

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Jens W. Fischer

**EINFLUSS VON CYCLOOXYGENASEINHIBITOREN
AUF DIE ZUSAMMENSETZUNG DER EXTRAZELLULÄREN
MATRIX IN ATHEROSKLEROTISCHEN LÄSIONEN
VON APO-E-KNOCKOUT MÄUSEN**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Luisa Würdehoff
2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. J.W. Fischer

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. A. Gödecke

Meinen Eltern gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Marzoll A, Nagy N, Wördehoff L, Dai G, Fries S, Lindner V, Grosser T, Fischer JW. Cyclooxygenase inhibitors repress vascular hyaluronan-synthesis in murine atherosclerosis and neointimal thickening. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009; 13:3713–3719.

Zusammenfassung

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen gehören in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen. Bei der Atherosklerose handelt es sich um ein durch Endothelschäden hervorgerufenen, chronisch-entzündliches Geschehen, wobei verschiedene Risikofaktoren in der Entstehung und Progression eine Rolle spielen. Neben Statinen werden auch COX-Inhibitoren seit Langem erfolgreich in der primären und sekundären Prävention eingesetzt. Bisher ist wenig über den genauen Einfluss der COX, insbesondere der COX-2 in atherosklerotischen Läsionen bekannt. In dieser Arbeit wird der Einfluss von Indometacin als nicht-selektivem COX-Inhibitor und Rofecoxib als selektivem COX-2-Inhibitor im apoE-*knockout* Mausmodell untersucht. Speziell geht es hierbei um die Auswirkungen auf die HA-Akkumulation und andere Bestandteile der EZM, sowie auf die Zellproliferation und den Gehalt an SMC und Makrophagen. Die Ergebnisse zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der HA-Akkumulation in den Plaques unter Behandlung mit Rofecoxib und Indometacin, während bei den übrigen untersuchten EZM-Bestandteilen Kollagen, Biglykan und Decorin keine Änderungen nachweisbar sind. Die Plaquefläche steigt unter Rofecoxibbehandlung an. Die Makrophagendichte in den Plaques nimmt unter Indometacinbehandlung signifikant ab, während gleichzeitig der Anteil α -SM-Aktin positiver glatter Muskelzellen an der Plaqueoberfläche signifikant ansteigt. Ein Anstieg der Proliferationsrate oder der Zelldichte insgesamt kann nicht nachgewiesen werden. Der Anstieg differenzierter SMC bei gleichzeitiger Reduktion der Makrophagendichte deutet auf eine Plaquestabilisierung unter Indometacin hin. Auch die reduzierte HA-Akkumulation kann zu der antiinflammatorischen und plaquestabilisierenden Wirkung der COX-Inhibition in diesem Modell beitragen. Jedoch ist zu beachten, dass HA als Bestandteil der endothelialen Glykokalyx auch wichtige physiologische Funktionen wahrnimmt und eine HA-Reduktion zu Endothelschäden und zur Progression der Atherosklerose beitragen kann. Eine systemische HA-Inhibition, wie sie auf dem Gebiet der Tumorthherapie Anwendung finden könnte, kann sich demnach auch negativ auf das kardiovaskuläre System auswirken. Zudem bleibt die Vorhersagbarkeit möglicher Nebenwirkungen einer selektiven COX-2 Inhibition auf das kardiovaskuläre System aufgrund der vielfältigen Funktionen der COX-2 vermittelten Prostaglandine schwierig.

Summary

Atherosclerosis and its late stage complications are among the most common causes of death in the industrial nations. Today atherosclerosis is believed to be a chronic-inflammatory disease, initialized by endothelial dysfunction with a range of risk factors contributing to the formation and progression of atherosclerotic lesions. Statins and COX-Inhibitors are successfully used for the primary and secondary prevention. To date little is known about the influence of COX, especially COX-2 in atherosclerotic lesions. The aim of the present study was to examine the impact of the non-selective COX-Inhibitor Indometacin and the selective COX2-Inhibitor Rofecoxib in an apoE-*knockout* mouse model with special attention paid to the accumulation of HA and other constituents of the ECM, cell proliferation and the content of macrophages and SMC in atherosclerotic lesions. The results show a significant reduction of HA-accumulation within the lesions after treatment with Rofecoxib and Indometacin compared to the untreated control group, whereas the other analyzed components of the ECM collagen, biglycan and decorin do not change. The average plaque size increases in the group treated with Rofecoxib. In the Indometacin treated group a significant decrease in the number of macrophages is shown, while the content of α -SM-Actin positive SMCs in the shoulder region of the atherosclerotic lesions increases significantly. The proliferation rate and absolute cell density do not change by COX-Inhibitor treatment. The increase of differentiated SMCs and the co-occurring decrease in the number of macrophages indicate a plaque stabilizing effect of Indometacin. Furthermore, the reduced HA-accumulation can contribute to the anti-inflammatory and plaque stabilizing effects in this model. On the other hand, HA is an integral constituent of the endothelial glycocalyx with relevant physiological functions and a reduced HA content can lead to endothelial dysfunction and progression of atherosclerosis. Therefore, a systemic HA-inhibition, as it might be used in tumor therapy in the future, can have negative effects on the cardiovascular system. Moreover, it remains difficult to predict possible side effects of selective COX2-inhibition in the cardiovascular systems, due to the several pathological and physiological functions of COX2 mediated prostaglandins.

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
Apo E	Apolipoprotein E
APPROVe	Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx Trial
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD44	Cluster of differentiation 44
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
COX	Cyclooxygenase
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EP-Rezeptor	Prostaglandin E Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Flt-1	Fms-like tyrosin kinase 1
GAG	Glykosaminoglykan
GP-Iba	Glycoprotein Ib alpha polypeptide
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hyaluronic acid (Hyaluronsäure)
HABP	Hyaluronsäure-Bindeprotein
HAS	Hyaluronsäure Synthasen
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HMW-HA	High molecular weight- hyaluronic acid
HRP	Horseradish peroxidase
HYAL	Hyaluronidase
IaI	Inter- α -Inhibitor
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN-γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
IP-Rezeptor	Prostacyclinrezeptor
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
LMW-HA	Low molecular weight- hyaluronic acid
LOX-1	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1
LYVE-1	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
Mac-2	Macrophage antigen 2
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MU	Methylumbelliferone
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Non-Steroidal-Anti-Inflammatory-Drug
PaVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PG	Prostaglandin
PGE	Prostaglandin E
PGES	Prostaglandin-E-Synthase
PGF	Prostaglandin F
PGH	Prostaglandin H
PGI	Prostacyclin
PBS	Phosphate buffered saline
RHAMM	Receptor for hyaluronan-mediated motility
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
SEM	Standard error mean
SLRP	Small leucinrich proteoglycans
SM	Smooth muscle

SMC	Smooth muscle cells
TF	Tissue factor
TGF-β	Tumor Growth Factor β
TLR	Toll like receptor
TNF-β	Tumornekrosefaktor β
Tsg	Tumor necrosis factor stimulated gene
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXA	Thromboxan
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Entstehung und Stabilität atherosklerotischer Plaques	3
1.2 Extrazelluläre Matrix in atherosklerotischen Plaques	7
1.3 Die Hyaluronsäurematrix	9
1.4 COX und Prostaglandine	12
1.5 Cyclooxygenase-Inhibitoren	14
1.6 Fragestellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Puffer und Lösungen	17
2.2 Farbstoffe und Farbstofflösungen	18
2.3 Substanzen/Kits und Arzneistoffe	18
2.4 Antikörper	19
2.5 Geräte	21
2.6 Tiere und Futter	21
2.7 Studiendesign	21
2.8 Präparation der Mäuse	24
2.9 Histologische Analyse der atherosklerotischen Plaques	24
2.9.1 Anfertigung und Bearbeitung von Paraffinschnitten	24
2.9.2 Kollagen-Färbung	25
2.9.3 Immunhistochemische Färbungen	26
2.10 Auswertung von histologischem Material	27
2.10.1 Mikroskop	27
2.10.2 Auswertung mittels ImageJ	27
2.11 Statistik	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Behandlung mit Rofecoxib und Indometacin	29
3.2 Einfluss der COX-Inhibitoren auf die Hyaluronsäureakkumulation in den Plaques	30

3.3	Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Plaquegröße	33
3.4	Einfluss von COX-Inhibitoren auf den Kollagengehalt der Plaques	34
3.5	Einfluss der COX-Inhibitoren auf die Expression der kleinen leucinreichen Proteoglykane Biglykan und Decorin	37
3.6	Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Makrophagendichte in den Plaques	40
3.7	Einfluss von COX-Inhibitoren auf den Gehalt glatter Muskelzellen in den Plaques	41
3.8	Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Proliferation von Zellen in den Plaques	42
4.	Diskussion	43
4.1	Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf die Hyaluronsäurematrix – pro- oder anti-atherogene Wirkung?	44
4.2	Auswirkungen der COX-Inhibition auf die endotheliale Glykokalyx als mögliche Ursache für eine Vergrößerung der Plaquefläche	47
4.3	Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf andere Bestandteile der Extrazellulären Matrix – allgemeines Matrixremodelling oder spezifische Effekte auf die Hyaluronsäure?	48
4.4	Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf die zelluläre Zusammensetzung atherosklerotischer Läsionen	51
4.4.1	Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf den Makrophagengehalt - Hinweise für antiinflammatorische Effekte der COX-Inhibitoren?	51
4.4.2	Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf den Plaquegehalt an glatten Muskelzellen und die Zellproliferation – Hinweise für erhöhte Plaquestabilität?	53
4.5	Mögliche therapeutische Konsequenzen	56
5.	Literaturverzeichnis	58

1. Einleitung

Die Folgen der Atherosklerose - wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), die koronare Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkte oder der Schlaganfall - stellen vor allem in den Industrieländern die mit Abstand häufigste Todesursache dar (1). In Deutschland wurden im Jahr 2012 40,2% aller Todesfälle durch Herz-/Kreislaufkrankungen verursacht (1). Da hohe Plasmakonzentrationen von Cholesterol, vor allem des low-density Lipoproteins (LDL), zu den Risikofaktoren einer Atherosklerose zählen (2), wurde lange angenommen, die Atherogenese sei hauptsächlich auf eine Akkumulation von Lipiden in der Gefäßwand zurückzuführen. Heute ist bekannt, dass es sich bei den Veränderungen der Gefäßwand um ein komplexes, chronisch-entzündliches Geschehen handelt, das durch die Interaktion zwischen oxidierten Lipiden und verschiedenen Bestandteilen des Blutes und der Gefäßwand charakterisiert wird. Dieser Zusammenhang wurde unter anderem 1999 in einer Arbeit von Ross *et al.* (3) beschrieben. Vielzählige *in vitro* und *in vivo* Studien bei Tieren und Menschen bestätigen diese Annahme und tragen zu einem besseren Verständnis der komplexen Vorgänge während der Atherogenese bei. Als Risikofaktoren für die Entstehung bzw. Beschleunigung der Atherosklerose gelten unter anderem Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen, familiäre Disposition und Diabetes mellitus (3). Durch diese und andere Faktoren kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion und in deren Folge über verschiedene Mechanismen zur Lipideinlagerung und Entstehung einer chronisch-inflammatorischen Läsion in der Gefäßwand (4). Eine bedeutende Rolle in diesem Prozess spielt die extrazelluläre Matrix (EZM), deren unterschiedliche Bestandteile bei nahezu allen Abläufen in der Entstehung einer atherosklerotischen Läsion beteiligt sind (5). Hier ist unter anderem die Hyaluronsäure mit zahlreichen physiologischen und pathologischen Funktionen von großer Relevanz.

Im Verlauf der Atherogenese können sich hochgradige Stenosen des Gefäßes mit hieraus resultierender Minderperfusion der betroffenen Organe oder Körperabschnitte entwickeln, wie es zum Beispiel bei der pAVK der Fall ist. Außerdem kann es zu Plaquerupturen kommen, bei denen ein Thrombus entsteht, der bei Embolisation und

komplettem Verschluss des Gefäßes eine akute Ischämie bzw. einen Infarkt in der entsprechenden Strombahn (z.B. Herz, ZNS) verursacht (6). Diese schwerwiegenden Folgen machen deutlich wie wichtig es ist, die komplexen Vorgänge während der Atherogenese und der Restenosierung nach operativer oder interventioneller Therapie im Detail zu verstehen, um mit gezielten pharmakologischen Therapien auf verschiedenen Ebenen der Atheroskleroseentstehung einzugreifen und ein Fortschreiten verhindern zu können. In diesem Zusammenhang sind die Cyclooxygenase-Inhibitoren (COX-Inhibitoren) zu nennen, welche in der Schmerztherapie und Plättchenaggregationshemmung breite klinische Anwendung finden und gerade in der Langzeittherapie Auswirkungen auf den Verlauf der Atherosklerose haben können, da die Syntheseprodukte der Cyclooxygenasen neben physiologischen Funktionen im kardiovaskulären System auch bei diversen entzündlichen Prozessen und in der Atherogenese beteiligt sind.

In dieser Arbeit wird der Einfluss von selektiver COX2-Inhibition und nicht-selektiver COX1-Inhibition auf die Matrix- und Zellzusammensetzung atherosklerotischer Plaques in einem geeigneten Mausmodell untersucht. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Hyaluronsäure-Matrix gelegt, die als Bestandteil der EZM eine wichtige Rolle in der Atherosklerose spielt.

1.1 Entstehung und Stabilität atherosklerotischer Plaques

Die Wände gesunder arterieller Gefäße lassen eine typische Dreischichtung erkennen, bestehend aus innen bzw. luminal gelegener Tunica intima, der muskulären Tunica media und der äußeren, bindegewebigen Tunica adventitia, die den Kontakt zum umliegenden Gewebe herstellt. Die in der Mitte gelegene Tunica media setzt sich aus glatten Muskelzellen (SMC) und elastischen Fasern zusammen und ist damit von entscheidender Bedeutung für die Kontraktilität und Weite der Gefäße. Zwischen Tunica media und adventitia befindet sich die Lamina elastica externa. Die innere Tunica intima besteht histologisch aus Endothel, aufgebaut aus einer Schicht lückenloser, flacher polygonaler Zellen, aufgereiht auf einer Basallamina, sowie aus einer darunter befindlichen subendothelialen Matrix und der Lamina elastica interna, als Abtrennung zur Tunica media (siehe Abb.1). Neben der Funktion als Diffusionsbarriere zwischen Intra- und Extravasalraum hat das Endothel auch Einfluss auf Zelladhäsion und -migration, sowie Blutgerinnung und Blutdruckregulation, u.a. über die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (7,8).

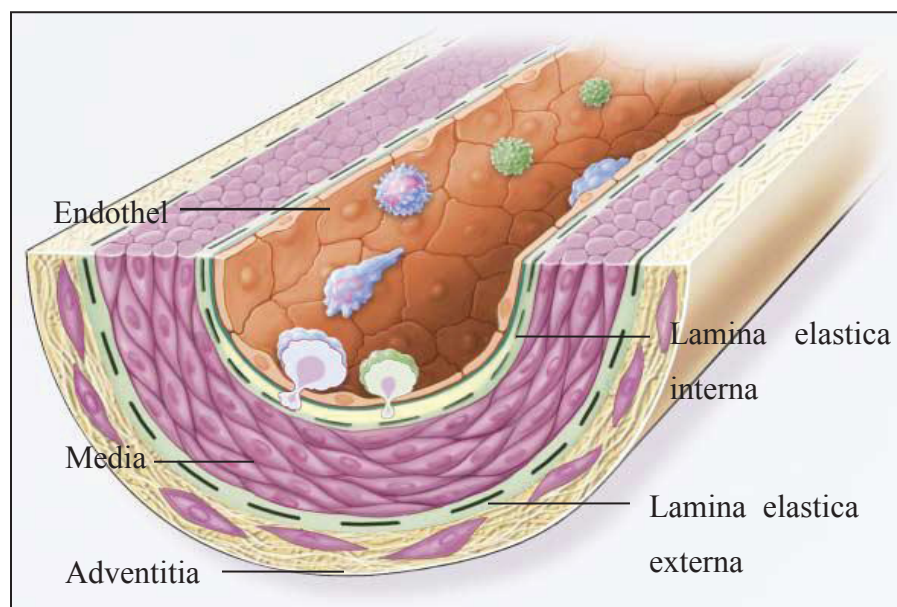


Abb. 1: Aufbau der Gefäßwand; Bearbeitetes Original aus Ross et al; N Engl J Med. 1999;340:115-26 (3).

Eine gesunde Gefäßwand besitzt eine luminale, zwischen Endothel und Blutstrom befindliche, kohlenhydratreiche Schicht aus membrangebundenen Makromolekülen, die sogenannte endotheliale Glykokalyx (9). Diese schützt die Gefäßwand vor Interaktionen mit zirkulierenden Leukozyten und Thrombozyten, bestimmt die Permeabilität des Gefäßes und ist entscheidend an der Aufrechterhaltung der Endothelfunktion beteiligt (10,11). Schäden in der Glykokalyx führen zu einer endothelialen Dysfunktion mit verminderter Ausschüttung vasodilatativer Substanzen wie Stickstoffmonoxid und Prostacyclin, sowie zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand und einer Freilegung endothelialer und subendothelialer Strukturen (4,12,13). Nach der von *Ross et al.* (3) formulierten „Response to injury“-Hypothese stellt die endotheliale Denudation und Dysfunktion den Auslöser für die Entstehung der Atherosklerose dar, während die weiteren inflammatorischen und prothrombotischen Mechanismen als Antwort der Gefäßwand auf die Schädigung zu verstehen sind (3,14).

Durch Schäden der Glykokalyx und des Endothels und einer dadurch entstehenden Freilegung der endothelialen und subendothelialen Matrix kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten an die Gefäßwand, vermittelt unter anderem durch den von-Willebrand-Faktor über GP-Ib α Rezeptoren (15). Die aktivierten Thrombozyten schütten Thromboxan A₂ (TxA₂) aus, das als positiver Feedback-Mediator zur weiteren Aktivierung, Plättchenadhäsion und -aggregation und so zur Ausbildung von Mikrothromben führt (16). Gleichzeitig werden auf der Oberfläche des geschädigten Endothels Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule*), VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule*) und P-Selektin exprimiert, die zu einer Adhäsion und Migration im Blut zirkulierender T-Zellen und Monozyten führen (17). Letztere differenzieren in der Gefäßwand zu Makrophagen. Die erhöhte Permeabilität des Endothels begünstigt eine Infiltration von Lipiden und Lipoproteinen, insbesondere von oxidiertem LDL (oxLDL), in den subendothelialen Raum. OxLDL wird hier von Makrophagen unter Entstehung sogenannter Schaumzellen aufgenommen (17). In diesen frühen atherosklerotischen Plaques werden von verschiedenen aktivierten Zellen inflammatorische Zytokine (z.B. γ -Interferon, TNF- β) und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet (3,6), welche die Stimuli für die Migration von SMC aus der Tunica media in die Intima darstellen und eine Veränderung des Phänotyps der SMC vom kontraktiven zum sekretorischen Phänotyp induzieren

können (18). Die so veränderten SMC weisen eine gesteigerte Proliferationsrate auf und können große Mengen an bindegewebiger Grundsubstanz, der extrazellulären Matrix (EZM) produzieren. Auf diesem Wege entstehen fortgeschrittene, auch als Neointima bezeichnete, komplexe Läsionen aus EZM und zellulären Bestandteilen, wobei die SMC und Makrophagen die dominierenden Zelltypen darstellen (19). Die genannten Veränderungen sind in Abb.2 graphisch dargestellt.

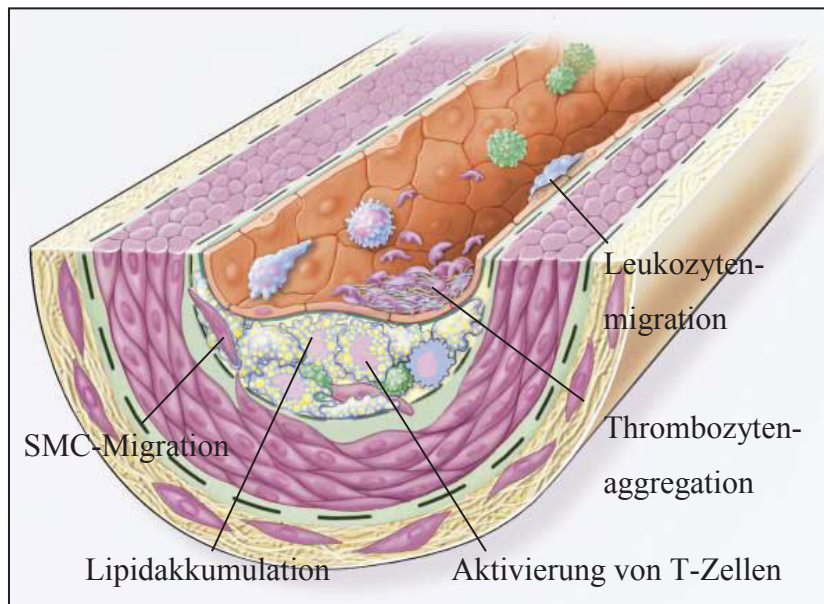


Abb. 2 : Atherosklerotische Läsion; Bearbeitetes Original aus Ross et al; N Engl J Med. 1999;340:115-26 (3).

Ob es im Laufe der Atherogenese zu einem klinisch relevanten Ereignis wie einem Herzinfarkt oder einer zerebralen Ischämie kommt, hängt entscheidend von der Stabilität atherosklerotischer Plaques ab. Daher unterscheidet man in der Klinik zwischen instabilen Plaques, die durch Ruptur akut symptomatisch werden, und stabilen Plaques, die gar nicht oder möglicherweise erst nach langjährigem chronischem Verlauf klinische Relevanz durch die zunehmende Stenosierung der Gefäße erlangen können (z.B. bei der KHK oder pAVK). Anfänge atherosklerotischer Gefäßveränderungen finden sich bereits im Kindesalter (3), ohne dass es im Laufe des Lebens jemals zu einer symptomatischen Atherosklerose oder zu thrombembolischen Ereignissen kommen muss.

Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Stabilität der Plaques. Ein hoher Gehalt an Kollagenfibrillen in den Plaques kann die mechanische Belastbarkeit atherosklerotischer Läsionen erhöhen. Zudem tragen SMC in der fibrotischen Kappe atherosklerotischer Plaques zu einem geringeren Rupturrisiko bei. Symptomatische, instabile Plaques zeichnen sich dagegen durch einen verminderten Kollagengehalt und eine dünne fibrotische Kappe aus (20). Außerdem besitzen instabile Plaques einen höheren Gehalt an Makrophagen, welche unter anderem Matrix-degradierende Enzyme, die Matrixmetalloproteinasen (MMPs), sezernieren. Durch MMPs werden Kollagen und andere Matrixbestandteile gespalten, was zu einer Destabilisierung der Plaques beiträgt (20). Desweiteren zeigen instabile Plaques im Vergleich zu asymptomatischen Läsionen eine vermehrte Expression von Entzündungsmediatoren wie COX-2 oder TGF- β . TGF- β stellt nach *Cipollone et al.* (20) einen direkten Parameter für die Beurteilung der Plaquestabilität dar, wobei ein hoher Gehalt an TGF- β für eine erhöhte Instabilität der Plaques spricht.

Da klinisch vor allem die instabilen Plaques mit ihren schwerwiegenden Folgen von Bedeutung sind, ist besonders die Stabilisierung atherosklerotischer Läsionen ein Ziel pharmakologischer Interventionen.

1.2 Extrazelluläre Matrix in atherosklerotischen Plaques

Die extrazelluläre Matrix stellt mit ihrem Netzwerk aus verschiedenen Makromolekülen das Grundgerüst der meisten Gewebetypen dar und spielt in der Pathogenese der Atherosklerose eine herausragende Rolle (5). Die EZM sorgt mit ihren strukturellen Eigenschaften dabei nicht nur für Stabilität innerhalb atherosklerotischer Läsionen, sondern ist durch diverse Zell-Matrix- und Matrix-Matrix-Interaktionen an entscheidenden pathophysiologischen Abläufen der Atherogenese beteiligt. So hat die EZM direkten Einfluss auf die Zellproliferation, –migration und –retention, die Lipidakkumulation, thrombembolische Ereignisse und die Veränderung des Phänotyps von SMCs (5,21).

Unter den Bestandteilen der EZM spielt das Kollagen und hier insbesondere Kollagen-Typ I eine entscheidende Rolle für die Stabilität atherosklerotischer Plaques (20). Kollagen Typ I ist das am häufigsten vorkommende Protein der extrazellulären Matrix und ist in vielen verschiedenen Gewebetypen an der Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion beteiligt. Parallel angeordnete Kollagenfibrillen, weisen durch ihre kovalente Quervernetzung eine extreme Zugfestigkeit auf. Aus mehreren Fibrillen werden wiederum dickere Kollagenfasern (22). Diese erhöhen die mechanische Belastbarkeit atherosklerotischer Läsionen.

Neben Kollagen stellen die Proteoglykane einen weiteren wichtigen Bestandteil der EZM dar. Proteoglykane bestehen aus einem Proteinfaden, dem sogenannten *core-protein* und kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen (GAG) (23), welche das Hauptdifferenzierungsmerkmal der verschiedenen Proteoglykane bilden. Die Namen der GAG beziehen sich auf die Gewebe, in denen sie primär entdeckt wurden. Sie kommen aber praktisch in allen Gewebetypen vor. Man unterscheidet Chondroitin-Sulfat, Dermatan-Sulfat, Keratan-Sulfat und Heparan-Sulfat (23). Ein weiteres bedeutendes Glykosaminoglykan, das im Unterschied zu den Übrigen nicht sulfatiert und nicht an Protein gebunden vorliegt, ist die Hyaluronsäure (HA), auf die im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird. Unter den Bestandteilen der EZM sind für die Atherosklerose neben Kollagen und der Hyaluronsäure, vor allem die Proteoglykane Versican, Decorin und Biglykan von Relevanz (24).

Biglykan und Decorin aus der Gruppe der kleinen leucinreichen Proteoglykane (SLRP) besitzen in ihrem Kernprotein eine sich wiederholende leucinreiche Sequenz und unterscheiden sich in ihren GAG-Ketten, von denen Decorin nur eine und Biglykan zwei besitzt (siehe Abb.3) (25). Über diese GAG-Ketten werden Funktionen der SLRPs wie z.B. die Interaktion mit Kollagen und die Beeinflussung der Proliferation glatter Muskelzellen vermittelt (26). Beispielsweise verzögert Decorin durch Bindung an Kollagenfibrillen ihre Aneinanderlagerung (27) und ist dadurch maßgeblich an der Anordnung des Kollagens und damit auch an der Stabilität der Kollagenmatrix in atherosklerotischen Läsionen beteiligt. Die Untersuchungen von *Fischer et al.* (28) aus dem Jahr 2000 zeigten außerdem, dass Decorin im Tiermodell die Entstehung einer Neointimahyperplasie hemmt. Auch Biglykan, das zweite Mitglied aus der Gruppe der SLRPs, spielt eine wichtige Rolle bei der Anordnung der Kollagenfibrillen im Gewebe. Dies zeigte *Corsi et al.* (29) am Beispiel von Biglykan-knockout-Mäusen, bei denen es durch das Fehlen von Biglykan zu einer gestörten Ossifikation durch fehlerhafte Zusammenlagerung der Kollagenfibrillen kommt. Durch die Interaktionen mit Kollagen und anderen Matrixbestandteilen und vor allem durch die *in vitro* nachgewiesene proliferationsregulatorische Wirkung auf SMCs haben SLRPs Einfluss auf die Entstehung und Progression der Atherosklerose (26,30).

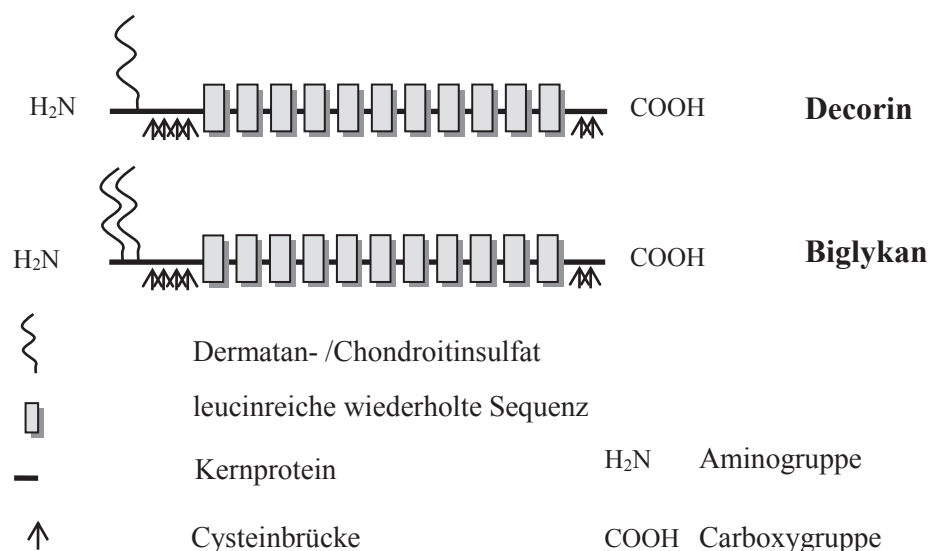


Abb. 3: Schematische Darstellung von Decorin und Biglykan

1.3 Die Hyaluronsäure-Matrix

Die Hyaluronsäure ist ein wichtiger Bestandteil der EZM und liegt als nicht sulfatiertes und nicht an Protein gebundenes Polysaccharid vor. Sie wird nicht wie die anderen GAGs im rauen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat synthetisiert, sondern durch membranständige Enzyme, die so genannten HA-Synthasen 1-3 (HAS 1-3) (31). Die Hyaluronsäure besteht aus 250 bis 50000 Disaccharid-Einheiten, mit einem Molekulargewicht von 10^5 bis 10^7 Dalton. Die Disaccharid-Einheiten sind aus je einem Molekül D-Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin aufgebaut (32,33). Der Aufbau einer Disaccharid-Einheit ist in Abb.4 graphisch dargestellt.

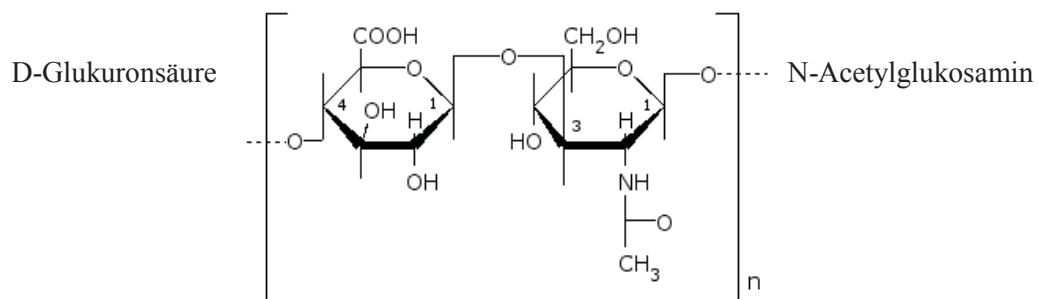


Abb. 4: Disaccharid-Einheit der Hyaluronsäure aus D-Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin

Die Synthese durch HAS und der enzymatische Abbau durch Hyaluronidasen (HYAL) beeinflussen Menge und Größe der HA-Moleküle. Die verschiedenen HA-Synthasen synthetisieren HA-Moleküle mit unterschiedlichen Kettenlängen von 1×10^5 bis 1×10^6 Dalton (HAS3), über 2×10^5 bis 2×10^6 Da (HAS1) bis über 2×10^6 Da (HAS2) (34). Die Hyaluronidasen können diese hochmolekularen HA-Moleküle bis auf wenige Disaccharid-Einheiten spalten (35). Die Größe der HA-Moleküle ist von entscheidender Bedeutung für die Funktion von HA. Hochmolekulare HA (HMW-HA)-Moleküle haben eine hohe Bindungskapazität für Wasser, wodurch sie ein großes Volumen einnehmen und als visköses Gel stabilisierende Funktionen wahrnehmen können. Als Wasserspeicher hat HA Bedeutung für die Widerstandsfähigkeit verschiedener Binde- und Stützgewebe z.B. in der Haut, im Glaskörper des Auges und als „Schmiermittel“ von Gelenken, der sogenannten Synovialflüssigkeit (36,37,38). In verschiedenen Studien konnten für niedermolekulare HA (LMW-HA), im Gegensatz

zu HMW-HA, proliferations- und migrationsfördernde und proinflammatorische Eigenschaften, sowie eine Unterstützung der Angiogenese nachgewiesen werden (39,40,41). Großen HA-Molekülen wird eine entgegengesetzte Wirkungen und eine Hemmung der Angiogenese zugeschrieben (42,43).

Die zellulären Signale und oben beschriebenen Wirkungen der Hyaluronsäure werden über Bindung an verschiedene membranständige HA-Rezeptoren vermittelt. Hierzu gehören unter anderem das transmembranäre Glykoprotein CD44, der *receptor of hyaluronan mediated motility* (RHAMM) und *Toll-like* Rezeptoren (TLR) (44). Zudem interagiert HA mit anderen Bestandteilen der EZM ohne Rezeptorfunktion, den Hyaladhärienen. Dazu zählen neben Proteoglykanen wie Versican auch der Inter- α -Trypsin-Inhibitor (I α I) und das *tumor necrosis factor stimulated gene-6* (Tsg-6) (45). Mittlerweile steht fest, dass die Hyaluronsäure für die Regulation von Tumorwachstum und Metastasierung eine entscheidende Rolle spielt (33). In gesunden Blutgefäßen ist HA vor allem im Bereich der Adventitia und der endothelialen Glykokalyx lokalisiert. Im Rahmen der Atherosklerose, Thrombosierung und besonders ausgeprägt bei der Restenosierung von Gefäßen kommt es zu einer starken intimalen Akkumulation von Hyaluronsäure welche assoziiert ist mit einer vermehrten Proliferation und Migration von SMC, einer Volumenexpansion der Neointima sowie mit inflammatorischen Prozessen (40,46). Es wird deshalb angenommen, dass Hyaluronsäure die Progression von Neointimahyperplasien und Atherosklerose beschleunigt (47).

Während *in vitro* bereits verschiedene Faktoren, wie der *platelet derived growth factor-BB* (PDGF-BB) und *transforming growth factor- β* (TGF- β), bestimmt werden konnten, die die HA-Synthese und –Akkumulation regulieren (48,49), gilt es die Mechanismen, die zu einer HA-Akkumulation *in vivo* führen und die spezifischen physiologischen und pathologischen Funktionen der einzelnen HAS-Unterformen und der verschiedenen HA-Molekülgrößen, v.a. in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, genauer zu untersuchen.

In den Jahren 2004 bzw. 2006 konnten *Sussmann et al.* (50) sowie *van den Boom et al.* (51) zeigen, dass Prostazyklin (PGI₂) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) die Expression von HAS2 und HAS1 in vaskulären SMC steigern. Abb. 5 und 6 zeigen einen Auszug aus den Ergebnissen dieser Arbeiten und eine schematische Darstellung des

Regulationsweges der HAS-Expression über Prostaglandine. Es wird angenommen, dass dieser Regulationsmechanismus der Hyaluronsäuresynthese auch *in vivo* eine entscheidende Rolle spielt und aufgrund der vermuteten proatherogenen Eigenschaften von HA in der Atheroskleroseentstehung und Progression von Bedeutung ist. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen wurden apoE-defiziente Mäuse mit COX-Inhibitoren behandelt und die Auswirkungen auf die HA-Matrix atherosklerotischer Plaques und die Progression der Atherosklerose analysiert.

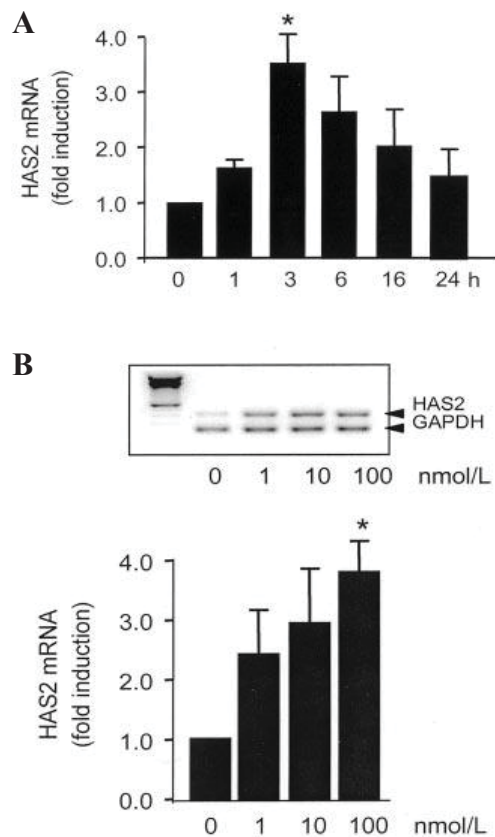


Abb.5: A, Zeitliche Abhängigkeit der HAS2 mRNA Induktion durch Iloprost (100 nmol/L) in arteriellen SMCs; Semiquantitative RT-PCR. B, Konzentrationsabhängigkeit der HAS2 mRNA Induktion durch Iloprost; n=3 (A) and n=6 (B); mean±SD. *P<0.05 vs control. Aus Sussmann et al; Circ Res. 2004; 94: 592-600 (50).

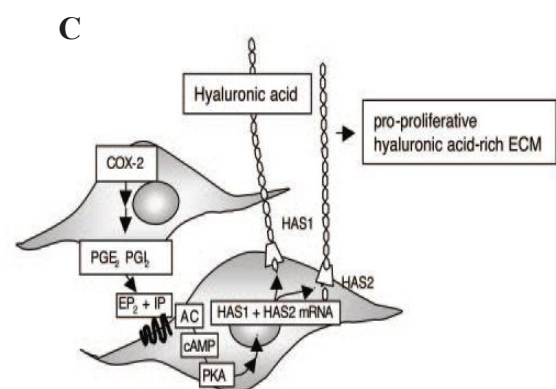


Abb.6: Schematisches Diagramm, das die Induktion der HAS1 und HAS2 Expression in venösen SMC durch PGI₂ und PGE₂ über eine Stimulation von G Protein gekoppelten IP und EP₂ Rezeptoren zeigt. Die vermehrte HA-Synthese führt zu einer Steigerung der SMC Proliferation. Aus van den Boom et al; Circ Res. 2006; 98: 36-44 (51).

1.4 COX und Prostaglandine

Die Cyclooxygenasen (COX), auch Prostaglandin H- (PGH-) Synthasen genannt, sind die Schlüsselenzyme im Biosyntheseweg der Prostaglandine (PG) aus Arachidonsäure. Man unterscheidet die beiden Isoenzyme COX1 und COX2, die sich im Hinblick auf ihre Funktionen im Körper sowie die Regulation ihrer Expression unterscheiden (52). Während das Isoenzym COX1 von fast allen Zellen konstitutiv exprimiert wird und ständig aktiv ist, ist die COX2 von bestimmten proinflammatorischen Botenstoffen wie Zytokinen induzierbar und wird vor allem von aktivierten Leukozyten, Monozyten und Makrophagen, aber auch von Endothelzellen und SMC exprimiert (53,54,55). In Abb. 7 sind die nachfolgend beschriebenen Synthesewege graphisch dargestellt.

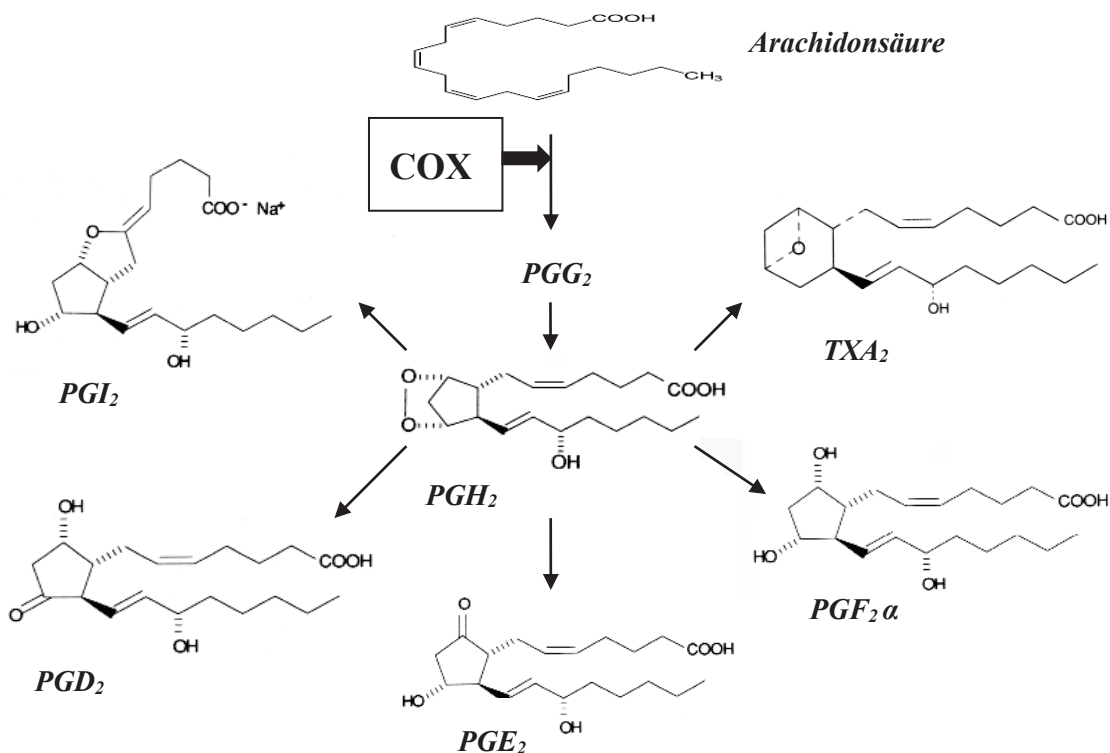


Abb. 7: Biosyntheseweg von Prostaglandinen und Thromboxan aus Arachidonsäure. Modifiziert nach Simmons et al; Pharmacol Rev 2004;56:387–437 (52).

Sowohl COX1 als auch COX2 katalysieren die Reaktionen von Arachidonsäure zu Prostaglandin G₂ (PGG₂) und weiter zu Prostaglandin H₂ (PGH₂). Über weitere Synthasen wird PGH₂ dann zu den verschiedenen, gewebespezifischen Endprodukten der Prostaglandinsynthese überführt. Zu diesen Produkten gehören PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGF₂α und TxA₂ (52). TxA₂ und PGI₂ sind Produkte der Prostaglandinsynthese mit

z.T. gegensätzlichen Funktionen und unterschiedlichen Synthesewegen. TxA_2 , das in Thrombozyten von COX1 und der TxA_2 -Synthase gebildet wird, führt über Bindung an TP-Rezeptoren zur Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten und hat außerdem vasokonstriktorische Eigenschaften (16). PGI_2 ist ein wichtiges Syntheseprodukt des Prostaglandinstoffwechsels im Endothel und neben PGE_2 das Hauptprodukt von COX2. Es wirkt im Gegensatz zu TxA_2 stark vasodilatatorisch und antithrombotisch (52,56,57). PGI_2 bindet an sogenannte IP-Rezeptoren in der Zellmembran, die G-Protein (Guanosintriphosphat (GTP) - bindendes Protein) gekoppelt sind (52,57). Neben wichtigen physiologischen Funktionen u.a. in Magen, Lunge und Niere spielt es, zusammen mit PGE_2 eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen, indem es u.a. zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und stärkeren Perfusion der Gewebe beiträgt (52,58). Für PGI_2 wurden außerdem proliferations- und migrationshemmende Eigenschaften in SMC nachgewiesen (59,60,61). PGE_2 wird wie PGI_2 in Endothelzellen, Monozyten und SMCs von Prostaglandin E-Synthasen (PGES) gebildet. PGE_2 bindet ebenfalls an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (EP-Rezeptoren 1-4) in der Zellmembran und übt darüber teilweise gegensätzliche Funktionen aus (62).

Die Bedeutung von COX2 in der Atherosklerose ist nicht ganz eindeutig und wird seit langem kontrovers diskutiert. COX1 wird konstitutiv in Endothelzellen und den SMC der Media exprimiert, wohingegen COX2 nicht in gesunden Gefäßen, sondern vornehmlich in atherosklerotischen Läsionen gefunden wird (55). Zu einer vermehrten Expression von COX2 durch SMC kommt es nach Gefäßverletzungen (63) und nach einer Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, TNF- α), Thrombin, oxidiertes LDL und Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF-BB), während nicht aktivierte SMC keine COX2 exprimieren (64,65). Die COX2-Expression ist innerhalb symptomatischer Plaques vor allem in der Schulterregion erhöht, in der auch die Makrophagendichte am höchsten ist (55,65). Neben der Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens in atherosklerotischen Läsionen, scheint COX2 mit ihren Produkten, den Prostaglandinen auch durch den Umbau der EZM (z.B. über MMPs) einen proatherosklerotischen Einfluss zu haben (65).

1.5 Cyclooxygenase-Inhibitoren

Nachdem 1897 erstmals reine Acetylsalicylsäure hergestellt werden konnte (66) und 1971 die Funktionsweise entschlüsselt wurde (67), folgte die Entwicklung verschiedener weiterer, auch als nicht steroidale Antiphlogistika (NSAID) bezeichneter Verbindungen, die eine analgetische, antipyretische und antiphlogistische Wirkung über die Hemmung der Prostaglandinsynthese entfalten. Durch ihren großen Anwendungsbereich in der Schmerztherapie, Fiebersenkung und Gerinnungshemmung gehören sie zu den am meisten verwendeten Arzneistoffen überhaupt.

Die Einnahme von COX-Inhibitoren kann, bedingt durch die Vielzahl physiologischer Funktionen der Prostaglandine im menschlichen Körper, mit verschiedenen Nebenwirkungen einher gehen. Eine wichtige, bei Gabe von ASS allerdings häufig erwünschte Wirkung, ist die irreversible Hemmung der Plättchenaggregation durch verminderte Bildung von TxA_2 . ASS findet in geringer Dosierung deshalb häufig Anwendung in der Prophylaxe von Herzinfarkten oder Schlaganfällen. Durch verminderte Natriumausscheidung in der Niere kann es bei Einnahme von COX-Inhibitoren zu Wasserretention mit Ausbildung von Ödemen und einer arteriellen Hypertension kommen (68). Eine weitere wichtige Nebenwirkung betrifft vor allem Patienten unter Langzeittherapie mit nicht-selektiven COX-Inhibitoren, z.B. bei Rheumatoider Arthritis oder anderen chronischen Schmerzzuständen. Durch die PG-Synthesehemmung kommt es zu einer gesteigerten Magensaftproduktion, in dessen Folge sich in der Langzeittherapie Schleimhauterosionen bis hin zu einem Magenulkus mit Blutungen und Perforation ausbilden können (68). Durch die Entwicklung selektiver COX2-Inhibitoren (Coxibe), die Anfang der 90er Jahre auf den Markt kamen, versprach man sich eine effektive Schmerzbehandlung bei geringem gastrointestinalem Risiko durch Erhalt der protektiven Wirkung von COX 1 in der Magemucosa, was zunächst auch in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte (69). In der klinischen Anwendung zeigte sich allerdings, dass es unter der Behandlung mit Coxiben, vor allem bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil, zu einem vermehrten Auftreten thromboembolischer Ereignisse kam (70,71), was dazu führte, dass die meisten Vertreter der Coxibe wieder vom Markt genommen werden mussten und die auf dem Markt verbliebenen Coxibe einer strengeren Indikationsstellung unterlagen. Die Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX-Studie (APPROVe-Studie) zeigte bereits nach 18 Monaten Behandlung mit

Rofecoxib (VIOXX) eine nahezu verdoppelte Rate an kardiovaskulären Ereignissen im Vergleich zur Placebogruppe, was den vorzeitigen Abbruch der Studie zur Folge hatte (72). Ursächlich hierfür ist die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen vasodilatativ und antithrombotisch wirkendem PGI₂ und prothrombotischem TxA₂. Durch selektive COX2-Inhibitoren wird die Synthese von PGI₂ gehemmt, während TxA₂ weiter synthetisiert wird, was eine gesteigerte Plättchenaggregation zur Folge hat und das Auftreten thromboembolischer Ereignisse begünstigt. In verschiedenen transgenen Mausmodellen wurde dieser Zusammenhang im Hinblick auf die Bedeutung für die Atherosklerose untersucht. So zeigte Cheng *et al.* (73) durch IP-Rezeptor-*knockout* eine gesteigerte SMC-Proliferation und Thrombozytenaktivierung, was durch gleichzeitigen *knockout* des Thromboxan-Rezeptors wieder aufgehoben wurde.

Das empfindliche Gleichgewicht zwischen prothrombotischen und antithrombotischen Produkten der COX-Isoenzyme kann durch COX-Inhibitoren gestört werden. Eine Inhibition von COX2 und deren Syntheseprodukten PGI und PGE₂ kann neben Auswirkungen auf die Blutgerinnung auch andere physiologische Vorgänge negativ beeinflussen. Andererseits könnten sich die antiinflammatorischen Wirkungen einer COX2 Inhibition und die hiermit verbundenen Umbauvorgänge in der EZM atherosklerotischer Läsionen positiv auf die Progression der Atherosklerose auswirken. Für die aktuellen Untersuchungen an atherosklerotischen Plaques wurde Indometacin als nicht-selektiver COX-Inhibitor und Rofecoxib als selektiver Inhibitor von COX2 ausgewählt. Die Strukturformeln von Indometacin und Rofecoxib sind in Abb. 8 graphisch dargestellt.

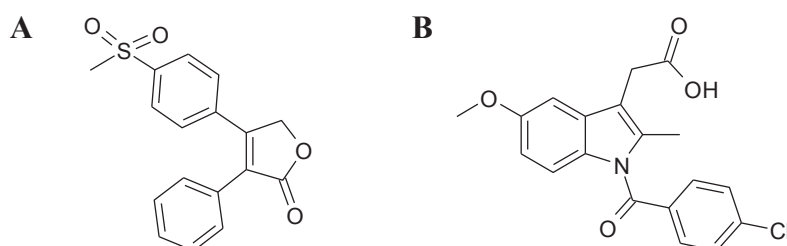


Abb. 8: Strukturformeln von (A) Rofecoxib und (B) Indometacin.

1.6 Fragestellung

Die hohe Zahl von Patienten mit symptomatischer Atherosklerose macht die Wichtigkeit einer effektiven primären und sekundären Prävention und pharmakologischen Intervention deutlich. Ein therapeutisches Ziel stellt die Senkung der Serumlipide durch Statine dar, die auch unabhängig von der Lipidsenkung pleiotrope und plaquestabilisierende Effekte aufweisen (74). Während die aggregationshemmenden Eigenschaften einer COX1-Inhibition z.B. durch Aspirin seit Jahren erfolgreich zur Prophylaxe von thrombembolischen Ereignissen genutzt werden, ist die Bedeutung von COX2 in der Atherosklerose bisher nicht gänzlich geklärt. Einerseits kommt es durch selektive COX2-Inhibitoren wie Rofecoxib zu einem vermehrten Auftreten thrombembolischer Komplikationen, andererseits führt die Hemmung der PG-Synthese zu antiinflammatorischen Effekten. Eine besondere Bedeutung im Rahmen der Atherogenese wird der EZM und hier insbesondere der Hyaluronsäure in atherosklerotischen Plaques zugeschrieben. Um die Auswirkungen einer Hemmung der COX2-abhängigen Prostaglandine wie PGI₂ und PGE₂ auf die Atherosklerose und die Zusammensetzung der EZM, besonders im Hinblick auf die Hyaluronsäurematrix zu untersuchen, wurde der COX2-spezifische Inhibitor Rofecoxib in einem atherosklerotischen Mausmodell, den *ApoEknockout* - Mäusen, verwendet. Durch Verwendung des unspezifischen COX-Inhibitors Indometacin wurde ein Vergleich zwischen selektiver und nicht selektiver COX-Inhibition erreicht. Welche Auswirkungen die PG-Synthesehemmung auf die Zusammensetzung der EZM und auf die Zellen in den atherosklerotischen Plaques hat, wurde anhand der folgenden Fragen untersucht:

1. Welchen Einfluss haben COX-Inhibitoren auf die Entwicklung der Plaquegröße im *ApoE knockout*-Mausmodell?
2. Inwiefern wird die Zusammensetzung von nicht zellulären Bestandteilen der EZM wie Kollagen und Proteoglykanen beeinflusst?
3. Welche Auswirkung haben COX-Inhibitoren auf den Hyaluronsäuregehalt der Plaques?
4. Wird die Zellzusammensetzung (Makrophagen, SMC) und die Proliferation der Zellen in den Plaques beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, in höchster Qualität von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen zur Gewebepräparation

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
4 % Formalin nach Lillie	46 mM Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) 29 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 4 % Formalin
ABC-Puffer	0,60 g Tris 1,33 g Natriumacetat x 3 H ₂ O 0,30 g NaCl ad 100 ml <i>Aqua dest.</i> BSA 1 mg/ml pH 8,0
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Blockierlösung für Histologie	1 mg/ml BSA in PBS
Blockierlösung endogener Peroxidasen	0,7 % H ₂ O ₂ in MeOH

2.2 Farbstoffe und Farbstofflösungen

Tabelle 2: Verwendete Farbstoffe und Farbstofflösungen (Picro-Siriusrot)

Farbstoff	Färbelösung
Picro-Siriusrot	0,1 (w/v) % Picro-Siriusrot gesättigte Pikrinsäurelösung
Cölestinblau	4,4 % (w/v) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 0,4 % (w/v) Cölestinblau 12,3 % (v/v) Glycerin
Hämalaun nach Mayer	gebrauchsfertig von Merck, Darmstadt

2.3 Substanzen/Kits und Arzneistoffe

Tabelle 3: Verwendete Substanzen und Kits

Substanzen	Hersteller
Aquatex	Merck, Darmstadt
Chondroitinase ABC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diaminobenzidin (DAB)	Zytomed Systems, Berlin
Entellan [®] (Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt
Hoechst 33324	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pikrinsäure, gesättigt	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Vectashield [®] Mounting Medium	Vector Laboratories, CA, USA

Tabelle 4: Verwendete Arzneimittel

Wirkstoffe	Arzneimittel-Name
Indometacin	Reinsubstanz, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rofecoxib	Vioxx [®] Tbl., Merck, Darmstadt

2.4 Antikörper

Tabelle 5: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
α -Aktin, polyklonal	DAKO, Hamburg	1:200
Biglykan LF106, polyklonal	von Larry Fisher (NIH, USA) zur Verfügung gestellt	1:1000
Decorin LF113, polyklonal	von Larry Fisher (NIH, USA) zur Verfügung gestellt	1:1000
Hyaluronsäurebinde- protein (HABP), biotinyliert	Seikagaku, Tokyo, Japan	2 μ g/ml
Mac 2, polyklonal	CEDARLANE Laboratories, Burlington, Ontario, Canada	1:400
PCNA (PC10, sc-56)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:1600

Tabelle 6 : In der Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
goat anti-rat IgG, Rhod X-konjugiert, präadsorbiert, (112295)	Dianova, Hamburg	1:400
goat anti-rabbit IgG, HRP- konjugiert, (sc- 2004)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:400
donkey anti-goat IgG, HRP- konjugiert, (sc- 2020)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:400
goat anti-mouse IgG, HRP- konjugiert, (sc- 2005)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:400
Streptavidin Typ IV, HRP- konjugiert, (S-5512)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	250 ng/ml
Streptavidin, FITC- konjugiert	DAKO, Hamburg	1:200

2.5 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Kaltlichtquelle (Sektionen)	Schott KL 1500 _{LCD}	Schott, Mainz
Kamera (Stereomikroskop)	Power Shot G6	Canon Inc., Tokio, Japan
Kamera + Software	Colorview II Kamera mit Soft Imaging System- Software	Soft Imaging System, Münster
Kühlplatte (Paraffinblöcke)	Leica EG 1150c	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop	Olympus BX 50	Olympus, Hamburg
Objektträger	SuperFrost Plus	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträgerbox	Objektträger- kasten 100	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Operationsbesteck	Aesculap	Aesculap AG, Tuttlingen
Paraffinstreckbad	Medax 25900	Medax, Kiel
Stereomikroskop	Stemi 2000	Zeiss, Oberkochen
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R (kühlbar)	Eppendorf, Hamburg

2.6 Tiere und Futter

Die Mäuse werden von der Firma Taconic M&B aus Dänemark bezogen und in der Tierversuchsanstalt in Düsseldorf gezüchtet. Die Tiere haben einen homozygoten *knockout* für das Apolipoprotein E (ApoE^{-/-}) und werden in einen C57BL/6 x 129 genetischen Hintergrund eingekreuzt. Für die Versuche werden ausschließlich männliche Tiere verwendet. In dem gewählten ApoE-*knockout*-Maus-Modell entwickeln die Mäuse durch das fehlende Apolipoprotein E ab einem Alter von 4-5 Wochen spontan atherosklerotische Plaques. Ab einem Alter von etwa 20 Wochen entstehen in diesem Mausmodell fibrotische Plaques unter anderem im Aortenursprung. Bei einem konstanten 12h Tag-/Nachtrhythmus steht den Mäusen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung. Die Mäuse erhalten ein Spezialfutter der Firma ssniff aus Soest (ssniff[®]NM – Alleinfuttermittel für die Zucht und Haltung von Nacktmäusen), dem, wie nachfolgend beschrieben, die COX-Inhibitoren Indometacin und Rofecoxib beigemischt werden. Alle Versuche richten sich nach den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes (Tierversuchsgenehmigung, Az 50.05-230-8/05) und dem *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* der US National Institutes of Health.

2.7 Studiendesign

Die Versuchstiere werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt, von denen die erste Gruppe über 15 Wochen, die zweite Gruppe über 25 Wochen mit normalem Nacktmausfutter gefüttert werden. Danach werden beide Hauptgruppen in jeweils drei Untergruppen aufgeteilt und dem Futter der ersten Untergruppe 3 mg/kg/d Indometacin und der zweiten Untergruppe 50 mg/kg/d Rofecoxib beigemischt. Die dritte Untergruppe erhält als Kontrollgruppe weiter normales Nacktmausfutter ohne Medikamentenzusatz. Nach einer 8-wöchigen Behandlungsdauer (d.h. im Alter von 23 bzw. 33 Wochen) werden die Mäuse getötet (siehe Abb.9) und Herz und Aorta für die darauf folgenden Analysen (Histologie bzw. RNA-Präparation) entnommen. Im Folgenden werden die Untergruppen nach dem Alter der Mäuse und der Art der Behandlung als 23I (23 Wochen alte Mäuse, Behandlung mit Indometacin), 23R

(Behandlung mit Rofecoxib) und 23K (Kontrollgruppe) und entsprechend bei den 33 Wochen alten Tieren mit 33I, 33R und 33K bezeichnet.

Um die Effizienz der Behandlung mit Rofecoxib und Indometacin zu untersuchen, werden die Prostaglandin- und Thromboxanmetabolite im Mäuseurin bestimmt. Diese Analysen werden von Dr. Tilo Grosser, Institute for Translational Medicine and Therapeutics, University of Pennsylvania, durchgeführt. Hierzu wird über 48 Stunden der Sammelurin der Versuchstiere aufgefangen und die darin enthaltenen PGI₂- und TxA₂-Urinmetabolite mittels Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie bestimmt.

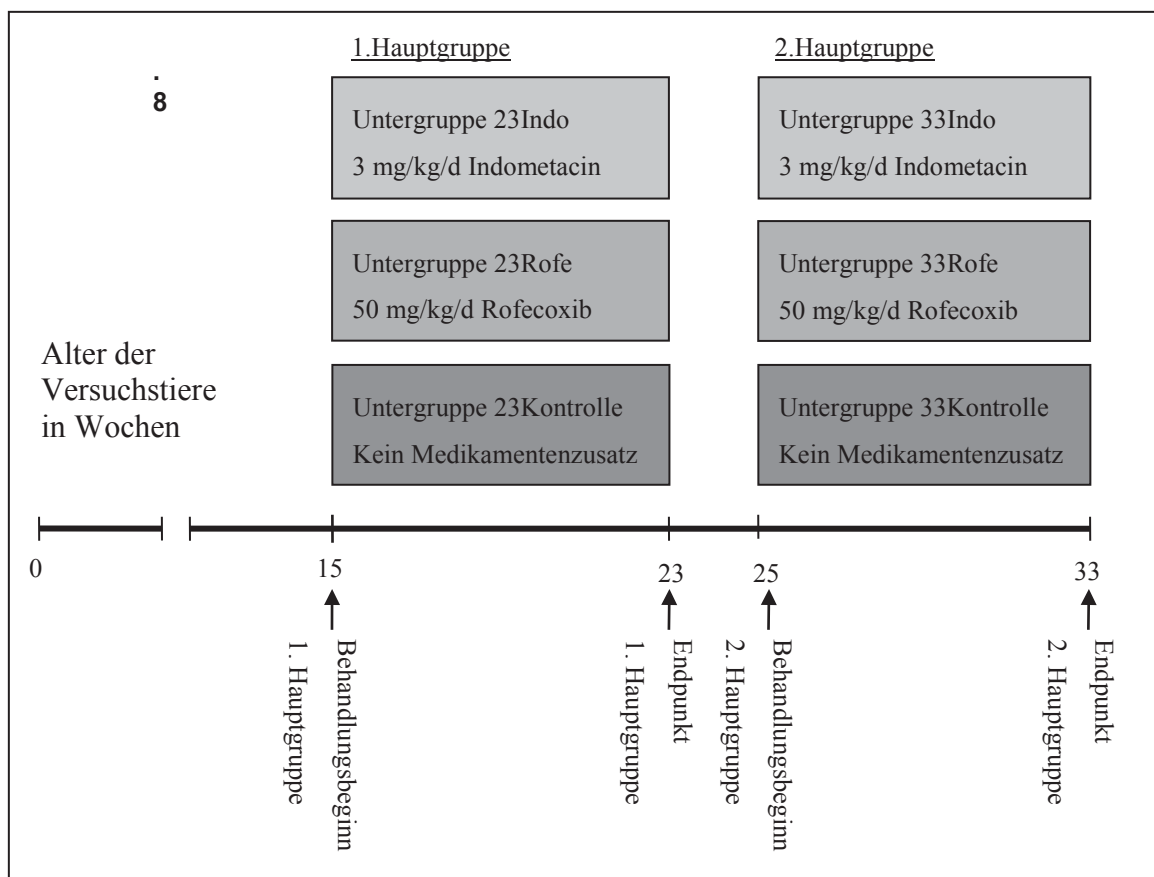


Abb. 9: Studiendesign

2.8 Präparation der Mäuse

Die Mäuse werden für die Gewebeentnahme mit CO₂ getötet. Bauch und Brustkorb der Tiere werden desinfiziert und mit sterilem, RNase freiem Operationsbesteck über einen longitudinalen Schnitt eröffnet. Das Herz und die Aorta werden nach Entnahme der übrigen Organe von umgebener Adventitia befreit und auf Höhe des Aortenbogens voneinander getrennt. Die Herzen werden für die spätere Paraffineinbettung fixiert. Die entnommene Aorta dient in einer weiteren Studie zur Isolierung und Analyse von RNA. Die RNA-Analysen werden von Dr. Andrea Marzoll, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt.

2.9 Histologische Analyse atherosklerotischer Plaques

2.9.1 Anfertigung und Bearbeitung von Paraffinschnitten

Die entnommenen Herzen werden bei Raumtemperatur sechs Stunden in Lillie-Puffer fixiert, um sie anschließend zu wässern, im Autotechnikon maschinell zu dehydrieren und in Paraffin einzubetten. Im gekühlten Zustand werden von den eingebetteten Herzen, senkrecht zur Längsachse des Herzens, auf Aortenklappenebene (siehe Abb.10) aufeinander folgende 3 µm dicke Schnitte angefertigt, von denen jeweils zwei auf einen Objektträger aufgezogen werden. Um ein Ablösen der Schnitte bei den bevorstehenden Färbungen zu verhindern, werden sie zur weiteren Lagerung bei 60°C hitzefixiert.

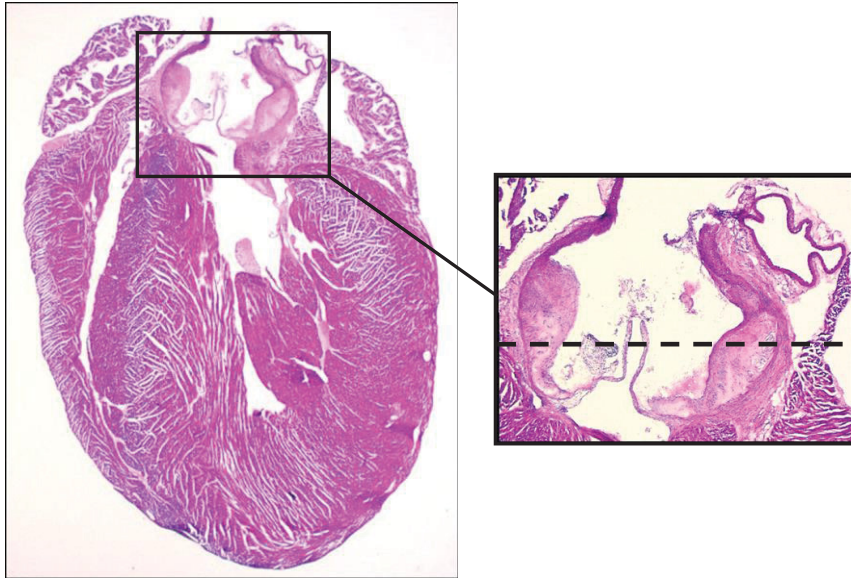


Abb. 10: Herz einer Maus im Längsschnitt in HE-Färbung; Ausschnittsvergrößerung mit Darstellung der Schnittebene (gestrichelte Linie) für die angefertigten Querschnitte des Aortenursprungs

Um die Schnitte anschließend von Paraffin zu befreien, werden sie 3 x 15 min in Xylol gewaschen und in einer absteigenden Alkoholreihe in vier Schritten für jeweils 2 min von 100 % igem bis zu 70 % igem Ethanol hydrophilisiert. Danach werden die Schnitte in PBS überführt, bevor mit den Färbungen begonnen wird.

2.9.2 Kollagen-Färbung

Die Kollagen-Färbung ist eine von *Puchtler et al. (75)* beschriebene Methode in der Histologie zur Darstellung des Kollagengehalts von Geweben. Zur Anfärbung der Zellkerne werden die Paraffinschnitte nach Deparaffinisierung und Hydrophilisierung für 7 min in Coelestinblau überführt und im Anschluss durch zweimaliges kurzes Eintauchen in 1 % iger Salzsäure differenziert und 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgt die Färbung mit Picro-Siriusrot für 15 min, bei der es zu einer Anlagerung des roten Farbstoffs zwischen die Kollagenfibrillen kommt. Nach aufsteigender Alkoholreihe (3 x 2 min) und einem Xylolbad für 3 x 5 min werden die gefärbten Schnitte mit Entelan eingedeckt. Mit der Picro-Siriusrot Färbung lässt sich sowohl das Kollagen selbst, als auch die

Packungsdichte der Kollagenfasern darstellen. Im polarisierten Licht erscheinen dicht gepackte Fasern rot, weniger dicht gepackte Fasern dagegen grün.

2.9.3 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemischen Färbungen werden die Schnitte nach Deparaffinisierung und Hydrophilisierung eine Stunde bei Raumtemperatur in einer BSA-haltigen Lösung blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und somit die Anfärbung des Hintergrunds zu reduzieren. Schnitte, die für die Nachweismethode mittels HRP-markierten Zweitantikörpern vorgesehen sind, werden 20 min mit H₂O₂-Lösung inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren und somit unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Um bei Proteoglykan-Färbungen das Antigen für den Erstantikörper zugänglich zu machen, werden Chondroitinsulfatketten eine Stunde bei 37° mit Chondroitinase gelöst und in ABC-Puffer verdaut. Für die Mac2-Färbung (Oberflächenantigen auf Makrophagen) sowie die Färbung mit dem fluoreszierenden Proliferationsmarker PCNA (proliferating cell nuclear antigen), einem Kernprotein, das in der DNA-Replikation eine Rolle spielt, werden die Schnitte vor Inkubation mit dem Erstantikörper in Citratpuffer gekocht, um die durch die Paraffineinbettung maskierten Antikörper wieder freizumachen. Für den Hyaluronsäurenachweis in den Plaques werden die Schnitte mittels Affinitätshistochemie für das HA-Bindeprotein (HABP) gefärbt, woraus direkt auf die Akkumulation der Hyaluronsäure geschlossen werden kann. Zum Nachweis glatter Muskelzellen in den Plaques werden die Schnitte mittels immunhistochemischer Detektion für α -Aktin, einem Oberflächenmarker für differenzierte glatte Muskelzellen gefärbt.

Die jeweiligen Primärantikörper werden in den entsprechenden Verdünnungen einzeln auf die Schnitte pipettiert, wobei jeder Objektträger einzeln behandelt wird, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Für die Negativkontrolle wird 1 % iges, in PBS gelöstes BSA auf die Schnitte gegeben, welche dann über Nacht bei 4 °C gelagert werden. Nach 3 x 5 min Waschen in PBS wird der Sekundärantikörper in gleicher Weise auf die Schnitte pipettiert und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Die Zweitantikörper sind entweder HRP-konjugiert, wobei die Detektion hier über eine durch Peroxidase katalysierte Farbreaktion von Diaminobenzidin

(DAB) erfolgt, oder es werden direkt durch Fluorochrom markierte Zweitantikörper verwendet. Nach Färbung der Kerne mit Hämalaun (bei der DAB-Detektion) bzw. Hoechst 33342 (bei den Fluoreszenzfärbungen) werden die Schnitte abschließend mit Aquatex (DAB) bzw. Vectashield (Fluoreszenz) eingedeckt.

2.10 Auswertung von histologischem Material

2.10.1 Mikroskop

Mit einem Olympus BX50 Mikroskop werden alle Schnitte mikroskopiert und mittels der aufgesetzten Colorview II Kamera sowohl lichtmikroskopische als auch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 40- und 100-facher Vergrößerung gemacht, wobei für die Fluoreszenzaufnahmen ein den sekundären Antikörpern entsprechender Filter verwendet wird. Mit einem Filter werden zunächst die mit Hoechst 33342 gefärbten Kerne fotografiert und anschließend mit einem zweiten Filter in exakt demselben Bildausschnitt die jeweils durch fluoreszierende Zweitantikörper gefärbten Areale. Diese Bilder werden mit Hilfe der *Soft Imaging System*-Software übereinander gelagert.

Zur genaueren Analyse der Siriusrot-Färbung wird ein spezieller Polarisationsfilter in den Lichtkanal eingebracht, um so die Packungsdichte der Kollagenfasern darstellen zu können.

2.10.2 Auswertung mittels ImageJ

Die quantitative Auswertung aller Färbungen erfolgt mittels der *ImageJ 1.37v software*. Mit dieser Software ist es möglich den Farbkanal für die Kernfärbung von dem Farbkanal der Zielstrukturen zu trennen und somit die Zielstruktur einzeln quantitativ zu erfassen. Es wird manuell ein konstanter Schwellenwert für alle Schnitte einer Färbung festgelegt, durch den die jeweils spezifisch gefärbten Bereiche, die oberhalb dieses Schwellenwertes lagen, als positiv

definiert werden. Die Werte der positiven Bereiche werden als Prozent der Plaqueoberfläche angegeben.

Um die teilweise schwankenden Intensitäten innerhalb der Färbungen mit zu berücksichtigen, wird die „mittlere Intensität“ des jeweiligen positiven Farbsignals mit dem Parameter „Prozent positiv/Gesamtfläche“ multipliziert und normalisiert.

Zur Bestimmung der Anzahl proliferierender Zellen in der PCNA-Färbung werden die Bilder für die Kernfärbung und die für PCNA gefärbten Bilder übereinander gelegt um so die proliferierenden Zellen durch eine andersfarbige Darstellung sichtbar zu machen. Die Zahl proliferierender Zellen wird als Prozent aller Zellen in den Plaques ausgedrückt.

2.11 Statistik

Die statistische Auswertung der Färbungen erfolgt mittels der *GraphPad Prism-Software* (Version 4.00, GraphPad Software, San Diego, USA). Die mit ImageJ erhobenen Messdaten werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Das Signifikanzniveau P für α wird mit 0.05 festgelegt. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen werden mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche überprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Behandlung mit Rofecoxib und Indometacin

Die Behandlung der ApoE^{-/-} Mäuse mit Rofecoxib und Indometacin wird im Alter von 15 bzw. 25 Wochen begonnen. Bei dem gewählten Mausmodell entwickeln die Tiere bereits ab einem Alter von 4-5 Wochen atherosklerotische Plaques. Die Progression der Atherosklerose und die Veränderungen in der Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques werden nach jeweils 8-wöchiger Behandlungszeit mit Rofecoxib bzw. Indometacin untersucht. Die Effizienz der COX-Inhibition wird von Dr. Tilo Grosser, Institute for Translational Medicine and Therapeutics, University of Pennsylvania, anhand der PGI₂- und TxA₂-Metabolite im Urin der Versuchstiere überprüft. Der TxA₂-Metabolit 2,3-dinor-TxB₂ dient als Indikator für die COX1 Aktivität der Thrombozyten und wird unter Behandlung mit Indometacin nahezu vollständig supprimiert, während unter Rofecoxibbehandlung keine signifikante Reduktion auftritt (Abb. 11B). Die PGI₂-Biosynthese, gemessen anhand des Urinmetaboliten 2,3-dinor-6-keto-PGF₁α, wird durch Indometacin um >90% und durch Rofecoxib um ca.75% gehemmt (Abb. 11A) (76). Diese Ergebnisse belegen die COX2-Selektivität von Rofecoxib und die nicht-selektive Inhibition der Cyclooxygenase durch Indometacin.

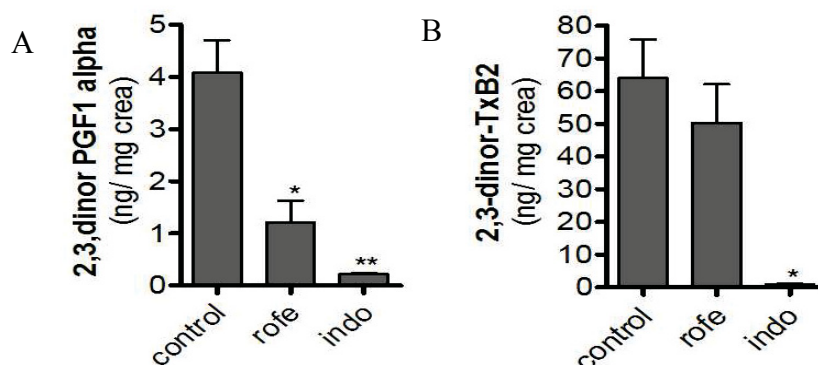


Abb. 11: Urinmetabolite von PGI₂ und TxA₂ im 48h Sammelurin. A, Konzentration von 2,3-dinor-6-keto-PGF₁α; B, Konzentration von 2,3-dinor-TxB₂ (76).

3.2 Einfluss der COX-Inhibitoren auf die Hyaluronsäureakkumulation in den Plaques

Zur Bestimmung der HA-Akkumulation in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs werden die angefertigten Paraffinschnitte mittels Affinitätshistochemie für das HA-Bindeprotein (HABP) gefärbt. Im Vergleich zur Untergruppe 23K kommt es sowohl unter der Behandlung mit Rofecoxib (23R) als auch mit Indometacin (23I) zu einer signifikanten Reduktion der Hyaluronsäure-Akkumulation in der Intima der atherosklerotischen Plaques. Während die unbehandelte Kontrollgruppe 23K bezogen auf die Gesamtplaquefläche eine HA-Akkumulation von $14,2 \pm 2,1$ % aufweist, zeigt sich unter Rofecoxib eine Reduktion der HA-Akkumulation auf $8,0 \pm 1,1$ % und unter Indometacin auf $8,1 \pm 0,9$ %. Damit ist im Vergleich zur Gruppe 23K eine Reduktion der HA-Akkumulation von ca. 44 % durch selektive COX2-Inhibition und um ca. 43 % durch nicht-selektive Inhibition von COX1 und 2 zu verzeichnen.

Im Gegensatz zu diesem signifikanten Ergebnis zeigt sich in der Hauptgruppe der 33 Wochen alten Tiere kein Unterschied in der HA-Akkumulation zwischen den Untergruppen 33K ($62,3 \pm 3,1$ %), 33R ($62,3 \pm 2,1$ %), 33I ($63,4 \pm 2,6$ %). Die Ergebnisse sind in Abb. 12 graphisch dargestellt.

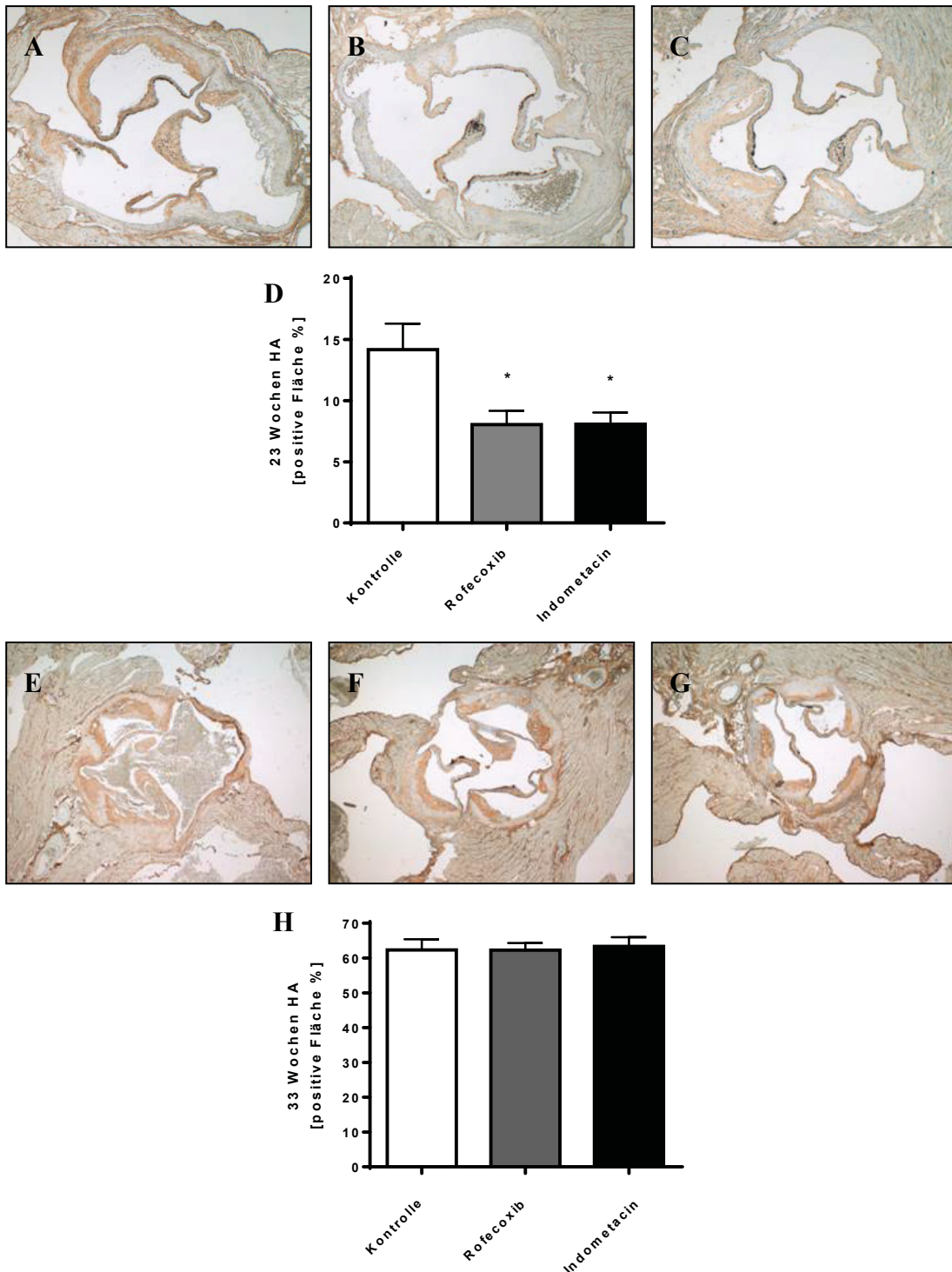


Abb. 12: Exemplarische Darstellung lichtmikroskopischer Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung der affinitätshistochemischen Färbung für HA in Aortenursprüngen von 23(A-C) und 33(E-G) Wochen alten, unbehandelten, mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten Tieren in 40-facher Vergrößerung. HA wurde über die Detektion des HA-Bindeproteins nachgewiesen. Positiv gefärbte Bereiche sind braun dargestellt. D, Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche von n=12 bei 23 Wochen alten Tieren mittels ImageJ; *, $p < 0.05$ vs. Kontrolle. H, Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche von n=12 bei 33 Wochen alten Tieren mittels ImageJ; *, $p < 0.05$ vs. Kontrolle

Die fehlende Reduktion der HA-Akkumulation in der Gruppe der 33 Wochen alten Tiere im Vergleich zu der unter Rofecoxib- und Indometacinbehandlung signifikanten Reduktion bei den 23 Wochen alten Tieren, deutet auf einen zu spät gewählten Zeitpunkt der Behandlung mit COX-Inhibitoren hin. Die Hemmung der Prostaglandinsynthese scheint hier keine Auswirkungen mehr auf das Ausmaß der HA-Akkumulation in den Plaques zu haben. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit der von Dr. Andrea Marzoll aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf untersuchten Genexpression der Hyaluronsäure-Synthasen in der Aorta der Versuchstiere. So kann sie in einer mRNA-Expressionsanalyse im Vergleich zur Kontrollgruppe 23K eine signifikante Reduktion der HAS1 und HAS2-Expression unter Rofecoxib (23R) und Indometacin (23I) und einen Trend hin zu einer reduzierten HAS3-Expression zeigen (Abb. 13). Dagegen kann bei den 33 Wochen alten Tieren keine Reduktion der HAS1-3 Expression nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Färbungen und Untersuchungen zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der Plaques (Zellproliferation, Makrophagen und glatte Muskelzellen) werden deshalb nur in der Gruppe der 23 Wochen alten Tiere durchgeführt.

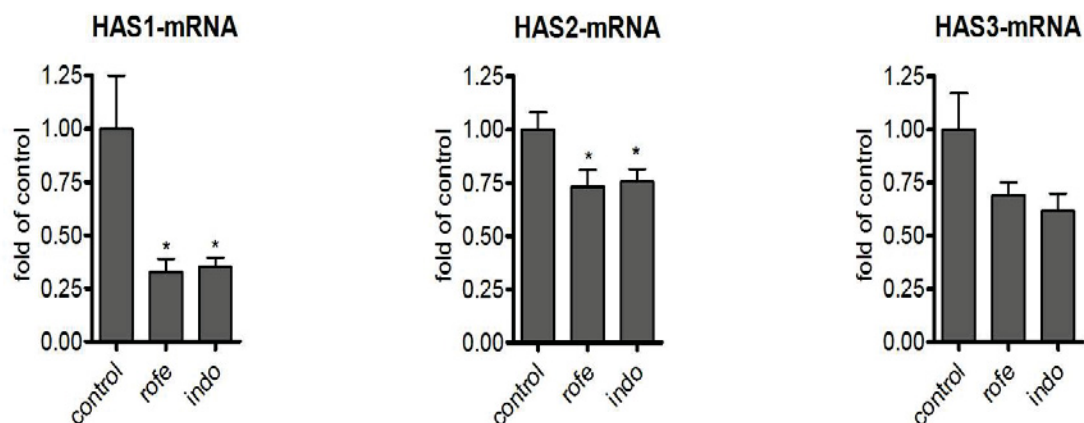


Abb. 13: Aortale mRNA-Expression von HAS-Isoformen von 23 Wochen alten Mäusen (76).

3.3 Einfluss der COX-Inhibitoren auf die Plaquegröße

Anhand mehrerer Messungen entlang der Aortenursprünge wird die mittlere Plaquefläche pro Aortenursprung bei den 23 und 33 Wochen alten Mäuse ermittelt. In der Gruppe 23R ist eine signifikante Zunahme der mittleren Plaquefläche im Vergleich zur Kontrollgruppe 23K um ca. 69 % von $25406 \pm 2056 \mu\text{m}^2$ auf $43048 \pm 5007 \mu\text{m}^2$ Plaquefläche nachzuweisen (Abb. 14A). Unter Indometacinbehandlung kann ein Trend in die gleiche Richtung beobachtet werden. Die mittlere Plaquefläche in dieser Gruppe beträgt $33163 \pm 3832 \mu\text{m}^2$.

Die 33 Wochen alten Tiere zeigen im Vergleich zu den jüngeren Tieren eine erwartete deutliche Progredienz des Plaquebesatzes in den Aortenursprüngen (Abb. 14B). Im Vergleich zur Gruppe 33K mit einer mittleren Plaquefläche von $173612 \pm 13320 \mu\text{m}^2$ kann hier jedoch in beiden behandelten Gruppen ein Trend zur Abnahme der Plaquefläche nachgewiesen werden, der unter in der Gruppe 33I ($132094 \pm 17286 \mu\text{m}^2$) etwas stärker ausfällt als in der Gruppe 33R ($162373 \pm 18526 \mu\text{m}^2$).

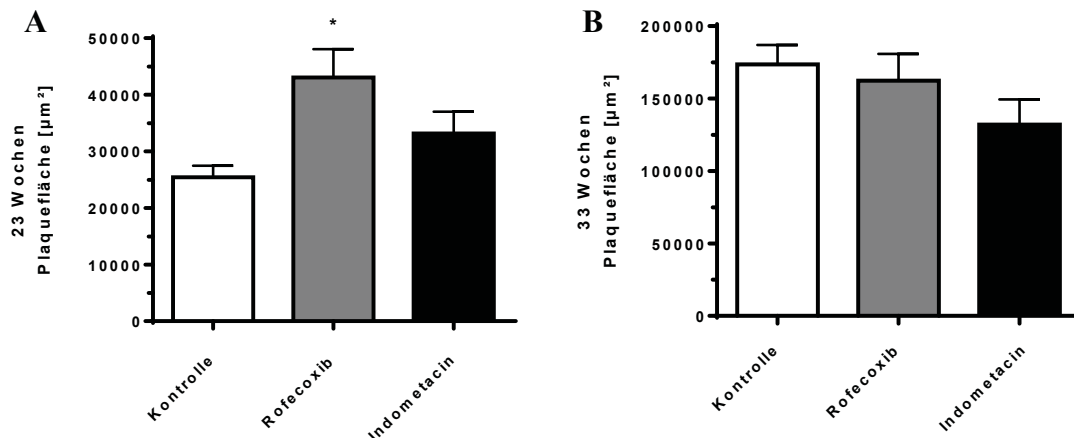


Abb. 14: Einfluss der COX-Inhibitoren auf die Plaquegröße im Aortenursprung von unbehandelten, mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten Tieren, A 23 Wochen Gruppe, n = 8-11, B 33 Wochen Gruppe, n = 8-11, *, $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

3.4 Einfluss der COX-Inhibitoren auf den Kollagengehalt der Plaques

Um die Auswirkungen der COX-Inhibition auf den Kollagengehalt atherosklerotischer Plaques zu analysieren und zu eruieren, ob eine erhöhte Matrixsynthese ursächlich für die Steigerung der Plauegröße unter Behandlung mit COX-Inhibitoren in der Gruppe der 23 Wochen alten Tiere ist, werden die Paraffinschnitte der Aortenursprünge mittels Picro-Sirius-Rot gefärbt. Bei den 23 Wochen alten Tieren zeigt sich zwischen den beiden behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied im Kollagengehalt. Dieser liegt mit $71,2 \pm 10,7$ % positiv gefärbter Fläche in der Gruppe 23R und $71,8 \pm 7,7$ % in der Gruppe 23I nur gering über dem Kollagengehalt der Kontrollgruppe mit $65,5 \pm 7,8$ % (Abb. 15D). Wie der Anteil rot-polarisierten Kollagens bei der Untersuchung mit polarisiertem Licht zeigt, wird auch die Packungsdichte der Kollagenfibrillen nicht signifikant durch die Rofcoxib- oder Indometacinbehandlung beeinflusst ($2,2 \pm 0,3$ % rot-polarisiertes Kollagen in der Gruppe 23K, $2,4 \pm 0,6$ % in 23R und $2,3 \pm 0,5$ % in 23I; siehe Abb. 15H).

Bei den 33 Wochen alten Tieren zeigt sich ebenfalls keine signifikante Änderung im Kollagengehalt der Plaques und der Packungsdichte der Kollagenfibrillen. Hier lässt sich in der Gruppe 33I lediglich ein leichter Trend hin zu einem vermehrten Kollagengehalt nachweisen, mit einer positiv gefärbten Fläche von $75,1 \pm 4,2$ % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $67,8 \pm 3,2$ % (Abb. 16D). Zudem weist die Gruppe 33I unter polarisiertem Licht einen Anteil rot-polarisierten Kollagens von $2,5 \pm 0,4$ % auf und zeigt damit eine gering erhöhte Packungsdichte des Kollagens im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $2,0 \pm 0,2$ % (Abb. 16G). In der Gruppe 33R kann in den Plaques des Aortenursprungs ein Kollagengehalt von $70,9 \pm 3,4$ % sowie ein Anteil dichter gepackten, rot-polarisierenden Kollagens von $2,2 \pm 0,3$ % festgestellt werden.

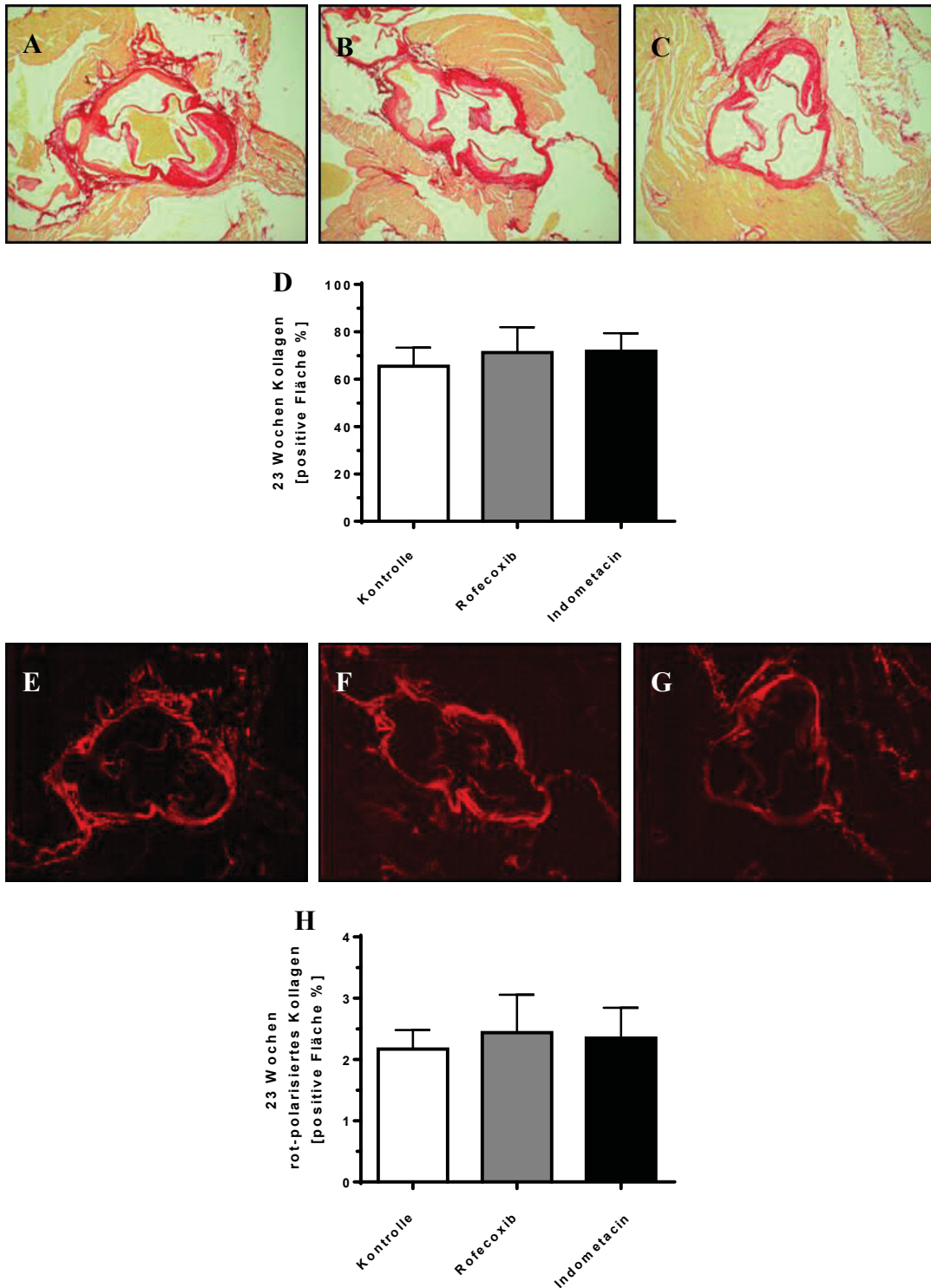


Abb. 15: Exemplarische Darstellung Picro-Siriusrot-gefärbter Schnitte des Aortenursprungs von 23 Wochen alten, unbehandelten, mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten Tieren. A-C, lichtmikroskopische Aufnahme in 40-facher Vergrößerung; hellrot gefärbte Bereiche stellen Gesamtkollagen dar. E-G; Darstellung der oberen Bilder unter polarisiertem Licht. Rot gefärbte Bereiche zeigen speziell Kollagenfasern mit erhöhter Packungsdichte. D, Auswertung der in A-C dargestellten Versuche, n = 8-11. H, Auswertung der in E-G dargestellten Versuche, n = 8-11.

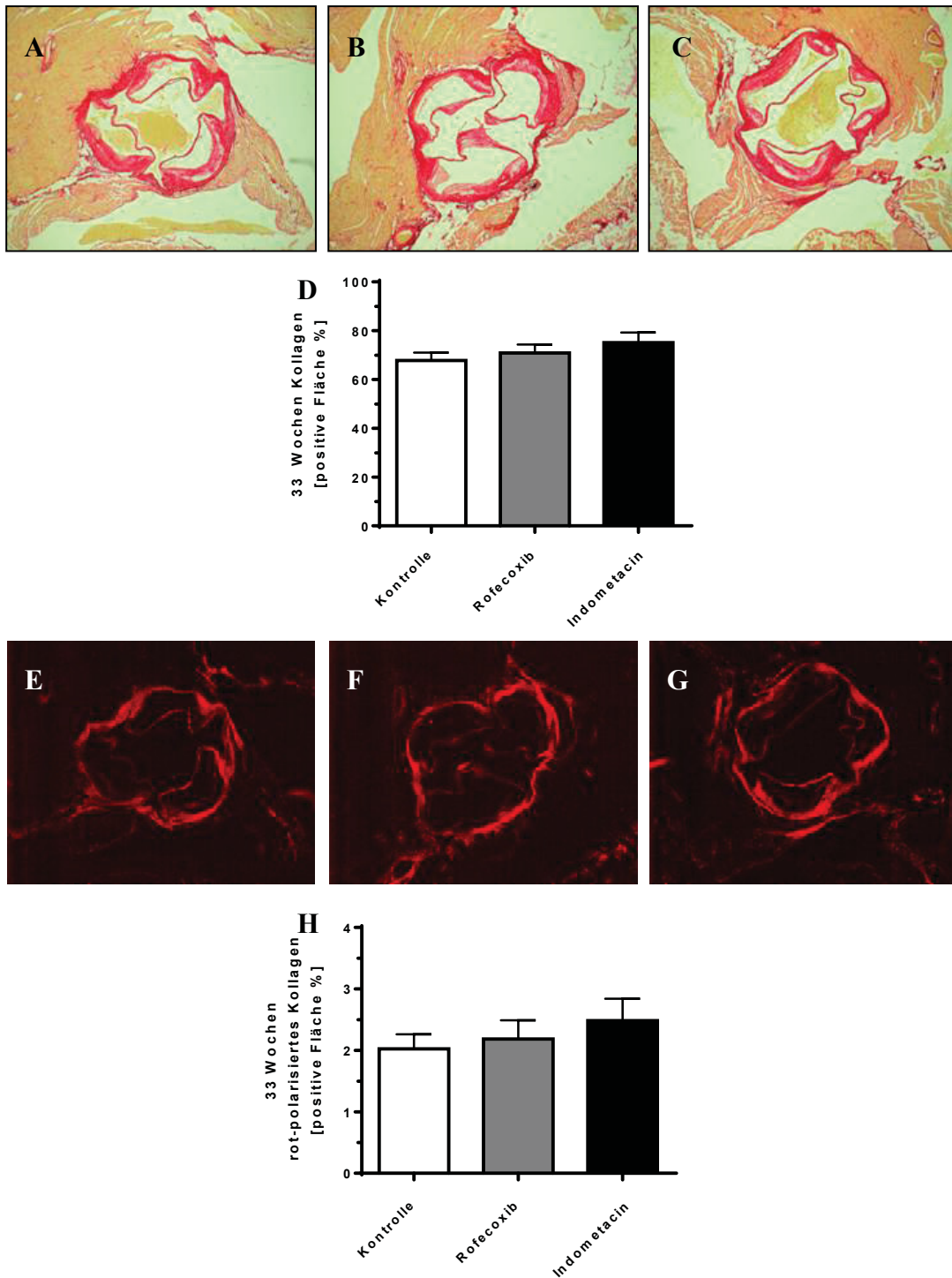


Abb. 16: Exemplarische Darstellung Picro-Siriusrot-gefärbter Schnitte des Aortenursprungs von 33 Wochen alten, unbehandelten, mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten Tieren. A-C, lichtmikroskopische Aufnahme in 40-facher Vergrößerung; hellrot gefärbte Bereiche stellen Gesamtkollagen dar. E-G; Darstellung der oberen Bilder unter polarisiertem Licht. Rot gefärbte Bereiche zeigen speziell Kollagenfasern mit erhöhter Packungsdichte. D, Auswertung der in A-C dargestellten Versuche, n = 8-11. H, Auswertung der in E-G dargestellten Versuche, n = 8-11.

3.5 Einfluss der COX-Inhibitoren auf die Expression der kleinen leucinreichen Proteoglykane Biglykan und Decorin

Die beiden untersuchten SLRPs Biglykan und Decorin sind eng mit Kollagen assoziiert und stehen über Bindungsstellen und GAG-Ketten mit Kollagen in Wechselwirkung. Für Biglykan und Decorin kann nach quantitativer Auswertung der gefärbten Aortenursprünge kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den behandelten Gruppen festgestellt werden. In beiden Altersgruppen zeigt sich lediglich ein leichter Trend hin zu einem höheren Biglykan- bzw. Decoringehalt in den mit COX-Inhibitoren behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In der immunhistochemischen Färbung für Biglykan wurden in der Kontrollgruppe 23K $19,7 \pm 2,1$ % und bei den 33 Wochen alten Tieren (33K) $20,7 \pm 3,5$ % der Plauefläche positiv für Biglykan gefärbt. Dieser Anteil steigt in den Gruppen 23R bzw. 23I um ca. 6 % auf $20,9 \pm 2,9$ % bzw. $20,9 \pm 3,6$ % positiv gefärbter Plauefläche an (Abb. 17A-D). Bei den 33 Wochen alten Tieren kann ein Anstieg um ca. 9 % in der Gruppe 33R ($22,7 \pm 3,7$ % positive Plauefläche) und etwas deutlicher (ca. 15 %) in der Gruppe 33I mit $23,8 \pm 2,5$ % positiv gefärbter Plauefläche beobachtet werden (Abb. 17E-H).

Ein ähnliches Bild ergibt die Auswertung der Decorinfärbung mit einem für Decorin positiv gefärbten Anteil der Plauefläche von $26,9 \pm 2,0$ % in der Kontrollgruppe 23K und einem Anstieg auf $32,5 \pm 4,3$ % in der Gruppe 23R und $29,6 \pm 3,4$ % in 23I, was einem Anstieg um ca. 21 % bzw. 10 % entspricht (Abb. 18A-D). Dieser Anstieg fällt bei den 33 Wochen alten Tieren geringer aus ($24,8 \pm 3,5$ % in 33K, $25,2 \pm 4,3$ % in 33R und $26,5 \pm 2,1$ % in 33I; Abb. 18E-H).

Im Gegensatz zu der signifikanten Reduktion der HA-Akkumulation in den Plaques sowohl durch selektive als auch nicht selektive COX-Inhibition werden das Kollagen sowie die an gleicher Stelle in atherosklerotischen Plaques exprimierten SLRPs Biglykan und Decorin nicht signifikant durch die COX-Inhibition beeinflusst.

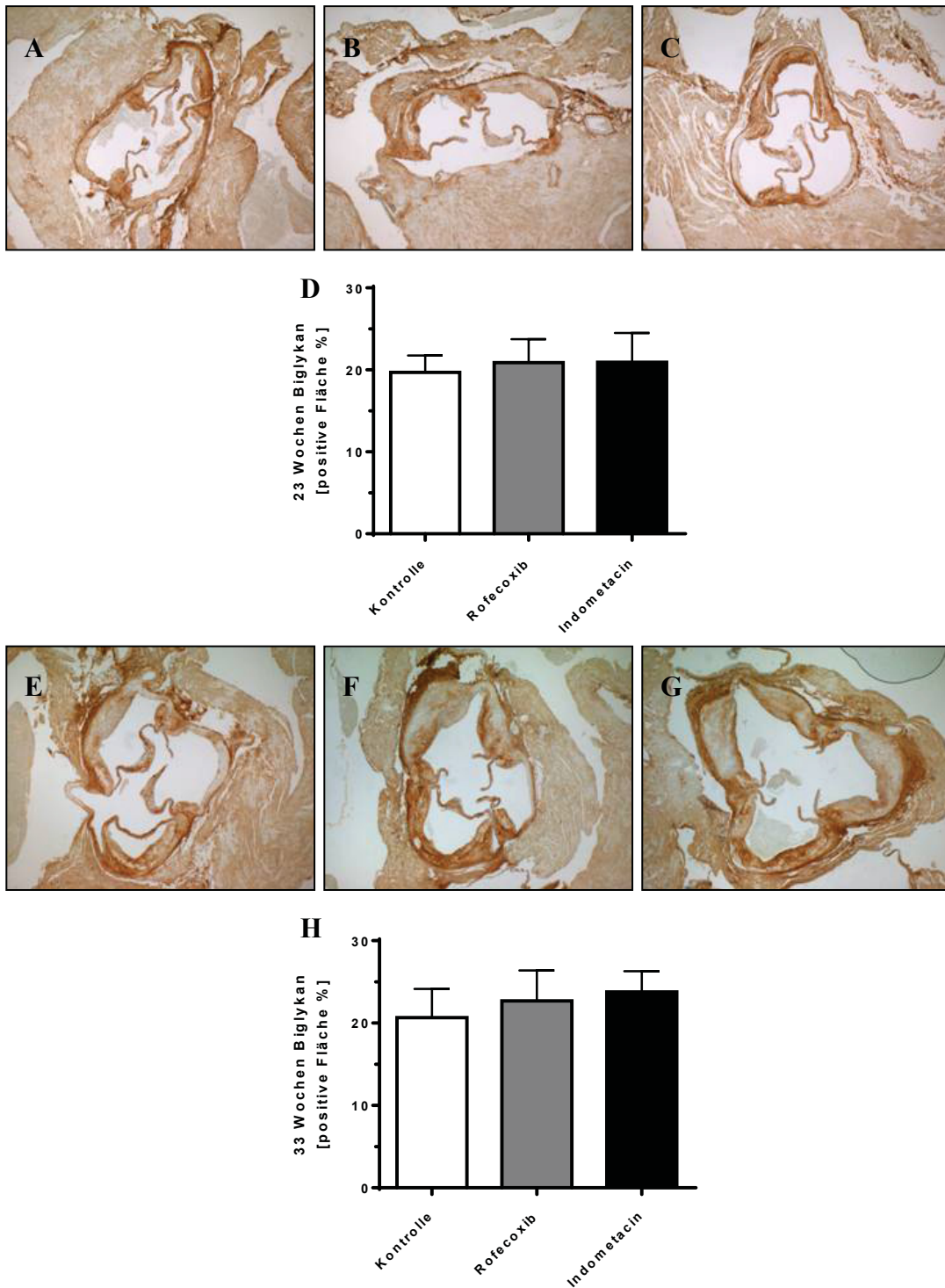


Abb. 17: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse der Expression von Biglykan in Plaques des Aortenursprungs von 23 (A-C) und 33 Wochen (E-G) alten, unbehandelten, mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten Tieren in 40-facher Vergrößerung. Biglykan exprimierende Bereiche sind braun dargestellt. D, Bildanalytische Auswertung der 23 Wochen alten Tiere mittels ImageJ für n = 9-13. H, Bildanalytische Auswertung der 33 Wochen alten Tiere mittels ImageJ für n = 10-13.

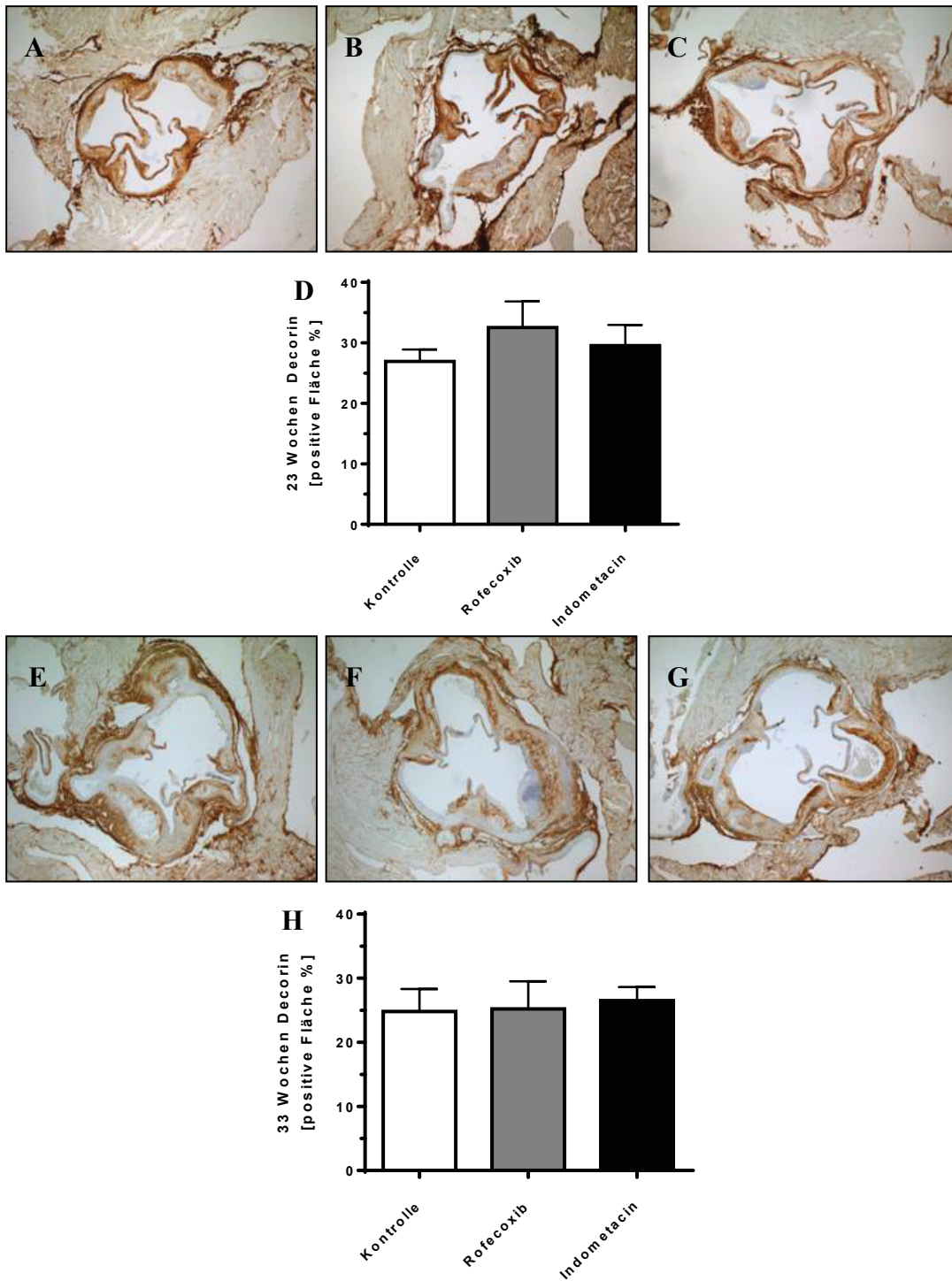


Abb. 18: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse der Expression von Decorin in Plaques des Aortenursprungs von 23 (A-C) und 33 Wochen (E-G) alten, unbehandelten, mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten Tieren in 40-facher Vergrößerung. Dekorin exprimierende Bereiche sind braun dargestellt. D, Bildanalytische Auswertung der 23 Wochen alten Tiere mittels ImageJ für n = 10-14. H, Bildanalytische Auswertung der 33 Wochen alten Tiere mittels ImageJ für n = 9-14.

3.6 Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Makrophagendichte in den Plaques

Die Inflammation spielt in der Entstehung und Progression der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. In der Entwicklung atherosklerotischer Plaques kommt es im Rahmen inflammatorischer Prozesse zur Migration von Monozyten aus dem Blut und Akkumulation von Makrophagen in den Plaques. Um den Einfluss der Prostaglandinsynthesehemmung auf den Makrophagengehalt der Plaques zu einem frühen Zeitpunkt der Atheroskleroseentwicklung zu untersuchen, werden die Makrophagen in den Plaques der 23 Wochen alten Mäusen durch immunhistochemische Detektion des Oberflächenantigens Mac-2 nachgewiesen. Die für Makrophagen positiven, rot gefärbten Bereiche finden sich vorwiegend an der Plaqueoberfläche und den Plaqueschultern. Im Vergleich zur Kontrollgruppe 23K mit einer Makrophagendichte von $19,1 \pm 1,5\%$ zeigt sich unter Indometacinbehandlung eine Reduktion um ca. 28 % auf $13,8 \pm 0,9\%$ (Abb. 19D). Ein Trend in die gleiche Richtung auf $16,3 \pm 1,6\%$ kann in der Gruppe 23R nachgewiesen werden.

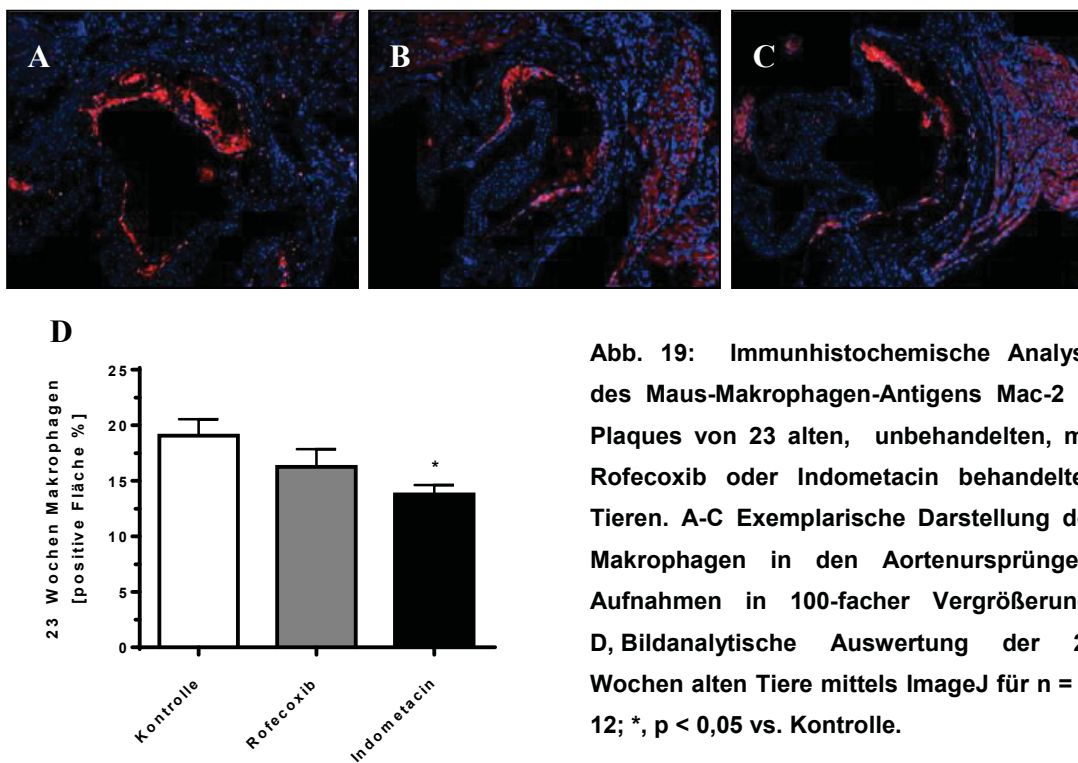


Abb. 19: Immunhistochemische Analyse des Maus-Makrophagen-Antigens Mac-2 in Plaques von 23 alten, unbehandelten, mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten Tieren. A-C Exemplarische Darstellung der Makrophagen in den Aortenursprüngen. Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung; D, Bildanalytische Auswertung der 23 Wochen alten Tiere mittels ImageJ für $n = 8-12$; *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.7 Einfluss von COX-Inhibitoren auf den Gehalt glatter Muskelzellen in den Plaques

Die SMC in den Plaques des Aortenursprungs wurden durch den Nachweis von α -smooth muscle-Aktin (α -SM-Aktin), einem Marker für differenzierte glatte Muskelzellen, nachgewiesen. α -SM-Aktin positiv gefärbte Bereiche stellen sich braun dar. Als Positivkontrolle sind in Abb. 20A und C neben den dargestellten Plaques des Aortenursprungs kleinere Gefäße mitabgebildet, die eine durchgehende, braun gefärbte Schicht von SMC in der Tunica media aufweisen. In den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs sind die SMC, wie die Abbildung 20A-C beispielhaft zeigt, nahezu ausschließlich an der Plaqueoberfläche lokalisiert. In den Gruppen 23R und 23I kommt es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem Anstieg dieser α -Aktin-positiven Schicht aus glatten Muskelzellen (Abb. 20D). Der Anstieg ist unter Indometacinbehandlung mit $0,5 \pm 0,1$ % positiver Fläche im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit $0,2 \pm 0,04$ % signifikant. In der mit Rofecoxib behandelten Gruppe zeigt sich ein nicht signifikanter Anstieg auf $0,3 \pm 0,1$ %.

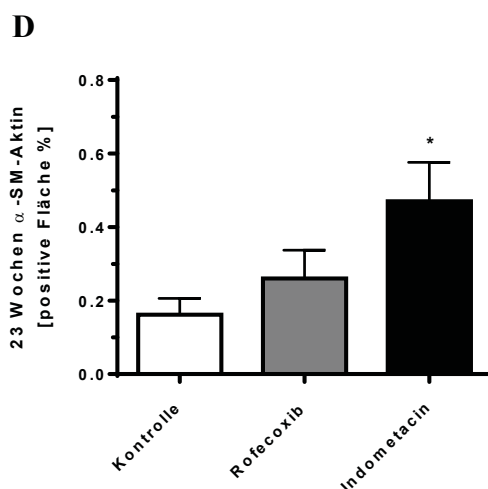
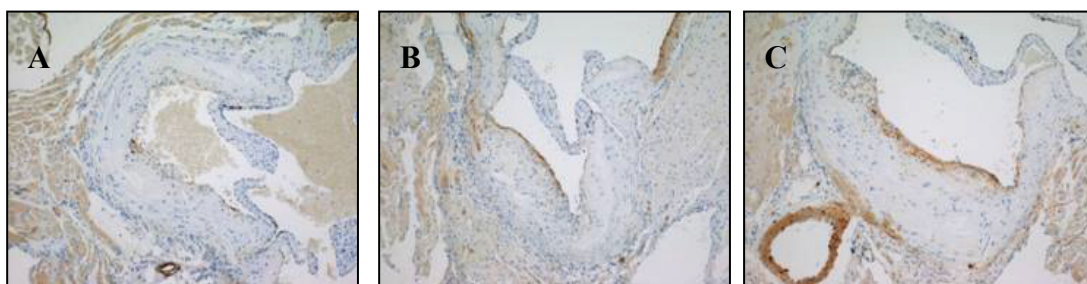


Abb. 20: Immunhistochemie für glatte Muskelzellen durch Detektion von α -Aktin in der fibrotischen Kappe von 23 Wochen alten, unbehandelten, mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten Tieren. A-C, Exemplarische Darstellung von Plaques aus Aortenursprüngen von n=8-12 Tieren. Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung; D, Vergleich der Länge des SMC-reichen Anteils (positiv für α -Aktin, braun gefärbt) der gesamten Plaqueoberfläche; *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.8 Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Proliferation von Zellen in den Plaques

Um zu untersuchen, ob der nachgewiesene signifikante Anstieg der α -SM-Aktin positiven SMC unter Indometacinbehandlung in Zusammenhang mit einer vermehrten Zellproliferation steht, wird eine immunhistochemische Färbung für den fluoreszierenden Proliferationsmarker PCNA durchgeführt. Die Auszählung der gelb erscheinenden proliferierenden Zellen ergibt einen insgesamt geringen Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtzellzahl. In der Kontrollgruppe 23K liegt dieser Anteil bei $1,4 \pm 0,2$ % mit nur gering steigender Tendenz in den Gruppen 23R ($1,8 \pm 0,3$ %) und 23I ($1,5 \pm 0,2$ %). Ein signifikanter Anstieg kann nicht beobachtet werden (Abb. 21A-D).

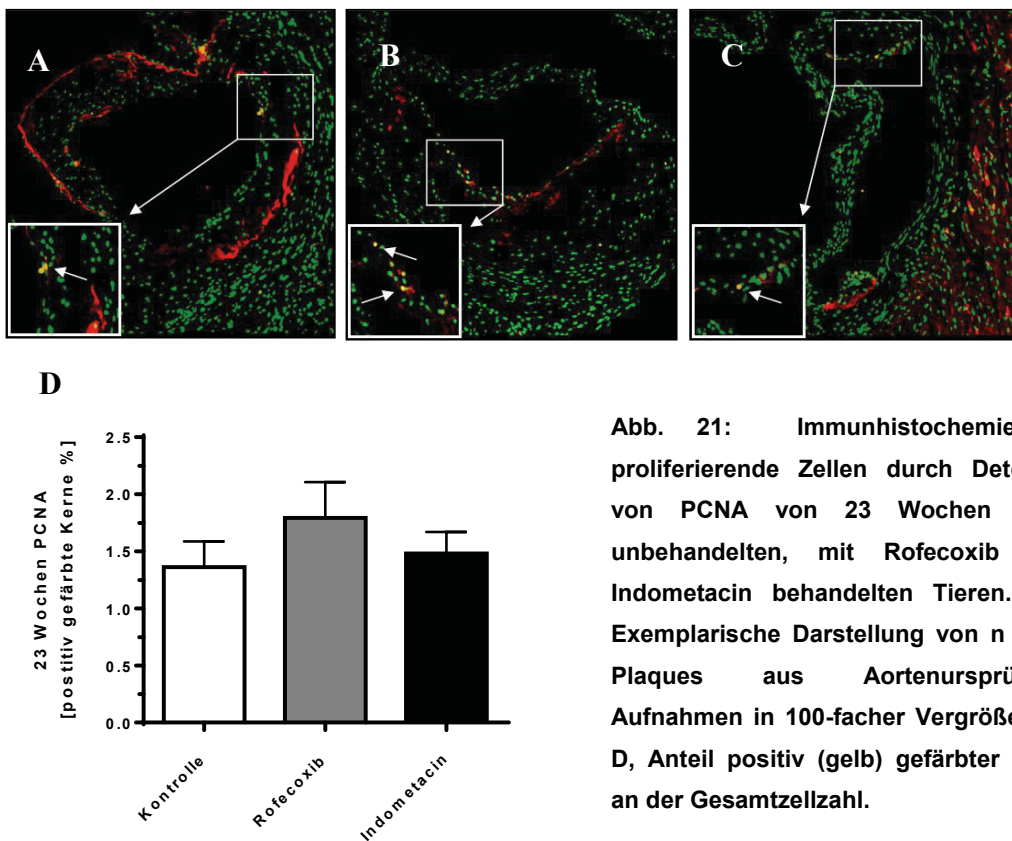


Abb. 21: Immunhistochemie für proliferierende Zellen durch Detektion von PCNA von 23 Wochen alten, unbehandelten, mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten Tieren. A-C, Exemplarische Darstellung von n = 8-11 Plaques aus Aortenursprüngen. Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung. D, Anteil positiv (gelb) gefärbter Kerne an der Gesamtzellzahl.

4. Diskussion

Neben allgemeinen präventiven Maßnahmen kommt der medikamentösen Intervention in der Atherosklerose eine immer größer werdende Bedeutung zu. Hier sind an erster Stelle die Statine zu nennen, die neben ihrer cholesterinsenkenden Wirkung auch Einfluss auf die Zusammensetzung der EZM (74) sowie die Inflammation und Thrombogenese haben (77,78), was insgesamt zu einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse bei Risikopatienten führen kann (79). Auch die Wirkstoffgruppe der COX-Inhibitoren kommt, neben der weit verbreiteten Anwendung in der Schmerztherapie, schon seit langem erfolgreich in der primären und sekundären Prävention atherosklerotischer Folgeerkrankungen zum Einsatz. Hier wird vor allem der aggregationshemmende Effekt der COX1-Inhibition durch verminderte TxA₂-Synthese genutzt, um das Risiko von Schlaganfällen und Myokardinfarkten zu verringern (80). Neben dieser gut belegten und ausgiebig genutzten Wirkung von COX-Inhibitoren, bleiben noch viele Fragen insbesondere in Bezug auf die Rolle von COX2 in atherosklerotischen Läsionen ungeklärt und sind, nicht erst seit der APPROVe-Studie (72), Gegenstand kontroverser Diskussionen. Verschiedene Zelltypen wie Makrophagen, SMC oder Endothelzellen können COX1, COX2 oder beide COX-Isoenzyme exprimieren und beeinflussen damit die Entstehung und Progression der Atherosklerose auf unterschiedliche Art und Weise. Welche Wirkung im Einzelnen im Vordergrund steht, hängt von der zell- und gewebespezifischen Ausstattung mit PG-Synthasen und dem Vorhandensein verschiedener Rezeptor-Subtypen ab. Während das über COX1 vermittelte TxA₂ die Atherogenese bei Mäusen beschleunigt (81), kann es durch Hemmung von COX2 zu gegensätzlichen Wirkungen kommen. Verschiedene Studien zeigen, dass durch COX2 Inhibition die Atherosklerose beschleunigt (82), gehemmt (83) oder gänzlich unbeeinflusst (84) bleiben kann.

Gerade aufgrund der weit verbreiteten Anwendung von COX-Inhibitoren im klinischen Alltag ist es deshalb wichtig den Einfluss dieser Wirkstoffgruppe auf die Entstehung und Progression der Atherosklerose besser zu verstehen. In dieser Arbeit wird der Einfluss im Hinblick auf die Zusammensetzung der EZM und der zellulären Bestandteile atherosklerotischer Plaques untersucht, wobei ein besonderes Augenmerk auf die HA-Matrix und die Plaquestabilität gelegt wird.

4.1 Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf die Hyaluronsäurematrix – pro- oder anti-atherogene Wirkung?

Wie gezeigt wurde, ergibt die immunhistochemische Untersuchung von atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs bei ApoE-defizienten Mäusen in der Gruppe der 23 Wochen alten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der HA-Akkumulation sowohl unter Behandlung mit dem nicht-selektiven COX-Inhibitor Indometacin, als mit dem selektiven COX2-Inhibitor Rofecoxib. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen verschiedener Studien, die die Regulierung von HA *in vitro* und die Rolle von HA in atherosklerotischen Plaques untersuchen (40,46,49-51). Die Gruppe der 33 Wochen alten Tiere zeigt weder unter Rofecoxib noch unter Indometacinbehandlung eine Veränderungen des HA-Gehaltes in den Plaques. Der Zeitpunkt könnte zu spät gewählt sein, sodass die COX-Inhibitoren keinen Einfluss mehr auf die Transkription der HAS ausüben können.

In atherosklerotischen Läsionen wird HA vor allem von SMC sezerniert und ist assoziiert mit der Entstehung einer Neointimahyperplasie (40,46). Eine Vielzahl an Mediatoren kann die HA-Sekretion und HAS-Expression von SMC beeinflussen. *Viola et al.* (85) können in einer jüngst erschienen Untersuchung zeigen, dass zu diesen Mediatoren auch Cholesterol-beladenes oxidiertes LDL zählt, welches nicht nur über die Ausbildung von Schaumzellen zur Progression atherosklerotischer Plaques beiträgt, sondern über sog. *scavenger* Rezeptoren wie LOX-1 auch direkt die HA-Sekretion über Aktivierung von HAS2 und 3 fördert. Auch für Adenosin kann in SMC humaner Koronararterien eine Steigerung der HA-Synthese über eine HAS1 Induktion nachgewiesen werden, was für das vaskuläre Remodelling in der Atherosklerose von Bedeutung ist (86). Viele weitere Faktoren wie PDGF-BB, TGF- β 1, Thrombin sowie die Prostaglandine beeinflussen die HA-Synthese abhängig von den HAS-Isoformen und dem betroffenen Gewebe- oder Zelltyp (49,50). Die Arbeit von *van den Boom et al.* (51) zeigt in diesem Zusammenhang wie genau die Expression der verschiedenen HAS-Isoformen durch Prostaglandine beeinflusst wird (51). Sowohl die HAS1- als auch die HAS2-mRNA-Expression werden, neben anderen Stimuli, durch PGI₂ und PGE₂ über Bindung an IP- und EP₂-Rezeptoren induziert (51). Interessanterweise zeigt die HAS3 keine Abhängigkeit von den Prostaglandinen und weist nur nach

Stimulation mit IL-1 β , ein von Makrophagen sezerniertes Zytokin, eine vermehrte mRNA-Expression auf (51).

Unter Rofecoxib und Indometacinbehandlung kann in der vorliegenden Untersuchung eine etwa identische Reduktion der HA-Akkumulation erreicht werden, was vermuten lässt, dass insbesondere COX2 und ihre Produkte wie PGI₂ und PGE₂ für diesen Effekt verantwortlich sind. Nach der Arbeit von *van den Boom et al.* (51) sollte die reduzierte HA-Akkumulation durch die hier verwendeten COX-Inhibitoren folglich vor allem durch Inhibition von HAS1 und HAS2 bedingt sein. Diese Vermutung wird durch *Marzoll et al.* (76) bestätigt. Ihre Untersuchungen zeigen in denselben apoE-defizienten Mäusen mittels Real-time(RT)-PCR eine signifikante Reduktion der HAS1- und HAS2-mRNA-Expression in der thorakalen Aorta durch Rofecoxib und Indometacin. Die HAS3-mRNA-Expression zeigt sich, den *in vitro* Ergebnissen von *van den Boom et al.* entsprechend, auch *in vivo* nicht signifikant reduziert (76). Außerdem scheint HAS2 in dem von uns gewählten *in vivo* Modell weniger stark von der COX-Funktion abhängig zu sein als HAS1, während sich hier *in vitro* keine Unterschiede ergeben (50,51,76).

Es stellt sich nun die Frage, welche Bedeutung eine reduzierte HAS-mRNA-Expression und HA-Akkumulation für die Stabilität und die Progression der Atherosklerose haben. Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien können den Zusammenhang zwischen einer HA-reichen Matrix und einer vermehrten Proliferation und Migration von vaskulären SMC belegen (46,49,87,88). Die aktivierten SMC exprimieren ihrerseits HA-Synthasen, steigern die HA-Sekretion und fördern so wiederum die Ausbildung eines proliferativen, migratorischen und sekretorischen Phänotyps der SMC (49,89,90). Welche individuelle Rolle die verschiedenen HAS-Isoformen jedoch in Bezug auf die Atherosklerose spielen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Dagegen konnten auf dem Gebiet der Tumorforschung in diesem Zusammenhang schon wichtige Informationen gewonnen werden. Korrelierend zu den Ergebnissen bei vaskulären SMC ist eine HA-reiche Matrix auch für viele Tumore charakteristisch und ist assoziiert mit einer vermehrten Migration und Proliferation von Tumorzellen (91). Beispielhaft sei hier die vermehrte Metastasierung von Melanom- und Fibrosarkomzellen durch HAS1 und HAS2-Überexpression (92) und die signifikant gesteigerte Zellproliferation und -migration durch eine HAS3-Überexpression beim Prostatakarzinom genannt (93). In Bezug auf das

kardiovaskuläre System kann *Chai et al.* (94) in einer 2005 veröffentlichten Studie zeigen, dass eine SMC-spezifische Überexpression von HAS2 in ApoE-defizienten Mäusen zu einer beschleunigten Progression der Atherosklerose führt. Ob dies ein spezifischer Effekt der HAS-Isoform oder das Ergebnis eines generellen HA-Anstiegs ist, bleibt zunächst ungeklärt.

Ein wichtiger Einflussfaktor ist die Größe der HA-Moleküle, die durch die verschiedenen HAS-Isoformen (34) und die HA degradierenden Enzyme, die sogenannten Hyaluronidasen (HYAL) reguliert wird. Mittlerweile steht fest, dass die Größe der HA-Moleküle von entscheidender Wichtigkeit für deren Funktion und Wirkung ist. Für niedermolekulare HA (LMW-HA) kann eine Verstärkung von Inflammation, Angiogenese sowie der Proliferation und Migration verschiedener Zellarten nachgewiesen werden (40,41). Die Inflammation wird u.a. über eine Aktivierung der Phospholipase A2 und Eicosanoid-Produktion in Makrophagen vermittelt (95). Zudem können *Vistejnova et al.* (96) in dermalen Fibroblasten eine vermehrte Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch kleinere HA Moleküle (4,3 kDa) nachweisen. Die durch LMW-HA induzierte verstärkte Angiogenese, die teilweise über CD44 reguliert wird, ist in atherosklerotischen Plaques mit einer verminderten Plaquestabilität verbunden (97,98,99). Auch *Bot et al.* (100) können in atheromatösen Läsionen einen hohen LMW-HA Gehalt und eine erhöhte CD44 Expression nachweisen, die mit einer gesteigerten Aktivität von MMP-9 als Zeichen der Plaquestabilisierung einhergeht. Dagegen zeigt hochmolekulare HA (HMW-HA) antiinflammatorische Wirkungen mit einer verminderten Expression proinflammatorischer Stimuli (96). Außerdem kann HMW-HA dosisabhängig zu einer Inhibition der Proliferation führen (101), ist in der Wundheilung und in der Entwicklung einer Immuntoleranz beteiligt (102). Dass neben der Größe der HA-Moleküle auch die Ausstattung der Gewebe mit HA-Rezeptoren eine Rolle in der Atheroskleroseprogression spielt und von therapeutischer Bedeutung werden könnte, zeigt eine aktuelle Studie von *Ma et al.* (103) am Mausmodell nach Carotisligatur. Hier kann durch Antikörperblockade bzw. *knockout* des HA-Rezeptors RHAMM einem konstriktiven Remodelling der arteriellen Gefäßwand vorgebeugt werden (103).

Insgesamt deuten die Ergebnisse der Studien, die sich mit der pathophysiologischen Rolle der HA, insbesondere im Zusammenhang mit dem kardiovaskulären System,

beschäftigen, auf eine atherogene Wirkung von HA, insbesondere von LMW-HA, während der Atheroskleroseentwicklung hin. Die in dieser Arbeit beschriebene Reduktion der HA-Akkumulation unter Behandlung mit COX-Inhibitoren und die reduzierte Expression von HAS1 und HAS2 sind so möglicherweise als antiatherogene Effekte der COX-Inhibition zu werten.

4.2 Auswirkungen der COX-Inhibition auf die endotheliale Glykokalyx als mögliche Ursache für eine Vergrößerung der Plaquerfläche

Im Gegensatz zu den vermuteten antiatherogenen Effekten einer verminderten HA-Synthese, zeigen die jüngst gewonnenen Ergebnisse von *Nagy et al.* (104) im ApoE $-/-$ Mausmodell eine signifikante Steigerung atherosklerotischer Plaques in der Aorta durch Inhibierung der HA-Synthese mit 4-Methylumbelliferone (4-MU). Zusätzlich kommt es unter 4-MU zu prothrombotischen und proinflammatorischen Effekten, einer Steigerung des Blutdrucks sowie zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx. In einer *in vitro* Studie von *Pahakis et al.* (105) kann an Endothelzellen eine verminderte scherkraft-induzierte NO Sekretion nach enzymatischer Depletion von HA in der endothelialen Glykokalyx nachgewiesen werden. NO gilt in seiner Funktion als wichtigster flussinduzierter Vasodilatator als Zeichen einer gesunden Endothelfunktion. Patienten, die regelmäßig endotheliale Dysfunktionen und ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse aufweisen, sind Patienten mit chronischem Nierenversagen und Dialysepflichtigkeit. *Vlahu et al.* (106) können in einer *in vivo* Studie Schäden in der endothelialen Glykokalyx bei Dialysepatienten nachweisen. Diese Schäden sind positiv korreliert mit dem Ausmaß der systemischen Inflammation und gehen einher mit einem erhöhten HA-Serumlevel als Zeichen des Verlustes von HA aus der Glykokalyx (106). In einer weiteren Studie kann bei Patienten mit chronischem Nierenversagen zudem ein Zusammenhang zwischen einem hohen HA Spiegel im Blut und weiteren Plasmamarkern einer endothelialen Dysfunktion (soluble Flt-1, VCAM-1, vWF, Angiopoietin-2) nachgewiesen werden (107). Bei Patienten mit Nierenersatztherapie ist ein hoher HA-Serumspiegel mit einer schlechten Prognose korreliert (108). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der HA als

integraler Bestandteil der endothelialen Glykokalyx und die entscheidende Bedeutung für den Schutz und die ungestörte Funktion des Endothels (9,10,109).

In der bereits erwähnten Studie von *Nagy et al.* (104) überwiegen die negativen Auswirkungen der systemischen HA-Inhibition auf die Endothelfunktion gegenüber den positiven Effekten in der Neointima und erzeugen so eine proatherogene Gesamtwirkung. Auch in der vorliegenden Untersuchung kommt es bei den 23 Wochen alten Mäusen unter Rofecoxib zu einer signifikanten Steigerung der Plaquegröße und nicht, wie nach Reduktion der HA-Akkumulation zu erwarten gewesen wäre, zu einer abnehmenden Plaquegröße. Möglicherweise ist dies auf die Schädigung der endothelialen Glykokalyx durch verminderte HA-Synthese zurückzuführen. Auch unter Indometacin zeigen die 23 Wochen alten Tiere einen Trend hin zu einer größeren Plaquefläche, während bei den 33 Wochen alten Tieren weder Änderungen in der HA-Akkumulation noch in der Plaquegröße nachweisbar sind, was wie in 4.1 bereits erwähnt, durch den spät gewählten Zeitpunkt erklärbar ist. Weitere Untersuchungen sind angezeigt um die Funktion und Regulation von HA innerhalb der endothelialen Glykokalyx und mögliche HA-unabhängige Auswirkungen einer COX-Inhibition auf die Zusammensetzung und Integrität der endothelialen Glykokalyx und deren Einfluss auf die Atheroskleroseentstehung und –progression zu entschlüsseln.

4.3 Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf andere Bestandteile der Extrazellulären Matrix – allgemeines Matrixremodelling oder spezifische Effekte auf die Hyaluronsäure?

Nachdem in dieser Arbeit die Aufmerksamkeit zunächst der Hyaluronsäure gilt, werden mittels histochemischer bzw. immunhistochemischer Färbung von Plaques des Aortenursprungs anschließend auch mögliche Effekte der COX-Inhibition auf die in der Atherosklerose funktionell und strukturell bedeutsamen Proteoglykane Biglykan und Decorin sowie das Kollagen, als mengenmäßig größter Bestandteil der EZM (5), untersucht. Keiner dieser drei untersuchten EZM-Bestandteile zeigt ein signifikantes Ansprechen auf Rofecoxib oder Indometacin. Diese Ergebnisse stehen im Einklang

mit denen von *Marzoll et al.* (76), die bei einer durch Carotisligatur induzierten Neointimahyperplasie in *ApoE-knockout* Mäusen ebenfalls keine signifikante Änderung des Kollagengehaltes unter Rofecoxib und Indometacin beobachten kann. Lediglich in der Gruppe der 33 Wochen alten Mäuse kann von einem leichten Trend hin zu einem vermehrten Kollagengehalt mit diskret erhöhter Packungsdichte gesprochen werden. Der für die Plaquestabilität bedeutsame Kollagengehalt wird zum einen durch die von Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 und PDGF-BB regulierte Kollagensynthese (110, 111) und zum anderen durch den Abbau durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) bestimmt, die abhängig vom jeweiligen Subtyp nicht nur Kollagen, sondern zum Beispiel auch Biglykan und Decorin spalten können (z.B. MMP-13) (112,113). Es besteht ein Zusammenhang zwischen instabilen, symptomatischen Plaques und einer erhöhten MMP-Aktivität, wie es beispielsweise für MMP-7 und 9 nachgewiesen werden konnte (114,115,116). Ein wesentlicher Teil der pleiotropen und plaquestabilisierenden Effekte bei der Behandlung mit Statinen wird der Inhibition von MMPs zugesprochen (117). Außerdem wird angenommen, dass COX-2 abhängige Prostaglandine neben anderen proinflammatorischen Stimuli an der Regulierung der MMPs beteiligt sind (65,118). Da sich in dieser Untersuchung durch COX-Inhibition keine signifikanten Änderungen im Kollagen-, Biglykan- oder Decorinengehalt der Plaques detektieren lassen, scheint der Einfluss auf die MMPs in diesem Modell eine untergeordnete Rolle zu spielen, oder es hat sich ein Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und dem Abbau durch MMPs eingestellt.

Die mit Kollagen eng verknüpften und in Wechselwirkung stehenden Proteoglykane Biglykan und Decorin sind durch ihren Einfluss auf den Auf- und Abbau der Kollagenmatrix an der Stabilität atherosklerotischer Plaques beteiligt (119-121). Wie entscheidend der Einfluss für die Stabilität und Belastbarkeit der Gefäßwände ist, zeigt ein Biglykan-knockout Mausmodell in dem die Tiere spontane Aortenrupturen erleiden und Strukturanomalien der Kollagenfibrillen nachweisbar sind (122). In Biglykan-knockout Mäusen sind die Kollagenfasern locker gepackt und Elastinfaserbrüche sind nachweisbar, was zur Ausbildung von Aneurysmata beiträgt (123). Auch beim Menschen besteht eine Korrelation zwischen erniedrigter Biglykanexpression und einem gehäuften Auftreten von Bauchaortenaneurysmata (124). Biglykan-knockout Mäuse zeigen zudem eine Beeinträchtigung der Narbenbildung nach Myokardinfarkt, was zu linksventrikulären Rupturen und hämodynamischer Insuffizienz führt (125). Bei Decorin-defizienten Mäusen können

ähnliche Effekte durch Destabilisierung des Kollagennetzwerkes nachgewiesen werden (126). Entgegen diesen Matrix-stabilisierenden Einflüssen der Proteoglykane, zeigt vor allem Biglykan jedoch auch pro-atherogene Eigenschaften und ist damit mutmaßlich in die frühesten Stadien der Atheroskleroseentwicklung involviert. So kann Biglykan über seine GAG-Ketten LDL binden und zur Lipidretention in der extrazellulären Matrix von Plaques beitragen (127). Im Biglykan-knockout Mausmodell wird diese Retentionsfunktion vermutlich über eine vermehrte Sekretion von Perlecan kompensiert (123). Nach der response to retention Theorie gehört die Retention von LDL durch Proteoglykane zu den initialen Schritten der Atheroskleroseentstehung (128). Über toll-like Rezeptoren kann Biglykan außerdem eine Makrophagenaktivierung und systemische Inflammation vermitteln (129). Durch Überexpression von Biglykan kommt es in einem Mausmodell zu einer gesteigerten Lipidretention und einer Progression der Atherosklerose (130). Aufgrund der möglicherweise zentralen Bedeutung in frühen Atherosklerosestadien könnte die Regulation von Biglykan in Zukunft ein Ziel medikamentöser Interventionen zur primären oder sekundären Prävention der Atherosklerose darstellen. *Tiede et al.* (131) weisen in ihrer Arbeit Faktoren nach, die die Biglykanexpression in kardialen Fibroblasten regulieren. Hierzu gehören Wachstumsfaktoren wie PDGF-BB, sowie TGF- β 1, Thrombin und TNF- α als Stimulatoren, sowie Stickstoffmonoxid als Inhibitor der Biglykanexpression. Eine Regulierung von Biglykan oder Decorin über Prostaglandine ist bisher nicht bekannt und auch diese Arbeit liefert keine Hinweise auf eine Abhängigkeit der Biglykan- und Decorinexpression von Cyclooxygenaseprodukten.

Da sowohl Kollagen als auch Biglykan und Dekorin, ganz im Gegensatz zur Hyaluronsäure, keine Veränderungen unter der Therapie mit COX-Inhibitoren zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Reduktion der HA-Akkumulation und der HAS-mRNA-Expression um eine spezifische Wirkung vor allem der COX-2 Inhibition handelt und nicht um allgemeine Effekte im Rahmen des Plaqueremodelling.

4.4 Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf die zelluläre Zusammensetzung atherosklerotischer Läsionen

4.4.1 Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf den Makrophagengehalt - Hinweise für antiinflammatorische Effekte der COX-Inhibitoren?

Zu den frühen und entscheidenden Schritten in der Atheroskleroseentstehung zählt die Infiltration des subendothelialen Raumes durch im Blut zirkulierende Monozyten (132,133), die sich hier zu Makrophagen differenzieren und in der Lage sind, oxidiertes LDL zu phagozytieren (3). Schon in den initialen atherosklerotischen Läsionen, den sogenannten „fatty streaks“ sind Makrophagen nachweisbar (134). Makrophagen gehören neben T-Lymphozyten zu den Hauptvertretern der Entzündungszellen in atherosklerotischen Läsionen. Ihre Rekrutierung, transendotheliale Migration, Proliferation und Differenzierung wird durch verschiedene Faktoren wie ICAM-1, VCAM-1, M-CSF und MCP-1 beeinflusst (6). Nach Phagozytose von Lipiden bilden sich sogenannte Schaumzellen (135), die eine vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Matrix-degradierender Enzyme aufweisen (136,137). Auch Thrombozyten können eine oxLDL induzierte Monozyten-Extravasation und die Ausbildung von Schaumzellen vermitteln (138,139). In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen bilden Schaumzellen zusammen mit Lipiden, Matrixbestandteilen, Cholesterolkristallen und apoptotischen Zellresten einen nekrotischen Kern, der zur Instabilität von Plaques beiträgt und in dessen Entwicklung und Progression Makrophagen eine entscheidende Rolle spielen (140). Übereinstimmend kann in instabilen, symptomatischen Plaques beim Menschen eine erhöhte Anzahl an Makrophagen und T-Lymphozyten nachgewiesen werden (141). Zudem zeigen *Cipollone et al.* (65) in symptomatischen Plaques neben einer Erhöhung von Makrophagen und T-Lymphozyten auch eine Kolo-kalisation mit vermehrter COX-2 sowie PGE₂ und MMPs in den gleichen Plaquerregionen. Makrophagen exprimieren

COX-2 und produzieren darüber verschiedene Prostaglandine. Hierzu zählt unter anderem PGE₂, als eines der atherogensten Prostaglandine.

Der Nachweis von Makrophagen in den Plaques des Aortenursprungs der untersuchten Mäuse erfolgt mittels immunhistochemischer Färbung des Oberflächenantigens Mac-2. In der Gruppe der 23 Wochen alten Mäuse kommt es unter Indometacin zu einer signifikanten Reduktion des Makrophagengehaltes im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch unter Rofecoxib ergibt sich ein Trend in die gleiche Richtung, was auf eine verminderte Inflammation und höhere Plaquestabilität hinweist. Bei den hier verwendeten Mäusen werden in vorangehenden Untersuchungen zudem die Plasmakonzentrationen der proinflammatorischen Marker IL-6, MCP-1 und CRP bestimmt, die keine Veränderungen durch die COX-Inhibition zeigen (76). Somit lässt sich die Reduktion des Makrophagengehaltes als eine spezifische Reaktion auf die COX-Inhibition deuten und ist nicht durch eine allgemeine systemische Antiinflammation bedingt. Dass Indometacin, welches neben COX-2 auch die COX-1 abhängige Bildung von TxA₂ inhibiert, den Makrophagengehalt stärker senkt als Rofecoxib, ist durch die enge Verknüpfung von Gerinnungssystem und Inflammation in der Atherosklerose erklärbar. *Cyrus et al.* (142) belegen in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen, dass die Atherogenese durch selektive COX-1-Inhibition stark reduziert werden kann und dass es durch gleichzeitige Gabe eines TxA₂-Rezeptor-(TP-) Antagonisten zu einer weiteren signifikanten Reduktion kommt, die auch durch einen verminderten Makrophagengehalt der Plaques gekennzeichnet ist. Auch andere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass Thrombozyten eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung im Blut zirkulierender Monozyten spielen und mit ihren Adhäsionsmolekülen als eine Art Brückenbildner zwischen Endothelzellen und Monozyten fungieren (138,143). Die Makrophagen nehmen ihrerseits aber auch Einfluss auf die Gerinnung, indem sie, gesteuert durch pro-inflammatorische Stimuli, den Tissue factor (TF) auf ihrer Oberfläche exprimieren (144). TF ist ein membranständiges Glykoprotein und einer der Hauptakteure in der Initialisierung der Gerinnungskaskade (145).

In der vorliegenden Studie trägt neben den oben beschriebenen direkten Effekten durch die COX-1 Inhibition und den allgemeinen antiinflammatorischen Effekten durch COX-2 Inhibition vermutlich auch die Reduktion der Hyaluronsäure zu dem erniedrigten Makrophagengehalt der Plaques bei, denn auch die Hyaluronsäure kann

über den CD44-Rezeptor die Rekrutierung von Leukozyten und Monozyten aus dem Blut verstärken (146,147,148).

Zusammengenommen und im Vergleich mit den zitierten Arbeiten weisen die Ergebnisse im Bezug auf den Makrophagengehalt auf eine anti-inflammatorische, antithrombotische und plaquestabilisierende Wirkung der COX-Inhibitoren hin. Jedoch sollten weitere Untersuchungen angestrebt werden, um zum einen die Verknüpfung zwischen COX-1 vermittelten Effekten und der Inflammation in der Atherosklerose genauer zu klären und zum anderen, um die Rolle der Hyaluronsäure in inflammatorischen Prozessen, abhängig von der Molekülgröße und der HAS-Isoform, näher zu beleuchten.

4.4.2 Auswirkungen von COX-Inhibitoren auf den Plaquegehalt an glatten Muskelzellen und die Zellproliferation – Hinweise für erhöhte Plaquestabilität?

In den initialen Stadien der Atherosklerose kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch Endothelzellen, Thrombozyten und inflammatorische Zellen (3,6), die in der Folge zu einer Aktivierung von SMC führen. Die aktivierten SMC ändern ihren Phänotyp von einem ruhenden, kontraktilen zu einem sekretorischen Status (149), was mit einer vermehrten Proliferation und Migration aus der Tunica media in die Intima und einer gesteigerten Synthese von EZM-Bestandteilen einhergeht (150,151). In einer gesunden Gefäßwand liegen SMC größtenteils im differenzierten, kontraktilen Phänotyp vor. Sie regulieren die Weite der Gefäße und steuern damit Blutfluss und Blutdruck (152,153). Im Verlauf der Atherosklerose sind SMC vor allem aufgrund ihrer Fähigkeit zur Produktion großer Mengen extrazellulärer Matrix für die Progression und Stabilität von Plaques von Bedeutung. Interessanterweise können aus Knochenmarkstammzellen differenzierte VSMC über *scavenger* Rezeptoren zudem oxLDL aufnehmen und so zur Population der Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques beitragen (154). Wie hoch der Anteil von SMC unter den Schaumzellen ist kann in einer aktuellen Arbeit von *Allahverdian et al.* (155) gezeigt werden.

Unter Behandlung der ApoE^{-/-} Mäuse mit Indometacin kann im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung des α -Aktin-positiven

SMC-Gehaltes in der fibrotischen Kappe der Plaques des Aortenursprungs nachgewiesen werden. Ein Trend in die gleiche Richtung zeigt sich auch unter Behandlung mit Rofecoxib. Die SMCs sind nahezu ausschließlich an der Plaqueoberfläche im Bereich der Schulterregion lokalisiert. In der Schulterregion der Plaques bilden die SMCs zusammen mit einer kollagenreichen EZM eine fibrotische Kappe aus, die einen nekrotischen Kern aus Zell- und Matrixbestandteilen, Schaumzellen und Lipiden bedeckt (156). Eine dicke Schicht glatter Muskelzellen deutet hier auf ein geringeres Rupturrisiko hin (157). Im Bereich dieser Schulterregion kommt es zudem zum Eintreten und zur Akkumulation von Makrophagen und unter anderem über MMPs zur Degradierung der fibrotischen Kappe, was zur Destabilisierung von Plaques bis hin zur Ruptur führen kann (114,158,159). Während in den initialen Stadien noch Makrophagen den dominierenden Zelltyp darstellen (3), werden die SMC in progredienten Läsionen immer zahlreicher (160). *Davies et al.* (161) beschreiben das Verhältnis von Makrophagen- zu SMC-Zahl als möglichen Indikator für Plaquevulnerabilität. Andererseits kann es durch ein vermehrtes Vorkommen von SMC und die damit assoziierte gesteigerte Matrixsynthese zu einer Volumenexpansion der Plaques und somit zu einer fortschreitenden Stenosierung der Gefäße kommen. Zu den Mediatoren, die die Migration und vermehrte EZM-Produktion der VSMC fördern, gehören unter anderem Faktoren wie PDGF-BB, Endothelin-1, Thrombin, IFN- γ und IL-1 (162), aber auch die COX-2 Produkte PGE₂ und PGI₂ (50,51). Die Moleküle der EZM können über intrazelluläre Signaltransduktion wiederum Einfluss auf die Funktion, Proliferation und Migration der SMC haben (163). Dies wurde in 4.1 und 4.2 bereits an den Beispielen Biglykan, Decorin und HA beschrieben (4,46,164).

Nach diversen Studien, die eine verstärkte migratorische und proliferative Antwort von SMC durch HA belegen (49,50,89,165), wäre im vorliegenden Fall, nach Inhibition der Hyaluronsäure durch COX-Inhibition, eher eine Reduktion des SMC-Gehaltes zu erwarten gewesen. Der gesteigerte SMC-Gehalt in den Plaques legt nahe, dass hier andere Faktoren einen stärkeren Einfluss haben. Verschiedene Untersuchungen kommen zu dem Ergebniss, dass den Prostaglandinen PGI₂ und PGE₂ proliferationshemmende Eigenschaften zugesprochen werden können (59,60,61). Dieser Effekt könnte durch die Behandlung der Mäuse mit COX-Inhibitoren vermindert bzw. antagonisiert worden sein, was eine Erklärung für den signifikanten Anstieg der SMC unter Indometacinbehandlung in dieser Studie sein

könnte. Zudem ist ein Einfluss anderer, die SMC-Proliferation regulierender Wachstumstumsfaktoren und Zytokine denkbar, die hier nicht näher untersucht wurden. Der am nächsten liegende Erklärungsansatz für den Anstieg der SMC besteht jedoch in einer Änderung des Differenzierungsgrades der SMC durch COX-Inhibition. Das zur Anfärbung der SMC verwendete SM- α -Aktin ist für differenzierte, ausgereifte SMC charakteristisch. Die durch COX-Inhibition bewirkte Verminderung proinflammatorischer Stimuli könnte in den SMC eine Veränderung des Phänotyps mit zunehmender Differenzierung bewirken und somit den Anstieg α -Aktin-positiver SMC erklären. Die Annahme, dass die erhöhte Zahl α -Aktin-positiver Zellen nicht durch eine vermehrte Proliferation oder Migration, sondern vielmehr durch eine Differenzierung der Zellen bedingt ist, wird zudem gestützt durch die weder unter Indometacin noch unter Rofecoxib wesentlich veränderte Proliferation der Zellen in den Plaques. Dies wird anhand einer immunhistochemischen Detektion des Oberflächenmarkers PCNA untersucht. Der stärkere Effekt durch Indometacin weist auf den oben beschriebenen Zusammenhang zwischen Inflammation und COX-1-vermittelter TxA₂-Synthese hin (142). Kommt es durch die zusätzliche COX-1 Inhibition unter Indometacin zu einer Verminderung des Makrophagengehaltes in den Plaques, so werden weniger inflammatorische Mediatoren freigesetzt. Für die in den Plaques ansässigen SMC werden dadurch die Stimuli zur Dedifferenzierung und Ausbildung eines sekretorischen und proliferativen Phänotyps verringert. Ausgereifte, differenzierte SMC können wesentlich zur Stabilität der Plaques beitragen.

4.5 Ausblick und mögliche therapeutische Konsequenzen

Cyclooxygenase-Inhibitoren finden weltweit eine breite klinische Anwendung u.a. bei kardiovaskulären Erkrankungen und können den Verlauf der Atherosklerose auf unterschiedliche Weise beeinflussen. COX-2 vermittelte Prostaglandine nehmen neben ihrer pathologischen Rolle in der Inflammation auch physiologische Funktionen in der Kontrolle des Gefäßtonus und der Hämostase wahr. Dieser Zusammenhang zeigt sich überzeugend an einem COX-2-knockout Modell, in dem die Tiere ernsthafte Beeinträchtigungen von Hämostase und Durchblutung aufweisen (166). Zudem kann diese Annahme in einer aktuell erschienenen Arbeit von *Kaber et al.* (167) bei Kaninchen bestätigt werden, die zeigt, dass die antiatherogenen und antithrombotischen Wirkungen von Aspirin durch gleichzeitige Behandlung mit Rofecoxib aufgehoben werden. Während in anderen Untersuchungen für die COX-1 Inhibition ein klarer antiatherogener Effekt gezeigt werden kann (84, 167, 168), ist die Rolle von COX-2 in der Atherogenese komplexer und Gegenstand kontroverser Diskussionen. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Studien, die sich mit der Rolle von COX-2 in der Atherosklerose beschäftigen und dabei zu höchst unterschiedlichen Ergebnissen gelangen (82-84,168,169).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen charakteristische Merkmale einer Plaquestabilisierung durch die COX-Inhibition auf, was sich an der hohen Anzahl differenzierter SMC und einem reduzierten Makrophagengehalt in den Plaques zeigt. Diese Effekte sind unter dem nicht-selektiven COX-Inhibitor Indometacin stärker ausgeprägt als unter selektiver COX-2 Inhibition, was auf die oben beschriebenen engen Verbindungen zwischen Inflammation und COX-1 vermittelten Funktionen des Gerinnungssystems hinweist. Da COX-2 abhängige Prostaglandine eindeutig in die Progression der Atherosklerose involviert sind (168), aber andererseits auch wichtige physiologische und protektive Funktionen übernehmen, bleibt die Vorhersagbarkeit von Wirkungen und Nebenwirkungen der COX-2 Inhibitoren bezogen auf das kardiovaskuläre System schwierig. Weitere Untersuchungen werden folgen müssen, die die Rolle von COX-2 auch in Abhängigkeit von verschiedenen Stadien der Atherosklerose näher beleuchten, um herauszufinden für welche Patienten das Risiko-Nutzen-Verhältnis der Coxibe ungünstig ist und welche Patienten eventuell von einer Behandlung mit Coxiben profitieren könnten.

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit wird auf die Auswirkungen der COX-Inhibition auf die Hyaluronsäurematrix gelegt. Die signifikante Reduktion der HA-Akkumulation, einhergehend mit einer Reduktion der HAS-1 und HAS-2-mRNA Expression (76), könnte zu den antiinflammatorischen und plaque-stabilisierenden Wirkungen der COX-Inhibition in diesem Modell beitragen und in der klinischen Anwendung einen positiven Effekt für die mit Präparaten dieser Wirkstoffgruppe behandelten Patienten bedeuten. Jedoch muss beachtet werden, dass die HA neben ihrer proliferativen, migrations- und inflammationsfördernden Wirkung auch viele physiologische Funktionen hat (37,38,170,171). Für die Atherosklerose ist hier vor allem die protektive Wirkung von HA als Bestandteil der endothelialen Glykokalyx von Bedeutung. So kann eine Inhibition der HA-Synthese zu Endothelschäden und zur Progression der Atherosklerose beitragen (104). Dieser Zusammenhang kann die gesteigerte Plaqueläche unter Rofecoxibbehandlung bei den 23 Wochen alten Mäusen erklären. Eine systemische HA-Inhibition könnte sich demnach auch nachteilig auf das kardiovaskuläre System auswirken.

Einen entscheidenden Einflussfaktor für die Wirkungen der HA stellt nicht nur die Ausstattung der Gewebe mit HA-Rezeptoren (z.B. CD44, RHAMM), sondern vor allem auch die durch Auf- und Abbau bestimmte Größe der HA-Polymere dar. In zukünftigen Studien sollte deshalb versucht werden die verschiedenen HA-Synthesen im Hinblick auf ihr atherogenes Potential zu untersuchen. Hier könnte insbesondere eine selektive Regulierung von HAS-3 interessante Ergebnisse liefern, da sie die kleinsten und damit in der Signaltransduktion wirksamsten HA-Moleküle produziert (172,173). Zu einem besseren Verständnis der individuellen Funktionen der HAS-Isoformen *in vivo* könnten Untersuchungen an knockout-Tiermodellen für die einzelnen HA-Synthesen beitragen, wie sie bereits erfolgreich in der Tumorforschung und auf dem Gebiet der Dermatologie Anwendung finden (174,175). Die HAS-knockout-Modelle werden in Zukunft auch zu einem besseren Verständnis der Funktionen der Hyaluronsäure im kardiovaskulären System beitragen. Dies ist von besonderer Relevanz, da eine Hemmung der Hyaluronsäure über HA-Synthesen, HA-Rezeptorblocker oder Hyaluronidasen in der Therapie von Tumoren ein vielversprechendes Konzept darstellt, das schon bald klinische Anwendung finden könnte (176-179). Die möglichen kardiovaskulären Nebenwirkungen einer solchen HA-Hemmung sollten nicht unterschätzt werden und bedürfen einer sorgsamem Überprüfung sowie einer individuellen Risiko-Nutzen-Abwägung.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2013. *Todesursachen in Deutschland 2012*. Fachserie 12, Reihe 4.
- 2 National Cholesterol Education Programm. *Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II)*. Bethesda, Md.: National Heart, Lung, and Blood Institute, 1993. (NIH publication no.93-3095.)
- 3 Ross R. *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med. 1999;340:115-26.
- 4 Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature. 1993;362(6423):801-809.
- 5 Wight TN. *The extracellular matrix and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol 1995;6:326–334.
- 6 Libby P. *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002; 420 868-874.
- 7 Lüllmann-Rauch R., *Lehrbuch Histologie*. Thieme 2003; 242-248.
- 8 Nathan C, Xie QW. *Regulation of biosynthesis of nitric oxide*. J Biol Chem.1994;269(19):13725-8.
- 9 Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. *The endothelial surface layer*. Pflugers Arch. 2000; 440:653–666.
- 10 Henry CB, Duling BR. *Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan*. Am J Physiol. 1999;277(2 Pt 2):H508-514.
- 11 Vink H, Duling BR. *Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000;278(1):H285-289.
- 12 Egbrink MG, Van Gestel MA, Broeders MA, Tangelder GJ, Heemskerk JM, Reneman RS, Slaaf DW. *Regulation of microvascular thromboembolism in vivo*. Microcirculation. 2005;12(3):287-300.
- 13 Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. *The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease*. Curr Opin Lipidol. 2005;16(5):507-511.
- 14 Ross R, Glomset JA. *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. Science 1973;180:1332-9.
- 15 Ruggeri ZM. *Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall*. Hämostaseologie 2004; 24: 1–11.
- 16 Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP. *Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation: essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors*. J Biol Chem. 1999;274:29108–29114.

- 17 Glass CK, Witztum JL. *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell. 2001;104:503-16.
- 18 Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. *Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease*. Physiol Rev. 2004;84: 767–801.
- 19 Raines EW, Ross R. *Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis*. Br Heart J. 1993;69:S30-7.
- 20 Cipollone F, Fazio M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Uchino S, Spigonardo F, Di Nisio M, Cuccurullo F, Mezzetti A, Porreca E. *Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques*. Stroke. 2004;35:2253-7.
- 21 Hynes RO. *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell. 1992;69:11-25.
- 22 Shoulders MD, Raines RT. *Collagen Structure and Stability*. Annu. Rev. Biochem. 2009;78:929–58.
- 23 Kjellen L, Lindahl U. *Proteoglycans: Structures and interactions*. Annu. Rev. Biochem. 1991;60:443-75
- 24 Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN, Virmani R. *Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:1642-8.
- 25 Neame PJ, Choi HU, Rosenberg LC. *The primary structure of the core protein of the small, leucine-rich proteoglycan (PG I) from bovine articular cartilage*. J Biol Chem. 1989;264:8653-61.
- 26 Fischer JW, Kinsella MG, Levkau B, Clowes AW, Wight TN. *Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21:777-84.
- 27 Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. *Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon*. Biochem J. 1984;223:587-97.
- 28 Fischer JW, Kinsella MG, Clowes MM, Lara S, Clowes AW, Wight TN. *Local expression of bovine decorin by cell-mediated gene transfer reduces neointimal formation after balloon injury in rats*. Circ Res. 2000;86:676-83
- 29 Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P, Young MF. *Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues*. J Bone Miner Res. 2002;17:1180-9
- 30 Nagy N, Melchior-Becker A, Fischer JW. *Long-term treatment with the AT1-receptor antagonist telmisartan inhibits biglycan accumulation in murine atherosclerosis*. Basic Res Cardiol. 2010;105:29–38.

- 31 Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem. 1997;272:13997-4000.
- 32 Lee JY, Spicer AP. *Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule*. Curr Opin Cell Biol. 2000;12(5):581-586.
- 33 Toole BP. *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue*. Nat Rev Cancer. 2004; 4: 528-39.
- 34 Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem. 1999;274(35):25085-25092.
- 35 Csoka AB, Frost GI, Stern R. *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes*. Matrix Biol. 2001;20(8):499-508.
- 36 Reed RK, Lilja K, Laurent TC. *Hyaluronan in the rat with special reference to the skin*. Acta Physiol Scand. 1988 Nov;134(3):405-11.
- 37 Fam H, Bryant JT, Kontopoulou M. *Rheological properties of synovial fluids*. Biorheology. 2007;44(2):59-74.
- 38 Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. J Intern Med. 1997;242(1):27-33.
- 39 Powell JD, Horton MR. *Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal*. Immunol Res. 2005;31:207-18.
- 40 Cuff CA, Kothapalli D, Azonobi I, Chun S, Zhang Y, Belkin R, Yeh C, Secreto A, Assoian RK, Rader DJ, Pure E. *The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation*. J Clin Invest. 2001; 108: 1031-40.
- 41 Nasreen N, Mohammed KA, Hardwick J, Van Horn RD, Sanders K, Kathuria H, Loghmani F, Antony VB. *Low molecular weight hyaluronan induces malignant mesothelioma cell (MMC) proliferation and haptotaxis: role of CD44 receptor in MMC proliferation and haptotaxis*. Oncol Res. 2002;13(2):71-78.
- 42 Feinberg RN, Beebe DC. *Hyaluronate in vasculogenesis*. Science. 1983;220:1177-9.
- 43 Kothapalli D, Zhao L, Hawthorne EA, Cheng Y, Lee E, Pure E, Assoian RK. *Hyaluronan and CD44 antagonize mitogen-dependent cyclin D1 expression in mesenchymal cells*. J Cell Biol. 2007;176(4):535-544.
- 44 Jiang D, Liang J, Noble PW. *Hyaluronan in tissue injury and repair*. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007; 23: 435-61.
- 45 Day AJ, Prestwich GD. *Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant*. J Biol Chem. 2002;277:4585-8
- 46 Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM. *Distribution of hyaluronan during*

- extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries*. *Circulation*. 1996;93:1141-7.
- 47 Toole BP, Wight TN, Tammi MI. *Hyaluronen – cell interactions in cancer and vascular disease*. *J Biol Chem*. 2002; 277: 4593-6.
- 48 Fischer JW, Schrör K. *Regulation of Hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis*. *Thromb Haemost*. 2007; 98: 287-95.
- 49 Evanko SP, Johnson PY, Braun KR, Underhill CB, Dudhia J, Wight TN. *Platelet-derived growth-factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells*. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 394: 29-38.
- 50 Sussmann M, Sarbia M, Meyer-Kirchrath J, Nusing RM, Schrör K, Fischer JW. *Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins*. *Circ Res*. 2004; 94: 592-600.
- 51 van den Boom M, Sarbia M, von Wnuck Lipinski K, Mann P, Meyer-Kirchrath J, Rauch BH, Grabitz K, Levkau B, Schrör K, Fischer JW. *Differential regulation of hyaluronic acid synthase isoforms in human saphenous vein smooth muscle cells: possible implications for vein graft stenosis*. *Circ Res*. 2006; 98: 36-44.
- 52 Simmons D et al. *Cyclooxygenase Isoenzymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition*. *Pharmacol Rev* 2004;56:387–437
- 53 Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ, Vane JR. *Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone*. *Br J Pharmacol*. 1994;113:1008-14.
- 54 McGeer PL, McGeer EG, Yasojima K. *Expression of COX-1 and COX-2 mRNAs in atherosclerotic plaques*. *Exp Gerontol*. 2002;37:925-9.
- 55 Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. *Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions*. *Am J Pathol*. 1999; 155: 1281–1291.
- 56 Woditsch I, Schrör K. *Prostacyclin rather than endogenous nitric oxide is a tissue protective factor in myocardial ischemia*. *Am J Physiol*. 1992;263:H1390-6.
- 57 FitzGerald GA, Pedersen AK, and Patrono C. *Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease*. 1983;*Circulation* 67:1174–1177.
- 58 Higgs EA, Moncada S, and Vane JR (1978) *Inflammatory effects of prostacyclin (PGI₂) and 6-oxo-PGF_{1α} in the rat paw*. *Prostaglandins* 16:153–162.
- 59 Zucker TP, Bonisch D, Hasse A, Grosser T, Weber AA, Schrör K. *Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of prostaglandin E₁ in coronary artery smooth muscle cells*. *Eur J Pharmacol*. 1998; 345: 213–220.
- 60 Bulin C, Albrecht U, Bode JG, Weber AA, Schrör K, Levkau B, Fischer JW. *Differential effects of vasodilatory prostaglandins on focal adhesions, cytoskeletal architecture, and*

- migration in human aortic smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:84-9.
- 61 Blindt R, Bosserhoff AK, vom Dahl J, Hanrath P, Schror K, Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J. *Activation of IP and EP(3) receptors alters cAMP-dependent cell migration*. *Eur J Pharmacol*. 2002;444:31-7
- 62 Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. *Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target*. *Pharmacol Rev*. 2007 Sep;59(3):207-24.
- 63 Pritchard KA, Jr., O'Banion MK, Miano JM, Vlasic N, Bhatia UG, Young DA, Stemerman MB. *Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*. 1994; 269: 8504-9
- 64 Smith WL. *Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells*. *Annu Rev Physiol*. 1986;48:251-62.
- 65 Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazia M, De Cesare D, Iezzi A, Uchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cucurullo F, Mezzetti A. *Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability*. *Circulation*. 2001;104:921-7.
- 66 Lafont O.: „*From the willow to aspirin*“. *Rev Hist Pharm*. 2007 Jul;55(354):209-16.
- 67 Vane JR.: *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs*. *Nat. New Biol*. 1971, Bd. 231, S. 232–235.
- 68 Wirth HP, Hürlimann R, Flückiger T. *NSAR und COX-2-Hemmer: die häufigsten unerwünschten Wirkungen*. *Schweiz Med Forum* 2006;6:284–289.
- 69 Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ. *Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis*. VIGOR Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343:1520-8, 2 p following 1528.
- 70 Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, Langford RM, Hoeft A, Parlow JL, Boyce SW, Verburg KM. *Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery*. *N Engl J Med*. 2005;352:1081-91.
- 71 Ott E, Nussmeier NA, Duke PC, Feneck RO, Alston RP, Snabes MC, Hubbard RC, Hsu PH, Saidman LJ, Mangano DT. *Efficacy and safety of the cyclooxygenase 2 inhibitors parecoxib and valdecoxib in patients undergoing coronary artery bypass surgery*. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;125:1481-92.
- 72 Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanasa A, Konstam MA, Baron JA; Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (APPROVE) Trial Investigators. *Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial*. *N Engl J Med*.

- 2005;352(11):1092-102.
- 73 Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. *Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂*. *Science*. 2002;296:539-41.
- 74 Marzoll A, Melchior-Becker A, Cipollone F, Fischer JW. *Small leucine-rich proteoglycans in atherosclerotic lesions: novel targets of chronic statin treatment?* *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2011;15:232–243.
- 75 Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. *Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA*. *Beitr Pathol*. 1973;150:174-87.
- 76 Marzoll A, Nagy N, Wördehoff L, Dai G, Fries S, Lindner V, Grosser T, Fischer JW. *Cyclooxygenase inhibitors repress vascular hyaluronan-synthesis in murine atherosclerosis and neointimal thickening*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009;13:3713–3719.
- 77 Schonbeck U, Libby P. *Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as anti-inflammatory agents?* *Circulation*. 2004; 109: II 18- II 26.
- 78 Bourcier T, Libby P. *HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:556-562.
- 79 Ridker PM, Danielson E, Fonesca FA, Genest J, Gotto JM, Jr., Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ: *Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial*. *The Lancet*. 2009; 373: 9670: 1175-1182.
- 80 Gonzalez ER. *Antiplatelet therapy in atherosclerotic cardiovascular disease*. *Clin Ther*. 1998;20 Suppl B:B18-41.
- 81 Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S. *Roles of thromboxane A₂ and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice*. *J Clin Invest*. 2004; 114: 784-94.
- 82 Rott D, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Zalles-Ganley A, Ogunmakinwa J, Epstein SE. *Effects of MF-tricyclic, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on atherosclerosis progression and susceptibility to cytomegalovirus replication in apolipoprotein-E knockout mice*. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 1812-9.
- 83 Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. *Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice*. *Circulation*. 2002; 105: 1816-23.
- 84 Pratico D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H, FitzGerald GA. *Acceleration of atherogenesis by*

- COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 3358-63.
- 85 Viola M, Barbara Bartolini B, Vigetti D, Karousou E, Moretto P, Deleonibus S, Sawamura T, Wight TN, Hascall V, De Luca G, Passi A. *Aortic Smooth Muscle Cells Affects Hyaluronan Synthesis in Human Oxidized Low Density Lipoprotein (LDL).* J. Biol. Chem. 2013, 288:29595-29603.
- 86 Grandoch M, Hoffmann J, Röck K, Wenzel F, Oberhuber A, Schelzig H, Fischer JW. *Novel effects of adenosine receptors on pericellular hyaluronan matrix: implications for human smooth muscle cell phenotype and interactions with monocytes during atherosclerosis.* Basic Res Cardiol. 2013; 108:340.
- 87 Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Roth M, Block LH. *Platelet-derived growth factor stimulates the secretion of hyaluronic acid by proliferating human vascular smooth muscle cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. 1995; Vol. 92, pp. 9881-9885.
- 88 Evanko SP, Elaine W., Raines EW, Ross R, Gold L, Wight TN. *Proteoglycan Distribution in Lesions of Atherosclerosis Depends on Lesion Severity, Structural Characteristics, and the Proximity of Platelet-Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor- β .* American Journal of Pathology, 1998; Vol. 152, No. 2.; 533-546.
- 89 Evanko SP, Angello JC, Wight TN. *Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:1004–1013.
- 90 Wilkinson TS, Bressler SL, Evanko SP, Braun KR, Wight TN. *Overexpression of Hyaluronan Synthases Alters Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype and Promotes Monocyte Adhesion.* Journal of Cellular Physiology 2006; 206:378–385.
- 91 Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjanen KJ, Saarikoski SV, Kosma VM. *High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer.* Cancer Res. 2000;60:150–155.
- 92 Kosaki R, Watanabe K, Yamaguchi Y. *Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage independent growth and tumorigenicity.* Cancer Res. 1999;59(5):1141-1145.
- 93 Liu N, Gao F, Han Z, Xu X, Underhill CB, Zhang L. *Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells.* Cancer Res. 2001;61(13):5207-5214.
- 94 Chai S, Chai Q, Danielsen CC, Hjorth P, Nyengaard JR, Ledet T, Yamaguchi Y, Rasmussen LM, Wogensen L. *Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis.* Circ Res. 2005; 96: 583-91.
- 95 Sokolowska M, Chen LY, Eberlein M, Martinez-Anton A, Liu Y, Alsaaty S, Qi HY, Logun C, Shelhamer LH und JH. *Low molecular weight hyaluronan activates cytosolic*

- phospholipase A2 α and eicosanoid production in monocytes and macrophages.* J.Biol.Chem. 2014; 289: 4470-4488. doi: 10.1074/jbc.M113.515106
- 96 Vistejnova L, Safrankova B, Nesporova K, Slavkovsky R, Hermannova M, Hosek P, Velebny V, Kubala L. *Low molecular weight hyaluronan mediated CD44 dependent induction of IL-6 and chemokines in human dermal fibroblasts potentiates innate immune response.* Cytokine 2014; 70: 97-103.
- 97 West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. *Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid.* Science. 1985; 228: 1324-6.
- 98 Cao G, Savani RC, Fehrenbach M, Lyons C, Zhang L, Coukos G, Delisser HM. *Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis.* Am J Pathol. 2006; 169: 325-36.
- 99 Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor AR, Brindle NP. *Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques.* J Vasc Surg. 2007; 45: 155-9.
- 100 Bot PT, Pasterkamp G, Goumans MJ, Strijder C, Moll FL, de Vries JP, Pals ST, de Kleijn DP, Piek JJ, Hofer IE. *Hyaluronic acid metabolism is increased in unstable plaques.* Eur J Clin Invest. 2010; 40(9): 818-827. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02326.x.
- 101 Savani RC, Turley EA. *The role of hyaluronan and its receptors in restenosis after balloon angioplasty: development of a potential therapy.* Int J Tissue React. 1995; 17(4):141-51.
- 102 Bollyky PL, Falk BA, Wu RP, Buckner JH, Wight TN, Nepom GT. *Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.* J Leukoc Biol. 2009; 86(3): 567-72. doi: 10.1189/jlb.0109001.
- 103 Ma X, Pearce JD, Wilson DB, English WP, Edwards MS, Geary RL. *Loss of the hyaluronan receptor RHAMM prevents constrictive artery wall remodeling.* J Vasc Surg. 2013 Jun 12. pii: S0741-5214(13)00775-1. doi: 10.1016/j.jvs.2013.03.047. [Epub ahead of print].
- 104 Nagy N, Freudenberger T, Melchior-Becker A, Rock K, Ter BM, Jastrow H, Kinzig M, Lucke S, Suvorava T, Kojda G, Weber AA, Sorgel F, Levkau B, Ergun S, Fischer JW. *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis.* Circulation 2010; 122:2313–2322.
- 105 Pahakis MY, Kosky JR, Tarbell JM. *The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress.* Biochem Biophys Res Commun. 2007; 355(1):228-33.
- 106 Vlahu CA, Lemkes BA, Struijk DG, Koopman MG, Krediet RT, Vink H. *Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients.* J Am Soc Nephrol. 2012 Nov;23(11):1900-8.

- doi: 10.1681/ASN.2011121181.
- 107 Padberg JS, Wiesinger A, di Marco GS, Reuter S, Grabner A, Kentrup D, Lukasz A, Oberleithner H, Pavenstädt H, Brand M, Kämpers P. Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. *Atherosclerosis*. 2014;234(2):335-43. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.016.
- 108 Woodrow G, Turney JH, Davison AM, Cooper EH. *Serum hyaluronan concentrations predict survival in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis*. *Nephrol Dial Transplant*. 1996 Jan;11(1):98-100.
- 109 Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. *Pflugers Arch*. 2007;454:345–359.
- 110 Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. *Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb*. 1991; 11:1223-1230
- 111 Okada Y, Katsuda S, Matui Y, Nakanishi I. *The modulation of collagen synthesis in cultured arterial smooth muscle cells by platelet-derived growth factor*. *Cell Biol Int Rep*. 1992; 16:1015-1022.
- 112 Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. *Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release*. *Biochem J*. 1997;322 (Pt 3):809-14.
- 113 Monfort J, Tardif G, Reboul P, Mineau F, Roughley P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. *Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloproteinase-13: identification of a new biglycan cleavage site*. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R26.
- 114 Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*. 1994;94:2493–2503.
- 115 Abbas A, Aukrust P, Russell D, Krohg-Sørensen K, Almås T, Bundgaard D, Bjerkeli V, Sagen EL, Michelsen AE, Dahl TB, Holm S, Ueland T, Skjelland M, Halvorsen B. *Matrix metalloproteinase 7 is associated with symptomatic lesions and adverse events in patients with carotid atherosclerosis*. *PLoS One*. 2014 Jan 6;9(1):e84935. doi: 10.1371/journal.pone.0084935.
- 116 Loftus IM, Naylor R, Goodall S, et al. *Increased matrix-metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques: a potential role in acute plaque disruption*. *Stroke*. 2000;31:40–47.
- 117 Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y, Shiomi M, Aikawa M. *Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits*. *Circulation*. 2001;103:993-9.
- 118 Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, DeWitt DL, et al. *Effect of cholera toxin and*

- pertussis toxin on prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases production by human monocytes.* Arch Biochem Biophys. 1994;310:481–488.
- 119 Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. *Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries.* Am J Pathol. 1994;144:962-74.
- 120 Neame PJ, Kay CJ, McQuillan DJ, Beales MP, Hassell JR. *Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican.* Cell Mol Life Sci. 2000;57:859-63.
- 121 Geng Y, McQuillan D, Roughley PJ. *SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases.* Matrix Biol. 2006;25:484-91.
- 122 Heegaard AM, Corsi A, Danielsen CC, Nielsen KL, Jorgensen HL, Riminucci M, Young MF, Bianco P. *Biglycan deficiency causes spontaneous aortic dissection and rupture in mice.* Circulation. 2007;115:2731-8.
- 123 Tang T, Thompson JC, Wilson PG, Yoder MH, Mueller J, Fischer JW, Williams KJ, Tannock LR. *Biglycan deficiency: increased aortic aneurysm formation and lack of atheroprotection.* J Mol Cell Cardiol. 2014 Oct;75:174-80. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.07.014.
- 124 Theocharis AD, Karamanos NK. *Decreased biglycan expression and differential decorin localization in human abdominal aortic aneurysms.* Atherosclerosis. 2002; 165:221–230
- 125 Westermann D, Mersmann J, Melchior A, Freudenberger T, Petrik C, Schaefer L, Lullmann-Rauch R, Lettau O, Jacoby C, Schrader J, Brand-Herrman SM, Young MF, Schultheiss HP, Levkau B, Baba HA, Unger T, Zacharowski K, Tschope C, Fischer JW. *Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction.* Circulation. 2008; 117:1269–1276.
- 126 Weis SM, Zimmerman SD, Shah M, Covell JW, Omens JH, Ross J Jr, Dalton N, Jones Y, Reed CC, Iozzo RV, McCulloch AD. *A role for decorin in the remodeling of myocardial infarction.* Matrix Biol 2005; 24:313–324.
- 127 O'Brien KD, Lewis K, Fischer JW, Johnson P, Hwang JY, Knopp EA, Kinsella MG, Barrett PH, Chait A, Wight TN. *Smooth muscle cell biglycan overexpression results in increased lipoprotein retention on extracellular matrix: implications for the retention of lipoproteins in atherosclerosis.* Atherosclerosis. 2004; 177:29–35.
- 128 Tabas I, Williams KJ, Boren J. *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications.* Circulation. 2007;116(16):1832-1844.
- 129 Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Gotte M, Malle E, Schaefer RM, Grone HJ *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in*

- macrophages*. J Clin Invest 2005; 115:2223–2233.
- 130 Thompson JC, Tang T, Wilson PG, Yoder MH, Tannock LR. *Increased atherosclerosis in mice with increased vascular biglycan content*. Atherosclerosis. 2014; 235(1):71-5. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.037.
- 131 Tiede K, Melchior-Becker A, Fischer JW. *Transcriptional and posttranscriptional regulators of biglycan in cardiac fibroblasts*. Basic Res Cardiol 2010; 105:99–108.
- 132 Rehm M, Zahler S, Lotsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, Becker BF. *Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed*. Anesthesiology. 2004;100(5):1211-1223.
- 133 Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. *Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability*. Anesthesiology. 2006;104(6):1223-1231.
- 134 Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP. *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions*. J Clin Invest 1997;100:2680-90.
- 135 Shashkin P, Dragulev B, Ley K. *Macrophage differentiation to foam cells*. Curr Pharm Des. 2005;11:3061–3072.
- 136 Hajjar DP, Haberland ME. *Lipoprotein trafficking in vascular cells: molecular Trojan horses and cellular saboteurs*. J Biol Chem 1997;272:22975-8.
- 137 Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, Aikawa E, Kim DE, Ntziachristos V, Weissleder R, Libby P. *Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo*. Circulation, 2006; 114: 55-62
- 138 Badrnya S, Schrottmaier WC, Kral JB, Yaiw KC, Volf I, Schabbauer G, Söderberg-Nauclér C, Assinger A. *Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014; 34(3):571-80. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302919.
- 139 von Hundelshausen P, Schmitt MM. *Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications*. Front Physiol. 2014; 5:294. doi: 10.3389/fphys.2014.00294.
- 140 Hegyi L, Skepper JN, Cary NR, Mitchinson MJ. *Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis*. J Pathol. 1996; 180:423-9.
- 141 Jander S, Sitzer M, Schumann R. *Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization*. Stroke. 1998; 29:1625–1630.
- 142 Cyrus T, Yao Y, Ding T, Dogne JM, Pratico D. *Thromboxane receptor blockade improves the antiatherogenic effect of thromboxane A2 suppression in LDLR KO mice*. Blood. 2007; 109: 3291-6.

- 143 Kuckleburg CJ, Yates C, Kalia N, Zhao Y, Nash GB, Watson SP, Rainger GE. *Endothelial cell borne platelet bridges selectively recruit monocytes in human and mouse models of vascular inflammation*. Cardiovasc Res., 2011; 91: 134-141.
- 144 Libby P, Simon DI. *Inflammation and thrombosis: the clot thickens*. Circulation. 2001;103:1718–1720.
- 145 Nemerson Y. *Tissue factor and hemostasis*. Blood, 1988; 71: 1-8.
- 146 Nandi A, Estess P, Siegelman MH. *Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44*. J Biol Chem. 2000; 275:14939-48.
- 147 de La Motte CA, Hascall VC, Calabro A, Yen-Lieberman B, Strong SA. *Mononuclear leukocytes preferentially bind via CD44 to hyaluronan on human intestinal mucosal smooth muscle cells after virus infection or treatment with poly(I.C)*. J Biol Chem. 1999;274(43):30747-30755.
- 148 DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH. *CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway*. J Exp Med. 1996; 183: 1119-30.
- 149 Owens GK, Vernon SM, Madsen CS. *Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation*. J Hypertens Suppl. 1996;14(5):S55-64.
- 150 Schwartz SM. *Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis*. J Clin Invest. 1997;99:2814-7.
- 151 Frid MG, Dempsey EC, Durmowicz AG, Stenmark KR. *Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels: importance in vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17:1203-9.
- 152 Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Kolati S, Mousavipour D, Scholz D, Afsah-Hedjri A, Schaper W, Schaper J. *Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries*. J Mol Cell Cardiol. 1998;30:2291-305.
- 153 Owens GK. *Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells*. Physiol Rev. 1995;75:487-517.
- 154 Yan P, Xia C, Duan C, Li S, Mei Z. *Biological characteristics of foam cell formation in smooth muscle cells derived from bone marrow stem cells*. Int J Biol Sci. 2011;7(7):937-46.
- 155 Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. *Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis*. Circulation. 2014 Apr 15;129(15):1551-9.doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015.
- 156 Hansson GK. *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med. 2005;352:1685-95.

- 157 Lee RT, Libby P. *The unstable atheroma*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1859-67.
- 158 Fuster V. *Mechanism leading to myocardial infarction: insight from studies of vascular biology*. *Circulation*. 1994;90:2126-46.
- 159 Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. *Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T-lymphocytes a role for CD40 signaling in plaque rupture?* *Circ Res*. 1997;81:448-54.
- 160 Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Richardson M, et al. *A definition of the intima of human arteries and its atherosclerosis-prone regions*. *Arteriosclerosis* 1992;12: 120-34.
- 161 Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. *Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content*. *Br Heart*, 1993; 69: 377-381.
- 162 Berk BC. *Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanism*. *Physiol Rev*. 2001;81:999.
- 163 Stegemann JP, Hong H, Nerem RM. *Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype*. *J Appl Physiol*. 2005; 98: 2321-7.
- 164 Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. *A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression*. *Circulation*. 1992; 86(6Suppl): III47-52.
- 165 Rilla K, Tiihonen R, Kultti A, Tammi M, Tammi R. *Pericellular hyaluronan coat visualized in live cells with a fluorescent probe is scaffolded by plasmamembrane protrusions*. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(10):901-910.
- 166 Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC et al. *Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse*. *Cell*, 1995; 83: 473-482.
- 167 Kaber G, Kaiser B, Baumgärtel-Allekotte D, Rauch BH, Noßmann S, Heim KH, Weber AA, Nagy N, Fischer JW, Schrör K. *Antagonism of the antithrombotic and anti-atherosclerotic actions of aspirin by rofecoxib in the cholesterol-fed rabbit*. *British Journal of Pharmacology*, 2011; 164: 561-569.
- 168 Belton OA, Duffy A, Toomey S, Fitzgerald DJ. *Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis*. *Circulation* 2003; 108: 3017-3023.
- 169 Olesen M, Kwong E, Meztli A, Kontny F, Seljeflot I, Arnesen H et al.. *No effect of cyclooxygenase inhibition on plaque size in atherosclerosis-prone mice*. *Scand Cardiovasc J*, 2002; 36: 362-367.
- 170 De Reeder EG, Girard N, Poelmann RE, Van Munsteren JC, Patterson DF, Gittenberger-De Groot AC. *Hyaluronic acid accumulation and endothelial cell detachment in intimal*

- thickening of the vessel wall. The normal and genetically defective ductus arteriosus. Am J Pathol.* 1988;132(3):574-585.
- 171 Levesque H, Girard N, Maingonnat C, Delpech A, Chauzy C, Tayot J, Courtois H, Delpech B. *Localization and solubilization of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls. Atherosclerosis.* 1994;105(1):51-62.
- 172 Stern R. *Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. Pathol Biol (Paris).* 2005;53(7):372-382.
- 173 Tammi MI, Day AJ, Turley EA. *Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. J Biol Chem,* 2002; 277:4581–4.
- 174 Mack JA, Feldman RJ, Itano N, Kimata K, Lauer M, Hascall VC, Maytin EV. *Enhanced Inflammation and Accelerated Wound Closure Following Tetraborborol Ester Application or Full-Thickness Wounding in Mice Lacking Hyaluronan Synthases Has1 and Has3. J Invest Dermatol,* 2011/08/18/online.
- 175 Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T et al. *Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. Cancer Res,* 2010; 70:7073–83.
- 176 Nakazawa H, Yoshihara S, Kudo D, Morohashi H, Kakizaki I, Kon A, Takagaki K, Sasaki M. *4-Methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;57:165–170.
- 177 Yoshihara S, Kon A, Kudo D, Nakazawa H, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K. *A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. FEBS Lett.* 2005;579:2722–2726.
- 178 Toole BP, Slomiany MG. *Hyaluronan, CD44 and emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. Drug Resist Updat.* 2008;11:110–121.
- 179 Twarock S, Freudenberger T, Poscher E, Dai G, Jannasch K, Dullin C, Alves F, Prenzel K, Knoefel WT, Stoecklein NH, Savani RC, Homey B, Fischer JW. *Inhibition of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Progression by in vivo Targeting of Hyaluronan Synthesis. Mol Cancer.* 2011.23;10:30.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Jens W. Fischer für die herzliche Überlassung dieses Themas, die fortwährende Unterstützung während der Dissertation, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, und die freundliche Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Andrea Marzoll, die mich von Beginn an bei allen praktischen Problemen im Laboralltag, sowie mit Tipps zur schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation, unterstützte. Dr. Nadine Nagy danke ich ebenfalls für ihre zahlreichen hilfreichen Ratschläge und vor allem für die Durchsicht der Dissertation. Dr. Anke Fender danke ich für die Unterstützung insbesondere in den letzten Zügen der Dissertation bis zur Abgabe. Auch bei allen anderen Kollegen und Kolleginnen aus der Pharmakologie in Düsseldorf bedanke ich mich für die nette Zusammenarbeit und Unterstützung.

Meinen Eltern, Mechthild und Dr. Benno Wördehoff, möchte ich ganz besonders danken, denn sie haben mir das Studium und die Dissertation erst möglich gemacht und mich in jeder Situation unterstützt und motiviert. Ich danke außerdem meinem Freund und meiner großen Liebe Frederik Middelhoff, der mir jederzeit Rat und Tat insbesondere in computertechnischen Fragen zur Seite stand und mich durch alle Höhen und Tiefen auf dem Weg zur Promotion begleitet hat.