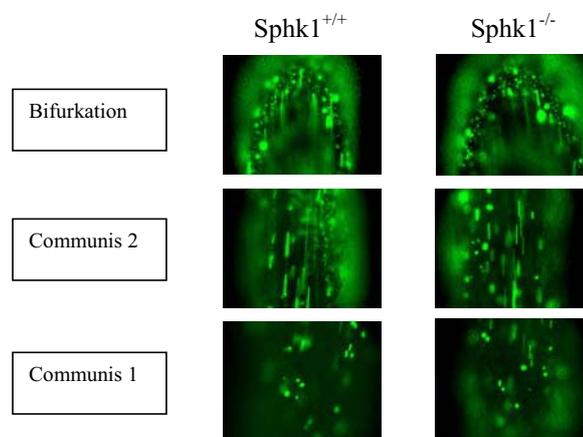
**Bild 44** ApoE<sup>-/-</sup> Tiere; 11 Wochen Fingolimod- /DMSO-Behandlung und Cholesterinfutter; mittlere Plaquesgröße in Prozent der Gesamtfläche an Aortenbogen und an der Arteria carotis communis

## 5.2 Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren in der arteriellen Thrombose

Zur Induktion einer arteriellen Thrombose erfolgt die Verletzung des Endothels mittels Denudation. Dann wird die Interaktion der Thrombozyten mit der freigelegten subendothelialen Matrix mittels Videofluoreszenzmikroskopie beurteilt. Dazu werden Blutplättchen eines Spendertieres isoliert, ex vivo mit dem Fluorophor 5(6)-CFDA angefärbt und über einen Venenkatheter in das Empfängertier injiziert. Nun wird die Anzahl der fest adhärenen Thrombozyten bestimmt, das Ausmaß der Aggregation von Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand berechnet, und die Ergebnisse statistisch bewertet.

### Vergleich von Sphk1<sup>+/+</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen

Durch den Vergleich von Sphk1-defizienten Tieren mit Kontrolltieren, soll die Einwirkung der Sphingosinkinase 1 auf die Mechanismen der arteriellen Thrombose demonstriert werden. Dazu wird zunächst die Anzahl einzelner fest adhärenen Thrombozyten im Bereich der Endothelverletzung ermittelt. Wie die intravitalmikroskopischen Bilder und das Diagramm zeigen, macht die Abwesenheit von Sphingosinkinase Typ 1 keinen Unterschied für die Thrombozytenadhäsion, im Vergleich zu den Mäusen mit intakter Sphk1 (siehe Bild 45 und Bild 46).



*Bild 45 intravitalmikroskopische Aufnahmen bei Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen: Thrombozytenadhäsion und -aggregation nach Denudation an drei Lokalisationen (Bifurkation, Communis 2, Communis 1)*

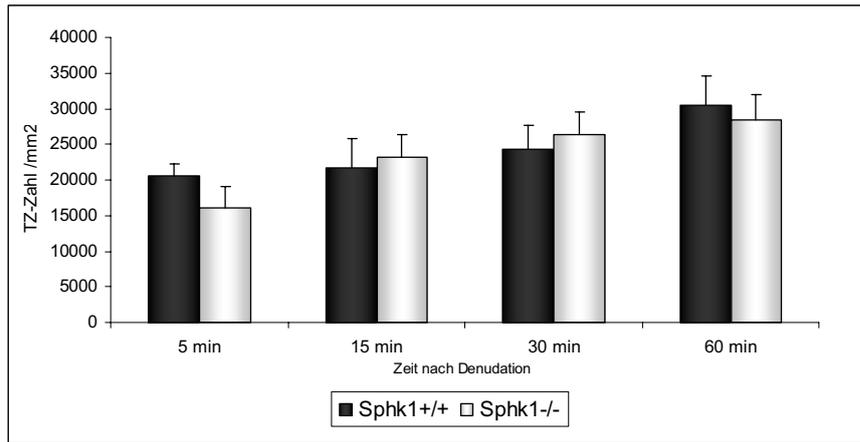


Bild 46 Vergleich  $Sphk1^{+/+}$  und  $Sphk1^{-/-}$  Tiere; Adhäsion einzelner Thrombozyten pro  $mm^2$  nach Denudation an der Arteria carotis communis

Im Gegensatz dazu zeigt sich in der Darstellung der Aggregationsfläche der Thrombozyten, eine Tendenz, dass die Neigung der Thrombozyten, sich aneinander zu lagern und einen Thrombus zu bilden, in den  $Sphk1$ -defizienten Mäusen, leicht gesteigert ist. Bei den Aufnahmen der Arteria carotis, die 60 Minuten nach Denudation erfolgt, ist dieser Unterschied statistisch signifikant (siehe Bild 47).

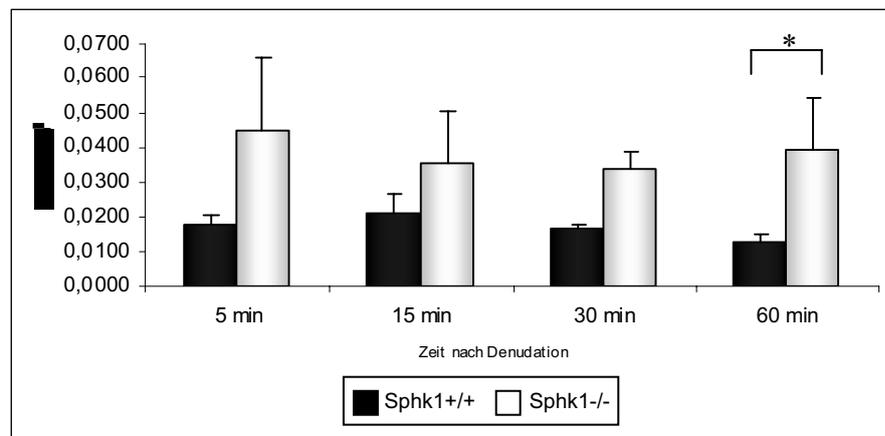


Bild 47 Vergleich  $Sphk1^{+/+}$  und  $Sphk1^{-/-}$  Tiere; Aggregationsfläche der Thrombozyten in  $mm^2$  nach Denudation an der Arteria carotis communis

### Behandlung von $Sphk1^{+/+}$ Mäusen mit den S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod und SEW 2871, und dem Lösungsmittel DMSO (Vehikel-Kontrolle)

Nächstes Ziel war es, den Einfluss von S1P-Rezeptoren auf die Regulationsmechanismen der arteriellen Thrombose aufzuzeigen. Dazu werden die Mäuse mit den S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod (bindet an  $S1P_{1,3-5}$ ) und SEW 2871 (bindet an  $S1P_1$ ) behandelt, und anschließend untersucht. Mittels Drahtverletzung wird die Endothelschicht in der Arteria carotis communis zerstört und die arterielle Thrombose initiiert. Die Behandlung mit den Agonisten erfolgt sowohl beim Empfänger- als auch beim Spendertier. Zusätzlich werden die präparierten und

gefärbten Thrombozyten mit Fingolimod bzw. SEW 2871 vorinkubiert. Dann erfolgt die Beurteilung der Thrombozytenadhäsion und –aggregation im denudierten Bereich des Gefäßes.

Wie die Ergebnisse der Fluoreszenzaufnahmen zeigen, wird die feste Adhäsion einzelner Blutplättchen sowohl durch Fingolimod, als auch durch SEW 2871 signifikant reduziert, wobei der Unterschied zu den Kontrolltieren bei der Fingolimodverabreichung deutlicher ist als bei der Applikation von SEW 2871 (siehe Bild 48).

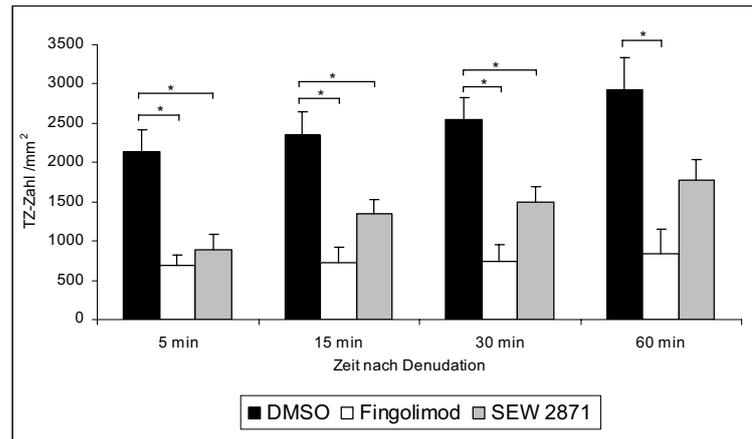


Bild 48 *Sphk1<sup>+/+</sup>* Mäuse behandelt mit Fingolimod, SEW 2871 oder DMSO; Thrombozytenadhäsion pro mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis

Die Analyse der Ergebnisse der Thrombozytenaggregation im Bereich der arteriellen Thrombose ergibt ein ähnliches Bild. Auch die Fläche, die durch aggregierte Blutplättchen an der exponierten subendothelialen Matrix eingenommen wird, ist durch Fingolimod-, ebenso wie durch SEW 2871-Medikation, deutlich reduziert. Aufgrund der hohen Standardabweichung bei den mit SEW 2871 behandelten Tieren, der Unterschied nicht signifikant (siehe Bild 49).

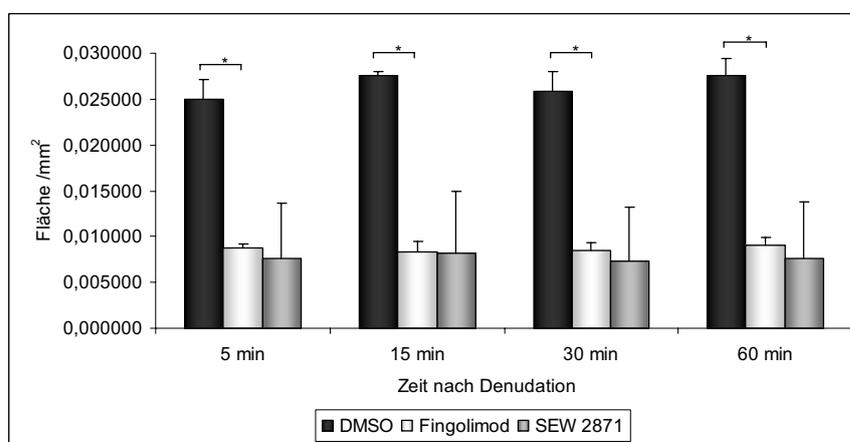


Bild 49 *Sphk1<sup>+/+</sup>* Mäuse behandelt mit Fingolimod, SEW 2871 oder DMSO; Aggregationsfläche der Thrombozyten in mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis

### 5.3 Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren für die Rekrutierung von eEPCs in der arteriellen Thrombose

Bei diesem Tiermodell wird die Rolle von S1P für die Regulation der Rekrutierung von T17b-Zellen an die durch Denudation verletzte Gefäßwand eruiert. Dazu werden T17b-Zellen ex vivo mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und dem Empfängertier über einen intravenösen Katheter injiziert. Die anhaftenden T17b-Zellen werden mittels Videofluoreszenzaufnahmen gezählt und ausgewertet.

#### Vergleich von Sphk1<sup>+/+</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen

Zunächst wird der Einfluss der Sphingosinkinase Typ 1 auf die Interaktion zwischen eEPCs und der freigelegten subendothelialen Matrix nach Gefäßwandverletzung untersucht. Dazu vergleicht man Mäusestämme mit ausgeknockter Sphk1 mit dem dazugehörigen Kontrollstamm und analysiert die Anzahl von am Thrombus adhären den T17b-Zellen im Bereich der Arteria carotis communis der Maus.

Stellt man die Ergebnisse der Versuche mit Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Tieren einander gegenüber, wird kein Unterschied ersichtlich. Die Rekrutierung der T17b-Zellen erfolgt bei beiden Mäusestämmen in gleicher Ausprägung (siehe Bild 50).

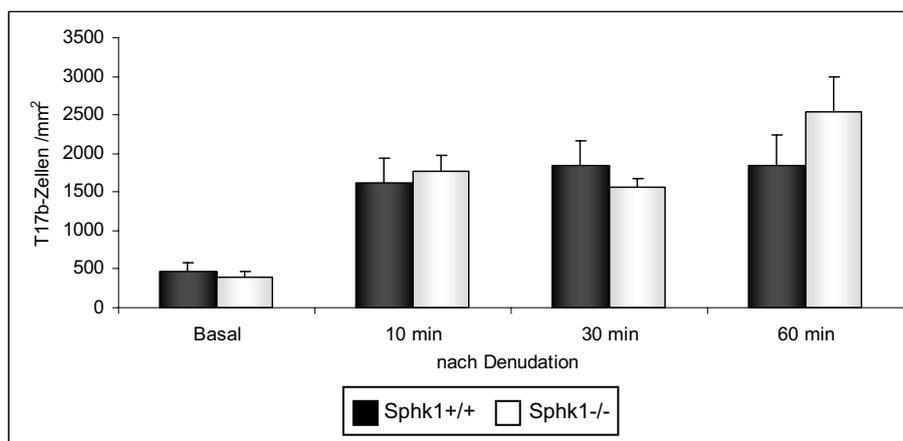


Bild 50 Vergleich Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Tiere; adhären te T17b-Zellen pro mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis

#### Behandlung von S1P<sup>+/+</sup> Mäusen mit den S1P-Agonisten Fingolimod und SEW 2871, und dem Lösungsmittel DMSO

Der Versuch wird in gleicher Weise mit Wildtyptieren wiederholt, wobei dieses Mal die Empfängermäuse mit den S1P-Agonisten Fingolimod und SEW 2871 vorbehandelt werden. Zusätzlich werden auch die präparierten T17b-Zellen vor Injektion in das zu untersuchende Tier mit den Agonisten vorinkubiert. Es schließt sich die intravitalmikroskopische Untersuchung der T17b-Zell-Interaktion in der Arteria carotis communis an.

Deutlich kann man erkennen, dass in diesem Versuchsmodell, SEW 2871 keinen Effekt auf die Rekrutierung der T17b-Zellen hat. Fingolimod hingegen, erhöht die Anzahl der an der verletzten Gefäßwand anhaftenden T17b-Zellen signifikant (siehe Bild 51).

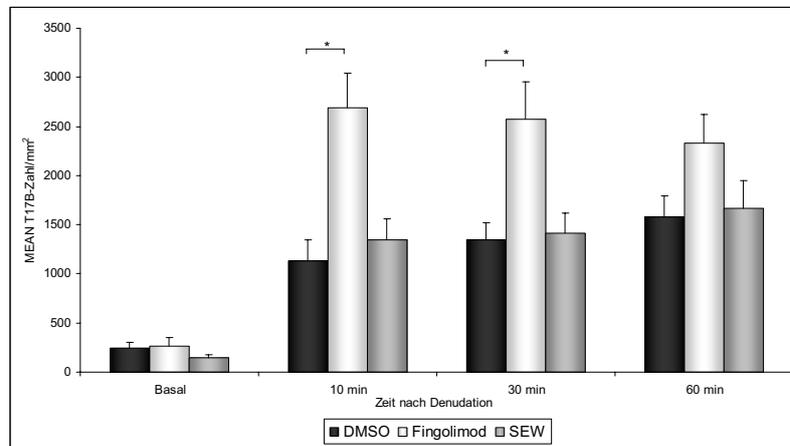


Bild 51 *Sphk1<sup>+/+</sup>* Mäuse behandelt mit Fingolimod, SEW 2871 oder DMSO; Anzahl der rekrutierten T17b-Zellen pro mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis

#### 5.4 Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren in der Regulation von Zell-Zell-Interaktionen und in der Neointimaformation nach Gefäßverletzung

Durch Drahtverletzung der Endothelschicht in der Arteria carotis communis wird initial eine Thrombose induziert. Im Verlauf kommt es zur Inflammation in der Gefäßwand und schließlich zur Neointimaprolieration. Im letzten Teil werden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gefäßverletzung videofluoreszenzmikroskopisch untersucht und anschließend geopfert. Beurteilt werden die Leukozytenadhäsion mit Hilfe der Videoaufnahmen am Tag der Verletzung, und die Dickenzunahme der Intima mittels histomorphometrischer Quantifizierung 7, 14, 21 und 28 Tage nach Verletzung. Verglichen werden *Sphk1<sup>+/+</sup>* und *Sphk1<sup>-/-</sup>* Tiere. Außerdem wird eine Wildtypgruppe nach der Denudation über sieben Tage mit Fingolimod behandelt.

Insgesamt ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tierstämmen mit und ohne funktionelle Sphingosinkinase Typ 1 (siehe Bild 52).

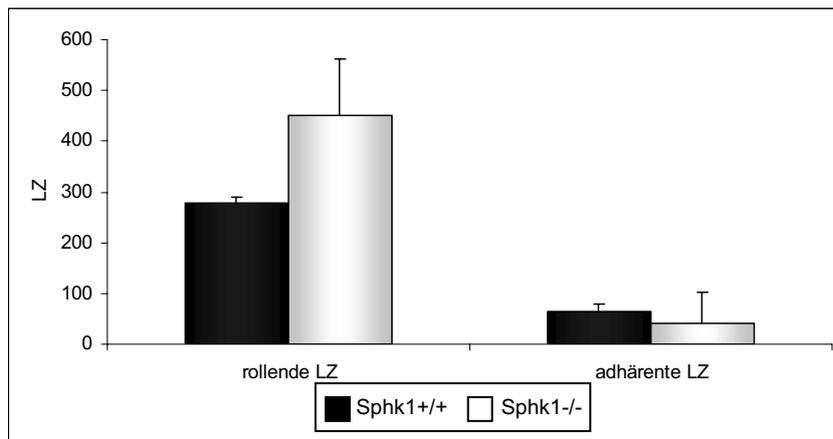


Bild 52 Vergleich  $Sphk1^{+/+}$  und  $Sphk1^{-/-}$  Tiere; rollende und adhärenente Leukozyten pro  $mm^2$  sieben Tage nach Denudation an der Arteria carotis

Auch die Quantifizierung der histologischen Schnitte zeigte im Ganzen keinen Unterschied zwischen den beiden Mäusestämmen. In zwei Versuchsgruppen (7 Tage und 14 Tage nach Denudation) gibt es zwar eine signifikante Reduktion der Neointimaformation, in den drei anderen Gruppen ist die Bildung von Neointima jedoch nahezu identisch. Auch die Behandlung mit Fingolimod nach erfolgter Denudation zeigte keinen Effekt auf die intimale Proliferation (siehe Bild 53)

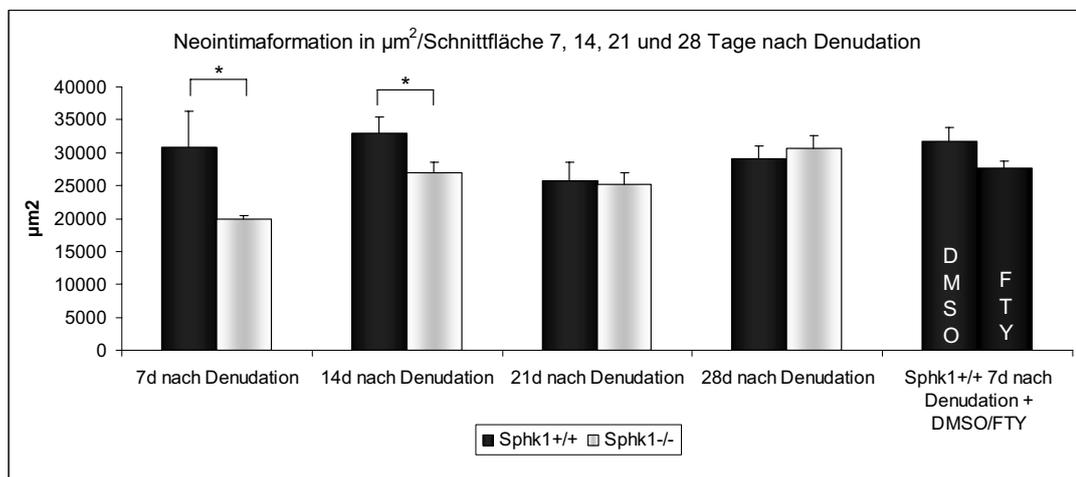


Bild 53 Vergleich  $Sphk1^{+/+}$  und  $Sphk1^{-/-}$  Tiere; Neointimaformation in  $\mu m^2$  pro Schnittfläche an Tag 7, 14, 21 und 28 nach Denudation an der Arteria carotis communis; rechts: Versuchsgruppe 7 Tage nach Denudation mit DMSO- und Fingolimod-Behandlung

## **5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit sollte die Relevanz des überwiegend durch Thrombozyten sezernierten Sphingosin-1-Phosphats für inflammatorische und proliferative Prozesse im Rahmen der Atherosklerose, der arteriellen Thrombose und des vaskulären Remodellings im Rahmen der Neointimaformation nach Verletzung der Gefäßwand genauer untersucht werden. Dazu wurden Zell-Interaktionen zwischen Thrombozyten, Leukozyten, eEPCs und der freigelegten subendothelialen Matrix mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung *in vivo* analysiert. Außerdem erfolgte die quantitative Auswertung der Plaquegröße mittels Sudan-III-Färbung in ApoE-defizienten Mäusen, und die histomorphometrische Ausmessung der Neointimabildung, anhand von histologischen Schnitten der Arteria carotis communis der Maus.

### **5.5.1 Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren in der Atherosklerose**

- a) Das vollständige Fehlen von Sphingosinkinase Typ 1 in allen Zellen, hat keinen Einfluss auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques am Aortenbogen und der Arteria carotis communis der ApoE-defizienten Maus.
- b) Die Behandlung der Versuchstiere mit Fingolimod (S1P<sub>1,3,5</sub>-Rezeptoragonist) bewirkt eine signifikante Reduktion der Leukozytenrekrutierung und der Plaquegröße an Aortenbogen und Arteria carotis communis der ApoE-defizienten Maus.

### **5.5.2 Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren in der arteriellen Thrombose**

- a) Das vollständige Fehlen von Sphingosinkinase Typ 1 in allen Zellen, hat keinen Einfluss auf die Adhäsion einzelner Thrombozyten an das mittels Drahtverletzung zerstörte Endothel.
- b) Das vollständige Fehlen von Sphingosinkinase Typ 1 in allen Zellen, bewirkt eine gesteigerte Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten im Bereich des verletzten Endothels.
- c) Die Behandlung der Versuchstiere mit Fingolimod (S1P<sub>1,3,5</sub>-Rezeptoragonist) bewirkt eine signifikante Reduktion der Anzahl von adhärierenden und aggregierenden Thrombozyten.
- d) Die Behandlung der Versuchstiere mit SEW 2871 (S1P<sub>1</sub>-Rezeptoragonist) bewirkt eine signifikante Reduktion der Anzahl von adhärierenden, und eine deutliche Reduktion der Anzahl aggregierender Thrombozyten (nicht so stark wie Fingolimod).

### **5.5.3 Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren für die Rekrutierung von eEPCs in der arteriellen Thrombose**

- a) Das vollständige Fehlen von Sphingosinkinase Typ 1 in allen Zellen, hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung von T17b-Zellen an das mittels Drahtverletzung zerstörte Endothel.
- b) Die Behandlung der Versuchstiere mit Fingolimod (S1P<sub>1,3-5</sub>-Rezeptoragonist) bewirkt einen signifikanten Anstieg der Anzahl von rekrutierten T17b-Zellen an das mittels Drahtverletzung zerstörte Endothel.
- c) Die Behandlung der Versuchstiere mit SEW 2871 (S1P<sub>1</sub>-Rezeptoragonist) hat keinen Einfluss auf die Anzahl von rekrutierten T17b-Zellen an das mittels Drahtverletzung zerstörte Endothel.

### **5.5.4 Rolle von Sphk1 und S1P-Rezeptoren in der Neointimaformation**

- a) Das vollständige Fehlen von Sphingosinkinase Typ 1 in allen Zellen, hat keinen Einfluss auf die Bildung von Neointima nach Drahtverletzung des Endothels.
- b) Die Behandlung der Versuchstiere mit Fingolimod (S1P<sub>1,3-5</sub>-Rezeptoragonist) hat keinen Einfluss auf die Bildung von Neointima nach Drahtverletzung des Endothels.

### **5.5.5 Schlussfolgerung**

Der nachgewiesenermaßen signifikant erniedrigte S1P-Plasmaspiegel bei der Sphk1-Knockoutmaus hat scheinbar keine Auswirkungen auf die Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen und die Rekrutierung von Leukozyten und T17b-Zellen im Rahmen der arteriellen Thrombose und die Proliferation von Intimazellen während des vaskulären Remodellings. Lediglich auf die Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten hat der erniedrigte S1P-Spiegel einen steigernden Effekt.

Die Bindung von Fingolimod an die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3-5</sub> hat einen starken hemmenden Einfluss auf die Rekrutierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und Leukozyten. Bei der T17b-Rekrutierung bewirkt Fingolimod das Gegenteil, es steigert die Anzahl der rekrutierten Zellen an das Endothel.

SEW 2871 hat über die Bindung an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor gleiche Effekte wie Fingolimod, wirkt aber insgesamt schwächer und hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung von T17b-Zellen. Dies legt die Beteiligung weiterer Rezeptoren zusätzlich zu S1P<sub>1</sub> nah.

## 6 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Sphingosin-1-Phosphat eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Thrombozyten, Leukozyten und T17b-Zellen an verletztes Endothel spielt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass, obwohl der Verlust der Sphingosinkinase Typ 1 zu einer signifikanten Erniedrigung des S1P-Plasmaspiegels führt, dies nahezu folgenlos für die Entwicklung der Atherosklerose, die Rekrutierung von Thrombozyten, Leukozyten und T17b-Zellen und auch für die Entstehung von Neointima nach Gefäßwandverletzung bleibt.

### 6.1 Wahl der Mäuselinien

In diesem Versuchsaufbau wird auf das Versuchstier Maus zurückgegriffen. Es gibt zahlreiche genetisch modifizierte Mäuselinien, die eine Untersuchung spezifischer Fragestellungen ermöglichen. Zur Durchführung der Intravitalmikroskopie ist die Maus aufgrund ihrer Größe geradezu prädestiniert. Die schnelle Aufzucht dieser Tiere und die niedrigen Haltungskosten sind weitere Vorteile für dieses Versuchsmodell. Schließlich gibt es gut etablierte Mausmodelle zur Initiierung einer arteriellen Thrombose, die für den hier gewählten Versuchansatz gut geeignet sind.

Der C57Bl6/J-Stamm dient in dieser Studie der Erzeugung eines Kontrollstamms für den Sphk1<sup>-/-</sup>-Stamm. Dieser besitzt als Hintergrundstamm die C57Bl6/J-Linie. Durch Kreuzung der beiden Stämme erhält man in der zweiten Generation Sphk1<sup>+/+</sup>-Tiere, die dann als Kontrollstamm für alle anderen verwendeten Mäusestämme erhalten. Anhand der Sphk1<sup>+/+</sup>-Tiere, wird das Modell zur Erzeugung der Neointima etabliert und die Kontrollwerte für Thrombozyten-, Leukozyten- und T17b-Zell-Rekrutierung, -adhäsion und -aggregation, sowie die Normwerte für die Entstehung von Neointima nach Gefäßwandverletzung ermittelt. Diese Ergebnisse dienen in den späteren Versuchen als Vergleichswerte zu den genetisch modifizierten Mäuselinien.

Als Modell für Atherosklerose wird in dieser Arbeit eine ApoE-defiziente Mäuselinie verwendet. Sie zeichnet sich durch einen deutlich erhöhten Cholesterol-Plasmaspiegel aus. Ab einem Alter von 3 Monaten findet man bei diesen Mäusen erste Anzeichen von atherosklerotischen Veränderungen in der proximalen Aorta. Mit zunehmendem Alter verstärkt sich das Erkrankungsbild der Atherosklerose und typische fortgeschrittene Läsionen entstehen. Durch die zusätzliche Fütterung eines cholesterolreichen Diätfutters wird die Ausprägung der Veränderungen zusätzlich verstärkt. Mit Hilfe der ApoE-Knockoutmäuse werden Richtwerte für die Plaquentstehung und die Leukozytenrekrutierung an das dysfunktionelle Endothel in verschiedenen Stadien der pathophysiologischen Entstehung der Atherosklerose bestimmt. Sie werden als

Kontrollwerte zu den genetisch modifizierten Mäuselinien verwendet. Die ApoE-Knockoutmaus ist problemlos in der Zucht, entwickelt aber mit steigendem Alter entzündliche Hautveränderungen mit Juckreiz.

Zur Erforschung der Bedeutung der Sphingosinkinase Typ 1 (Sphk1) für inflammatorische und proliferative Prozesse an der denudierten bzw. atherosklerotisch veränderten Gefäßwand wird ein Sphk1-Knockoutstamm verwendet. Charakteristisch ist hier das Fehlen der Sphk1 in allen Zellen der Tiere. Studien haben gezeigt, dass bei diesen Tieren der S1P-Plasmaspiegel signifikant erniedrigt ist<sup>65</sup>. Die Tiere lassen sich dennoch problemlos züchten und zeigen keine phänotypischen Abweichungen.

Um schließlich die Rolle der Sphingosinkinase Typ 1 bei der Entstehung der Atherosklerose analysieren zu können, werden die beiden Stämme ApoE<sup>-/-</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> gekreuzt und eine Doppelknockoutlinie generiert. Als Kontrollgruppe dienen Sphk1<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere.

## **6.2 Tiermodell der arteriellen Thrombose**

Da im arteriellen System die Thrombusbildung immer mit einer Endothelverletzung und Plättchenaktivierung einhergeht, ist für alle arteriellen Thrombosemodelle die Zerstörung der intakten Endothelschicht die Methode der Wahl. Dazu werden unterschiedliche Verfahren, basierend auf mechanischer, elektrischer, photochemischer oder chemischer Verletzung, angewandt.

In der vorliegenden Arbeit wird auf das bestehende Denudationsmodell zur Induzierung einer arteriellen Thrombose zurückgegriffen. Erstmals wird diese Methode, bei der ein flexibler Draht in die Arteria carotis communis eingeführt und die Endothelzellen durch mehrmaliges Drehen komplett zerstört werden, von Lindner et al. beschrieben<sup>66</sup>. Der großzügige Endothelschaden führt zur Plättchenadhäsion und -aggregation und zur muralen Thrombose. Meist kommt es zum raschen Verschluss der Arteria carotis communis durch einen wandständigen Thrombus und zur anschließenden Rekanalisierung des Gefäßes. Zur Durchführung der Versuche in dieser Arbeit wird das Denudationsmodell nach Lindner leicht modifiziert. Die Stärke des endothelialen Schaden wird so gewählt, dass es nicht zum Verschluss des Gefäßes kommt. Dazu wird der Draht nicht gedreht, sondern in der Arterie vor- und zurückgeschoben. So bleibt der Blutfluss während der gesamten Untersuchungszeit erhalten und diverse zelluläre Prozesse, wie Zelladhäsion, -migration und -proliferation können zeitnah und im Detail beurteilt werden.

### **6.3 Tiermodell der Neointimaformation**

Auch bei der Induktion der Formation von Neointima nach endothelialer Verletzung bedient man sich des oben beschriebenen modifizierten Drahtmodells. Diese Methode ist kliniknah und kommt der Situation bei der Katheterisierung von Herzkranzgefäßen sehr nahe. Durch Einführen des flexiblen Drahtes in die Arteria carotis communis wird die Endothelschicht der Gefäßwand möglichst gleichmäßig zerstört. Die Bewegung des Drahtes und die Durchführung der Operation müssen immer exakt gleich sein um die Varianz der Läsionen möglichst gering zu halten. Kurz nach erfolgter Denudation wird der endotheliale Defekt durch die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten abdeckt. Es kommt bald zur Thrombusorganisation. Nach einigen Tagen proliferieren glatte Muskelzellen aus der Tunica media und die Formation von Neointima beginnt. Das vaskuläre Remodelling und die Reendothelialisierung mit Herstellung des normalen Gefäßlumens können Wochen bis Monate dauern. Aus diesem Grund werden in dem hier verwendeten Tiermodell vier Zeitpunkte gewählt an denen die Dickenzunahme der Tunica intima analysiert wird. So erfolgt die Organentnahme in jeweils einer Gruppe nach 7, 14, 21 und 28 Tagen, nachdem die Arteria carotis communis denudiert wurde. Ein Nachteil an diesem Tiermodell ist, dass die Bildung der Neointima nur in sehr geringem Maße induziert wird. Meist sieht man Neointimaformation nur an den Stellen des Gefäßes, an denen die Membrana elastica interna verletzt wurde. Wahrscheinlich lässt sich das Ausmaß der Intimaproliferation durch eine stärkere Verletzung der Endothelschicht verbessern. Leider stellt sich dann das Problem der vollständigen Okklusion des Gefäßes. Ohne Rekanalisierung bleibt die Arterie verschlossen und die Neointimaformation kann nicht beurteilt werden. Kritisch zu betrachten ist auch die Wahl der gewählten Lokalisation für die Induktion der Neubildung von Intima. Die Arteria carotis communis der Maus stellt scheinbar ein Gefäß dar, in dem es nur in geringem Maß zur Proliferation der Intima nach Endothelschaden kommt. Eine Alternative in diesem Fall ist die Denudation der Femoralisarterie der Maus. In neueren Studien zeigt sich an dieser Lokalisation eine deutlicher ausgeprägte Neointimaformation nach Drahtverletzung als an der Arteria carotis communis<sup>67</sup>.

### **6.4 Die Rolle der Sphk1 für die Regulation von inflammatorischen und proliferativen Prozessen nach arterieller Gefäßwandverletzung und in der Atherogenese**

Durch den Vergleich von Sphingosinkinase 1-defizienten Mäusen mit den dazugehörigen Kontrollstämmen sollte die Funktion der Sphingosinkinase Typ 1 bei der Regulation der inflammatorischen und proliferativen Prozesse nach arterieller Gefäßwandverletzung und während der Atherogenese genauer untersucht werden.

Bei der Sphingosinkinase 1-Knockoutmaus fehlt die Sphingosinkinase 1 (Sphk1) in allen Zellen. Neuere Studien haben gezeigt, dass bei dieser Mauslinie der S1P-Plasmaspiegel signifikant um etwa 65% erniedrigt ist. Es scheint, dass die Sphk1-

Aktivität ein entscheidender Faktor für den S1P-Level im Blut darstellt<sup>42</sup>. Fehlen beide Sphingosinkinasen in den Zellen, sind die Tiere nicht überlebensfähig. Fehlt nur eine der beiden Kinasen, kommt es unter physiologischen Bedingungen, phänotypisch zu keiner Veränderung im Gefäßsystem der Maus<sup>25</sup>.

Bei den Versuchsmodellen zur Atherosklerose und Neointimaformation zeigten sich zwischen Sphk1<sup>-/-</sup> und Sphk1<sup>+/+</sup> Tieren keine Unterschiede in Bezug auf Leukozyten- und EPC-Rekrutierung und -Adhäsion, und Schweregrad der atherosklerotischen Veränderungen bei der ApoE-defizienten Maus. Man kann also prinzipiell davon ausgehen, dass die Produktion von S1P durch die Sphingosinkinase Typ 2 hier noch ausreichend erfolgt, um die untersuchten physiologischen und pathophysiologischen Prozesse in der Atherosklerose und bei der Neointimaformation, nicht zu beeinflussen.

Auffällig ist, dass der reduzierte S1P-Plasmaspiegel der Sphk1<sup>-/-</sup> Maus, offensichtlich Einfluss auf die Aggregationseigenschaften der Thrombozyten hat. Die Auswertung der Videofluoreszenzaufnahmen ergibt eine signifikante Zunahme der Aggregationsfläche der Thrombozyten an der verletzen Gefäßwand 60 Minuten nach Denudation bei den Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen. Dies würde bedeuten, dass die Anwesenheit von S1P die Aggregation der Thrombozyten hemmt. Möglicherweise wird dieser Mechanismus sehr sensibel reguliert und reagiert auf Änderungen der S1P-Konzentration früher als die anderen untersuchten Mechanismen, wie etwa die Thrombozytenadhäsion. Man sollte allerdings beachten, dass die hohen Standardabweichungen der Ergebnisse auf große Schwankungen bei der Auswertung hindeuten.

## **6.5 Die Rolle der Sphk1 und der S1P-Rezeptoren für die Regulation der Atherogenese**

In klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass HDL (high-density lipoprotein) ein eigenständiger Faktor bei der Vorbeugung von koronaren Herzerkrankungen ist<sup>68</sup>. Verschiedene gut dokumentierte Funktionen des HDL sprechen für dessen antiatherosklerotischen Effekt. Eine der wichtigsten ist die Fähigkeit des HDL, Cholesterin von der Peripherie zur Leber zu transportieren, und so die Ablagerung an der Arterienwand zu verhindern. Weitere atheroprotektive Eigenschaften des HDL sind zudem seine antioxidative und antiinflammatorische Aktivität. Vor einigen Jahren konnte demonstriert werden, dass HDL-assoziierte Lysophospholipide wie zum Beispiel das Sphingosin-1-Phosphat, wahrscheinlich als potente antiinflammatorische Substanzen wirken. Man nimmt an, dass HDL-assoziiertes S1P die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) aktivieren und dadurch die Freisetzung von NO (Stickstoffmonoxid) triggern kann, wobei NO ein antiinflammatorisches und antiatherosklerotisches Signalmolekül darstellt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass S1P die Permeabilität der Endothelschicht stark herabsetzt. Dadurch wird das Einwandern von Zellen in die Intima deutlich erschwert und so das Fortschreiten der Atherosklerose verzögert. Ein weiterer Punkt ist die durch endotheliale Dysfunktion

hervorgerufene Apoptose von Endothelzellen, die bei der Pathogenese der Atherosklerose eine Schlüsselrolle spielt. Hier zeigte sich, dass die Anwesenheit von S1P einen antiapoptotischen und damit ebenso antiatherosklerotischen Effekt besitzt (siehe 2.8.4) <sup>25</sup>.

Ein weiterer Bestandteil atherosklerotischer Läsionen sind die vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs). Auch diese Zellen besitzen verschiedene S1P-Rezeptoren. Auffällig ist, dass im Bereich von atherosklerotischen Läsionen der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor der VSMCs verhältnismäßig stark exprimiert wird, wobei dessen Stimulation zur gesteigerten Migration der glatten Muskelzellen führt. Der aktivierte S1P<sub>2</sub>-Rezeptor dagegen, bewirkt genau das Gegenteil, nämlich eine Hemmung der Migration der VSMCs (siehe 2.8.5) <sup>25</sup>.

In den hier durchgeführten Versuchen wurden ApoE<sup>-/-</sup> Tiergruppen über 11 Wochen mit dem S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod behandelt. Die Ergebnisse zeigten eine eindeutige Verbesserung der klinischen Ausprägung der Atherosklerose. Fingolimod bindet, nach Phosphorylierung zu Fingolimod-P, an die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3-5</sub>. Über die Aktivierung von S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> auf den Endothelzellen führt es zu einer herabgesetzten Permeabilität des Endothels. Die zellprotektive Wirkung von Fingolimod-P durch Aktivierung der eNOS, wird vornehmlich über die Bindung an den endothelialen S1P<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt. Außerdem bewirkt Fingolimod-P eine Reduktion der Thrombozytenadhäsion an geschädigtes Endothel, was in der Initialphase der Atherosklerose von Bedeutung sein kann. Die hierbei beteiligten S1P-Rezeptoren und Mechanismen sind bisher nicht bekannt, allerdings können auch hier die Stimulierung der eNOS und der antiadhäsive Effekt von NO eine Rolle spielen. Insgesamt zeigte die Auswertung eine signifikante Reduktion der Leukozytenrekrutierung an das dysfunktionelle Endothel der ApoE<sup>-/-</sup>Maus ebenso wie eine signifikant herabgesetzte Plaqueentwicklung, so dass hier sicherlich ein therapeutischer Ansatz für Fingolimod in der Atherosklerosebehandlung besteht. Ein entscheidender Nachteil der Fingolimod-Dauerbehandlung ist allerdings seine über S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren vermittelte bradykarde Wirkung.

## **6.6 Die Rolle der Sphingosin-1-Phosphat und S1P-Rezeptoren für die Regulation der Thrombozytenadhäsion und -aggregation nach arterieller Gefäßwandverletzung**

Der in diesem Versuchsmodell eingesetzte S1P-Rezeptoragonist Fingolimod kann in vielfältiger Weise auf die Zellen des Gefäßsystems einwirken. Das besondere Interesse dieser Arbeit lag auf der Klärung der Rolle von Sphingosin-1-Phosphat bei der Regulation von zellulären Mechanismen und molekularen Signalwegen während der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten im Bereich einer endothelialen Gefäßverletzung. Fingolimod-P ist prinzipiell ein Aktivator der Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3-5</sub> und wirkt hier als S1P-Rezeptoragonist <sup>41</sup>. Gleichzeitig ist bekannt, dass die

Bindung von Fingolimod-P an den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor von Lymphozyten, zu einer Internalisierung der Rezeptoren führt. In diesem Fall hat Fingolimod-P einen antagonistischen Effekt<sup>25</sup>. Schließlich bewirkt Fingolimod-P eine Hemmung der S1P-Lyase, welche dem Abbau von S1P dient<sup>43</sup>. Dadurch steigt die S1P-Konzentration, was einer S1P-agonistischen Wirkung von Fingolimod entspricht. SEW 2871 ist ein spezifischer S1P<sub>1</sub>-Rezeptoragonist, und wird in den Versuchen in gleicher Weise wie das Fingolimod eingesetzt.

Die Behandlung von Sphk1<sup>+/+</sup> Mäusen mit Fingolimod führt in den hier gezeigten Versuchen zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenadhäsion und –aggregation. Die Ergebnisse bei den mit SEW 2871 behandelten Tieren zeigen die gleichen Effekte in weniger starker Ausprägung. Welche S1P-Rezeptoren auf Thrombozyten exprimiert werden ist bisher nicht im Detail bekannt. Aus den hier gezeigten Resultaten lässt sich schließen, dass die Stimulation von S1P<sub>1</sub>-Rezeptoren mittels SEW 2871, einen deutlich hemmenden Effekt auf die Thrombozytenadhäsion und –aggregation an das verletzte Endothel besitzt. Der stärkere Effekt von Fingolimod im Vergleich zu SEW 2871 lässt sich durch die zusätzliche Stimulierung der Rezeptoren S1P<sub>3-5</sub> durch Fingolimod erklären. Um die genaue Beteiligung der Rezeptoren herausfinden zu können, muss zunächst geklärt werden, welche S1P-Rezeptoren von Thrombozyten exprimiert werden. Dann erst kann eine weitere Differenzierung mit Hilfe von Rezeptorknockoutmäusen oder anderen spezifischen S1P-Agonisten oder –Antagonisten erfolgen.

## **6.7 Die Rolle von Sphingosin-1-Phosphat und S1P-Rezeptoren für die Regulation der Rekrutierung von eEPCs nach arterieller Gefäßwandverletzung**

Endothelzellen besitzen auf ihrer Oberfläche die S1P-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>. Bei der T17b-Zelllinie handelt es sich um murine embryonale endotheliale Progenitorzellen. Das besondere der Endothelzellen der Maus ist, dass sie nur die Rezeptoren S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> besitzen. Dies konnte durch unsere Versuche mit dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptoragonist SEW 2871 bestätigt werden. Bei Vorbehandlung der Mäuse mit SEW 2871 ergab sich kein Unterschied bei der Rekrutierung von T17b-Zellen an die verletzte Gefäßwand im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Gegensatz dazu führt die Medikation mit Fingolimod zu einem signifikanten Anstieg der rekrutierten T17b-Zellen. Da die murine Zelllinie nur die Rezeptoren S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> exprimiert, während Fingolimod an die Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3-5</sub> bindet, kann dieser Effekt nur durch die Stimulation des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors hervorgerufen werden. Fingolimod reduziert die Anzahl von adhärenenten Thrombozyten an der Verletzung. Gleichzeitig bewirkt es eine gesteigerte Rekrutierung von T17b-Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass interessanterweise der Mechanismus der T17b-Zell-Rekrutierung nicht alleine auf die Anwesenheit von Thrombozyten angewiesen zu sein scheint. S1P vermittelt

folglich, über die Aktivierung von endothelialen S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren, die Rekrutierung von murinen T17b-Zellen nach arterieller Gefäßwandverletzung, unabhängig von der Aktivität der Thrombozyten. Dabei funktioniert S1P als chemischer Lockstoff und aktiviert über G<sub>i</sub>-Proteine die Proteinkinase B, welche für die chemotaktische Antwort der Endothelzellen verantwortlich ist<sup>25</sup>. Die endothelialen Progenitorzellen haben dabei eine besondere Bedeutung für die Reendothelialisierung im verletzten Gefäß, und können die Bildung neointimaler Hyperplasien hemmen.

## **6.8 Die Rolle der Sphingosin-1-Phosphat und S1P-Rezeptoren für die Regulation der Neointimaformation nach arterieller Gefäßwandverletzung**

Ein großes Problem nach angioplastischen Eingriffen ist die überschießende Wundheilung und daraus resultierende Restenose bei bis zu 35 Prozent der Patienten, ausgelöst durch die Zerstörung von Endothelzellen. Wie weiter oben beschrieben, besitzt S1P zahlreiche Effekte auf Endothelzellen, angefangen bei der Steigerung der Endothelpermeabilität über die Aktivierung der eNOS bis hin zu chemotaktischen Eigenschaften bei der Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen.

Bei der Entstehung von postangioplastischen Restenosen, kommt es zu einer exzessiven Proliferation von glatten Muskelzellen (SMC) in der Tunica intima des Gefäßes. Wie oben bereits erwähnt, hat die Reduktion des S1P-Plasmaspiegels in Sphingosinkinase 1-Knockout Tieren keinen Einfluss auf die Dickenzunahme der Intima nach endothelialer Verletzung. Durch die Behandlung von Sphk1<sup>+/+</sup> Tieren mit dem S1P-Rezeptoragonisten Fingolimod, sollte in der vorliegenden Studie die Rolle der S1P-Rezeptoren für die proliferativen Prozesse an der denudierten Gefäßwand eruiert werden. Glatte Muskelzellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche die Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>. Studien haben gezeigt, dass die Stimulierung der S1P<sub>1</sub> Rezeptoren über die Aktivierung von G<sub>i</sub>-Protein die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen steigert. Die Bindung an S1P<sub>2</sub>-Rezeptoren hat den gegenteiligen Effekt und hemmt die Proliferation und Migration von SMCs. Auf adulten glatten Muskelzellen wird überwiegend der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor exprimiert während auf jugendliche Zellen vermehrt S1P<sub>1</sub> vorkommt<sup>25</sup>. So wird bei Vorhandensein von S1P die immature SMC zu Migration und Proliferation stimuliert, wohingegen die adulten glatten Muskelzellen die Intimaproliferation eher hemmen. Fingolimod kann auf den SMCs sowohl S1P<sub>1</sub> als auch S1P<sub>3</sub> stimulieren. Bei der Behandlung der Mäuse mit Fingolimod ist kein Effekt auf die Neointimaformation nach endothelialer Verletzung festzustellen. Ein möglicher Grund dafür ist die reduzierte Expression von S1P<sub>1</sub>-Rezeptoren auf den adulten glatten Muskelzellen, so dass Fingolimod möglicherweise keine Wirkung auf diese Zellen ausübt. Um weitere Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen und die Rezeptorbeteiligung muss in diesem Zusammenhang außerdem die Funktion des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors genauer abgeklärt werden.

## 6.9 Schlussfolgerung

Man kann sagen, dass S1P und dessen pharmakologische Pendant Fingolimod und SEW 2871, starke Effekte auf entzündliche Mechanismen im Gefäßsystem, und auf für die Entstehung der Atherosklerose hat. Die Regulation dieser Effekte erfolgt in der Regel über die Rezeptoren S1P<sub>1-3</sub>. Teilweise ist es schwierig den spezifischen Rezeptor des zellulären Targets für einzelne Effekte von S1P-Modulatoren herauszufinden. Dafür gibt es mehrere Gründe. Zum einen gab es bis vor kurzem keine spezifischen Agonisten oder Antagonisten für die einzelnen Rezeptoren, zum anderen bestehen viele komplexe Interaktionen zwischen S1P-Rezeptoren und anderen Rezeptorklassen, wodurch die Interpretation über präzise Mechanismen der S1P-Aktionen sehr schwierig wird<sup>25</sup>. Dass die Ergebnisse einzelner Studien zum Thema S1P teilweise divergieren, lässt sich außerdem durch die unterschiedlichen verwendeten Tiermodelle und Zelllinien erklären. Des Weiteren ist bekannt, dass das Expressionsmuster der Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch Faktoren wie Blutfluss, Zytokine und S1P-Plasmaspiegel stark beeinflusst wird und die Bedeutung von S1P davon abhängt, ob es frei vorliegt, oder an Lipo- oder Plasmaproteine gebunden ist<sup>25</sup>.

## 6.10 Ausblick

Grundlage für alle prophylaktischen und therapeutischen Interventionen bei der Atherosklerose, der arteriellen Thrombose und bei der Restenosierung durch Neointimaformation im Organismus, ist das umfangreiche Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen und Signalwege.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben einen ersten Einblick in die Wirkungsweise von S1P bei der Regulation zellulärer und molekularer Mechanismen bei inflammatorischen und proliferativen Prozessen nach arterieller Gefäßwandverletzung und am dysfunktionellen Endothel. Aufgrund der Vielfalt an S1P-Rezeptoren und der unterschiedlichen Expression dieser Rezeptoren auf einzelnen Zelltypen, sowie der Interaktion mit anderen Rezeptorklassen sind die Effekte von S1P im Gefäßsystem sehr vielgestaltig und komplex.

Durch die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe wie die spezifischen S1P-Antagonisten JTE-013 (S1P<sub>2</sub>) oder VPC-44116 (S1P<sub>1</sub>) eröffnen sich neue Möglichkeiten für die weitere Erforschung der Signalwege und Wirkmechanismen der S1P-Rezeptoren. Auch wurden inzwischen S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>4</sub>-Rezeptorknockoutmäuse generiert, die zusätzliche Einblicke bei der Erforschung der Funktion von S1P ermöglichen.

## 7 Zusammenfassung

Die exakten molekularen und zellulären Mechanismen die zur Entstehung der Atherosklerose, der arteriellen Thrombose und zur Intimaproliferation nach Zerstörung endothelialer Zellen führt, sind nach wie vor nur unzureichend verstanden. Die Folgen wie Herzinfarkt und Schlaganfall sind auch in der heutigen Zeit noch für die Hälfte aller Todesfälle verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit werden daher Atherosklerosemodelle und eine Denudationsmethode zur Erzeugung arterieller Thrombosen verwendet, um zelluläre und molekulare Details in den verschiedenen pathologischen Zuständen nachvollziehen zu können.

Anhand der ApoE-Knockout Maus, die ein etabliertes Modell für die manifeste Atherosklerose darstellt, wurde der Einfluss von Sphingosinkinase 1 (Sphk1) und den Sphingosin-1-Phosphat (S1P) -Rezeptoren auf die Atherogenese näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein erniedrigter S1P-Plasmaspiegel, wie er bei der Sphk1<sup>-/-</sup> Maus vorliegt, keinen Einfluss auf das Fortschreiten der Gefäßerkrankungen hat. Die Behandlung von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit dem S1P-Rezeptoragonist Fingolimod, führte zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsverlaufs mit signifikant geringerer Bildung atherosklerotischer Plaques.

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchung der Rolle von Sphk1 und der S1P-Rezeptoren bei der arteriellen Thrombose zeigte sich, dass die herabgesetzte S1P-Konzentration im Plasma der Sphk1<sup>-/-</sup> Maus zu einer gesteigerten Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand führt.

Die Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit Fingolimod und SEW 2871 führte demgegenüber zu einer deutlichen Reduzierung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation über die Aktivierung von S1P<sub>1,3,5</sub>- bzw. S1P<sub>1</sub>- Rezeptoren. Welche genauen thrombozytären S1P-Rezeptoren hierbei eine Rolle spielen, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Die Verabreichung von Fingolimod führte wie bereits erwähnt zu einer reduzierten Thrombozytenadhäsion. Gleichzeitig erhöht sich aber die Anzahl der rekrutierten embryonalen endothelialen Progenitor Zellen (T17b) durch die Stimulierung von endothelialen S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren signifikant. S1P fördert somit, wahrscheinlich auf chemotaktischem Weg, die Migration von endothelialen Progenitorzellen in den Bereich des verletzten Gefäßes.

Analysiert man die Ergebnisse der Versuche zur Entstehung von Restenosen nach Zerstörung endothelialer Zellen, zeigt sich, dass weder eine niedrige S1P-Konzentration bei Sphk1<sup>-/-</sup>-Tieren, noch die Behandlung von Wildtyp-Tieren mit Fingolimod einen

Effekt auf die Neointimabildung hat. Hier müssen zusätzliche Untersuchungen erfolgen, um beispielsweise die Rolle der S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen beurteilen zu können. Interessant wäre auch die Arbeit mit S1P<sub>2</sub>-defizienten Mäusen, da in diesem Mausmodell die Proliferation von glatten Muskelzellen übermäßig leicht induziert werden kann.

Zusammenfassend zeigen die hier erarbeiteten Ergebnisse, dass S1P und die dazugehörigen S1P-Rezeptoren starke Effekte auf entzündliche und proliferative Prozesse im Gefäßsystem, und auf die Entstehung der Atherosklerose haben. Gerade Fingolimod als Immunmodulator findet bereits therapeutischen Einsatz beispielsweise bei der Behandlung der Multiplen Sklerose. Hier sollten dringend weitere Studien erfolgen, um neue prophylaktische und therapeutische Strategien zu entwickeln.

## 8 Summary

Recruitment of platelets, leukocytes and endothelial cells to the injured vessel wall – the role of the lipidmediator sphingosine 1-phosphate

The detailed molecular and cellular mechanisms that lead to the development of atherosclerosis, arterial thrombosis and neointimaformation after endothelial injury are not yet very well understood. Currently the consequences of atherosclerosis such as heart attack and stroke are the main causes of death in the industrialised nations. Therefore models of atherosclerosis and arterial thrombosis are used in the present study to analyse cellular and molecular processes that contribute to the different pathological situations *in vivo*. Specifically we focus on the role of S1P and its receptors on the development of atherosclerotic lesions, the appearance of arterial thrombus at sites of dysfunctional vessel wall or ruptured plaques and the healing of the injured endothelial layer in the form of media proliferation and neointima formation.

By using ApoE-deficient mice, which represents a well characterized model of manifest atherosclerosis, the influence of sphingosine 1-phosphate (S1P) and its receptors in atherogenesis was examined. We found that a decreased S1P-concentration in plasma, which is found in sphingosinekinase 1 (sphk1) -deficient mice, has no influence on the development of atherosclerotic vascular lesions. When we treated ApoE-deficient mice with the S1P-receptor agonist Fingolimod, we observed an improved course of the disease and a significant reduction of the atherosclerotic plaques.

Next we examined the effects of S1P and its receptors in arterial thrombosis. The findings show that the reduced S1P-level in Sphk1-deficient mice leads to an increased number of adherent platelets and platelet aggregates at sites of vascular injury.

Then we treated wild type mice with the S1P-agonists Fingolimod (S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3-5</sub>) or SEW 2871 (S1P<sub>1</sub>). We found a significant reduction of thrombocyte adhesion and aggregation following vessel injury.

Finally we defined the role of S1P and the S1P-receptors for the recruitment of embryonic endothelial progenitor cells (T17b) to sites of arterial injury. While treatment with Fingolimod reduced thrombocytic adhesion, the amount of recruited T17b-cells was significantly elevated presumably by stimulating the S1P<sub>3</sub>-receptor on the endothelial progenitor cells. Thus S1P enhances the migration of endothelial progenitor cells to the injured vessel wall probably in a chemotactic manner.

When we determined the role of S1P and the S1P-receptors in neointima formation after endothelial deletion, neither a reduced plasmatic S1P-level in Sphk1<sup>-/-</sup> mice nor the treatment with Fingolimod showed any effect on the proliferation of the intimal tissue.

This suggests differential, presumably diverse effects of S1P signalling in different cell types involved in this process.

To summarize, our results show that S1P and the S1P-receptors have strong effects on inflammatory and proliferative processes in the diseased vascular system and in atherogenesis. Further research has to be done to see whether Fingolimod might serve as a new prophylactic and therapeutic strategy to prevent cardiovascular diseases.

## 9 Abkürzungen

5(6)-CFDA:	5(6)-Carboxyfluoreszein Diazetat
A.:	Arteria
Abb.:	Abbildung
AC:	Adenylatcyclase
ADP:	Adenosindiphosphat
ApoE:	Apolipoprotein E
ATP:	Adenosintriphosphat
BCL-2:	B cell lymphoma gene 2
bzw.:	beziehungsweise
CD:	cluster of differentiation
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
eEPC:	embryonale endotheliale Progenitorzelle
EGF:	endothelial growth factor
eNOS:	endotheliale NO-Synthase
EPC:	endotheliale Progenitorzelle
ERK:	extracellular signal-related kinase
FCS:	fetal calf serum
FGF-2:	fibroblast growth factor-2
GCSF:	granulocyte colony stimulating factor
GMCSF:	granulocyte macrophage colony stimulating factor
Gp:	Glykoprotein
HDL:	high density lipoprotein
H.E.:	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1:	hypoxia-inducible factor-1

HLA:	human leucocyte antigen (früher MHC)
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule-1
IFN:	Interferon
Ig:	Immunglobulin
KDR:	kinase insert domain receptor
IL:	Interleukin
LDL:	low density lipoprotein
MCP-1:	monocyte chemoattractant protein-1
MPS:	mononukleäres phagozytotisches System
NO:	Stickstoffmonoxid
OP:	Operation
PBS:	phosphate buffered saline
PDGF:	platelet derived growth factor
PECAM-1:	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PI3:	Phosphoinositol 3
PKB:	Proteinkinase B
PRP:	platelet rich plasma
PSGL-1:	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTCA:	perkutane transluminale coronare Angioplastie
RANTES:	regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted chemokine
RES:	Retikuloendotheliales System
RNA:	Ribonukleinsäure
S1P:	Sphingosin-1-Phosphat
SDF-1:	stromal cell-derived factor-1
SK:	Sphingosinkinase
SMC:	smooth muscle cell
SPL:	Sphingosin-1-Phosphat-Lyase
TGF- $\beta$ :	transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$ :	Tumornekrosefaktor $\alpha$
tPa:	Gewebsthromboplastinaktivator

VAA:	vollständig antagonistisierbare Anästhesie
VCAM-1:	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF:	vascular endothelial growth factor
VEGFR-2:	vascular endothelial growth factor receptor-2
v.G.:	van Gieson
VLA-4:	very late antigen-4
VSMC:	vascular smooth muscle cell
WHO:	world health organisation
z.B.:	zum Beispiel
ZO:	zonula occludens

## 10 Bilderverzeichnis

*Bild 1 Allgemeiner Aufbau eines Gefäßes modifiziert nach <sup>6</sup>*

*Bild 2 Von links nach rechts zunehmende entzündliche und fibroplastische Veränderungen der arteriellen Gefäßwand bis hin zur Bildung von Plaque und Entstehung einer Plaqueruptur (modifiziert nach Stary H.C. et al)*

*Bild 3 Verschiedene Stadien bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques*

*Bild 4 Feinbau eines Blutplättchens modifiziert nach <sup>7</sup>*

*Bild 5 Ruhende und aktivierte Blutplättchen; links: ruhende diskoidale Form; rechts: aktivierte Form mit Pseudopodien (Echinosphärozyten), Elektronenmikroskopie modifiziert nach <sup>2</sup>*

*Bild 6 Mechanismen der Plättchenadhäsion und -aggregation modifiziert nach <sup>9</sup>*

*Bild 7 exogener und endogener Mechanismus der Blutgerinnung modifiziert nach <sup>1</sup>*  
*(P-Lip=Phospholipide)*

*Bild 8 schematische Darstellung der Fibrinolyse modifiziert nach <sup>1</sup>*  
*(tPA=Gewebsplasminogenaktivator)*

*Bild 9 neutrophiler Granulozyt mit segmentiertem Kern und staubartiger Granulation schematisch (rechts) und mikroskopisch (links)*

*Bild 10 Eosinophiler Granulozyt mit hantelförmigem Kern und eosinophilen Granula schematisch (links) und mikroskopisch (rechts)*

*Bild 11 Basophiler Granulozyt mit gelappten Zellkern und basophilen Granula schematisch (links) und mikroskopisch (rechts)*

*Bild 12 Lymphozyt mit rundlichem Kern und kaum sichtbarem Zytoplasma schematisch (links) und mikroskopisch (rechts)*

*Bild 13 Monozyt mit heterochromatinarmen Kern und basophilen Zytoplasma schematisch (links) und mikroskopisch (rechts)*

*Bild 14 Kinetik der EPCs bei der postnatalen Gefäßneubildung. Zirkulierende EPCs werden aus dem Knochenmark mobilisiert und an den Ort der Gefäßneubildung rekrutiert.*

*Bild 15 Homing der endothelialen Progenitorzellen (EPCs) an aktivierte Thrombozyten im Bereich der verletzten Gefäßwand*

*Bild 16 Synthese und Abbau von Sphingosin-1-Phosphat*

*Bild 17 Signaltransduktion von Sphingosin-1-Phosphat über fünf G-Protein gekoppelte Rezeptoren in der Plasmamembran von Zellen; EDG=endothelial differentiation gene <sup>3</sup>*

*Bild 18 Chemische Formel von FTY 720*

*Bild 19 Chemische Strukturformel von SEW 2871*

- Bild 20 Anregung eines Atoms und Anhebung auf ein energiereicheres Niveau durch Absorption von Licht
- Bild 21 Beim Zurückfallen eines Atoms auf ein energieärmeres Niveau wird Emissionslicht ausgesendet
- Bild 22 Chemische Struktur von 5-Carboxyfluorescein<sup>5</sup>
- Bild 23 Absorptions- und Fluoreszenzmissionsspektren von 5-Carboxyfluorescein modifiziert nach<sup>4</sup>
- Bild 24 Struktur von Rhodamin 6G
- Bild 25 Schematische Darstellung der Präparation der Arteria carotis zur Durchführung der endothelialen Denudation
- Bild 26 Prinzip des Strahlenganges bei der Auflichtmikroskopie..
- Bild 27 Schematischer Aufbau der Arbeitseinheit zur intravitalem fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit dem Epifluoreszenzmikroskop Olympus BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg) und der Realtime-Image-Station Cell<sup>R</sup> (Fa. Olympus, Hamburg)
- Bild 28 Schematischer Aufbau der Arbeitseinheit zur intravitalem fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiotech<sup>vario</sup> 100 HD (Fa. Zeiss, Göttingen)
- Bild 29 Beispiel einer intravitalemikroskopischen Aufnahme der Arteria carotis communis mit dem Auflichtmikroskop Axiotech<sup>vario</sup> (Fa. Zeiss, Göttingen)
- Bild 30 **Links:** Schematische Darstellung der Arteria carotis communis mit drei Aufnahmefenstern Com1, Com2 und Bifurkation für die intravitalem Fluoreszenzmikroskopie;  
**Rechts:** intravitalemikroskopische Aufnahmen an den drei Aufnahmefenstern der Arteria carotis communis mit den Fluoreszenzmikroskopen Olympus BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg) und Axiotech<sup>vario</sup> (Fa. Zeiss, Göttingen)
- Bild 31 Arteria carotis dexter einer ApoE<sup>-/-</sup> Maus mit atherosklerotischen Plaques (dunkelrot) nach Sudan III-Färbung, 40fach
- Bild 32 Aortenbogen einer ApoE<sup>-/-</sup> Maus mit atherosklerotischen Plaques (dunkelrot) nach Sudan III-Färbung, 25fach
- Bild 33 Schematische Darstellung der Anfertigung serieller histologischer Schnitte der Arteria carotis communis über 1000 µm, beginnend an der Bifurkation
- Bild 54 Arteria carotis communis; H.E.-Färbung
- Bild 55 Arteria carotis communis; v. G.-Färbung
- Bild 36 Schematische Darstellung der Arteria carotis communis
- Bild 37 histologischer Schnitt der Arteria carotis communis; Schematische Darstellung der Berechnung der Neointimafläche
- Bild 38 Vergleich Sphk1<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; mittlere Plaquergröße in Prozent der Gesamtfläche am Aortenbogen der Maus; Cholesterinreiche Diät über 7, 10 und 13 Wochen
- Bild 39 Vergleich Sphk1<sup>+/+</sup> ApoE<sup>-/-</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup>; mittlere Plaquergröße in Prozent der Gesamtfläche an der Arteria carotis communis der Maus; Cholesterinreiche Diät über 7, 10 und 13 Wochen

- Bild 40 Links:** intravitalmikroskopische Aufnahmen der Arteria carotis communis einer ApoE<sup>-/-</sup> Maus nach Behandlung mit DMSO an drei Lokalisationen (von oben: Communis1, Communis2, Bifurkation) **Rechts:** intravitalmikroskopische Aufnahmen der Arteria carotis communis einer ApoE<sup>-/-</sup> Maus nach Behandlung mit Fingolimod an drei Lokalisationen (von oben: Communis1, Communis2, Bifurkation); Pfeile: Leukozyten
- Bild 41** ApoE<sup>-/-</sup> Tiere; 11 Wochen Fingolimod- /DMSO-Behandlung; Leukozytenadhäsion pro mm<sup>2</sup> an der **Bifurkation** der Arteria carotis; links die rollenden und rechts die fest adhärenen Leukozyten
- Bild 42** ApoE<sup>-/-</sup> Tiere; 11 Wochen Fingolimod- /DMSO-Behandlung und Cholesterinfutter; Leukozytenadhäsion pro mm<sup>2</sup> an der **Arteria carotis communis**; links die rollenden und rechts die fest adhärenen Leukozyten
- Bild 43 Links:** Aortenbogen und Arteria carotis communis einer mit DMSO behandelten ApoE<sup>-/-</sup> Maus, Sudan III-Färbung; **Rechts:** Aortenbogen und Arteria carotis communis einer mit Fingolimod behandelten ApoE<sup>-/-</sup> Maus, Sudan III-Färbung
- Bild 44** ApoE<sup>-/-</sup> Tiere; 11 Wochen Fingolimod- /DMSO-Behandlung und Cholesterinfutter; mittlere Plauegröße in Prozent der Gesamtfläche an Aortenbogen und an der Arteria carotis communis
- Bild 45** intravitalmikroskopische Aufnahmen bei Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Mäusen: Thrombozytenadhäsion und -aggregation nach Denudation an drei Lokalisationen (Bifurkation, Communis 2, Communis 1)
- Bild 46** Vergleich Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Tiere; Adhäsion einzelner Thrombozyten pro mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis
- Bild 47** Vergleich Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Tiere; Aggregationsfläche der Thrombozyten in mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis
- Bild 48** Sphk1<sup>+/+</sup> Mäuse behandelt mit Fingolimod, SEW 2871 oder DMSO; Thrombozytenadhäsion pro mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis
- Bild 49** Sphk1<sup>+/+</sup> Mäuse behandelt mit Fingolimod, SEW 2871 oder DMSO; Aggregationsfläche der Thrombozyten in mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis
- Bild 50** Vergleich Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Tiere; adhärenente T17b-Zellen pro mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis
- Bild 51** Sphk1<sup>+/+</sup> Mäuse behandelt mit Fingolimod, SEW 2871 oder DMSO; Anzahl der rekrutierten T17b-Zellen pro mm<sup>2</sup> nach Denudation an der Arteria carotis communis
- Bild 52** Vergleich Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Tiere; rollende und adhärenente Leukozyten pro mm<sup>2</sup> sieben Tage nach Denudation an der Arteria carotis communis
- Bild 53** Vergleich Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup> Tiere; Neointimaformation in µm<sup>2</sup> pro Schnittfläche an Tag 7, 14, 21 und 28 nach Denudation an der Arteria carotis communis; rechts: Versuchsgruppe 7 Tage nach Denudation mit DMSO- und Fingolimod-Behandlung

## 11 Tabellenverzeichnis

*Tabelle 1 Zusammensetzung des humanen Blutes modifiziert nach <sup>6</sup>*

*Tabelle 2 Zusammensetzung des murinen Blutes modifiziert nach <sup>35</sup>*

*Tabelle 3 Dosierung der vollständig antagonisierbaren Anästhesie (VAA) bei der Maus  
(Anästhesievorschlag modifiziert nach Henke Julia, Erhardt Wolf, TU München 2003)*

*Tabelle 4 Aufnahmeschema der analogen Videodokumentation zu den Versuchen zur  
Atherosklerose*

*Tabelle 5 Aufnahmeschema der digitalen Videodokumentation zu den Versuchen zur arteriellen  
Thrombose*

*Tabelle 6 Aufnahmeschema der digitalen Videodokumentation zu den Versuchen zur T17b-  
Zell-Rekrutierung*

*Tabelle 7 Resultate bei der H.E.- und Van G.-Färbung modifiziert nach <sup>7</sup>*

*Tabelle 8 Versuchsprotokoll zum Einfluss von SIP auf die Atherogenese; Vergleich von  
ApoE<sup>-/-</sup> Sphk1<sup>+/+</sup> mit Sphk1<sup>-/-</sup>ApoE<sup>+/+</sup>Mäusen*

*Tabelle 9 Versuchsprotokoll zum Einfluss von SIP auf die Atherogenese; Vergleich von  
ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit Fingolimod- bzw. DMSO-Behandlung*

*Tabelle 10 Versuchsprotokoll zum Einfluss von SIP auf die arterielle Thrombose; Vergleich von  
Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup>Mäusen*

*Tabelle 11 Versuchsprotokoll zum Einfluss von SIP auf die arterielle Thrombose; Behandlung  
mit Fingolimod, SEW 2871 und DMSO*

*Tabelle 12 Versuchsprotokoll zum Einfluss von SIP auf die T17b-Zell-Rekrutierung; Vergleich  
von Sphk1<sup>+/+</sup> und Sphk1<sup>-/-</sup>Mäusen*

*Tabelle 13 Versuchsprotokoll zum Einfluss von SIP auf die T17b-Zell-Rekrutierung;  
Behandlung mit Fingolimod, SEW 2871 und DMSO*

*Tabelle 14 Versuchsprotokoll zum Einfluss der Sphk1 bei der Neointimaformation nach  
Endothelverletzung*

*Tabelle 15 Versuchsprotokoll zum Einfluss der SIP-Rezeptoren bei der Neointimaformation  
nach Endothelverletzung*

## 12 Literaturverzeichnis

1. Klinker, R. and Silbernagel, S., *Lehrbuch der Physiologie*. 4. Auflage ed. 2003, Stuttgart: Thieme Verlag.
2. [cited; Available from: [http://health.upenn.edu/News/News\\_Releases/platelet.jpg](http://health.upenn.edu/News/News_Releases/platelet.jpg).
3. *Signal Transduction via EDG/SIP Receptors*. [cited; Available from: <http://www.postech.ac.kr/chem/skc-lab/research/lipidomics.htm>.
4. Invitrogen, Corporation. *Fluorescence Spectra Viewer*. 2007 [cited; Available from: <http://probes.invitrogen.com/servlets/spectraviewer?fileid1=368ph9>.
5. Gentaur, BVBA. *Amine-reactive Dyes and Related Reagents Product Specification*. 2005 [cited; Available from: [http://www.bioxys.com/i\\_Biotium/amine-reactive\\_dyes\\_and\\_related\\_reagents.htm](http://www.bioxys.com/i_Biotium/amine-reactive_dyes_and_related_reagents.htm).
6. Rohen, J. W. and Lütjen-Drecoll, E., *Funktionelle Histologie, Kurzgefaßtes Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen nach funktionellen Gesichtspunkten*. 4. Auflage ed. 2000, Stuttgart: Schattauer.
7. Hees, H. and Sinowatz, F., *Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. 2. Auflage ed. 1992, Köln: Deutscher Ärzte-Verlag
8. AG, B. Braun Melsungen. *H.E.L.P. - B. Braun Melsungen AG*. 2008 [cited; Available from: [http://www.help-therapie.de/call\\_url.cfm?curl=doc/doc\\_download.cfm?uuid=5E4D8BBE2A5AE6266806D4A56F323E1A&&IRACER\\_AUTOLINK&&&bPrint=1&bTop=1&bClose=1&bScroll=1&width=980&height=650&title=H.E.L.P.%20-%20B.%20Braun%20Melsungen%20AG](http://www.help-therapie.de/call_url.cfm?curl=doc/doc_download.cfm?uuid=5E4D8BBE2A5AE6266806D4A56F323E1A&&IRACER_AUTOLINK&&&bPrint=1&bTop=1&bClose=1&bScroll=1&width=980&height=650&title=H.E.L.P.%20-%20B.%20Braun%20Melsungen%20AG).
9. Varga-Szabo, D., Pleines, I. and Nieswandt, B., *Cell Adhesion Mechanisms in Platelets*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008.
10. Kawamoto, A. and Asahara, T., *Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2007. **70**(4): p. 477-84.
11. Reed, M. J., Karres, N., Eyman, D. and Edelberg, J., *Endothelial precursor cells*. *Stem Cell Rev*, 2007. **3**(3): p. 218-25.
12. *Wikipedia*. 2008 [cited.
13. Gebbers, J.O., *Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins - a critical review*. *German Medical Science*, 2007. **5**.
14. Gregory, C. R., et al., *Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement*. *Transplantation*, 1995. **59**(5): p. 655-61.
15. Grube, E. and Büllersfeld, L., *Initial experience with paclitaxel-coated stents*. *J Interv Cardiol*, 2002. **15**(6): p. 471-475.

16. Ward, M. R., Stewart, D. J. and Kutryk, M. J., *Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives*. Catheter Cardiovasc Interv, 2007. **70**(7): p. 983-98.
17. Gawaz, M., *Das Blutplättchen, Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. 1999, Stuttgart: Thieme Verlag.
18. Nickel, R., Schummer, A. and Seiferle, E., *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III, Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane*. 3. Auflage ed. 1996, Berlin: Parey Verlag.
19. Sartore, S., et al., *Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1111-21.
20. Ross, R., *Cell biology of atherosclerosis*. Annu. Rev. Physiol., 1995. **57**: p. 791-804.
21. Massberg, S., et al., *Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb*. Circulation, 2005. **112**(8): p. 1180-8.
22. Sachs, U. J. and Nieswandt, B., *In vivo thrombus formation in murine models*. Circ Res, 2007. **100**(7): p. 979-91.
23. Pschyrembel, W., *Medizinisches Wörterbuch*. 1994, Hamburg: Nikol Verlagsgesellschaft mbH Hamburg.
24. Massberg, S., et al., *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation*. J. Exp. Med., 2002. **196**(7): p. 887-896.
25. Tolle, M., Levkau, B., Kleuser, B. and van der Giet, M., *Sphingosine-1-phosphate and FTY720 as anti-atherosclerotic lipid compounds*. Eur J Clin Invest, 2007. **37**(3): p. 171-9.
26. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**: p. 1685-1695.
27. Langer, H., et al., *Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro*. Circ Res, 2006. **98**(2): p. e2-10.
28. Massberg, S., et al., *Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: The role of P-Selectin*. Blood, 1998. **92**(2): p. 507-515.
29. Welsch, U., *Sobotta Atlas Histologie*. 6. Auflage ed. 2002, München: Urban und Fischer.
30. Silbernagel, S. and Despopoulos, A., *Taschenatlas der Physiologie*. 6. Auflage ed. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
31. Wiesner, E. and Ribbeck, R., *Lexikon der Veterinärmedizin*. 4. Auflage ed. 2000, Ludwigsburg: Enke im Hippokrates Verlag.
32. Ishiwata, S., Robinson, K., Chronos, N., Crocker, I. R. and King, S. B., 3rd, *Irradiation and postangioplasty restenosis: a recent overview*. Jpn Heart J, 2000. **41**(5): p. 541-70.

33. Zargham, R., *Preventing restenosis after angioplasty: a multistage approach*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(4): p. 257-64.
34. Kantor, B., Ashai, K., Holmes, D. R., Jr. and Schwartz, R. S., *The experimental animal models for assessing treatment of restenosis*. Cardiovasc Radiat Med, 1999. **1**(1): p. 48-54.
35. Hedrich, H., *The Laboratory Mouse*, ed. S. Bullock and P. Petrusz. 2004, London: Elsevier Academic Press.
36. Lev, E. I., et al., *Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix*. Thromb Haemost, 2006. **96**(4): p. 498-504.
37. Vajkoczy, P., et al., *Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis*. J Exp Med, 2003. **197**(12): p. 1755-65.
38. Zhang, Q. H. and She, M. P., *Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases*. Chin Med J (Engl), 2007. **120**(24): p. 2297-303.
39. Hatzopoulos, A. K., Folkman, J., Vasile, E., Eiselen, G. K. and Rosenberg, R. D., *Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos*. Development, 1998. **125**(8): p. 1457-68.
40. Hla, T., *Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(5): p. 513-20.
41. Anada, Y., Igarashi, Y. and Kihara, A., *The immunomodulator FTY720 is phosphorylated and released from platelets*. Eur J Pharmacol, 2007. **568**(1-3): p. 106-11.
42. Venkataraman, K., et al., *Vascular Endothelium As a Contributor of Plasma Sphingosine 1-Phosphate*. Circ Res, 2008.
43. Bandhuvula, P., Tam, Y. Y., Oskouian, B. and Saba, J. D., *The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 33697-700.
44. Lee, M. J., et al., *Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate*. Cell, 1999. **99**(3): p. 301-12.
45. Shimizu, T., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation in mouse arteries*. Circ Res, 2007. **101**(10): p. 995-1000.
46. Keul, P., et al., *The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(3): p. 607-13.
47. Massberg, S. and von Andrian, U. H., *Fingolimod and sphingosine-1-phosphate-modifiers of lymphocyte migration*. N Engl J Med, 2006. **355**(11): p. 1088-91.
48. Da Violante, G., et al., *Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures*. Biol Pharm Bull, 2002. **25**(12): p. 1600-3.
49. Biotium, Inc. *Amine-reactive dyes and related reagent*. [cited; Available from: [http://www.biotium.com/product/price\\_and\\_info.asp?item=90041&Sub\\_section=07C](http://www.biotium.com/product/price_and_info.asp?item=90041&Sub_section=07C).

50. Massberg, S., Eisenmenger, S., Enders, G., Krombach, F. and Messmer, K., *Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse*. Res Exp Med (Berl), 1998. **198**(1): p. 23-35.
51. Baatz, H., Steinbauer, M., Harris, A. G. and Krombach, F., *Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G*. Int J Microcirc Clin Exp, 1995. **15**(2): p. 85-91.
52. Villringer, A., et al., *Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo*. Microvasc Res, 1991. **42**(3): p. 305-15.
53. Saetzler, R. K., et al., *Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes*. J Histochem Cytochem, 1997. **45**(4): p. 505-13.
54. Allende, M. L., et al., *Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52487-92.
55. *GV-Solas*. 1999 [cited].
56. Zutphen, L.F.M. van, Baumans, V. and Beynen, A.C., *Versuchstierkunde*. 1. Auflage ed. 1995, Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
57. Lüllmann, H. and Mohr, K., *Pharmakologie und Toxikologie*. 14. Auflage ed. 1999, Stuttgart: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
58. Erhardt, W., Henke, J. and Lendl, C., *Narkosenotfälle*. 2002, Stuttgart: Enke Verlag.
59. Close, B., et al., *Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission*. Lab Anim, 1996. **30**(4): p. 293-316.
60. Close, B., et al., *Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission*. Lab Anim, 1997. **31**(1): p. 1-32.
61. Olympus. *CellR-Imaging-Station*. 2008 [cited; Available from: [http://www.olympus.de/microscopy/22\\_cell\\_R.htm](http://www.olympus.de/microscopy/22_cell_R.htm)].
62. Baker, G. R., Sullam, P. M. and Levin, J., *A simple, fluorescent method to internally label platelets suitable for physiological measurements*. Am J Hematol, 1997. **56**(1): p. 17-25.
63. Massberg, S., et al., *A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 41-9.
64. Zeintl, Dr. H. *Cap-Image for your Image*. 2007 [cited; Available from: <http://www.drzeintl.de/index.htm>].
65. Venkataraman, K., et al., *Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular SIP gradient*. Biochem J, 2006. **397**(3): p. 461-71.
66. Lindner, V., Fingerle, J. and Reidy, M. A., *Mouse model of arterial injury*. Circ Res, 1993. **73**(5): p. 792-6.
67. Ott, I., et al., *Vascular remodeling in mice lacking the cytoplasmic domain of tissue factor*. Circ Res, 2005. **97**(3): p. 293-8.
68. Nofer, J., R., and Assmann, G., *Lectures in Clinical Atherosclerosis and Dyslipidemia*. The protective role of HDL, ed. L. Carlson, A. 2005, London.

## **13 Danksagungen**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl bedanken für die Übernahme der Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. S. Massberg für die interessante Themenstellung, die kompetente und freundliche Projektbetreuung sowie für seine Anregungen, Hilfestellungen und Diskussionsbereitschaft bei allen auftretenden Fragen.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl, Dr. med. vet. Susanne Sauer, Dr. med. vet. Maria Köllnberger, Dr. med. vet. Kathrin Schürzinger, Dr. med. vet. Ildiko Konrad, Dr. med. Christian Schulz, Lena Orschiedt, Sandra Kerstan, Michael Lorenz und Lin Zhang für die wundervolle, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die exzellente Betreuung und fachkundige und stetige Hilfestellung, sowie für die unermüdliche Unterstützung und konsequente Motivation.

Besonders danken möchte ich Roswitha Bergmeier, Maren Bathge und allen Tierpflegern für die stets verantwortungsvolle und zuverlässige Pflege der Tiere, und Renate Hegenloh für die Hilfestellung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Schließlich möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie bedanken, die mir mein Studium ermöglicht hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite steht. Vielen Dank an meine Eltern, meinen Bruder und meinen Mann, für die zuverlässige Unterstützung, den familiären Rückhalt und die stete Motivation.