

Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor:  
Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Lokale Gefäßdegeneration durch reaktive Sauerstoffspezies  
Die fokale Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies im Tiermodell

Dissertation

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

vorgelegt von  
Isabella Reinsch  
2019

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

gez.:

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

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Sixt

Meinen Familienmitgliedern Elisabeth, Frank, Victoria und Oma Groth sowie Fabian  
gewidmet.

## **Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Minol J-P, Reinsch I, Luik M, Leferink A, Barth M, Assmann A, Lichtenberg A,  
Akhyari P .

Focal induction of ROS-release to trigger local vascular degeneration.

PloS one. 2017;12(6):e0179342 (1)

## **Zusammenfassung**

Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine bedeutende Rolle bei der Genese kardiovaskulärer Erkrankungen. Dabei evaluierten bisher genutzte Tiermodelle vor allem die systemische Wirkung von oxidativem Stress im Hinblick auf die Entwicklung von Gefäßdegenerationen. Im Gegensatz dazu haben wir in der aktuellen Arbeit mittels Rattentiermodell die Auswirkung der photochemischen Reaktion aus der Kombination von Bengalrot *i.v* als *biosensitizer* mit einem fokal applizierten Laserstrahl auf das Remodelling von nativen Gefäßen überprüft. Hierdurch entstehen fokal reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Zwei Gruppen von Ratten wurden lokal an ihren abdominalen Aorten von extern bestrahlt. Zuvor erhielt die ROS-Gruppe als Expositionsgruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe zusätzlich Bengalrot. Die Aorten wurden entweder direkt oder zu verschiedenen späteren Zeitpunkten explantiert und histologisch analysiert.

Wir konnten in der ROS-Gruppe nach 56 Tagen eine lokal signifikante Zunahme der Verkalkung und der relativen Gefäßwanddicke im Vergleich zu früheren Explantationszeitpunkten feststellen. Darüber hinaus beobachteten wir in der Tunica media der gleichen Gruppe eine verringerte Expression von *α smooth muscle actin*. Trotz der aufgezeigten Zusammenhänge fehlten jedoch weitere Merkmale degenerativer Gefäßerkrankungen, wie zum Beispiel eine fibröse Kappe. Dementsprechend sollten weitere Evaluationsmethoden zur Anwendung kommen, um bessere Schlussfolgerungen aus dem hier genutzten Tiermodell ziehen zu können.

## **Summary**

Reactive oxygen species play an important role in the pathogenesis of cardiovascular disease. In most commonly applied animal models, the systemic effect of oxidative stress is used to induce vascular degeneration. In our experiments, we developed and evaluated a rodent model, in which reactive oxygen species (ROS) production can be induced in a circumscribed vascular area via a photochemical reaction of intravenously administered bengalrose and locally applied laserlight.

Laser light was locally applied to the abdominal aorta of two different groups of rats. The ROS group was treated by intravenous injection of bengalrose as a biosensitizer before laser irradiation in contrast to the control group, which did not receive bengalrose. The irradiated aortic tissue was either explanted directly after laser application or at different time periods thereafter and then histologically analysed.

We detected a significant increase in local calcification and in vessel wall thickness in samples explanted from the ROS group at a late time point after 8 weeks in comparison to earlier explantation time points. Furthermore, the expression of  $\alpha$  smooth muscle actin was reduced.

Despite these similarities to degenerative vascular disease, our model lacks some aspects such as the presence of a fibrous cap. Further studies including additional methods will show if further conclusions can be drawn from our model.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AHA</b>	<i>American Heart Association</i>
<b>AK</b>	Antikörper
<b>Anti</b>	Antikörper
<b>Aqua dest.</b>	<i>Aqua destillata</i>
<b>Art.-Nr.</b>	Artikelnummer
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>d</b>	<i>Day</i>
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
<b>dl</b>	Deziliter
<b>g</b>	Gramm
<b>IFN</b>	Interferon-
<b>IU</b>	<i>international unit</i>
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>l</b>	Liter
<b>mg</b>	Milligramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm<sup>2</sup></b>	Quadratmillimeter
<b>mmol</b>	Millimol
<b>mW</b>	Milliwatt
<b>nm</b>	Nanometer
<b>p</b>	p-Wert
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>ref.</b>	Referenzgruppe
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>VCAMs</b>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecules</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

## **Symbolverzeichnis**

Symbol	Bezeichnung	Dimension
t	Zeitfaktor	Tage (d)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Summary</b> .....	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Symbolverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 Gefäßdegenerationen im Hinblick auf die Atherosklerose .....	- 1 -
1.1.1 Klinische Relevanz .....	- 1 -
1.1.2 Definition und Klassifikation .....	- 1 -
1.1.3 Pathophysiologie .....	- 4 -
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies .....	- 6 -
1.2.1 Allgemeines .....	- 6 -
1.2.2 Systemische Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies .....	- 8 -
1.2.3 Lokale Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies .....	- 9 -
1.3 Fragestellung dieser Arbeit .....	- 10 -
<b>2 Material und Methodik</b> .....	<b>- 11 -</b>
2.1 Material .....	- 11 -
2.1.1 Tiere und Diät .....	- 11 -
2.1.2 Intervention und Präparation .....	- 11 -
2.1.3 Histologie und Immunhistologie .....	- 11 -
2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	- 13 -

2.1.5	Software.....	- 14 -
2.2	Methodik.....	- 14 -
2.2.1	Tiere und Diät.....	- 14 -
2.2.2	Intervention und Präparation .....	- 15 -
2.2.3	Histologie und Immunhistologie .....	- 17 -
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>- 24 -</b>
3.1	Serumanalysen .....	- 24 -
3.2	Umbau der Gefäßwand in der Hämatoxylin Eosin Färbung.....	- 25 -
3.3	Kalzifizierung der Gefäßwand in der von Kossa Färbung.....	- 27 -
3.4	Umbau der Gefäßwand in der Movat`s Pentachrom Färbung .....	- 29 -
3.5	Immunhistologischer Nachweis von <i>α smooth muscle actin</i> und Von-Willebrand-Faktor.....	- 33 -
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>- 35 -</b>
4.1	Einordnung des Experiments im Hinblick auf aktuelle Arbeiten .....	- 35 -
4.2	Einordnung der Ergebnisse im Hinblick auf die angewandten Methoden .....	- 37 -
4.3	Schlussfolgerung.....	- 42 -
<b>5</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>- 44 -</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 45 -</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Gefäßdegenerationen im Hinblick auf die Atherosklerose**

### 1.1.1 Klinische Relevanz

Im Jahr 2013 starben laut einer Lancet Studie weltweit 17.287.500 Menschen an den Folgen von kardiovaskulären Erkrankungen. Davon entfielen 3.272.900 Todesfälle auf ischämische Schlaganfälle und 8.139.900 auf ischämische Herzerkrankungen wie zum Beispiel den akuten Myokardinfarkt (2). Diese Erkrankungen sind zum Großteil als klinische Manifestationen der Atherosklerose zu verstehen. Auf Grund von zwei pathophysiologischen Mechanismen ist Atherosklerose in der Lage, zu einer Gefäßstenose und somit zu einer Ischämie zu führen. Zum einen führt die langsame Entstehung und Progression einer atherosklerotischen Läsion zu einer chronischen Gefäßeinengung. Zum anderen kann eine plötzliche Plaque-Ruptur die Entwicklung von assoziierten Thromben oder Hämatomen nach sich ziehen und damit zu einem plötzlichen Gefäßverschluss führen (3). Prinzipiell ist ein solches Geschehen an allen arteriellen Gefäßen möglich. H. Sary nannte atherosklerotische Läsionen, welche mit Thromben, Hämatomen oder Oberflächenzerstörung assoziiert sind, komplizierte atherosklerotische oder *Typ VI Läsionen* (4). Am Beispiel einer Koronararterie führen derartige Erscheinungen zu einem akuten Koronarsyndrom (5). Im Gegensatz dazu ist der langsame und chronische Koronararterienverschluss auf Grund einer progressiven Atherosklerose häufiger mit einer stabilen *Angina pectoris* vergesellschaftet (6).

### 1.1.2 Definition und Klassifikation

Zur Definition der Atherosklerose bedarf es einer differenzierten Betrachtung des

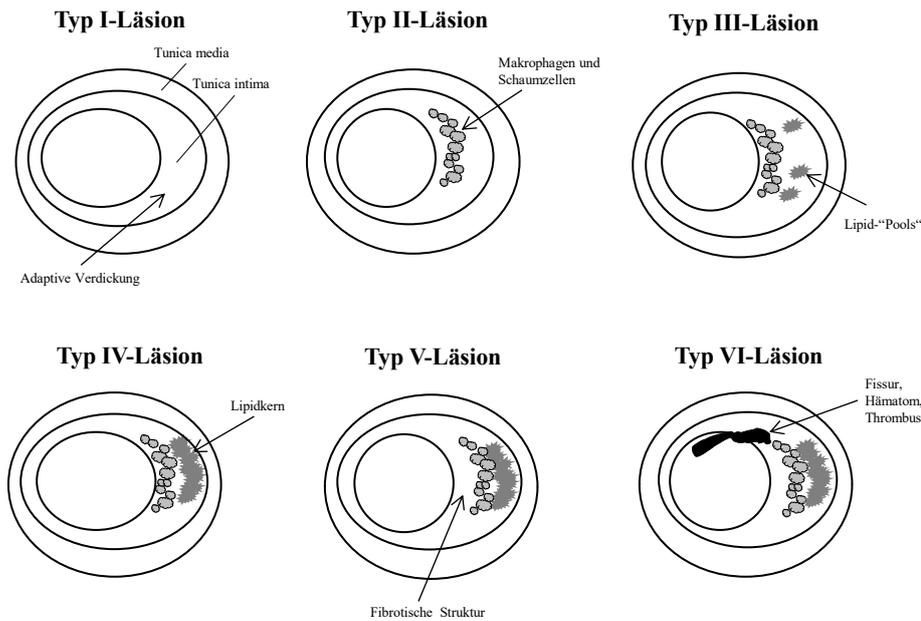
Begriffs an sich, der Geschichte und des aktuellen Konsenses. Bereits 1833 wurde der Begriff der Arteriosklerose von J. Lobstein verwendet. Er beschreibt damit nach drei Kategorien sortiert (inflammatorisch, ossifizierend und sklerosierend) die Versteifung und Verdickung der großen Arterien (7). Der Begriff Arteriosklerose setzt sich aus den altgriechischen Wörtern „*arteria*“ für Ader und „*skleros*“ für hart zusammen.

Davon abzugrenzen ist der Begriff der Atherosklerose, welcher sich aus den altgriechischen Wörtern „*athära*“ für Grütze und „*skleros*“ für hart zusammen setzt. 1904 schlug F. Marchand diese Bezeichnung, unter Berücksichtigung vielfältiger morphologischer Aspekte der Arteriosklerose vor. Es sollten neben den degenerativen, sklerosierenden und entzündlichen Aspekten, auch produktive und ossifizierende Erscheinungen der Arterienwandverdickung mit eingeschlossen werden (8).

Diese ungenaue Definition der Atherosklerose konnte 1958 von der WHO kaum verbessert werden. So einigte sich eine Expertenkommission auf folgende Definition: „Atherosclerosis is a variabel combination of changes of the intima of arteries (as distinguished from arterioles) consisting of the focal accumulation of lipids, complex carbohydrates, blood and blood products, fibrous tissue and calcium deposits, and associated with medial changes“ (9). Ohne einen Anspruch auf Klärung der Ätiologie und Pathogenese sollte diese Definition die internationale Datenerhebung zum Thema Atherosklerose standardisieren.

Mit dem Ziel, pathogenetische Mechanismen nachvollziehen zu können, Vergleiche zu ermöglichen und auf klinische Manifestationen zu beziehen, veröffentlichte H. Sary 1995 eine Klassifikation der humanen Atherosklerose. Er unterscheidet dabei folgende sechs Läsionstypen: *Typ I Läsionen* sind geprägt durch erste Lipidablagerungen, welche in der Tunica intima mikroskopisch nachweisbar sind. Kleine isolierte Gruppen von Makrophagen und lipidhaltigen Makrophagen, genannt Schaumzellen, können

nachweisbar werden und befinden sich, wie aus Abb. 1 ersichtlich wird, vor allem in einer kompensatorisch verdickten Tunica intima. Im Gegensatz dazu besitzen *Typ II Läsionen* nicht nur vereinzelte Gruppen von Schaumzellen, sondern benachbarte Schichten dieses Zelltypus. In Abgrenzung dazu weisen *Läsionen* vom *Typ III* vor allem extrazellulär lokalisierte Lipide auf. Die Lipide drängen glatte Muskelzellen auseinander und befinden sich unter einer Schicht aus Makrophagen und Schaumzellen (10). Auf Grund von weiteren Strukturveränderungen der Tunica intima werden *Läsionen* vom *Typ IV, V, und VI* als fortgeschrittene Läsionen zusammengefasst. Die *Typ IV Läsion*, auch Atherom genannt, zeichnet sich durch eine dichte Ansammlung von extrazellulären Lipiden in der Tunica intima aus. Ein Lipidkern führt häufig zu einer Verdickung der Arterienwand. Werden die zuvor veränderten Tunica intima Strukturen fibrotisch ersetzt, spricht man von einer *Typ V Läsion*. Dabei werden drei Unterklassen des fibrotischen Typs differenziert. Sind zum Beispiel der Lipidkern und/oder das Bindegewebe kalzifiziert spricht man von einer *Typ Vb Läsion*. Von einer komplizierten oder *Typ VI Läsion* kann die Rede sein, wenn sich zu einer *Typ IV oder V Läsion* eine weitere Komponente, wie zum Beispiel eine Fissur oder Ulzeration, gesellt. H. Sary macht außerdem deutlich, dass sich atherosklerotische Läsionen, je nach Einflussfaktoren, im Wandel befinden und sich somit auch ihre Histologie stetig ändern kann.



**Abb. 1: Darstellung und Klassifikation von atherosklerotischen Läsionen (modifiziert nach (4)):**

Darstellung identischer Lokalisation von sechs verschiedenen Koronararterien im Querschnitt. Die Morphologie der Tunica intima reicht von adaptiver Verdickung bis hin zu einer *Typ VI Läsion* bei fortgeschrittener atherosklerotischer Erkrankung.

### 1.1.3 Pathophysiologie

Bereits 1904 postulierte F. Marchand, dass vor allem degenerative Prozesse die Entwicklung der Atherosklerose begründen. Toxine, wie zum Beispiel Alkohol, oder Ernährungsstörungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus, sorgen für eine Art Anfälligkeit und Vorschädigung der Gefäßwand. Gesellt sich zu dieser Vorschädigung eine stärkere Inanspruchnahme der Arterien, durch einen hohen Blutdruck oder starke Blutdruckschwankungen, kommt es zu Läsionen der Tunica intima (8). Auch N. Anitschkow erkannte 1914 an, dass multiple Faktoren die Entstehung der Atherosklerose beeinflussen können. Ganz im Gegensatz zu F. Marchand vertrat er aber die Ansicht, dass die Fettansammlungen der Atherosklerose nicht aus den degenerativen Prozessen entstehen, sondern durch eine Infiltration von Lipiden hervorgerufen werden.

Laut N. Anitschkow ist Cholesterin, welches vom Lumen aus in die Gefäßwand gelangt, als die Hauptursache für Fettablagerungen und die Dissoziation von interstitiellem Gewebe anzusehen. Auf Grund dieser Ablagerungen kommt es zu einer Reizwirkung und im Anschluss zu infiltrativen und proliferativen Prozessen (11).

Neue Methoden und Fortschritte in der Zytologie trieben in den 1970er Jahren die Erforschung der zellulären Komponenten voran. 1972 entwickelte R. Ross ein Tiermodell in dem er zeigen konnte, dass es nach einer selektiven Entfernung des Endothels zu einer Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen aus der Tunica media in die Tunica intima kommt (12). Er ging davon aus, dass dieses Modell zur Erforschung der Atherosklerose geeignet ist und stellte die Theorie „*response to injury*“ vor, welche er im Laufe der Jahre weiterentwickelte.

Ross wurde klar, dass nicht nur Gefäße, die einen Schaden ihres Endothels erlitten hatten, atherosklerotische Läsionen entwickeln können. Er modifizierte seine „*response to injury*“ Theorie zu einer Entzündungstheorie (13). Er war 1999 der Meinung, dass Noxen viel mehr zu einer Funktionsstörung als allein zu einer Schädigung des Endothels führen. Durch diese Störung wird unter anderem die Permeabilität des Endothels gesteigert, die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten gefördert und Faktoren, wie Zytokine, werden ausgeschüttet (14). Bis heute wird davon ausgegangen, dass in der Pathogenese der Atherosklerose chronische Inflammationsreaktionen eine dominierende Rolle einnehmen (15).

Auf molekularer Ebene konnten eine Vielzahl von Faktoren, welche intra- und interzelluläre Interaktionen regulieren, identifiziert werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass es auf Grund von oxidativen Stress zu einer verstärkten Expression von *vascular cell adhesion molecules (VCAMs)* an der Endothelzelloberfläche kommen kann. Durch eine erhöhte Expression der *VCAMs* binden vermehrt Leukozyten, wie zum

Beispiel Monozyten und T-Lymphozyten (16, 17). Die Endothel gebundenen Leukozyten migrieren in die Tunica intima und stehen hier unter dem Einfluss von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, welche zugleich von ihnen mit produziert werden. Darüber hinaus konnte eine gesteigerte Produktion von proinflammatorischen T-Zell-Zytokinen, wie zum Beispiel  $\text{IFN-}\gamma$ , in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (15). Oxidierte Lipide stehen unter dem Verdacht T-Zell abhängig an der Vermittlung von atherosklerotischen Plaques beteiligt zu sein (18). Reaktive Sauerstoffspezies nehmen dabei eine Art vermittelnden Charakter in der Initiierung und Progression von inflammatorischen Prozessen ein. Es wird deutlich, dass eine Vielzahl von Zellen und Mediatoren an der Initiierung und Progression der chronischen arteriellen Inflammation, welche im Verdacht steht atherosklerotische Läsionen hervorzurufen, involviert sind.

## **1.2 Reaktive Sauerstoffspezies**

### 1.2.1 Allgemeines

Zu der großen Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gehören neben Oxidantien, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) auch Radikale ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ , etc.) und Singulett Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Diese Sauerstoffverbindungen sind sowohl lebensnotwendig als auch schädlich. Auf der einen Seite sind reaktive Sauerstoffspezies in zelluläre Signaltransduktion involviert (19) und entstehen als Produkte der Atmungskette (20). Auf der anderen Seite oxidieren reaktive Sauerstoffspezies Proteine, Fette und Nukleinsäuren und können somit zu einer Gewebeschädigung führen (21). Besteht ein Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und antioxidativen Reagenzien, wie zum Beispiel der Katalase (22), zugunsten der reaktiven

Sauerstoffspezies, kommt es zum so genannten oxidativen Stress (23). Im Hinblick auf die degenerative Pathogenese von Gefäßläsionen zeigen sich zahlreiche Interaktionen von reaktiven Sauerstoffspezies.

Diese können als *second messenger* an der zellulären Signaltransduktion und Genexpression beteiligt sein. Beispielsweise kann es durch Angiotensin II zur Aktivierung der NADH/NADPH Oxidase kommen, welche über die Bildung von Sauerstoffradikalen zur Hypertrophie von glatten Muskelzellen führen kann (24). Außerdem sind reaktive Sauerstoffspezies in der Lage, intra- und extrazelluläre Lipide zu oxidieren. Diese oxidierten Lipide können wiederum Makrophagen zur Expression von proinflammatorischen Faktoren, wie zum Beispiel dem *monocyte chemotactic protein*, bewegen und somit eine Entzündungsreaktion unterhalten (25, 26). Unter dem Einfluss von oxidierten Phospholipiden können Endothelzellen eine gesteigerte Synthese von Interleukin 8, *monocyte chemotactic protein* oder dem *tissue factor* zeigen. Der *tissue factor* ist dafür bekannt, eine tragende Rolle in der sekundären Hämostase zu spielen und kann unter anderem zur Proliferation von glatten Muskelzellen beitragen (27).

Darüber hinaus steht die Induktion von kalzifizierenden Transkriptionsfaktoren unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies und ist in der Lage, die osteogene Zelldifferenzierung von glatten Muskelzellen voran zu treiben. Byon et al. konnten mit Hilfe der von Kossa Färbung *in vitro* eine vermehrte Kalzifikation glatter Muskelzellen nach der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigen. Darüber hinaus stellten sie fest, dass es zu einem veränderten Expressionsmuster von Zellmarkern kommt. Die behandelten glatten Muskelzellen exprimierten weniger typische glattmuskuläre Zellmarker, wie zum Beispiel das *α smooth muscle actin*. Im Gegensatz dazu kam es zu einer vermehrten Expression osteogener Zellmarker (28).

Es wird somit deutlich, dass reaktive Sauerstoffspezies bei der Entstehung und Progression von degenerativen Gefäßprozessen eine Rolle spielen können.

### 1.2.2 Systemische Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies

Um die Auswirkung von reaktiven Sauerstoffspezies nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* analysieren zu können, wurden bis heute eine Vielzahl von Tiermodellen entwickelt. Die Induktion sowie Inhibition von oxidativem Stress wurden dabei vor allem durch die Anwendung von systemisch wirkenden Mechanismen verwirklicht. Enzymatische sowie nutritive Interventionen stellen hierbei einen Großteil der angewendeten Methoden dar.

Dabei wirkt sich zum Beispiel die Fütterung einer stark cholesterinhaltigen Diät nicht nur auf das kardiovaskuläre System, sondern auch auf weitere Organsysteme und Zellen aus. So vermuten beispielsweise Guodong et al., dass es über eine Hypercholesterinämie durch die Entstehung von oxidativem Stress zu einer beschleunigten Alterung von hämatopoetischen Stammzellen kommen kann (29).

Darüber hinaus wurden bis heute verschiedene Nager mit enzymatischen Veränderungen auf Grund von Genmanipulationen zur Erforschung von oxidativem Stress genutzt. An Hand von Superoxiddismutase-3-defizienten Ratten zeigten Pinto et al., dass von der Superoxiddismutase ein kardioprotektiver Effekt nach Reperfusion ausgeht. Diese kann unter anderem Superoxide detoxifizieren, welche eine wichtige Rolle bei der Mediation von Reperfusionsläsionen nach Ischämien spielen können (30).

Ein weiteres Beispiel stellen die Apoprotein E defizienten Mäuse (ApoE<sup>-/-</sup>) dar. Diese weisen eine vermehrte Expression der Xanthin Oxidoreduktase auf, welche im Verdacht steht, über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies Atherosklerose zu induzieren. All diese Konzepte haben gemein, dass sie systemisch wirksam sind. So ist zu bedenken, dass eine Zunahme der Xanthin Oxidoreduktase nicht nur in den

Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen, sondern auch in der Leber und dem Plasma zu verzeichnen ist (31). Und auch die Fütterung einer cholesterinhaltigen Diät wirkt sich auf verschiedene Organsysteme aus.

### 1.2.3 Lokale Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies

Bengalrot (Tetrachlorotetraiodofluorescein) wurde 1882 von R. Gnehm entdeckt und patentiert. Zunächst genutzt als Färbemittel für Wolle, fand es bereits Anfang des 19. Jahrhunderts Einzug in die Medizin. Besonders in der Augenheilkunde erwies sich Bengalrot als diagnostisches Hilfsmittel und wird bis heute als Farbstoff zur Detektion von Oberflächendefekten des Auges angewandt (32, 33). Auch wurde lange Zeit die exkretorische Funktionsleistung der Leber mit Hilfe eines Farbstoffeliminationstest, welcher auf Bengalrot basierte, beurteilt (34, 35). Die alleinige intravenöse Applikation von Bengalrot gilt als gering toxisch und somit systemisch kaum relevant.

Wird dieser Farbstoff jedoch grünem Licht der Wellenlänge 543nm ausgesetzt, kommt es zu einer photochemischen Reaktion. Es entstehen lokal reaktive Sauerstoffspezies wie zum Beispiel Singulett-Sauerstoff und Superoxidionen (36).

Diese Art der Applikation von oxidativem Stress ist vor allem im Hinblick auf akute und kurzzeitige Effekte untersucht worden. So konnten Perez et al. zeigen, dass es nach der Applikation von Bengalrot in Kombination mit einem Laserstrahl nicht nur zu einer Thrombusentwicklung kommen kann, sondern auch zu einer kompletten Okklusion des behandelten Gefäßes. Bei konstanter Laserintensität ist es abhängig von der Bengalrotkonzentration, ob es zu einem Gefäßverschluss kommt oder nicht. Jedoch führte die alleinige Anwendung von Bengalrot oder dem Laserstrahl zu keiner Thrombusentstehung. Sie sind zu der Schlussfolgerung gekommen, dass ihr Model für die *in vivo* Erforschung der Thrombose einfach und kostengünstig zu nutzen ist (37). Eitzmann et al. induzierten in ihrem Mausmodell ebenfalls durch Bengalrot in

Kombination mit einem Laser eine photochemische Reaktion. Sie etablierten ein Tiermodell zur Erforschung der akuten Thrombose bei bereits bestehenden atherosklerotischen Läsionen (38). Jedoch haben die genannten Beispiele lediglich kurzfristige Effekte erfasst und es kam zu keiner längeren Beobachtung der induzierten Läsionen.

### **1.3 Fragestellung dieser Arbeit**

Reaktive Sauerstoffspezies stehen seit einigen Jahren unter dem Verdacht, entscheidende Mediatoren in der Entstehung und Progression von atherosklerotischen Läsionen zu sein. Im Sinne der Entwicklung neuer Therapieoptionen gilt es somit, der Erforschung reaktiver Sauerstoffspezies und deren Auswirkungen auf arterielle Gefäßläsionen gesteigertes Interesse entgegen zu bringen. Die bisherigen *in vivo* Versuche nutzten dabei vor allem Tiermodelle, welche systemisch wirksame Mechanismen verwendeten. Daraus ergeben sich Limitationen, wie zum Beispiel die Induktion von Enzymen außerhalb des kardiovaskulären Systems (29). Ein Ansatz zur besseren Erforschung von kardiovaskulären Erkrankungen könnten somit Modelle darstellen, welche die Entstehung von lokal begrenzten Läsionen ermöglichen.

Um fokal reaktive Sauerstoffspezies generieren zu können, nutzten wir die photochemische Reaktion von Bengalrot in Kombination mit einem Laserstrahl aus. Es stellt sich die Frage, ob es durch diese lokale Applikation von ROS zu Veränderungen der arteriellen Gefäßwand kommt. Von besonderem Interesse sind vor diesem Hintergrund Degenerationen und morphologische Aspekte der Atherosklerose.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Tiere und Diät

Diät Zusatz t(-7d)-t(28d) Cholesterin 2%	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Diät Zusatz t(-7d)-t(28d) Dikalziumphosphat 1,5%	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Diät Zusatz t(-7d)-t(28d) Vitamin D 300.000 IU/kg	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Ratten, männlich, Wistar, 200g-250g	Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf, Deutschland, 84-02.04.2011.A3
Rattenfutter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, R/M- H:V1534-0

#### 2.1.2 Intervention und Präparation

Bengalrot	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Art.-Nr.: 3162.1
Buprenorphin	Animalcare Limited, Großbritannien, Art.- Nr.: 401045.00.00
Carprofen	Norbrook, Nordirland, Art.-Nr.: 6191-91K
Chirurgisches Nahtmaterial, 8-0 Prolene, monofil, nicht absorbierbar	Ethicon, Norderstedt
Isofluran 2%-2,5%	Piramal healthcare, UK
Ketamin	Pfizer, Deutschland, Art.-Nr.: 3151811
Laser 543nm cw, 1mW (roithner, Wien)	Roithner, Wien
Xylazin	Bayer, Deutschland, Art.-Nr.: 1320422

#### 2.1.3 Histologie und Immunhistologie

Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.: 1.00014
Alcianblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.: A5268
Aluminiumsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.: 202614

Ammoniaklösung 30%	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.:CP17.1
Antikörper, primär ,Von Willebrand Factor, polykonal aus dem Kaninchen	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark, Art.-Nr.:A0082
Antikörper, primär, $\alpha$ Smooth Muscle, monoklonal aus der Maus	Sigma, Saint Louis, USA, Art.-Nr.:A5228
Antikörper, sekundär , Schaf gegen Maus IgG, CY3	Sigma, Saint Louis, Art.-Nr.: C 2181
Antikörper, sekundär, Ziege gegen Kaninchen IgG, Alexa488	Invitrogen, Carlsbad, USA, Art.-Nr.:A-11008
Aqua destillata., Ecotainer	Braun, Melsungen, Art.-Nr.:0082479E
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.:A9418
Brilliant Crocein R	Waldeck GmbH, Münster, Art.-Nr.:1B-109
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark, Art.-Nr.:S2002
Eindeckmedium Vectashield mit DAPI(4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Vector Laboratories, Burlingame, USA, Art.-Nr.:H-1200
Einschlussmittel Roti Histokitt	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.: T160.1
Eisen-Chlorid-Hexahydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.:236489
Eosin G	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.:7089.1
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.:6755.2
Ethanol 70%, 96%, 100%	Zentralapotheke, Universitätsklinikum Düsseldorf
Formaldehyd 37%, Rotipuran	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.:4979.2
Formaldehyd 4%, Roti Histofix	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.:P087.3
Hämatoxylin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.Nr.:H3136
Jod	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.:7935.1
Kaliumjodid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.:8491.3
Kernechtrot	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.:N8002
KP-CryoCompound	Klinipath, Duiven, Art.-Nr.:VWRK1620-C
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.:1.06392
Natriumthiosulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.:72049

PBS	Gibco by life technologies, Darmstadt, Art.-Nr.: 14190-094
Phosphorwolframsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.:4006
Pikrinsäure	VWR Chemicals, Braunschweig, Art.-Nr.:84512.260
Safran du Gatinais	Waldeck GmbH, Münster, Art.-Nr.:5A-394
Salzsäure rauchend 37%	Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.:1.00317
Säurefuchsin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Art.-Nr.:T128.1
Silbernitrat	VWR Chemicals, Leuven, Art.-Nr.:21570.238
Triton X	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.:T9284
Tween 20, Calbiochem	Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.:655205
Xylol	VWR Chemicals, Braunschweig, Art.-Nr.:28975.325

#### 2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Cryotom	Leica, Wetzlar, Leica CM 1950
Durchlichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Leica DM 2000
Fluoreszenzlampe	Leica, Wetzlar, DFC425 C
Leuchtstoffröhre	Osram, München, 30Watt, cool wight
Magnetrührer, Rotilabo	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, MH15
Mikroskopkamera	Leica, Wetzlar, DFC 425C
Waage	Sartorius, Göttingen, BP 110 S
Wärmeschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, UT 20

Deckgläser 24x60mm	Engelbrecht GmbH, Edermünde, Art.-Nr.:k12460
Einbetttschälchen Kunststoff	Medite GmbH, Burgdorf, Art.-Nr.:31051717
Filter Tip, 10µl XL, graduated	Starlab International GmbH, Hamburg, Art.-Nr.:S1120-3810
Filter Tip, 1000µl XL, graduated	Starlab International GmbH, Hamburg, Art.-Nr.:S1122-1830

Filter Tip, 20µl, bevelled	Starlab International GmbH, Hamburg, Art.-Nr.:S1120-1810
Filter Tip, 200µl, graduated	Starlab International GmbH, Hamburg, Art.-Nr.:S1120-8810
Mikrotom-Klinge S-35pfm	Feather LTD., Osaka, Art.-Nr.:02.075.00.000
Mikrotube, 1,5ml	Biosigma S.r.l., Cona Italien, Art.-Nr.:CL022
Naturaltube, 0,2ml	Sorenson, Utah, USA, Art.-Nr.:16950A
Nitra Tex Handschuhe, Micro Touch	Ansell, München, Art.-Nr.:700113
Obejektträger SuperFrost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Art.-Nr.:03-0060
Skapell, steril, No.10pfm	Feather, Osaka, Art.-Nr.:02.001.30.010

### 2.1.5 Software

Image J	Freeware, NIH
Microsoft Office Word 2007	Microsoft Inc., Redmond, USA
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Inc., Redmond, USA
Mikroskop Software	Leica Microsystems, Wetzlar, LAS V3.8
Paint	Microsoft Inc., Redmond, USA
Prism5	Prism version 5 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA,

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Tiere und Diät

Männliche Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von 200-250g wurden ausschließlich über die Tierversuchsanlage der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf bezogen und unter dem vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz vergebenen Aktenzeichen: 84.02.04.2011.A34 geführt. Alle Tierversuche erfolgten gemäß des genehmigten Tierversuchsantrags und den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes. Die Tiere erhielten durchgehend *ad libitum* ein Standard-

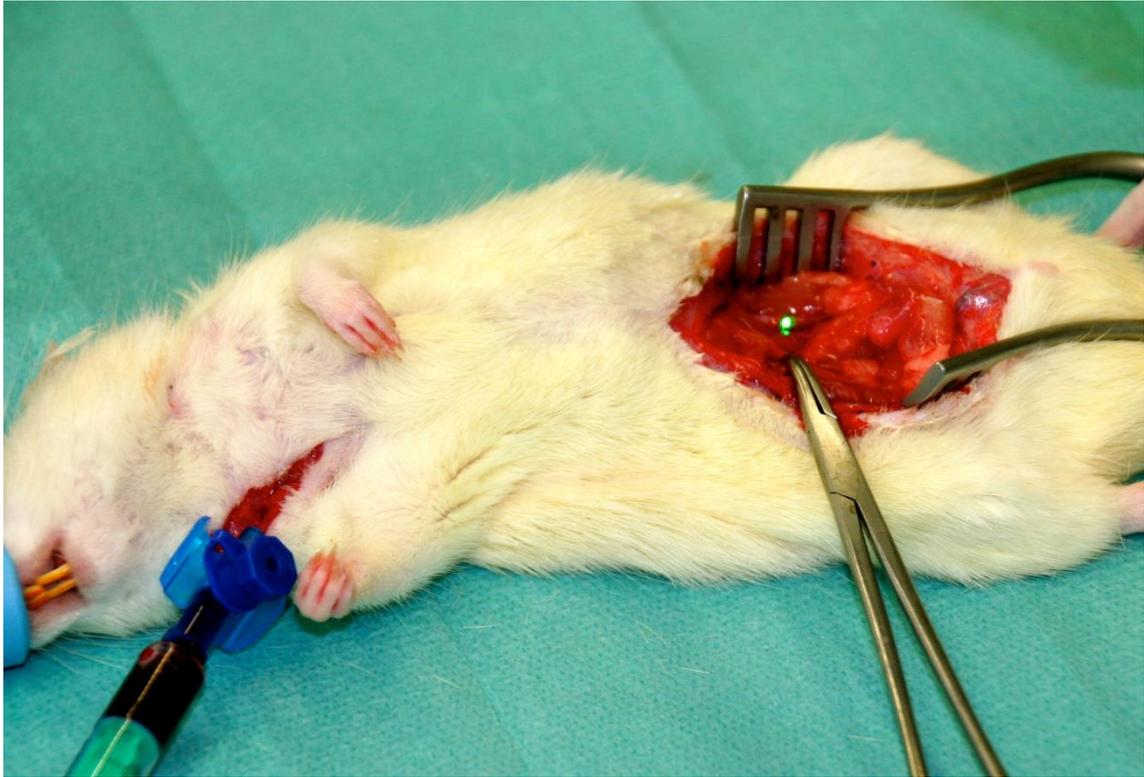
Rattenfutter. Eine Woche vor bis vier Wochen nach der primären Intervention wurde das Standard-Rattenfutter mit zusätzlichen prodegenerativen Komponenten angereichert. Hierzu wurden 1,5% Dikalziumphosphat, 2% Cholesterin und 300.000 IU/kg Vitamin D beigefügt. Zur Kontrolle der prodegenerativen Diät wurden Serumproben an den Explantationszeitpunkten  $t = 0$ ,  $t = 8d$ ,  $t = 28d$ ,  $t = 56d$  von jeweils fünf Versuchstieren, sowie von fünf Tieren, welche ausschließlich eine Standarddiät erhalten hatten, entnommen. Diese wurden auf ihren Kalzium-, Phosphat-, Cholesterin- und Triglyceridspiegel hin analysiert.

### 2.2.2 Intervention und Präparation

Die vorgenommenen Interventionen fanden im Kleintieroperationsaal des Forschungslabors der Kardiovaskulären Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf statt.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (90mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (5mg/kg Körpergewicht). Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere mit 2%-2,5%igen Isofluran beatmet und erhielten zur Analgesie subkutan Carprofen (5mg/kg Körpergewicht).

Zu Beginn wurde eine sonographische Doppleruntersuchung der abdominalen Aorta durchgeführt. Im Anschluss wurde die Aorta durch eine mediane Laparotomie und Lateralisation des Intestinums freigelegt. Außerdem wurde die rechte Jugularvene freipräpariert. Über diese erhielt eine Gruppe von Ratten eine Bengalrotlösung (40mg/kg Körpergewicht) injiziert. Wie aus Abb. 2 ersichtlich wird wurden anschließend die Aorten beider Gruppen für 60 Minuten infrarenal mit einem Laser 543nm cw, 1mW bestrahlt.



**Abb. 2: Darstellung der primären tierexperimentellen Intervention**

Die narkotisierte Ratte erhielt über die Vena jugularis den Farbstoff Bengalrot injiziert. Anschließend wurde die freipräparierte Aorta abdominalis mit einem Laser (grüner Punkt) bestrahlt.

Die bestrahlte Läsion wurde mit einem 8-0 Monofilamentfaden, welcher nicht resorbierbar ist, markiert. Nach der Laserintervention wurde das Abdomen sowie der Jugularvenenzugang schichtweise verschlossen und zur Kontrolle eine weitere Doppler-Untersuchung der abdominalen Aorta durchgeführt. Vom ersten bis zum dritten postoperativen Tag erhielten die Tiere als postoperatives Schmerzmanagement alle 24 Stunden eine subkutane Injektion von Carprofen (5mg/kg Körpergewicht). Zusätzlich wurde am ersten postoperativen Tag bei Bedarf intramuskulär Buprenorphin (0,05mg/kg Körpergewicht) appliziert.

Für die Explantation der zuvor behandelten Aorten wurden sechs Zeitpunkte gewählt. Zum einem erfolgte eine sofortige Explantation nach der Laserintervention ( $t = 0$ ), zum anderen erfolgten Explantationen nach einigen Tagen ( $t = 2d$ ,  $t = 4d$ ,  $t = 8d$ ) und nach mehreren Wochen ( $t = 28d$ ,  $t = 56d$ ). Für jeden Explantationszeitpunkt kamen zehn

Tiere zum Einsatz, fünf erhielten zuvor die Bengalrot-Applikation mit Laserintervention (ROS-Gruppe), fünf erhielten als Kontrollgruppe ausschließlich eine Laserintervention. Vor der Explantation der Aorten wurden die Tiere abermals mit dem bereits genannten Regime narkotisiert. Im Anschluss wurden die Tiere durch Exsanguination euthanasiert. Es folgte die erneute Freilegung der zuvor markierten Läsion und die Explantation der Aorta. Das explantierte Präparat der Aorta wurde unverzüglich in PBS gewaschen und von dorsal in seiner Länge nach aufgeschnitten. In dieser Form wurden die Präparate in KP-CryoCompound eingebettet und bei -20°C tiefgefroren. Zur weiteren histologischen und immunhistologischen Aufarbeitung wurden die Aortenpräparate in Serie auf Objektträger verteilt. Hierzu wurden die Proben bei -20°C zu 7µm dicken Schnitten verarbeitet.

### 2.2.3 Histologie und Immunhistologie

Im Rahmen der histologischen und immunhistologischen Aufarbeitung wurden für alle aufgelisteten Färbungen 7µm dicke kryohistologische Schnitte verwendet.

#### *Hämatoxylin Eosin Färbung*

Begonnen wurde mit einer fünfminütigen Fixierung der Kryoschnitte in 4%igem Formalin. Es folgte die Färbung mit Hämatoxylin für eine Minute. Dieser schloss sich eine Spülung von einer Minute in Aqua dest. und eine Bläuung von zehn Minuten in 5%igen Essigwasser an. Die anschließende Spülung bestand aus Aqua dest. für eine Minute, aus fließendem Leitungswasser für zwei Minuten und aus 70%igen Alkohol für eine Minute. Daraufhin kam eine alkoholische Färbung mit Eosin für fünf Minuten zum Einsatz. Zum Abschluss wurden die Kryoschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, 70%iger Alkohol für eine Minute, 96%iger Alkohol für zweimal eine Minute, 100%iger Alkohol für zweimal eine Minute, und einem Xylolbad für zweimal eine Minute entwässert. Die Präparate wurden getrocknet und mit Eindeckmedium verschlossen.

Im Rahmen dieser Färbung werden die basophilen Komponenten, wie zum Beispiel Zellkerne und raues Endoplasmatisches Retikulum, blau dargestellt. Eosin färbt die eosinophilen, basischen Bestandteile, wie zum Beispiel Zellplasma, glattes Endoplasmatisches Retikulum und extrazelluläre Matrix rot. Mit Hilfe dieser Färbung konnte ein erster Eindruck über die Präparate gewonnen werden.

#### *Färbung von kalzifizierten Regionen nach von Kossa*

Zu Beginn des Färbevorgangs wurden die Kryoschnitte acht Minuten mit vorgekühltem Aceton behandelt. Es folgte eine einminütige Trocknung der Schnitte mit anschließendem kurzem Eintauchen in Aqua dest. Daraufhin kam eine 5%ige Silbernitratlösung (10g Silbernitrat in 200ml Aqua dest.) mit ca. 1m Abstand zu einer 30 Watt Leuchtstoffröhre für 15 Minuten zum Einsatz. Es folgte ein dreimaliges Spülen in Aqua dest. für jeweils drei Minuten und ein Reduzieren in einer Natriumkarbonat-Formaldehydlösung (10g Natriumkarbonat in 50ml 35%-40% Formaldehyd und 150ml Aqua dest.) für zwei Minuten. Anschließend wurden die Kryoschnitte zehn Minuten in fließendem Leitungswasser gewässert, um dann fünf Minuten in einer 5%igen Natriumthiosulfatlösung (10g Natriumthiosulfat in 200ml Aqua dest.) fixiert und nochmals für 15 Minuten in fließendem Leitungswasser gewässert zu werden. Eine dreiminütige Spülung in Aqua dest. wurde der zehnminütigen Färbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (0,2g Kernechtrot und 10g Aluminiumsulfat in 200ml Aqua dest.) vorangestellt. Es schloss sich ein erneutes dreiminütiges Spülen mit Aqua dest. an. Zum Abschluss wurden die Kryoschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 50%igem, 70%igem, 90%igem, 100%igem Alkohol für jeweils zwei Minuten, und einem Xylolbad zweimal fünf Minuten entwässert. Die Eindeckung erfolgte nach Trocknung der Präparate mit dem Einschlussmittel Histokitt.

Im Rahmen dieser Färbung werden Kalziumionen durch Silberionen der

Silbernitratlösung ersetzt und anschließend zu metallischem, braunschwarzem Silber reduziert. Mineralisierte Strukturen werden so braunschwarz hervorgehoben. Mit Hilfe der Kernechtrot-Aluminiumsulfat Lösung werden Zellkerne rot gefärbt. Die Färbung wird zur Darstellung von mineralisierten Strukturen, wie zum Beispiel Knochen oder kalzifiziertem Gewebe, verwendet. Sie diente im Rahmen dieser Arbeit der Evaluation von Verkalkungen der Aorta.

#### *Movat`s Pentachrom Färbung*

Begonnen wurde mit der einer fünfminütigen Spülung in Aqua dest., gefolgt von einer zehnminütigen Fixierung in 4%igen Formalin und einer erneuten fünfminütigen Spülung in Aqua dest.. Daraufhin kam für zehn Minuten eine 50°C warme Bouin'sche Lösung (300ml Pikrinsäure und 20ml 100%iger Eisessig in 100ml 37%-40% Formaldehyd) zum Einsatz. Die Schnitte wurden anschließend zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült und fünf Minuten in 5%igen Natriumthiosulfat (10g Natriumthiosulfat in 200ml Aqua dest.) fixiert. Es folgte ein erneuter Spülschritt mit zweimal zwei Minuten Aqua dest. und einmal eine Minute Aqua dest.. Als nächstes wurden die Kryoschnitte für 20 Minuten mit einer 1%igen Alcianblaulösung (1g Alcianblau auf 100ml Aqua dest.) gefärbt. Daraufhin folgte für zehn Minuten, nach vorangehender und anschließender Spülung für dreieinhalb Minuten unter fließendem Leitungswasser, die Stabilisierung mit 60°C warmen alkalischen Alkohol (40ml 30%Ammoniaklösung in 360ml 96%igen Alkohol). Es schloss sich für neun Minuten die Färbung mit einer Weigert's Arbeitslösung an. Diese bestand aus 60ml alkoholischem Hämatoxylin (10g Hämatoxylin in 500ml 96%igem Alkohol), 40ml Eisenchlorid (12,4g Eisenchloridhexahydrat und 5ml 32%-37%ige Salzsäure in 500ml Aqua dest.) und 20ml Jodlösung (10g Jod und 20g Kaliumjodid in 500ml Aqua dest.). Der anschließende Waschschrift umfasste die Spülung unter fließendem Leitungswasser

für eine Minute, sowie zweimal zwei Minuten und einmal eine Minute in Aqua dest. Daraufhin kam eine Minute eine Crocein-Säurefuchsin-Arbeitslösung, welche 120ml Brilliant Crocein R (4g Brilliant Crocein R in 398ml Aqua dest.) und 20ml Säurefuchsin (0,5g Säurefuchsin und 2,5ml 100%iger Eisessig in 497,5ml Aqua dest.) beinhaltet, zum Einsatz. Es folgte, nach vorangehender Spülung für zweimal zwei Minuten in Aqua dest. und einmal eine Minute in Aqua dest., die fünfminütige Differenzierung mit einer 5%igen Phosphorwolframsäure (25g Phosphorwolframsäure in 500ml Aqua dest.). Die anschließende Spülung wurde mit 1%igen Eisessig für fünf Minuten und Aqua dest. für zweimal zwei Minuten und einmal eine Minute durchgeführt. Vor der letzten achtminütigen Färbung mit alkoholischem Safran (12g Safran du Gatinais in 200ml 100%igen Alkohol) erfolgt eine Dehydratation in 96%igen Alkohol für eine Minute und 100%igen Alkohol für zweimal eine Minute. Zum Schluss wurden die Kryoschnitte zweimal eine Minute in 100%igen Alkohol gespült und dreimal fünf Minuten im Xylolbad entfettet. Die Eindeckung erfolgte nach der Trocknung mit Histokitt.

Bei der hier beschriebenen Färbung stellen sich Kerne und elastische Fasern schwarz bis dunkelblau, Muskulatur rot, Kollagenfasern und retikuläres Bindegewebe gelb bis orange und saure Glykosaminoglykane, sowie weitere Grundsubstanzen der extrazellulären Matrix blau bis grün, dar. Auf Grund der differenzierten Darstellung von zellulären und extrazellulären Gewebsbestandteilen findet diese aufwendige Färbung eine breite Anwendung. Somit ließ sich auch im Rahmen unserer Arbeit eine Darstellung der Gewebszusammensetzung der Aorten erzeugen. Außerdem wurde mit Hilfe dieser Färbung die relative Wanddicke der Präparate bestimmt.

### *Immunhistologie*

Die Objektträger für die Immunhistologische Aufarbeitung enthielten jeweils zwei kryohistologische Schnitte. Ein Schnitt diente als zu untersuchende Probe ein weiterer als direkte Negativkontrolle. Begonnen wurde mit einer zehnminütigen Fixierung in 4%igen Formalin. Daraufhin folgte vor und nach einer dreimal einminütigen Waschung in PBS eine zehn Minuten andauernde Demaskierung mit Hilfe von 0,25%igen Triton X (0,25g TritonX in 100ml PBS). Anschließend fand eine 60minütige Blockierung mittels 5%igen BSA (5g Bovines-Serum-Albumin in 100ml 0,1%igen Tween20) statt. Zur darauffolgenden Spülung wurde dreimal eine Minute 0,1%iges Tween20 (1ml Tween20 in 1000ml PBS) genutzt. Im nächsten Schritt wurden die als kryohistologische Schnitte zu untersuchenden Proben jeweils mit 40ml Primär-Antikörperlösung und die Negativkontrollen mit 40ml PBS für 60 Minuten bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Primär-Antikörperlösung wies eine Antikörperkonzentration von 1:300 für den Antikörper von Willebrand Faktor (aus dem Kaninchen) und den Antikörper *α smooth muscle actin* (aus der Maus) auf und basierte auf einer 1%igen BSA in 0,1%iger Tween20 Lösung (10 g Bovines-Serum-Albumin und 1ml Tween20 in 1000ml PBS). Es folgte dreimal eine fünfminütige Waschung in 0,1%igen Tween20 (1ml Tween20 in 1000ml PBS). Im Anschluss wurden die zu untersuchenden Proben, sowie die Negativkontrolle, mit 40ml Sekundär-Antikörperlösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Die Sekundär-Antikörperlösung basierte auf einer 1%igen BSA in 0,1%iger Tween20 Lösung (10 Bovines-Serum-Albumin und 1ml Tween20 in 1000ml PBS) und beinhaltete einen mit dem Fluophor CY3 gekoppelten Sekundär-Antikörper der Spezies Schaf gegen Maus und einen mit Alexa 488 gekoppelten Sekundär-Antikörper der Spezies Ziege gegen Kaninchen. Alle weiteren Schritte erfolgten in Dunkelheit. Eine dreimalige Waschung für fünf Minuten mit PBS

wurde von einer zehnminütigen Trocknung gefolgt. Zum Abschluss wurde auf die zu untersuchenden Proben und die Negativkontrollen jeweils ein Tropfen Eindeckmedium, Vectashield mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), pipettiert und jene mit einem Deckgläschen verschlossen. Anschließend wurden die Objektträger lichtdicht verpackt. In der verwendeten immunhistologischen Färbung stellen sich Zellkerne blau und Zellproteine entsprechend der gewählten Sekundär-Antikörper (Von-Willebrand-Faktor = grün; *α smooth muscle actin* = rot) fluoreszierend dar. Diese immunhistologische Färbung wurde verwendet, um die luminale Beschaffenheit und Integrität der Aorten aufzuzeigen.

<b>Antikörper</b>	<b>Information</b>	<b>Konzentration</b>
Anti-vWF	Primär-Antikörper gegen Von Willebrand Faktor, polykonal aus dem Kaninchen; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark, Art.-Nr.:A0082	1:300
Anti- $\alpha$ SMA	Primär-Antikörper gegen <i>α smooth muscle actin</i> , monoklonal aus der Maus; Sigma,Saint Louis, USA, Art.-Nr.:A5228	1:300
Anti-Kaninchen	Sekundär-Antikörper, Ziege gegen Kaninchen IgG, Alexa Flour 488; Invitrogen, Carlsbad, Art.-Nr.:A-11008; Fluoreszenz grün	1:200
Anti-Maus	Sekundär-Antikörper, Schaf gegen Maus IgG, CY3; Sigma, c.: C 2181; Fluoreszenz rot	1:100

#### *Auswertung histologischer und immunhistologischer Färbungen*

Die Betrachtung aller histologischen und immunhistologischen Bilder erfolgte mit einem Leica DM 2000 Durchlichtmikroskop, und gegebenenfalls mit einer DFC425 Fluoreszenzlampe. Es wurden Bilder mit Hilfe der Leica DFC 425C Kamera und der Software Leica Microsystems LAS V3.8 aufgezeichnet. Die anschließende Auswertung wurde unter der Nutzung von ImageJ vorgenommen (39).

Zur Bestimmung der relativen Wanddicken wurden an Movat`s Pentachrom gefärbten Schnitten die Breite der Tunica media, einschließlich der Tunica intima, erhoben. Es

wurde sowohl die lasereponierte Region als auch die benachbarte nicht exponierte Region evaluiert. Es folgte die Bildung des Quotienten aus beiden zur Bestimmung der relativen Wanddicke. Diese Erhebungen fanden für die ROS- und die Kontrollgruppe gleichermaßen statt.

Zur quantitativen Darstellung der arteriellen Verkalkung wurden die von Kossa gefärbten Schnitte der ROS- und der Kontrollgruppe planimetrisch evaluiert. Es erfolgte mit Hilfe von ImageJ die maßstabsgerechte Erfassung aller schwarzangefärbten Flächen. Hierdurch ließ sich die absolute Fläche der Verkalkung einer Probe ermitteln.

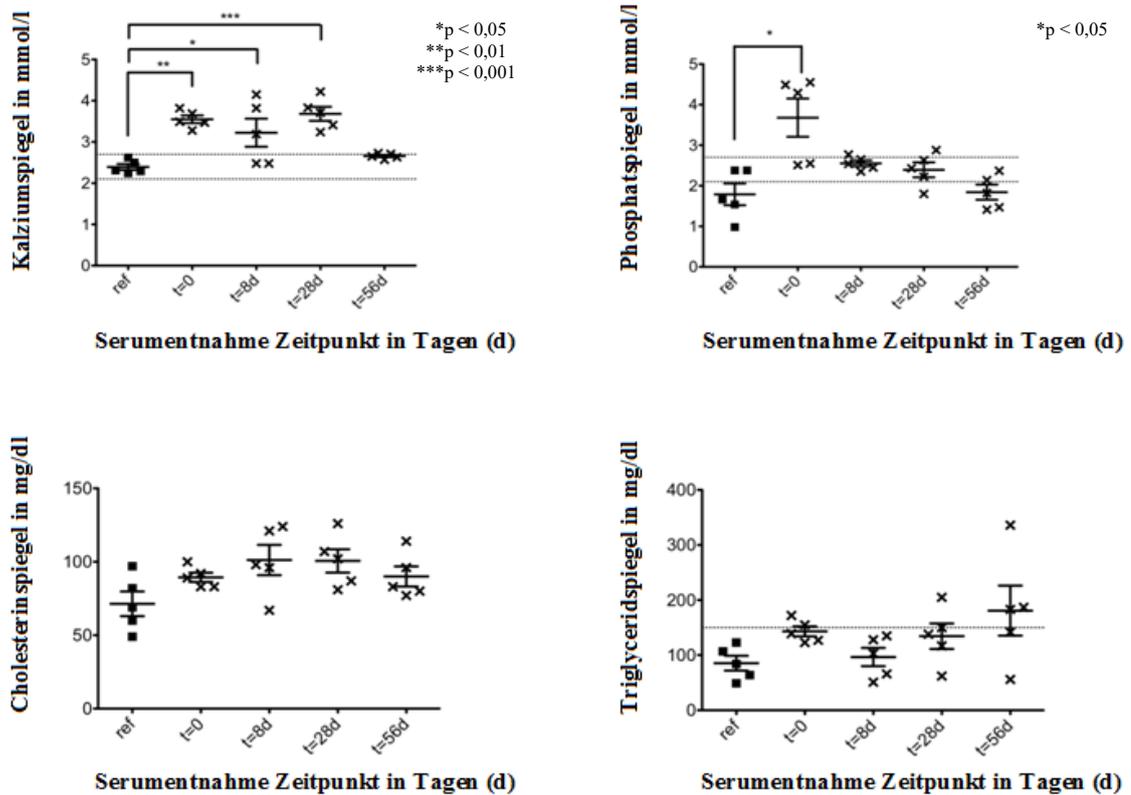
#### *Statistische Auswertung*

Alle Daten wurden mit dem Programm *Graphpad Prism 5* und *Microsoft Office Excel 2007* analysiert. Die Erstellung von Diagrammen, Histogrammen und Tabellen erfolgte ebenfalls mit dieser Software. Alle Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit Hilfe der *One-way-Anova* vollzogen. Zur Identifikation von Gruppenunterschieden im Rahmen der Varianzanalyse wurden zum einen der Tukey-Test und zum anderen der Dunn-Test als *post hoc* Test herangezogen. Der Tukey-Test fand zur Analyse der relativen Mediadicke und zum Vergleich von Serumwerten für Kalzium und Phosphat Anwendung. Für den Gruppenvergleich der Aortenverkalkung diente der Dunn-Test. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant erachtet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Serumanalysen**

Im Rahmen der Versuchsreihe erhielten alle Ratten eine prodegenerative Diät mit Beginn eine Wochen vor der Intervention bis maximal vier Wochen nach der primären Intervention (entspricht Explantationszeitpunkt  $t = 28d$ ). Zum Vergleich dienten die Serumwerte von fünf Ratten (Referenzgruppe, ref), welche ausschließlich Standardfutter erhalten hatten. Wie aus Abb. 3 ersichtlich wird sind die Kalziumserumspiegel der prodegenerativen Diätgruppe an den Tagen  $t = 0$ ,  $t = 8d$  und  $t = 28d$  im Vergleich zur Referenzgruppe signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). Lediglich am Entnahmetag  $t = 56d$  gibt es keinen signifikanten Unterschied dieser Gruppe zur Referenzgruppe. Für die ermittelten Phosphatwerte der prodegenerativen Diätgruppe zeigt sich, dass ausschließlich die Gruppe des Explantationstages  $t = 0$  einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Referenzgruppe aufweist ( $p < 0,05$ ). In der Cholesteringruppe sind zu keinem Entnahmezeitpunkt signifikante Unterschiede zur Referenzgruppe zu verzeichnen. Auch die erhobenen Serumtriglyceridwerte zeigen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe.



**Abb. 3: Darstellung der Kalzium-, Phosphat-, Cholesterin- und Triglyceridserumspiegel der ROS-Gruppe zu vier verschiedenen Explantationszeitpunkten im Vergleich zur Referenzgruppe (ref)**

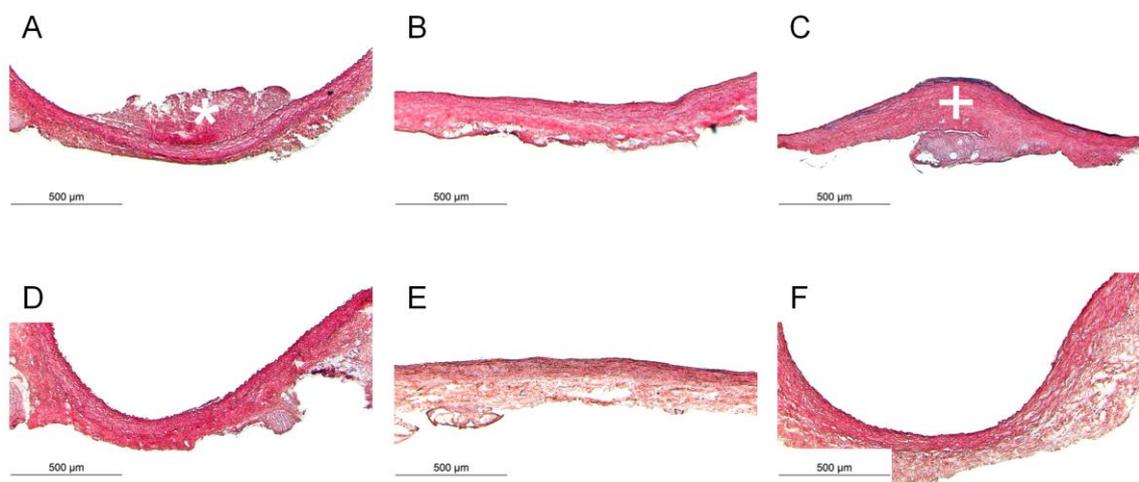
Die Serumanalysen machen den Einfluss der prodegenerativen Diät, welche die Tiere eine Woche vor bis vier Wochen nach der primären Intervention (t = 28d) erhalten hatten, deutlich. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg des Kalziumspiegels zu den Explantationszeitpunkten t = 0, t = 8d, t = 28d im Vergleich zur Referenzgruppe (p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001). Der Phosphatserumspiegel ist im Vergleich zu Referenzgruppe lediglich zum Explantationszeitpunkt t = 0 signifikant erhöht (p < 0,05). Die Cholesterin- und Triglyceridserumwerte zeigen zu keinem Explantationszeitpunkt einen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe. (1) (t = Zeitfaktor in Tagen; d = days)

## 3.2 Umbau der Gefäßwand in der Hämatoxylin Eosin

### Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin Eosin Färbung ist es möglich, einen ersten Eindruck über die Beschaffenheit der Präparate zugewinnen. Es werden im Folgenden exemplarisch Präparate zu verschiedenen Explantationszeitpunkten der ROS-Gruppe (Abb. 4 A-C), sowie der Kontrollgruppe (Abb. 4 D-F) dargestellt. In der ROS-Gruppe kommt es zum Explantationszeitpunkt t = 0 zur Bildung eines Thrombus (Abb. 4 Asterisk), welcher der

luminalen Gefäßwand aufgelagert ist (Abb. 4 A). Die Tunica media scheint in diesem Präparat eine einheitliche und geordnete Struktur aufzuweisen. Die blau angefärbten Zellkerne sind vor allem längs ausgerichtet. Dies gilt sowohl für die Präparate der ROS-Gruppe zum Explantationszeitpunkt  $t = 8d$  (Abb. 4 B), als auch für die Präparate der Kontrollgruppe zu den Explantationszeitpunkten  $t = 0$ ,  $t = 8d$  und  $t = 56d$  (Abb. 4 D-F). Im Gegensatz dazu fällt auf, dass Aortenproben der ROS-Gruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  (Abb. 4 C) im zuvor bestrahlten Bereich eine Verbreiterung der Gefäßwandstruktur aufweisen (Abb. 4 C, weißes Kreuz). Im Vergleich zur restlichen Gefäßwand kommt es in diesem Bereich zu einer Auflockerung der Tunica media. Die Zellkerne scheinen sich sowohl längs als auch quer zueinander anzuordnen. Eine klare Differenzierung von Tunica media zu Tunica adventitia ist erschwert. Die angrenzenden Bereiche der bestrahlten Region zeigen wiederum eine geordnete und einheitliche Struktur wie die zuvor beschriebenen Präparate

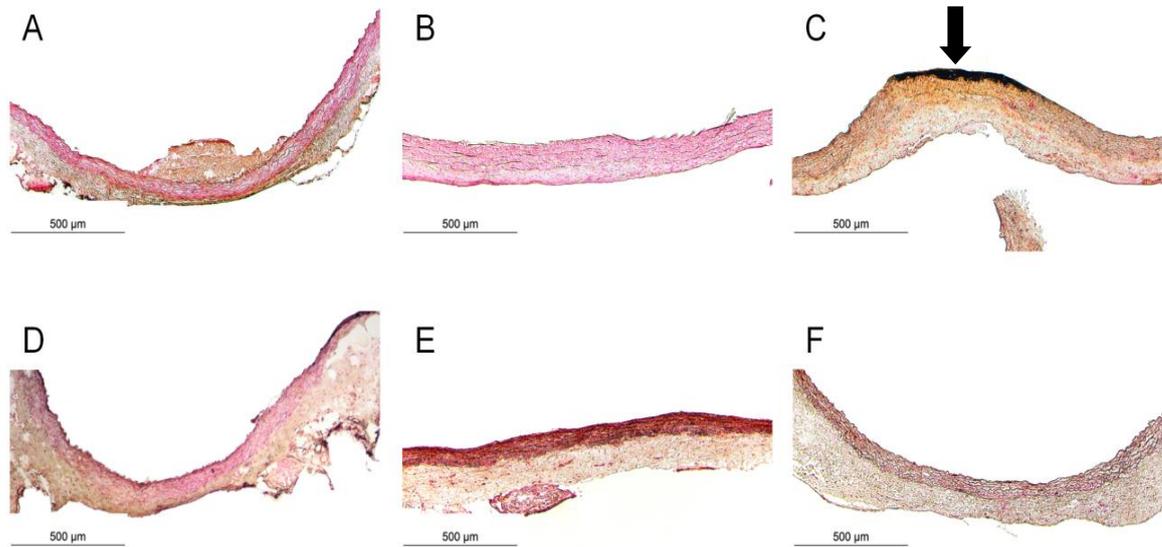


**Abb. 4: Darstellung von Querschnitten der Rattenaorta nach Hämatoxylin Eosin Färbung**  
 Die Bilder A-C gehören zur ROS-Gruppe. Im Bild A, welches den Explantationszeitpunkt  $t = 0$  aufweist, ist ein Thrombus (Asterisk) erkennbar. Dieser ist sowohl zum Explantationszeitpunkt  $t = 8d$  (B) als auch  $t = 56d$  (C) nicht mehr erkennbar. Im Gegensatz dazu lassen sich zu keinem Zeitpunkt Auffälligkeiten in den Präparaten der Kontrollgruppe ausmachen,  $t = 0$  (D),  $t = 8d$  (E),  $t = 56d$  (F). (Zellkerne = blau; Zellplasma = rot) ( $t =$  Zeitfaktor in Tagen;  $d =$  days)

### **3.3 Kalzifizierung der Gefäßwand in der von Kossa Färbung**

Anhand der von Kossa Färbung zeigen sich Unterschiede im Hinblick auf die verkalkte Fläche zum einen innerhalb der ROS-Gruppe, und zum anderen zwischen der ROS- und der Kontrollgruppe. Im Folgenden dient Abb. 5 zur beispielhaften Darstellung. Es sind keine relevanten Verkalkungen in den ROS-Gruppen der frühen Explantationszeitpunkte, wie zum Beispiel  $t = 0$  (Abb. 5 A) oder  $t = 28d$  (Abb. 5 B) zu erkennen. Im Gegensatz dazu lässt sich eine starke flächenhafte Verkalkung der Präparate der ROS-Gruppe zum spätesten Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  (Abb. 5 C) ausmachen. Diese starken flächenhaften Verkalkungen zeichnen sich durch ihr fokal abgrenzbares Erscheinungsbild aus. Es zeigt sich, dass vor allem die vom Laser abgewandten Gefäßschichten, wie Tunica intima und der luminale Teil der Tunica media, betroffen sind (Abb. 5 C, schwarzer Pfeil).

Die Kontrollgruppen, welche als Intervention ausschließlich eine Laserbestrahlung erhalten hatten, zeigen zu keinem Explantationszeitpunkt eine vermehrte oder gar flächenhafte Verkalkung ihrer Gefäßwand (Abb. 5 D-F). Auch zum Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  sind in der Kontrollgruppe lediglich vereinzelte, punktförmige Verkalkungen auszumachen (Abb. 5 F).



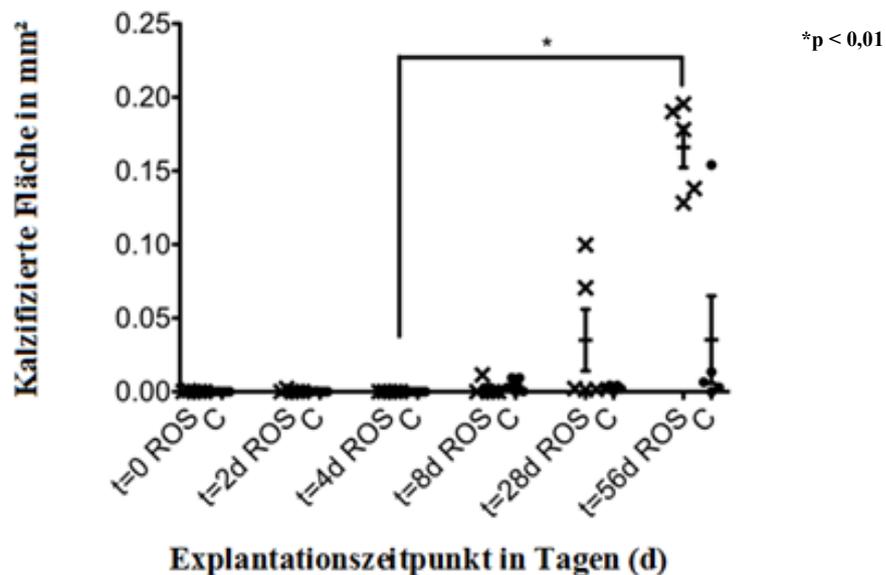
**Abb. 5: Darstellung von Querschnitten der Rattenaorta nach von Kossa Färbung**

In diesen repräsentativen aortalen Querschnitten zeigen sich in der ROS-Gruppe zu den frühen Explantationszeitpunkten  $t = 0$  (A) und  $t = 28d$  (B) kleine, vereinzelt auftretende Verkalkungen. Im Gegensatz dazu weist die ROS-Gruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  (C) eine flächenhafte, fokale und eng umschriebene Verkalkung (Pfeil) auf. Die Kontrollgruppe weist zu jedem Zeitpunkt  $t = 0$  (D),  $t = 28d$  (E),  $t = 56d$  (F) nur vereinzelte, punktförmige und über das gesamte Präparat verteilte Verkalkungen auf (1). (Verkalkte Bereiche = schwarz, Zellkerne = rot) ( $t =$  Zeitfaktor in Tagen;  $d =$  days)

Die zuvor beschriebenen Unterschiede lassen sich darüber hinaus quantitativ analysieren und darstellen. Hierzu wurden mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms die kalzifizierten Flächen der Präparate in  $\text{mm}^2$  erfasst. Wie aus Abb. 6 ersichtlich wird, weist die ROS-Gruppe einen ersten Anstieg ihrer mittleren verkalkten Flächen ab dem Explantationszeitpunkt  $t = 8d$  auf, gefolgt von einem weiteren leichten Anstieg zum Explantationszeitpunkt  $t = 28d$ . Zum Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  erreicht die ROS-Gruppe den höchsten Mittelwert an absoluter verkalkter Fläche. Quantitativ zeigt sich in der ROS-Gruppe ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den frühen Explantationszeitpunkten, wie zum Beispiel  $t = 4d$ , und dem spätesten Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  ( $p < 0,01$ ).

Auch innerhalb der Kontrollgruppe (Abb. 6 C) ist eine Zunahme der mittleren verkalkten Flächen zu späteren Explantationszeitpunkten zu verzeichnen. Im Gegensatz zur ROS-Gruppe besteht jedoch zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter

Unterschied innerhalb der Kontrollgruppe.



**Abb. 6: Progression der kalzifizierten Fläche in Abhängigkeit vom Explantationszeitpunkt und der Interventionsgruppe**

Dargestellt ist die errechnete kalzifizierte Fläche in den histologischen Präparaten in mm<sup>2</sup>. Mittelwerte eines jeden Versuchstiers der ROS-Gruppe (Kreuz) sind denen der Kontrollgruppe (Punkt) für die jeweiligen Explantationszeitpunkte gegenübergestellt. Es zeigt sich innerhalb der ROS-Gruppe ein signifikanter Unterschied der kalzifizierten Fläche zwischen dem Explantationszeitpunkt t = 56d und t = 4d (\*) (1). (t = Zeitfaktor in Tagen; d = *days*)

### 3.4 Umbau der Gefäßwand in der Movat's Pentachrom

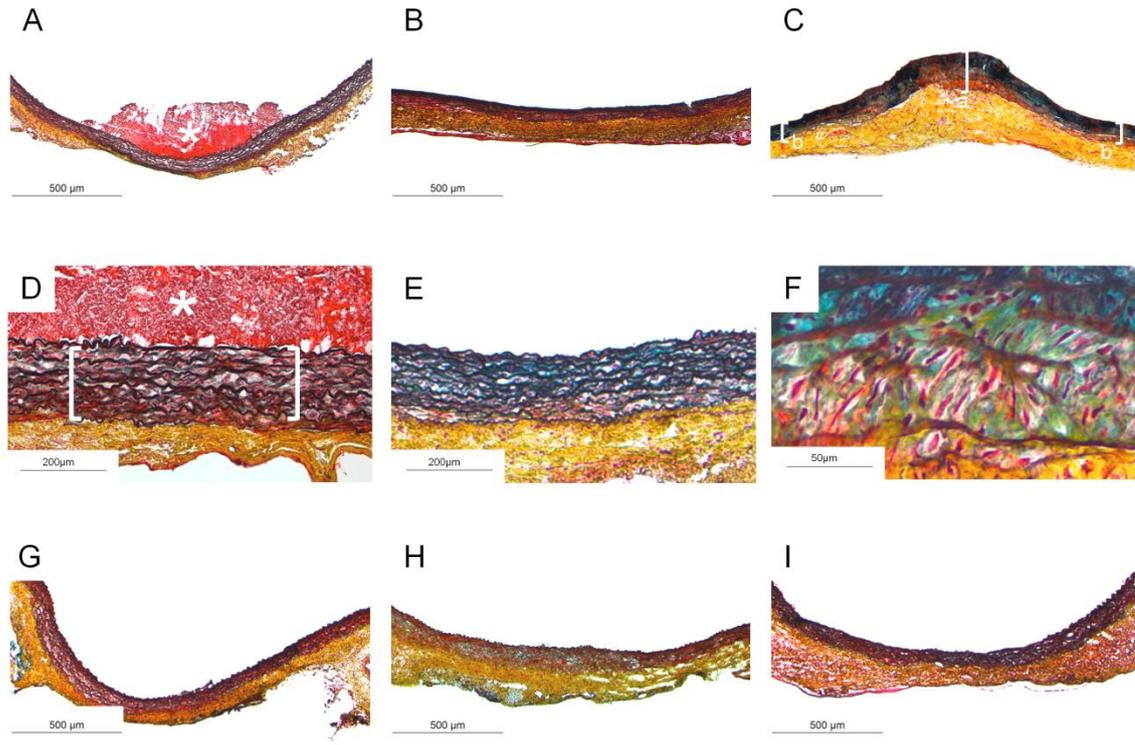
#### Färbung

Zur weiteren Differenzierung von Gewebe dient die Färbung nach Movat's Pentachrom.

Mit Hilfe von Abb. 7 sollen beispielhaft die wichtigsten Aspekte dargestellt werden.

In der ROS-Gruppe lässt sich nach direkter Explantation ein luminaler Thrombus darstellen (Abb. 7 A, D, Asterisk). Unterhalb des Thrombus zeigt sich eine Tunica media, welche regelmäßig angeordnete, alternierende elastische Lamellen aufweist (Abb. 7 D, weiße Klammer). Zwischen den schwarzen Lamellen lassen sich rot-schwarze Zellkerne und rote Zelleiber ausmachen, welche glatte Muskelzellen

vermuten lassen. Die Tunica adventitia besteht aus verstreuten, rot-schwarzen Zellkernen und kollagenem Bindegewebe, welches sich hier gelb-orange darstellt (Abb. 7 A, D). Wenn innerhalb der ROS-Gruppe spätere Explantationszeitpunkte gewählt werden, wie zum Beispiel  $t = 28d$ , sind keine Thromben mehr nachweisbar (Abb. 7 B, E). Der oben bereits beschriebene Wandaufbau ändert sich nicht. Gleiches gilt für alle Präparate der Kontrollgruppe (Abb. 7 G-I). Dabei kommt es bis einschließlich zum Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  weder zu Veränderungen des Gefäßwandaufbaus, noch zur Ausbildung von Thromben (Abb. 7 G-I). Im Gegensatz dazu weisen Präparate der ROS-Gruppe zum Explantationszeitpunkte  $t = 56d$  Veränderungen ihrer Gefäßwand auf (Abb. 7 C, F). Diese Veränderungen sind fokal begrenzt und lediglich in den Bereichen des Gefäßes vorzufinden, welche der photochemischen Reaktion von der Kombination des Laserstrahls und Bengalrot ausgesetzt waren. Die elastischen Lamellen der Tunica media verlieren ihre regelmäßige, alternierende Anordnung und erscheinen eher aufgelockert bis auseinander gedrängt. Wie bereits im Rahmen der Hämatoxylin Eosin Ergebnisse erwähnt zeichnet sich an dieser Stelle eine Verbreiterung des bestrahlten Bereichs ab (Abb. 7 C, weiße Klammer a). Jedoch erscheint die angrenzende Gefäßwand nicht von dieser Verbreiterung betroffen zu sein (Abb. 7 C, weiße Klammer b). Außerdem lassen sich im betroffenen Teil der Tunica media vereinzelte gelb-orange kollagene Bindegewebsstrukturen ausmachen. Im Gegensatz dazu sind die kollagenen Bindegewebsstrukturen zu früheren Explantationszeitpunkten streng auf die Tunica adventitia beschränkt (Abb. 7 A, B, D, E).



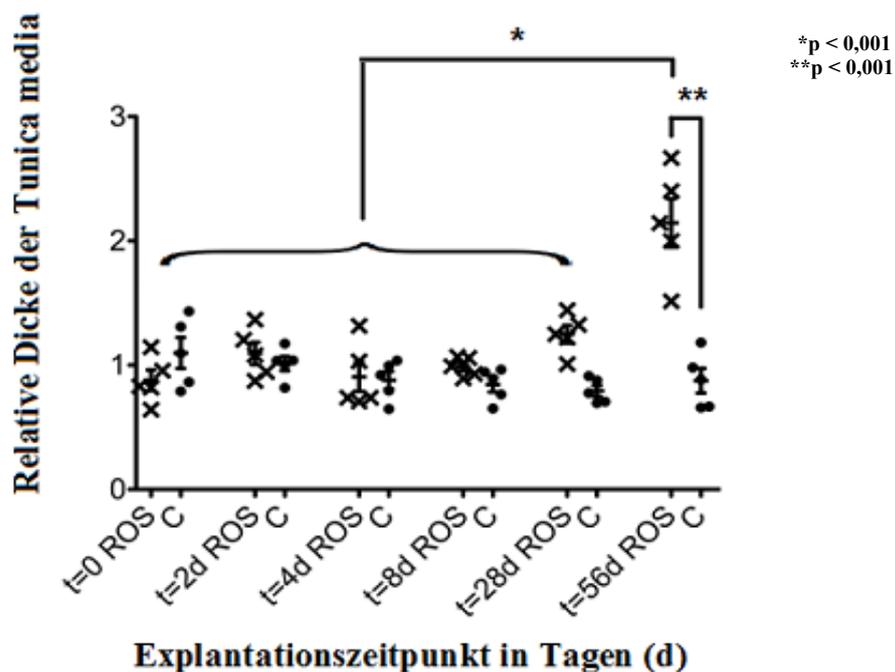
**Abb. 7: Darstellung von Querschnitten der Rattenaorta nach Movat's Pentachrom Färbung**

Repräsentative Querschnitte sind in kleinerer (A-C) und höherer Vergrößerung (D-F) dargestellt. Aufnahmen der ROS-Gruppe (A-F) sind denen der Kontrollgruppe (G-I) gegenübergestellt. Von links nach rechts betragen die Explantationszeitpunkte  $t = 0$  (A, D, G),  $t = 28d$  (B, E, H),  $t = 56d$  (C, F, I). In den Bildern A und D ist ein Thrombus (Asterisk) erkennbar. Die Bilder A und D zeigen bezüglich ihres Wandaufbaus keinen Unterschied zu den Bildern B und E. Zudem sind in den Kontrollgruppen (G-I) keine Auffälligkeiten des Gefäßwandaufbaus ersichtlich. Im Gegensatz dazu zeichnen sich in der ROS-Gruppe zum Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  Strukturveränderungen der Tunica media (C, F) ab. Die schwarzen, elastischen Lamellen erscheinen zu diesem Zeitpunkt auseinander gedrängt (1). (Elastische Fasern = schwarz, Kollagenes Bindegewebe = gelb-orange) ( $t = \text{Zeitfaktor in Tagen}$ ;  $d = \text{days}$ )

Zur Ermittlung von Unterschieden bezüglich der Wanddicke der Tunica media wurden zum einen der bestrahlte Bereich und zum anderen die sich anschließende Nachbarregionen ausgemessen. Setzt man die erhobenen Werte ins Verhältnis zueinander erhält man die relative Dicke der Tunica media.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich wird, treten innerhalb der Kontrollgruppe (Abb. 8 C) zu keinem Explantationszeitpunkt signifikante Unterschiede der relativen Wanddicken der Tunica media auf. Auch sind keine signifikanten Unterschiede innerhalb der ROS-

Gruppe zwischen den Explantationszeitpunkten  $t = 0$  bis einschließlich  $t = 28d$  zu verzeichnen. Lediglich die ROS-Gruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  unterscheidet sich signifikant, sowohl von der Kontrollgruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$ , als auch von den ROS-Gruppen mit früheren Explantationszeitpunkten ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 8: Relative Dicke der Tunica media in Abhängigkeit vom Explantationszeitpunkt und der Interventionsgruppe.**

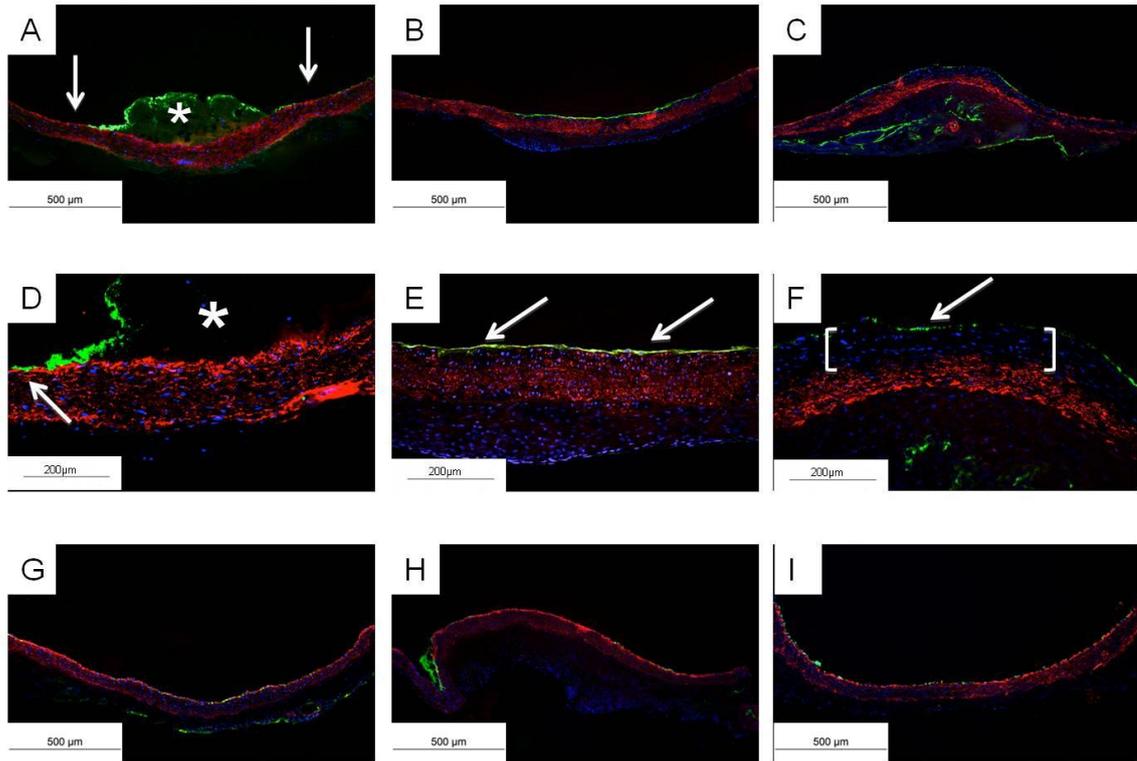
Dargestellt ist die relative Dicke der Tunica media. Hierzu wurden sowohl die Tunica media der bestrahlten Region, als auch die Tunica media der angrenzenden Nachbarregion ausgemessen. Die erhobenen Werte im Verhältnis zueinander repräsentieren somit die relative Zu- oder Abnahme der Wanddicke (Werte größer eins demonstrieren eine relative Zunahme der Wanddicke). Versuchstiere der ROS-Gruppe (Kreuz) sind denen der Kontrollgruppe (Punkt) für die jeweiligen Explantationszeitpunkte gegenübergestellt. Es wird ein signifikanter Unterschied zwischen der ROS-, und Kontrollgruppe zum Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  deutlich. Außerdem unterscheidet sich die ROS-Gruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  signifikant von allen anderen Explantationszeitpunkten der ROS-Gruppe (1). ( $t =$  Zeitfaktor in Tagen;  $d =$  days)

### **3.5 Immunhistologischer Nachweis von *α smooth muscle actin* und Von-Willebrand-Faktor**

Abb. 9 stellt beispielhaft die erhobenen Ergebnisse dar. Es zeigt sich in der ROS-Gruppe zum Explantationszeitpunkt  $t = 0$  ein luminal gelegener Thrombus (Abb. 9 A, D, Asterisk). Die benachbarten Regionen weisen eine kontinuierliche Schicht des Von-Willebrand-Faktors auf. Auch zu späteren Explantationszeitpunkten, wie zum Beispiel  $t = 28d$  oder  $t = 56d$ , zeigt sich in der ROS-Gruppe eine kontinuierliche, luminale Schicht des Von-Willebrand-Faktors (Abb. 9 B, C, E, F, weiße Pfeile). Gleiches gilt für alle Explantationszeitpunkte der Kontrollgruppe (Abb. 9 G-I).

Im Hinblick auf die Expression des *α smooth muscle actin* zeigen sich in den gleichen Schnitten folgende Ergebnisse: Wenn frühe Explantationszeitpunkte, wie zum Beispiel  $t = 0$  (Abb. 9 A, D) und  $t = 28d$  (Abb. 9 B, E) gewählt werden, kommt es in der ROS-Gruppe zu einer gleichmäßigen Expression des *α smooth muscle actin* über die gesamte Tunica media. Im Gegensatz dazu zeigt sich in der ROS-Gruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  an der bestrahlten Region eine verminderte Expression des *α smooth muscle actin* im luminal gelegenen Teil der Tunica media (Abb. 9 C, F, weiße Klammer). Die Präparate der Kontrollgruppe weisen ein ähnliches Expressionsmuster wie die frühen Explantationszeitpunkte der ROS-Gruppe auf. Zum Explantationszeitpunkt  $t = 0$  (Abb. 9 G),  $t = 28d$  (Abb. 9 H) sowie  $t = 56d$  (Abb. 9 I) ist *α smooth muscle actin* gleichmäßig über die gesamte Tunica media verteilt.

Zu keinem Explantationszeitpunkt sind in der ROS-Gruppe sowie der Kontrollgruppe Auffälligkeiten bezüglich der blau fluoreszierenden Zellkerne zu beobachten.



**Abb. 9: Darstellung von Querschnitten der Rattenaorta nach Immunhistologischer Färbung**

Repräsentative Querschnitte sind in kleinerer (A-C) und höherer Vergrößerung (D-F) dargestellt. Aufnahmen der ROS-Gruppe (A-F) sind denen der Kontrollgruppe (G-I) gegenübergestellt. Von links nach rechts betragen die Explantationszeitpunkte  $t = 0$  (A, D, G),  $t = 28d$  (B, E, H),  $t = 56d$  (C, F, I). In der ROS-Gruppe kommt es zum Explantationszeitpunkt  $t = 0$  zur Thrombus Bildung (A, D, Asterisk). Eine kontinuierliche Schicht des Von-Willebrand-Faktors ist sowohl in der ROS- als auch in der Kontrollgruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  zusehen (C, F; I). Die Expression des  $\alpha$  smooth muscle actin zeigt in der ROS-Gruppe zum Explantationszeitpunkt  $t = 0$  eine gleichmäßige Verteilung in der Tunica media (A, D). Im Gegensatz dazu ist die Expression von  $\alpha$  smooth muscle actin in der ROS-Gruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  im luminalen Teil der Tunica media kaum zu beobachten (C, F, weiße Klammer) (1). (Zellkerne = blau,  $\alpha$  smooth muscle actin = rot, Von-Willebrand-Faktor = grün) ( $t$  = Zeitfaktor in Tagen;  $d$  = days)

## **4 Diskussion**

### **4.1 Einordnung des Experiments im Hinblick auf aktuelle Arbeiten**

In den vergangenen Jahren nahmen reaktive Sauerstoffspezies eine immer bedeutendere Rolle in der Diskussion um die multifaktorielle Genese der kardiovaskulären Erkrankungen ein. Dabei legen zahlreiche Experimente nahe, dass reaktive Sauerstoffspezies sowohl bezüglich Inflammation und Degeneration als auch im Hinblick auf Zellproliferation und -migration eine ursächliche Rolle spielen (18, 21, 28). In der Vergangenheit sind einige Tiermodelle entwickelt worden, die vor allem eine systemische Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies zur Induktion von degenerativen Veränderungen an Gefäßen verwenden. Häufig stellen genmanipulierte Tiere, wie zum Beispiel ApoE-defiziente Mäuse, die Basis solcher experimenteller Untersuchungen dar (38). Hieraus ergeben sich Limitationen, da es auch zur Induktion von Enzymen außerhalb des kardiovaskulären Systems kommt (29). Interaktionen und Wechselwirkungen, welche Ergebnisse beeinflussen, lassen sich somit nicht ausschließen.

Im Gegensatz dazu nutzen bereits Eitzman et al. in ihrer Arbeit die lokale photochemische Reaktion von Bengalrot in Kombination mit einem Laser, um oxidativen Stress fokal applizieren zu können. Sie etablierten ein Tiermodell zur Erforschung der akuten Thrombose bei bereits bestehenden atherosklerotischen Läsionen. Hierbei beschränken sie sich jedoch im Sinne von thrombotischen Gefäßokklusionen auf die Beobachtung akuter Ereignisse (38).

Auch in der vorliegenden Arbeit nutzen wir die bekannte photochemische Reaktion von Bengalrot mit einem Laserstrahl (36). Durch die fokale Laserapplikation wird eine

lokale Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies an einem Gefäßwandabschnitt ermöglicht. Genauso wie in den Arbeiten von Eitzman et al. und Perez et al. kommt es bei uns zunächst zur Entstehung eines Thrombus (37). Dieser ist zudem ausschließlich in der ROS-Gruppe nachweisbar. Allerdings konnten wir durch eine titrierte Dosierung der photochemischen Reaktion eine komplette Gefäßokklusion vermeiden. Darüber hinaus erfolgt eine Evaluation der ROS- sowie der Kontrollgruppen zu verschiedenen Explantationszeitpunkten. Somit lässt sich der früheste Explantationszeitpunkt ( $t = 0$ ) sowohl mit den mittleren Explantationszeitpunkten ( $t = 2d$ ,  $t = 4d$ ,  $t = 8d$ ) als auch mit den späteren Explantationszeitpunkten ( $t = 28d$ ,  $t = 56d$ ) vergleichen. Ab dem Explantationszeitpunkt  $t = 8d$  lässt sich kein Thrombus mehr nachweisen, jedoch fallen mit der Zeit weitere Unterschiede zwischen der ROS- und Kontrollgruppe auf.

Somit können wir mit Hilfe der späteren Explantationszeitpunkte ( $t = 28 d$ ,  $t = 56d$ ) Veränderungen, die erst im chronischen Verlauf entstanden sind, erfassen. Besonders im Hinblick auf die Entstehung von chronischen Läsionen erscheint dieser Beobachtungszeitraum sinnvoll. Dennoch beschränken sich die meisten bestehenden Tiermodelle auf die Beobachtung von akuten Auswirkungen oder Schädigungen von bereits bestehenden Läsionen. Es werden häufig nur Zeiträume von ein bis 24 Stunden nach der experimentellen Behandlung angesetzt (37, 38).

Die Relevanz unserer Arbeit erschließt sich aus der Etablierung eines neuen Tiermodells, welches den Anspruch hat, die multifaktorielle Genese von degenerativen Gefäßwandprozessen zu ergründen. Besonders im Hinblick auf ein besseres Verständnis von reaktiven Sauerstoffspezies und deren Auswirkung erscheinen eine lokale Generierung von oxidativem Stress und eine längerfristige Beobachtung als sinnvoll.

## **4.2 Einordnung der Ergebnisse im Hinblick auf die angewandten Methoden**

Die Hämatoxylin Eosin Färbung liefert einen ersten groben Überblick über die Beschaffenheit der gewonnenen Präparate. Es fällt auf, dass es zum Explantationszeitpunkt  $t = 0$  in der ROS-Gruppe zur Entwicklung von Thromben kommt. Diese sind in der ROS-Gruppe ab dem Explantationszeitpunkt  $t = 8d$  nicht mehr nachweisbar und in der Kontrollgruppe können wir zu keinem Explantationszeitpunkt Thromben ausfindig machen. Perez et al. generieren in ihrer Arbeit ebenfalls Gefäßwandthromben mit Hilfe der lokalen Anwendung von Bengalrot in Kombination mit einem Laser. Sie stellen darüber hinaus fest, dass die alleinige Anwendung des Lasers oder Bengalrot keine Thrombose hervorruft (37). Die Auffälligkeiten, welche in unserer ROS-Gruppe zum Explantationszeitpunkt  $t = 0$  auftreten, scheinen im Einklang mit den Erkenntnissen von Perez et al. und weiteren Arbeiten zu sein (37, 38). Dabei gehen die angeführten Arbeiten davon aus, dass die entstanden Thromben durch eine Schädigung von Endothelzellen zustande kommen. Auch in unserer Arbeit kommt es an der fokal bestrahlten Lokalisation zu einer lokalen Entstehung eines adhärenenten Thrombus. Ob die Thrombusentstehung jedoch durch die Schädigung von Endothelzellen zustande kommt, konnten wir an dieser Stelle nicht abschließend klären. Im Rahmen unserer immunhistologischen vWF-Färbung kommt es unterhalb der Thromben zu einer diskontinuierlichen fluoreszierenden Schicht. Diese Beobachtung kann entweder als Schaden des Endothels oder lediglich als mangelnde Markierung des vWF gedeutet werden. Da es im Rahmen einer Thrombusentstehung zum Gebrauch des endothelialen vWF kommt, kann es sein, dass dieser vWF einer AK-Bindung nicht mehr zur Verfügung steht. Somit lässt sich festhalten, dass die angewandte Methode für die exakte Detektion von akut auftretenden Endothelzellschädigung unterhalb eines

Thrombus gewisse Limitationen aufweist.

Nichtsdestotrotz weist die immunfluoreszente Färbung des vWF nach der Thrombolyse eine lückenlose Schicht auf. Sowohl in der ROS-Gruppe als auch in den Kontrollgruppen zeigen sich zu den späteren Explantationszeitpunkten keine Auffälligkeiten bezüglich der Endothelzellschicht. Dies deutet darauf hin, dass es in den bestrahlten Regionen zu keinem schwerwiegenden oder lang anhaltendem Schaden des Endothels gekommen sein dürfte. Die genannten Gefäßwandveränderungen scheinen also kaum durch einen alleinigen Schaden des Endothels erklärbar zu sein. Allerdings könnte alternativ auch eine rasche Regeneration der luminalen Endothelschicht stattgefunden haben.

Im Gegensatz zu der vorher genannten Arbeit von Perez et al. streben wir zudem längere Beobachtungszeiträume an (37). So können wir mit Hilfe der Hämatoxylin Eosin Färbung zum Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  weitere Unterschiede zwischen der ROS-Gruppe und der Kontrollgruppe beobachten. Zum Beispiel scheinen in der ROS-Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe die Zellkerne ungeordnet zu sein und eine klare Differenzierung von Tunica media zu Tunica adventitia ist erschwert. Histologisch ist die klare Struktur und Schichtung der Gefäßwand der bestrahlten Region der ROS-Gruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  aufgehoben.

Zur weiteren Differenzierung dieser Veränderungen kamen zusätzliche Färbungen zum Einsatz. Unsere Ergebnisse der von Kossa Färbung zeigen in der ROS-Gruppe eine über die Zeit zunehmende Verkalkung der Tunica media und Tunica intima. Zum Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  besteht in der ROS-Gruppe ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu früheren Explantationszeitpunkten, wie zum Beispiel  $t = 4d$ . Außerdem fällt auf, dass die zunehmende Verkalkung sich durch ein fokal konzentriertes Erscheinungsbild auszeichnet. In den Kontrollgruppen, welche ausschließlich eine

Laserintervention erhalten haben, zeigt sich zu keinem Explantationszeitpunkt ein signifikanter Unterschied bezüglich der verkalkten Fläche.

Dabei spielen Gefäßwandverkalkungen nicht nur eine wichtige Rolle in der Klassifikation der Atherosklerose, sondern haben zudem einen entscheidenden Einfluss auf die klinische Relevanz dieser. Besonders fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen neigen zu Komplikationen, wie zum Beispiel einer Plaqueruptur und anschließender Gefäßstenose (4). Aus der im Jahr 2015 veröffentlichten Arbeit von Otsuka et al. geht hervor, dass es im Laufe der Entstehung und Entwicklung von Atherosklerose zu einer vermehrten Verkalkung kommt. Sie untersuchten dazu histologisch 151 vergleichbare Präparate von Patienten, welche zuvor einen plötzlichen Herztod erlitten hatten. Mit steigendem atherosklerotischen Läsionsgrad kommt es sowohl zur Größenzunahme der Verkalkungsherde als auch zu einer gesteigerten Anzahl dieser (40). H. Sary klassifiziert fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen mit Kalzifikationen als *Typ VIII Läsionen* (4, 41). Dennoch stellt die aktualisierte Arbeit von H. Sary auch klar, dass Verkalkungen nicht zwangsläufig in atherosklerotischen Läsionen nachweisbar sein müssen. Er beschreibt vielmehr einen stetigen Prozess, welcher in den betroffenen Gefäßen stattfindet. Im Rahmen eines solchen Prozesses kann es zwar zu Kalzifikationen kommen, diese können jedoch regredieren oder gänzlich fehlen.

Nichtsdestotrotz galten arterielle Kalzifikationen lange Zeit als eine Art Endstation der vaskulären Erkrankungen. Hierzu veröffentlichten Proudfoot et al. eine wegweisende Arbeit. Sie generieren *in vitro* die Apoptose von glatten Muskelzellen und können zeigen, dass es im Anschluss zu einer bis zu zehnfach erhöhten Kalzifikation kommt. Im Gegensatz dazu führt eine Inhibition der Apoptose zu keiner nachweisbar vermehrten Verkalkung (42). Von Interesse ist dabei, dass reaktive Sauerstoffspezies

dafür bekannt sind, Zelltod durch die Aktivierung von apoptotischen Mechanismen zu provozieren (43).

Neben der Induktion von apoptotischen Prozessen könnte im vorliegenden Projekt auch ein Phänotypenswitch für die signifikant stärkere Verkalkung der ROS-Gruppe zum Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  im Vergleich zu  $t = 4d$  verantwortlich gemacht werden. Byon et al. publizierten hierzu eine maßgebliche Arbeit. Sie provozieren durch die Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies eine Differenzierung von glatten Muskelzellen. Sie zeigen, dass reaktive Sauerstoffspezies für einen Wechsel glatter Muskelzellen von einem kontraktilem zu einem osteogenen Phänotypen verantwortlich gemacht werden können. In ihrem Versuchsansatz kommt es zu einer vermehrten Kalzifikation der Proben, ohne eine Induktion von Apoptose (28). Naik et al. gelingt es zudem, im atherosklerotischen Mausmodell den genetischen Pfad von glatten Muskelzellen nachzuvollziehen. Sie zeigen, dass es nach der Differenzierung von glatten Muskelzellen zu einem veränderten Expressionsmuster kommen kann. Diese können dadurch zu einer vermehrten Kalzifikationen der Gefäße beitragen (44).

Es wird deutlich, dass sich der wissenschaftliche Diskurs über die Entstehung von Gefäßverkalkungen sehr vielschichtig gestaltet. Um weitere Schlussfolgerungen aus dem hier genutzten Tiermodell ziehen zu können, empfiehlt sich die Anwendung weiterer Methoden. Im Hinblick auf eine apoptotische Genese könnten beispielsweise immunhistologische Färbungen, welche einen Caspase-3 oder 3-Nitrotyrosin Antikörper enthalten, wichtige Informationen liefern.

Ausgehend von den genannten Erkenntnissen liegt der Gedanke nahe, dass es auch im Rahmen unserer Arbeit zu einem Phänotypenswitch gekommen sein könnte. So zeigen sich auch in unseren Experimenten Veränderungen der *α smooth muscle actin* Expression. In der Laser bestrahlten Region der ROS-Gruppe zum

Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  erscheint die Expression von  *$\alpha$  smooth muscle actin* verringert. Im Gegensatz dazu kommt es in der Kontrollgruppe, sowie zu frühen Explantationszeitpunkten in der ROS-Gruppe, zu einer gleichmäßigen Darstellung des  *$\alpha$  smooth muscle actin*. Dieser Umstand lässt sich zum einen als ein Hinweis auf vermehrten Zelluntergang oder zum anderen auf einen Phänotypenswitch von glatten Muskelzellen deuten. Gegen einen vermehrten Zelluntergang spricht, dass die Fluoreszenz von DAPI gefärbten Zellkernen zu allen Explantationszeitpunkten gleichmäßig erscheint. Die bereits genannten Beobachtungen von Byon et al. könnten eine mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse darstellen. Sie stellen fest, dass es durch die Applikation von  $H_2O_2$  zu einer osteogenen Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen kommt. Die glatten Muskelzellen weisen ein verändertes Expressionsmuster auf und haben einen sogenannten Phänotypenswitch vollzogen. Anstatt der glatten Muskelzellmarker  *$\alpha$  smooth muscle actin* und Transgelin (*SM22 $\alpha$* ) exprimieren die Zellen vermehrt Knochenmarker, wie zum Beispiel Osteocalcin (28). Auch im Rahmen unserer Arbeit könnte es somit zu einem osteogenen Phänotypenswitch der glatten Muskelzellen gekommen sein.

Auffällig ist zudem, dass die verkalkten Regionen der ROS-Gruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  eine relative Verbreiterung der Tunica media und Tunica intima aufweisen. Sowohl zu den frühen Explantationszeitpunkten der ROS-Gruppe als auch zu allen Explantationszeitpunkten der Kontrollgruppe zeigt sich keine signifikante Zunahme der relativen Gefäßwanddicken. Neben der relativen Expansion der Tunica media beobachten wir außerdem einen veränderten Aufbau der Wandstrukturen. Es zeigen sich in der ROS-Gruppe mit dem Explantationszeitpunkt  $t = 56d$  Veränderungen bezüglich der alternierenden Anordnung der elastischen Lamellen. In der Tunica media der bestrahlten Regionen erscheinen die elastischen Lamellen auseinander gedrängt

worden zu sein. Ähnliche Beobachtungen machen Naik et al. an Hand ihres atherosklerotischen Tiermodells. Ihnen fällt auf, dass es besonders in der Tunica intima und der inneren Schicht der Tunica media zu Läsionen der elastischen Lamellen kommt (44). Auch Clarke et al. fällt auf, dass es im Rahmen ihrer Experimente zu derartigen Veränderungen kommt. In ihrem Mausmodell können sie mit Hilfe der chronischen Apoptose von glatten Muskelzellen Gefäßdegenerationen induzieren. Es zeigt sich, dass es nicht nur zu einer vermehrten Kalzifikation kommt, sondern auch zu Strukturveränderungen der Tunica media. Es kommt neben einer Expansion dieser zu vermehrten Brüchen der elastischen Lamellen. Die Veränderungen der elastischen Lamellen sind vor allem in der Nähe von atherosklerotischen Plaques zu finden. Dennoch stellen sie fest, dass Brüche von elastischen Lamellen auch unabhängig von jeglichen Plaques auftreten (45). Es ist somit fraglich, ob Veränderungen der elastischen Lamellen ein weiteres kennzeichnendes Merkmal von Gefäßdegenerationen darstellen können.

### **4.3 Schlussfolgerung**

Wir etablierten ein Tiermodell, das vaskuläre Veränderungen nach fokal induziertem oxidativen Stress aufweist.

Es zeigen sich im Vergleich zu etablierten Atherosklerosemodellen sowohl Parallelen als auch Unterschiede. Wir können Zeichen der kardiovaskulären Degeneration, wie zum Beispiel vaskuläre Verkalkungen oder auch die Steigerung der Wanddicke eines Gefäßabschnitts nachweisen. Im Gegensatz dazu sind Lipidansammlungen oder Schaumzellen, welche als wesentliche Merkmale der Atherosklerose gelten, nicht vorhanden.

Somit kann dieses Modell zwar nicht die im Menschen beobachtete Atherosklerose

gänzlich wiedergeben, stellt jedoch eine Alternative zu anderen klassischen Atherosklerosemodellen dar. So könnte das in dieser Arbeit dargestellte Modell als Plattform zur Evaluation des fokalen Effekts von reaktiven Sauerstoffspezies genutzt werden.

Dieses Modell hat gegenüber systemisch wirksamen Tiermodellen entscheidende Vorteile. Zum einen können Veränderungen der Gefäße mit gesunden Abschnitten verglichen werden, zum anderen existieren geringere systemische Nebeneffekte. Außerdem unterstützt dieses Modell die Vorstellung, dass reaktive Sauerstoffspezies dazu in der Lage sind, Differenzierung und Migration von glatten Muskelzellen und vaskuläre Verkalkungen zu induzieren.

## **5 Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Darstellung und Klassifikation von atherosklerotischen Läsionen (modifiziert nach (5)):	- 4 -
Abb. 2: Darstellung der primären tierexperimentellen Intervention	- 16 -
Abb. 3: Darstellung der Kalzium-, Phosphat-, Cholesterin- und Triglyceridserumspiegel der ROS-Gruppe zu vier verschiedenen Explantationszeitpunkten im Vergleich zur Referenzgruppe (ref)	- 25 -
Abb. 4: Darstellung von Querschnitten der Rattenaorta nach Hämatoxylin Eosin Färbung	- 26 -
Abb. 5: Darstellung von Querschnitten der Rattenaorta nach von Kossa Färbung ...	- 28 -
Abb. 6: Progression der kalzifizierten Fläche in Abhängigkeit vom Explanationszeitpunkt und der Interventionsgruppe	- 29 -
Abb. 7: Darstellung von Querschnitten der Rattenaorta nach Movat's Pentachrom Färbung	- 31 -
Abb. 8: Relative Dicke der Tunica media in Abhängigkeit vom Explantationszeitpunkt und der Interventionsgruppe.	- 32 -
Abb. 9: Darstellung von Querschnitten der Rattenaorta nach Immunhistologischer Färbung	- 34 -

## **6 Literaturverzeichnis**

1. Minol J-P, Reinsch I, Luik M, Leferink A, Barth M, Assmann A, et al. Focal induction of ROS-release to trigger local vascular degeneration. *PloS one*. 2017;12(6):e0179342.
2. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*.385(9963):117-71.
3. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *European Heart Journal*. 2013;34(10):719-28.
4. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92(5):1355-74.
5. Kojima S, Nonogi H, Miyao Y, Miyazaki S, Goto Y, Itoh A, et al. Is preinfarction angina related to the presence or absence of coronary plaque rupture? *Heart*. 2000;83(1):64-8.
6. Smits PC, Pasterkamp G, van Ufford MAQ, Eefting FD, Stella PR, de Jaegere PPT, et al. Coronary artery disease: arterial remodelling and clinical presentation. *Heart*. 1999;82(4):461-4.
7. Garrison FH. An Outline of the History of the Circulatory System. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1931;7(10):781-806.
8. Marchand F. Über Arteriosklerose. . *Verhandlungen des Kongresses für Innere Medizin*  
21 Kongress, Leipzig 1904. 1904.

9. WHO. Classification of atherosclerotic lesions : report of a study group [meeting held in Washington, D.C. from 7 to 11 October 1957]. 1958.
10. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994;89(5):2462-78.
11. Anitschkow N. Zur Ätiologie der Atherosklerose. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*. 1924;249(1):73-82.
12. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell. *Science*. 1973;180(4093):1332-9.
13. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(2):115-26.
14. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *The American Journal of Pathology*. 1977;86(3):675-84.
15. Frostegård J, Ulfgrén A-K, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999;145(1):33-43.
16. Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu S-N, Chen M, Guha D, Cybulsky MI. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(9):2073-83.
17. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(10):1255-62.
18. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T

lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995;92(9):3893-7.

19. Mittal CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1977;74(10):4360-4.

20. Konstantinov AA, Siletsky S, Mitchell D, Kaulen A, Gennis RB. The roles of the two proton input channels in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(17):9085-90.

21. White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(3):1044-8.

22. McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. Science (New York, NY). 1974;185(4150):529-31.

23. Curello S, Ceconi C, Cargnoni A, Cornacchiari A, Ferrari R, Albertini A. Improved procedure for determining glutathione in plasma as an index of myocardial oxidative stress. Clinical chemistry. 1987;33(8):1448-9.

24. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Minieri CA, Akers M, Lassegue B, Griendling KK. Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. Antioxidants & redox signaling. 1999;1(2):167-79.

25. Leonarduzzi G, Gamba P, Sottero B, Kadl A, Robbesyn F, Calogero RA, et al. Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells. Free Radical Biology and Medicine. 2005;39(9):1152-61.

26. Liu Y, Hultén LM, Wiklund O. Macrophages Isolated From Human Atherosclerotic Plaques Produce IL-8, and Oxysterols May Have a Regulatory Function for IL-8 Production. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17(2):317-23.
27. Zimman A, Mouillesseaux KP, Le T, Gharavi NM, Ryvkin A, Graeber TG, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 plays a role in the activation of aortic endothelial cells by oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(2):332-8.
28. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(22):15319-27.
29. Tie G, Messina KE, Yan J, Messina JA, Messina LM. Hypercholesterolemia induces oxidant stress that accelerates the ageing of hematopoietic stem cells. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(1):e000241.
30. Pinto A, Immohr MB, Jahn A, Jenke A, Boeken U, Lichtenberg A, et al. The extracellular isoform of superoxide dismutase has a significant impact on cardiovascular ischaemia and reperfusion injury during cardiopulmonary bypass†. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2016;50(6):1035-44.
31. Nomura J, Busso N, Ives A, Matsui C, Tsujimoto S, Shirakura T, et al. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates experimental atherosclerosis in mice. *Sci Rep*. 2014;4:4554.
32. Marx E. Über vitale Färbungen am Auge und an den Lidern. *Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie*. 1924;114(3):465-82.
33. Doughty MJ, Lee CA, Ritchie S, Naase T. An assessment of the discomfort

associated with the use of rose bengal 1% eyedrops on the normal human eye: a comparison with saline 0.9% and a topical ocular anaesthetic. *Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)*. 2007;27(2):159-67.

34. Delprat GD, Epstein NN, Kerr WJ. A new liver function test: The elimination of rose bengal when injected into the circulation of human subjects. *Archives of Internal Medicine*. 1924;34(4):533-41.

35. Axel M. Gressner TAH. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013.

36. Jourdan A, Aguejoui O, Imbault P, Doutremepuich F, Inamo J, Doutremepuich C. Experimental thrombosis model induced by free radicals. Application to aspirin and other different substances. *Thrombosis research*. 1995;79(1):109-23.

37. PÉRez P, AlarcÓN M, Fuentes E, Palomo I. Thrombus formation induced by laser in a mouse model. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2014;8(1):64-8.

38. Eitzman DT, Westrick RJ, Xu Z, Tyson J, Ginsburg D. Hyperlipidemia promotes thrombosis after injury to atherosclerotic vessels in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(7):1831-4.

39. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9:671.

40. Otsuka F, Kramer MCA, Woudstra P, Yahagi K, Ladich E, Finn AV, et al. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):772-82.

41. Sary HC. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. An Update. 2000;20(5):1177-8.

42. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res.* 2000;87(11):1055-62.
43. Li AE, Ito H, Rovira II, Kim KS, Takeda K, Yu ZY, et al. A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res.* 1999;85(4):304-10.
44. Naik V, Leaf EM, Hu JH, Yang HY, Nguyen NB, Giachelli CM, et al. Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovasc Res.* 2012;94(3):545-54.
45. Clarke MCH, Littlewood TD, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, et al. Chronic Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Accelerates Atherosclerosis and Promotes Calcification and Medial Degeneration. *Circulation Research.* 2008;102(12):1529.

## **Danksagung**

An dieser Stelle sei allen gedankt, ohne die die Entstehung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. med. Lichtenberg als Direktor der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und Herrn Professor Dr. med. Akhyari für die Überlassung des Themas, die regelmäßigen Besprechungen und den Ideenaustausch. Zudem danke ich Herrn Dr. med. Minol für seine Betreuung und die Durchführung der experimentellen Tierversuche.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des experimentellen Forschungslabors der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Hierbei seien insbesondere Mareike Barth und Gisela Müller genannt. Ihre freundliche und engagierte Betreuung hat mir das Erlernen vieler Labormethoden und -fertigkeiten erheblich erleichtert.

Des Weiteren möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung danken.